



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**JOSE KLEYBSON DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DA DIETA MAL-ED ASSOCIADA COM DESNUTRIÇÃO  
INFANTIL NA BARREIRA MORFOFUNCIONAL DO EPITÉLIO INTESTINAL  
E RECUPERAÇÃO DA LESÃO COM USO DE GLUTAMINA EM MODELO  
MURINO**

**FORTALEZA**

**2023**

JOSE KLEYBSON DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA DIETA MAL-ED ASSOCIADA COM DESNUTRIÇÃO INFANTIL  
NA BARREIRA MORFOFUNCIONAL DO EPITÉLIO INTESTINAL E  
RECUPERAÇÃO DA LESÃO COM USO DE GLUTAMINA EM MODELO MURINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo  
Moreira Lima.

Coorientador: Prof. Dr. Sean R. Moore.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S697a Sousa, José Kleybson de.  
Avaliação da dieta MAL-ED associada com desnutrição infantil na barreira morfofuncional do epitélio intestinal e recuperação da lesão com uso de glutamina em modelo murino / José Kleybson de Sousa. – 2023. 334 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.  
Coorientação: Prof. Me. Sean Ryan Moore.
1. Barreira Intestinal. 2. Câmara de Ussing. 3. Desnutrição. 4. Permeabilidade Intestinal. I. Título.  
CDD 610
-

JOSE KLEYBSON DE SOUSA

AVALIAÇÃO DA DIETA MAL-ED ASSOCIADA COM DESNUTRIÇÃO INFANTIL NA BARREIRA MORFOFUNCIONAL DO EPITÉLIO INTESTINAL E RECUPERAÇÃO DA LESÃO COM USO DE GLUTAMINA EM MODELO MURINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Aprovada em: 27/ 11/ 2023

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Sean R. Moore  
University of Virginia (UVA)

---

Prof. Dr. Francisco Aldelvane de Paulo Rodrigues  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau  
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

A Deus.

Aos meus pais, minha família, aos meus  
mestres e amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por toda Graça, que não foi pouca, recebida até aqui.

Aos meus pais, imensamente, por me darem a educação que a escola não seria capaz de me oferecer, que me deram todo o suporte, apoio e incentivo, tão importante nessa minha caminhada até aqui.

Aos meus irmãos, que não são poucos, que muito contribuíram, mesmo sem saber, na minha formação pessoal.

À UFC, a todos os amigos e mestres que acolheram este Paraibano tão bem durante meu mestrado e doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, à secretaria do programa, aos professores e colegas que contribuíram com a minha jornada acadêmico-científica.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos meus amigos do mestrado, representados aqui pelo Antônio José de Jesus Evangelista (Tony), Livia Maria Galdino Pereira, Fernando Victor Portela e Ana Raquel Colares de Andrade. Os irmãos que a Pós-Graduação me apresentou, que me acolheram tão bem e tornaram a minha estadia longe dos meus, mais agradável.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por ter me dado a oportunidade de fazer o Doutorado mais desafiador e enriquecedor que eu poderia ter feito. E com isso, ter me permitido fazer parte da grande Família LDI e IBIMED. Obrigado, Mestre, por todos os ensinamentos que transcendem o acadêmico, formando não só excelentes profissionais, mas também indivíduos de valores. Gratidão pela excelente orientação.

Aos Professores Dr. Alberto Melo Soares e Dr. Ricardo de Freitas Lima, pelos valiosos momentos de ensinamento sobre bioestatística, eletrofisiologia e o método de Câmara de Ussing, os quais foram de extrema importância para o entendimento e realização dos experimentos desta tese.

Ao Professor Dr. Alexandre Havt, por ser sempre solícito e disposto a contribuir na construção científica de todos que fazem parte do Laboratório de Doenças Infecciosas e do Laboratório de Toxinologia Molecular.

À Universidade da Virginia, em nome do Professor Dr. Sean R. Moore, pelo convênio mantido por tantos anos e por ter me acolhido tão bem, proporcionando esta incrível oportunidade de aprendizado e crescimento profissional e pessoal junto com os demais membros da brilhante equipe Moore Lab. Agradeço também por me permitir concluir meu doutorado em seu laboratório.

Aos professores participantes da banca examinadora de qualificação, meu Orientador Professor Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, Professor Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau, Professor Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pelo tempo dedicado a avaliar o trabalho e pelas valiosas sugestões.

Aos professores participantes da banca examinadora de defesa, Professor Dr. Sean R. Moore, Professor Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues, Professor Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau, Professor Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao professor Dr. Marco Antônio Clementino, por todo conhecimento compartilhado sobre biologia molecular e cultivo celular.

Aos colegas e amigos do IBIMED, à Sra. Kátia Lima Nogueira, e aos senhores Charles, Quirino e Júnior, administradores e colaboradores incansáveis, pessoas extraordinárias, sempre prestativos e eficientes na execução das atividades.

Ao Sr. José Amadeus Souza, que está sempre ativo, circulando pelos corredores executando um trabalho excepcional no suporte, apoio, destreza e agilidade na resolução dos problemas de manutenção e harmonia estrutural do Centro de Biomedicina, obrigado, meu amigo.

Ao corpo técnico do LDI, à Dr. Lyvia Maria Vasconcelos Carneiro Magalhães, Charliene e Luciana, por todo suporte técnico, empenho e zelo na realização da pesquisa.

À Sra. Terezinha Freire França, por toda ajuda e apoio técnico fornecido durante a realização dos longos e extenuantes experimentos nas Câmaras de Ussing.

Aos colegas de laboratório, os senhores Pedro Quintela, Dr. Pierre, Mara Prata, Samilly Albuquerque Ribeiro, Marília Maia, Mariana Bona, Herlice Veras e Xhaulla Quaraguasi, pelas reflexões, críticas, sugestões recebidas e pela ajuda que me deram de forma prática ou teórica na execução deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, Mikael Almeida Lima, Thiago de Freitas, Marcus Lins, Dayara de Oliveira Silva, Lavouisier Frankilin Brito Nogueira, Antônio Klingem Leite de Freitas, pela ajuda durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos alunos Iniciação Científica do LDI e LTM, Enock Lee, Alexia Medeiros, Bruno Souza, Ana Carlina Giló Lavor, Flayane Chagas, Mário Clévio, Samuel Ramon e demais alunos que colaboraram na realização dos experimentos desta Tese, meu muito obrigado.

Aos colegas internacionais da Universidade da Virgínia, Deiziane Viana da Silva Costa e Antônio Vinícios Alves da Silva, por toda ajuda na finalização desta Tese.

À *undergraduate* da Universidade da Virgínia, Madeline Miles, pela ajuda na coleta dos dados deste trabalho, meu muito obrigado.



“O Brasil conheceu a riqueza dos engenhos e das plantações de cana-de-açúcar nos primeiros tempos coloniais, mas não venceu a fome; proclamou a independência nacional e aboliu a escravidão, mas não venceu a fome; conheceu a riqueza das jazidas de ouro, em Minas Gerais, e da produção de café, no Vale do Paraíba, mas não venceu a fome; industrializou-se e forjou um notável e diversificado parque produtivo, mas não venceu a fome. Isso não pode continuar assim.” (LULA, 2003, p. 9).

## RESUMO

A desnutrição infantil é considerada um grave problema de saúde pública, pois está associada a altas taxas de mortalidade, déficits cognitivos e de crescimento. O uso de modelos pré-clínicos translacionais é essencial para buscar tratamentos mais adequados e importante para reduzir a morbidade associada à desnutrição. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a função da barreira epitelial intestinal de camundongos sujeitos a um modelo animal de desnutrição aguda baseado na dieta complementar de crianças com desnutrição, conforme descrito no estudo COORTE multicêntrico MAL-ED, e investigar se o tratamento com glutamina reverte as alterações causadas. Para induzir a desnutrição experimental, camundongos C57BL/6 machos (21 dias de idade) foram alimentados com a dieta MAL-ED por 12 dias. Como tratamento, a glutamina foi usada continuamente (com uma concentração final de 31,4 mM na água de beber) por cinco dias, iniciando no oitavo dia após o início da dieta. Outro grupo de animais recebeu a mesma concentração de glicina isonitrogênica, para investigar se os resultados encontrados no tratamento com glutamina foram causados pelo aumento dos níveis de nitrogênio. Nos dias 0, 7 e 12 do protocolo experimental, a composição corporal e o desenvolvimento corporal foram mensurados. A função de barreira intestinal foi mensurada utilizando parâmetros eletrofisiológicos de Diferença de Potencial (DP), Corrente de Curto-Circuito (CCC) e Resistência Transepitelial (Rt) basais, bem como na absorção de glicose, glutamina e alanil-glutamina. Camundongos submetidos à dieta MAL-ED apresentaram redução da massa gorda, ganho de peso e crescimento corporal. As análises realizadas no sistema automatizado de Câmaras de Ussing (SCU) indicaram aumento da Rt frente a concentrações cumulativas de glutamina e alanil-glutamina, o que sugere baixa absorção desses substratos nos animais que consumiram a dieta MAL-ED. Por outro lado, o tratamento com glutamina reverteu a perda de peso, promoveu melhora no crescimento corporal e aumentou a Rt basal, além de melhorar a função da barreira epitelial intestinal nos animais que consumiram a dieta MAL-ED. De acordo com os achados do presente estudo, a dieta MAL-ED causa alterações na barreira gastrointestinal e evidenciou-se o uso da glutamina como um novo mecanismo para melhorar o ganho de peso e o crescimento de animais desnutridos, por meio da restauração da função da barreira epitelial intestinal.

**Palavras chaves:** Barreira intestinal; Câmara de Ussing; Desnutrição; Permeabilidade intestinal.

## ABSTRACT

Child malnutrition is considered a serious public health problem as it is associated with high mortality rates, cognitive and growth deficits. The use of translational preclinical models is essential for the search for more appropriate treatments and is important to reduce the morbidity associated with malnutrition. Therefore, the objective of this work was to evaluate the intestinal epithelial barrier function of mice subject to an animal model of acute malnutrition based on the complementary diet of children with malnutrition described in the MAL-ED multicenter COHORT study and to investigate whether treatment with glutamine reverses the changes caused. For the induction of experimental malnutrition, male C57BL/6 mice (21 days old) were fed the MAL-ED diet for 12 days. As a treatment, glutamine was used continuously (final concentration of 31.4 mM in drinking water) for five days, starting on the eighth day after starting the diet. Another group of animals received the same concentration of isonitrogenic glycine, to investigate the results found in glutamine treatment were caused by increased nitrogen levels. On days 0, 7 and 12 of the experimental protocol, body composition and body development were measured. The intestinal barrier function was measured using electrophysiological parameters of Potential Difference - DP, Short Circuit Current -  $I_{sc}$  and Transepithelial Resistance - Basal  $R_t$  and absorption of glucose, glutamine, and alanyl-glutamine. Mice subjected to the MAL-ED diet showed a reduction in fat mass, weight gain, and body growth. The analyzes in automatized Ussing Chamber System (UCS) showed an increase in  $R_t$  in relation to the cumulative concentrations of glutamine and alanyl-glutamine, reducing the low absorption of substrates in animals that consumed the MAL-ED diet. Treatment with glutamine reversed weight loss and promoted improvement in body growth, an increase in basal  $R_t$  and an improvement in the intestinal epithelial barrier function in animals that consumed the MAL-ED diet. According to the findings of the present study, the MAL-ED diet causes changes in the gastrointestinal barrier. Furthermore, it demonstrated the use of glutamine as a new mechanism for effectiveness in improving weight gain and growth in malnourished animals by restoring the function of the intestinal epithelial barrier.

**Keywords:** Intestinal Barrier; Intestinal Permeability; Malnutrition; Ussing Chamber.

## LISTA DE FIGURAS

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Figura 1  | – Prevalência mundial de desnutrição aguda infantil.....   | 20  |
| Figura 2  | – Síntese da Glutamina.....  | 30  |
| Figura 3  | – Metabolismo da Glutamina.....  | 31  |
| Figura 4  | – Arquitetura do epitélio do intestinal delgado e tipos de células presentes na barreira epitelial intestinal..... | 33  |
| Figura 5  | – Estrutura e morfologia da junção firmes.....   | 36  |
| Figura 6  | – O complexo juncional apical da barreira epitelial intestinal.....  | 37  |
| Figura 7  | – Anatomia das junções firmes das células epiteliais intestinais.....  | 40  |
| Figura 8  | – Protocolo experimental.....  | 73  |
| Figura 9  | – Grupos experimentais.....  | 75  |
| Figura 10 | – Esquematização do procedimento experimental da bioimpedância elétrica...   | 77  |
| Figura 11 | – Avaliação do comprimento corporal.....   | 78  |
| Figura 12 | – Sistema de Câmaras de Ussing para pesquisa epitelial.....  | 79  |
| Figura 13 | – Amplificador, pré-amplificador e Software de aquisição de dados.....   | 81  |
| Figura 14 | – Esquematização do procedimento experimental da bioimpedância elétrica...   | 87  |
| Figura 15 | – Sistema de Câmaras de Ussing para pesquisa epitelial.....  | 90  |
| Figura 16 | – Amplificador, pré-amplificador e Software de aquisição de dados.....   | 93  |
| Figura 17 | – Preparo de soluções para teste de curva cumulativa de substratos no SCU...                                       | 95  |
| Figura 18 | – Cirurgia para coleta de segmento medial do intestino delgado nos camundongos.....                                | 96  |
| Figura 19 | – Consumo de Ração durante o período experimental.....   | 100 |
| Figura 20 | – Ganho de peso durante o período experimental.....  | 101 |
| Figura 21 | – Crescimento dos animais submetidos as dietas.....  | 102 |
| Figura 22 | – Avaliação da composição corporal dos animais submetidos as dietas.....   | 104 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 23 – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre parâmetros eletrofisiológicos da permeabilidade intestinal.....  | 106 |
| Figura 24 – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal.....   | 107 |
| Figura 25 – Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na Corrente de Curto-Circuito, diferença de potencial e resistência transepitelial em condições basais.....                 | 109 |
| Figura 26 – Efeitos das concentrações cumulativas da glicose no segmento medial do intestino delgado.....  | 110 |
| Figura 27 – Efeitos das concentrações cumulativas da glutamina no segmento medial do intestino delgado.....  | 111 |
| Figura 28 – Efeitos das concentrações cumulativas da alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado.....   | 113 |
| Figura 29 – Consumo de Ração e água após o tratamento com glutamina ou glicina.....  | 114 |
| Figura 30 – Comprimento de cauda e total após o tratamento com glutamina ou glicina.....   | 116 |
| Figura 31 – Avaliação da composição corporal dos animais submetidos à dieta MAL-ED tratados com glutamina ou glicina.....  | 118 |
| Figura 32 – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre parâmetros eletrofisiológicos da permeabilidade intestinal de animais e tratados.....                                  | 120 |
| Figura 33 – Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na Corrente de Curto-Circuito, diferença de potencial e resistência transepitelial em condições basais após tratamento..... | 122 |
| Figura 34 – Efeitos das concentrações cumulativas da glicose no intestino de animais tratados com glutamina ou glicina.....  | 123 |
| Figura 35 – Efeitos das concentrações cumulativas da glutamina no intestino de animais tratados com glutamina ou glicina.....  | 124 |
| Figura 36 – Efeitos das concentrações cumulativas da alanil-glutamina no intestino de animais tratados com glutamina ou glicina.....   | 126 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |     |
|--|-----|
| Gráfico 1 – Comprimento total do intestino delgado.....  | 103 |
| Gráfico 2 – Ganho de peso dos animais após o tratamento com glutamina ou glicina.....  | 115 |
| Gráfico 3 – Comprimento total do intestino delgado após o tratamento.....  | 117 |
| Gráfico 4 – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal de animais desnutridos e tratados..... | 121 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Diagnóstico e gravidade de desnutrição através do escore Z.....  | 17 |
| Tabela 2 – Modelos experimentais de deficiência nutricional e efeitos nos parâmetros corporais, intestino, sistema imunológico e demais sistemas..... | 24 |
| Tabela 3 – Composição nutricional da dieta MAL-ED e controle.....   | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| AAT           | alfa ( $\alpha$ )-1-antitripsina                              |
| ATP           | <i>Adenosine Triphosphate</i>                                 |
| cAMP          | Cíclic Adenosine Monophosphate                                |
| CC            | <i>Current Clamp</i>  |
| CCC           | Corrente de Curto-Circuito                                    |
| CEUA          | Comissão de Ética no Uso e Animais                            |
| CFTR          | <i>Cistic Fibrosis transmembrane Conductance Regulator</i>    |
| CONCEA        | Comitê Nacional de Controle de Experimentação Animal          |
| COVID-19      | <i>Coronavirus Disease 2019</i>                               |
| DEA           | Disfunção Entérica Ambiental                                  |
| DII           | Doença Inflamatória Intestinal                                |
| DP            | Diferença de Potencial  |
| DRB           | Dieta Básica Regional   |
| EAEC          | Enterogregativa <i>Escherichia coli</i>                       |
| EUA           | Estados Unidos da América                                     |
| FABP          | <i>Fatty Acid Binding Proteins</i>                            |
| FATCD/36      | <i>Fatty Acid Translocase</i>                                 |
| GA            | Glutaminase   |
| GI            | Gastrointestinal  |
| GLP-2         | <i>Glucagon-Like Peptide - 2</i>                              |
| GLUT-1        | <i>Glucose Transporter Protein type 1</i>                     |
| GLUT-2        | <i>Glucose Transporter Protein type 2</i>                     |
| GNL           | Glutamina   |
| GS            | Glutamina Sintetase   |
| GVHD          | <i>Graft vs. Host Disease</i>                                 |
| HAZ           | <i>height-age Z score</i>                                     |
| HPLC-MS       | <i>High-Performance Liquid Chromatography – Mass spectrum</i> |
| I             | Corrente  |
| IEC           | <i>Intestinal Epithelial Cell</i>                             |
| IFN- $\gamma$ | <i>Interferon <math>\gamma</math></i>                         |



|            |   |
|------------|---|
| IMC        | Índice de Massa Corporal  |
| ISC        | <i>Intestinal Stem Cell</i>   |
| KRB        | <i>Krebs-Ringer Bicarbonate</i>                                       |
| LBP        | <i>LPS-Binding Protein</i>  |
| LCN2       | Lipocaina fecal ou sérica   |
| LM         | Lactulose/Manitol   |
| LPS        | Lipopolissacarídeos   |
| MAL-ED     | <i>Malnutrition-Enteric Disease</i> (Desnutrição e infecção Entérica) |
| MCP-1      | <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>                             |
| MHz        | Megahertz   |
| mOsm       | MiliOsmol   |
| MPO        | <i>Myeloperoxidase</i>  |
| PEG        | Polietilenoglicóis  |
| PEPT-1     | <i>Peptide Transporter 1</i>  |
| PMAPs      | Padrões Moleculares Associados a Patógenos                            |
| RT         | Resistência Transepitelial  |
| SARS-CoV-2 | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>                |
| SCU        | Sistema de Câmaras de Ussing  |
| SGLT-1     | <i>Sodium-Glucose Linked Transporter-1</i>                            |
| SN2        | <i>Nucleophilic Substitution 2</i>                                    |
| TNF        | <i>Tumor Necrosis Factor</i>  |
| UC         | <i>Ussing Chamber</i>   |
| UPC        | Unidade de pesquisas Clínicas   |
| US\$       | <i>United States Dollar</i>   |
| UVA        | <i>University of Virginia</i>   |
| V          | Voltagem  |
| VC         | <i>Voltage Clamp</i>  |
| WAZ        | <i>weight-age Z score</i>   |
| WHO        | <i>World Health Organization</i>                                      |
| WHZ        | <i>weight-height Z score</i>  |
| ZO-1       | <i>Zonula Occludens - 1</i>   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <b>NH<sub>3</sub></b> | Amônia                            |
| <b>Å</b>              | Ångström                          |
| <b>cm</b>             | Centímetros                       |
| <b>Cl<sup>-</sup></b> | Cloreto                           |
| <b>NaCl</b>           | Cloreto de Sódio                  |
| <b>Gt</b>             | Condutância                       |
| <b>©</b>              | Copyright                         |
| <b>\$</b>             | Dólar                             |
| <b>G</b>              | Gramas                            |
| <b>°C</b>             | Graus Celsius                     |
| <b>H<sup>+</sup></b>  | Hidrogênio                        |
| <b>Zt</b>             | Impedância                        |
| <b>±</b>              | Mais ou Menos                     |
| <b>®</b>              | Marca Registrada                  |
| <b>µg</b>             | Microgramas                       |
| <b>µL</b>             | Microlitros                       |
| <b>µm</b>             | Micrômetros                       |
| <b>µM</b>             | Micromolar                        |
| <b>mg</b>             | Miligramas                        |
| <b>mM</b>             | Milimolar                         |
| <b>mV</b>             | Milivolts                         |
| <b>mL</b>             | Millilitros                       |
| <b>M</b>              | Molar                             |
| <b>nm</b>             | Nanômetros                        |
| <b>%</b>              | Percentual                        |
| <b>K<sup>+</sup></b>  | Potássio                          |
| <b>Vt</b>             | Potencial Elétrico Transepitelial |
| <b>kDa</b>            | QuiloDalton                       |
| <b>Kg</b>             | Quilogramas                       |
| <b>Na<sup>+</sup></b> | Sódio                             |

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 22         |
| <b>1.2. Desnutrição</b> .....  | 22         |
| 1.2.1. Epidemiologia da desnutrição aguda .....  | 25         |
| 1.2.2. Modelos experimentais de desnutrição: importância e limitações .....  | 27         |
| 1.2.3. A busca por tratamentos eficazes .....  | 33         |
| <b>1.3. Glutamina</b> .....  | 33         |
| 1.3.1. Estrutura Molecular, Síntese e Metabolismo da glutamina.....  | 35         |
| <b>1.4. Barreira Morfofuncional Gastrointestinal e componentes extracelulares....</b>  | <b>38</b>  |
| <b>1.4.1. Morfologia da Barreira Gastrointestinal</b> .....  | <b>40</b>  |
| 1.4.1.1. Junções Aderentes e Desmossomos.....  | 42         |
| 1.4.1.2. Junções Firmes.....   | 44         |
| 1.4.1.2.1. Ocludinas .....   | 47         |
| 1.4.1.2.2. Claudinas .....   | 47         |
| 1.4.1.2.3. Moléculas de Adesão Juncional .....   | 49         |
| 1.4.1.2.4. Zonulas ocludentes .....  | 49         |
| <b>1.4.2. Barreira Morfofuncional Gastrointestinal e Doenças</b> .....   | <b>51</b>  |
| <b>1.4.3. Permeabilidade Intestinal</b> .....  | <b>52</b>  |
| <b>1.5. Métodos de avaliação de Barreira Morfofuncional Gastrointestinal.....</b>  | <b>53</b>  |
| <b>1.5.1. Avaliação da Permeabilidade e Função de Barreira Intestinal In Vitro</b>   | <b>53</b>  |
| <b>1.5.2 Avaliação da Permeabilidade e Função de Barreira Intestinal Ex Vivo.</b>  | <b>57</b>  |
| 1.5.2.1. Método de Câmara de Ussing .....  | 57         |
| <b>1.5.3. Avaliação da Permeabilidade e Função de Barreira Intestinal In Vivo</b>  | <b>62</b>  |
| 1.5.3.1. Teste Lactulose: Manitol .....  | 66         |
| <b>1.5.4 Biomarcadores para avaliação de Função de Barreira Intestinal</b> .....   | <b>67</b>  |
| <b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....   | <b>72</b>  |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | <b>75</b>  |
| <b>3.1. Objetivo Geral</b> .....   | <b>75</b>  |
| <b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....  | <b>75</b>  |
| <b>4. MATERIAL E METODOS</b> .....   | <b>76</b>  |
| <b>4.1. Animais e Comitê de Ética</b> .....  | <b>76</b>  |
| <b>4.2. Dietas e substratos testados</b> .....   | <b>76</b>  |
| 4.2.1. Dieta MAL-ED.....   | 76         |
| 4.2.2. Substratos testados.....  | 77         |
| <b>4.3 Desenho experimental</b> .....  | <b>77</b>  |
| <b>4.4. Grupos Experimentais</b> .....   | <b>80</b>  |
| <b>4.5. Análise da composição corporal: Bioimpedância elétrica</b> .....   | <b>81</b>  |
| <b>4.6. Avaliação do desenvolvimento corporal</b> .....  | <b>84</b>  |
| <b>4.8. Avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos basais e durante o transporte de peptídeos e carboidratos por Câmara de Ussing</b> ..... | <b>84</b>  |
| <b>4.9. Solução perfusora e soluções teste</b> .....   | <b>88</b>  |
| <b>4.10. Montagem das Câmaras Ussing e calibração do sistema</b> .....   | <b>92</b>  |
| <b>4.11. Coleta da amostra e montagem das câmaras</b> .....  | <b>95</b>  |
| <b>4.12 Medidas elétricas</b> .....  | <b>97</b>  |
| <b>4.13 Curva dose-resposta da glutamina, alanil-glutamina e glicose</b> .....   | <b>98</b>  |
| <b>4.14 Avaliação de permeabilidade por meio de teste de LM em SCU</b> .....   | <b>100</b> |
| <b>4.15 Cálculo dos parâmetros eletrofisiológicos</b> .....  | <b>102</b> |

|   |            |
|---|------------|
| 4.16 Análise estatística .....  | 104        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>105</b> |
| 5.1. Composição da Dieta MAL-ED .....   | 105        |
| <b>5.2. Indução de desnutrição pela dieta MAL-ED em camundongos recém<br/>desmamados.....</b>   | <b>106</b> |
| 5.2.1. Sinais clínicos registrados após o consumo agudo da dieta MAL-ED em<br>camundongos recém desmamados.....   | 106        |
| 5.2.2. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre o tamanho total do<br>intestino delgado de camundongos recém desmamados.....   | 108        |
| 5.2.3. Composição corporal de camundongos recém desmamados após<br>consumo agudo de dieta MAL-ED.....   | 109        |
| <b>5.3. Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a barreira funcional<br/>gastrointestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém<br/>desmamados.....</b>   | <b>111</b> |
| 5.3.1. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade<br>intestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém<br>desmamados.....   | 111        |
| 5.3.2.1. Avaliação da Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e<br>Tensão Transepitelial no segmento medial do intestino delgado durante o<br>transporte dos carboidratos lactulose e manitol em Câmara de Ussing.....                                   | 111        |
| 5.3.2.2. Avaliação da permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino<br>delgado por meio do teste de lactulose:manitol ex vivo .....   | 112        |
| <b>5.3.3. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre o transporte de<br/>substratos de glicose, glutamina e alanil-glutamina no intestino de<br/>camundongos recém desmamados.....</b>   | <b>114</b> |
| 5.3.3.1. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência<br>Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o<br>transporte de glicose no intestino de camundongos recém desmamados.....   | 114        |
| 5.3.3.2. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência<br>Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o<br>transporte de glutamina no intestino de camundongos recém desmamados.....                                       | 116        |
| 5.3.3.3. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência<br>Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o<br>transporte de alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado de<br>camundongos recém desmamados ..... | 118        |
| <b>5.4. Tratamento com glutamina após indução de desnutrição aguda pela dieta<br/>MAL-ED em camundongos recém desmamados tratados com glutamina ou<br/>glicina .....</b>  | <b>119</b> |
| 5.4.1. Avaliação dos sinais clínicos de desnutrição após tratamento com<br>glutamina ou glicina .....   | 119        |
| 5.4.2. Tamanho total do intestino delgado de camundongos desnutridos pela<br>dieta MAL-ED após tratamento com glutamina.....  | 122        |
| 5.4.3. Avaliação da composição corporal de camundongos desnutridos pela<br>MAL-ED após tratamento com glutamina .....   | 123        |
| <b>5.5. Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade e<br/>barreira funcional gastrointestinal no intestino de camundongos recém<br/>desmamados tratados com glutamina ou glicina.....</b>   | <b>125</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5.5.1. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém desmamados tratados com glutamina ou glicina.....</b>  | <b>125</b> |
| 5.5.1.1. Avaliação da Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial no segmento medial do intestino delgado de camundongos durante o transporte dos carboidratos lactulose e manitol em Câmara de Ussing   | 125        |
| 5.5.1.2. Avaliação da permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos por meio do teste de lactulose:manitol ex vivo .....   | 126        |
| <b>5.5.2. Efeito do consumo agudo da dieta de desnutrição MAL-ED sobre o transporte de substratos de glicose, glutamina e alanil-glutamina no intestino de camundongos recém desmamados tratados com glutamina ou glicina.....</b>  | <b>127</b> |
| 5.5.2.1. Efeito do consumo agudo da dieta de desnutrição MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de glicose no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém desmamados tratados com glutamina ou glicina..... | 127        |
| 5.5.3.2. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de glutamina no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém desmamados tratados com glutamina ou glicina.....              | 130        |
| 5.5.3.3. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém desmamados tratados com glutamina ou glicina.....       | 131        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>133</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>148</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>149</b> |
| <b>ANEXO A – ARTIGO 1 .....</b>   | <b>192</b> |
| <b>ANEXO B – ARTIGO 2 .....</b>   | <b>206</b> |
| <b>ANEXO C – ARTIGO 3 .....</b>   | <b>260</b> |
| <b>ANEXO D – ARTIGO 4 .....</b>   | <b>280</b> |
| <b>ANEXO E – PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CAMARAS DE USSING.....</b>  | <b>323</b> |
| <b>ANEXO F – PREPARO DO SISTEMA DAS CAMARAS DE USSING.....</b>  | <b>325</b> |
| <b>ANEXO G – PREPARO DE PONTES DE AGAR PARA CAMARAS DE USSING .....</b>   | <b>329</b> |
| <b>ANEXO H – PREPARO DE MEMBRANA PARA CAMARAS DE USSING.....</b>  | <b>331</b> |
| <b>ANEXO I – FINALIZAÇÃO E LIMPEZA DAS CAMARAS DE USSING .....</b>  | <b>334</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.2. Desnutrição

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define má nutrição como a insuficiência, excesso ou desequilíbrio no consumo de energia e/ou nutrientes (WHO, 2006). Essa condição é classificada em três principais categorias: desnutrição, excesso de peso e desnutrição relacionada a micronutrientes. A desnutrição, por sua vez, pode ser subdividida em desnutrição aguda (conhecida como *wasting* em inglês), desnutrição crônica (*stunting* em inglês) e subnutrição (*underweight* em inglês). Já o excesso de peso engloba o sobrepeso, a obesidade e doenças não transmissíveis relacionadas à dieta, tais como doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer. A desnutrição relacionada a micronutrientes abrange a deficiência de micronutrientes, como a carência de vitaminas e minerais essenciais, assim como o excesso desses elementos (BOSWELL, 2021; IDDRISU *et al.*, 2021; WHO, 2021).

O diagnóstico de desnutrição infantil pode ser realizado por meio de várias abordagens. Entre elas, estão a avaliação dos índices antropométricos, como o escore Z, o índice de massa corporal (IMC), as dobras cutâneas ou a circunferência do braço médio. Além disso, são considerados indicadores bioquímicos, como a albumina plasmática, e sinais clínicos, como a retenção de líquidos, alterações no cabelo ou na pele (OMS, 2006).

Os indicadores antropométricos apresentam vantagens, sendo métodos não invasivos e com sensibilidade para detectar todos os tipos de desnutrição. Por outro lado, os métodos bioquímicos e os sinais clínicos requerem um grau mais acentuado de desnutrição para que o resultado seja validado (OMS, 2006). Por exemplo, a presença do sinal clínico de retenção de líquidos indica desnutrição grave causada pela hipoalbuminemia resultante da deficiência proteica (ARCIERI *et al.*, 2021; COULTHARD, 2014).

O escore Z já foi considerado o padrão principal para o diagnóstico da desnutrição infantil, permitindo a distinção entre os diferentes tipos de desnutrição e o grau de gravidade (**Tabela 1**). No entanto, a Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral e a Academia de Nutrição e Dietética apresentaram uma nova série de indicadores de diagnóstico de desnutrição na população pediátrica com idades de 1 mês a 18 anos, com o objetivo de padronizar o diagnóstico em todo o mundo. Esses novos indicadores

foram implementados e validados na prática clínica (BECKER *et al.*, 2015).

O diagnóstico de desnutrição infantil pode ser realizado com base em um único ponto de dados ou por meio da comparação de dois pontos de dados. No primeiro caso, o diagnóstico pode ser estabelecido utilizando o escore Z em parâmetros como peso para altura, índice de massa corporal (IMC) para idade, comprimento/altura para idade ou circunferência do braço médio. Já na abordagem com dois pontos de dados, o diagnóstico pode ser feito com base nos seguintes critérios: velocidade de ganho de peso (para crianças com menos de 2 anos de idade), percentual de perda de peso (para crianças entre 2 e 20 anos de idade), desaceleração do escore Z de peso por comprimento/altura e ingestão inadequada de nutrientes. Ambos os métodos utilizam pontos de corte específicos para determinar a gravidade da desnutrição no paciente (BOUMA, 2017).

**Tabela 1** – Diagnóstico e gravidade de desnutrição através do escore Z

| <b>Diagnóstico</b>  | <b>Escore Z</b>   |
|---------------------|---|
| Desnutrição aguda   | peso para altura (WHZ, do inglês <i>weigh-height Z score</i> )  |
| Desnutrição crônica | altura para a idade (HAZ, do inglês <i>height-age Z score</i> ) |
| Subnutrição         | peso para a idade (WAZ, do inglês <i>weigh-age Z score</i> )    |
| <b>Gravidade</b>    | <b>Desvio padrão*</b>   |
| Leve                | $-2,0 \leq \text{escore Z} < -1,0$                              |
| Moderado            | $-3,0 \leq \text{escore Z} < -2,0$                              |
| Grave               | $\text{Escore Z} < -3,0$  |

Fonte: WHO, 2006; RIBEIRO, 2022.

Nota: desvio padrão de referência da WHO (1999).

O Escore Z é considerado o desvio do valor de um indivíduo em relação ao valor da mediana de uma população de referência, dividido pelo desvio padrão da população de referência, ou sendo transformado para distribuição normal (WHO, 2006). Em termos práticos, o escore z corresponde ao número de desvios-padrão que o dado analisado está distante de sua mediana de referência e varia de -3 a +3. A OMS recomenda a utilização do escore z nas relações de peso-para-idade e estatura-para-idade, em relação aos valores obtidos na população de referência do Centro Nacional de Estatística em Saúde dos Estados Unidos (NCHS – *National Center for Health Statistics*). O ponto de corte fica entre escore Z < -2, que significa 2 desvios padrão abaixo da média da população de referência, sendo que na desnutrição aguda o peso-para-idade e peso-para-estatura

apresenta escore  $Z < -2$ , e na desnutrição grave tem escore  $Z < -2$  para o índice estatura-para-idade.

Já na desnutrição aguda ou crônica, o escore  $Z$  para peso-para-estatura ou estatura-para-idade fica entre escore  $Z < -1$  para desnutrição aguda e escore  $Z < -2$  para desnutrição crônica (DE ONIS; HABICHT, 1996; WHO, 2006).

Quanto aos tipos de desnutrição, de forma geral, a **desnutrição aguda** está relacionada a ocorrência, de forma recente e severa, de perda de peso por deficiência nutricional ou em decorrência de alguma enfermidade, como doenças infecciosas, por exemplo (IDDRISU *et al.*, 2021; WHO, 2021). Em quadros graves de desnutrição aguda, o risco de mortalidade aumenta consideravelmente e seus efeitos podem durar vários meses, quando o tratamento é ineficaz ou inexistente (ADEGOKE *et al.*, 2021; ISANAKA *et al.*, 2011; KEBEDE, 2022).

Já no contexto de **desnutrição crônica**, a causa normalmente está relacionada a condições socioeconômicas precárias, que envolvem a saúde da mãe, seu estado nutricional durante a gestação e amamentação, bem como a ocorrência frequente de doenças, maus cuidados nutricionais ou inadequados na primeira infância (WHO, 2021). Mesmo não possuindo um alto risco de mortalidade como na desnutrição aguda, a desnutrição crônica, quando manifestada nos primeiros 1000 dias de vida, tem sido relacionada com déficit cognitivo, obesidade e síndromes metabólicas na vida adulta (ALAM *et al.*, 2020; BARTELT; BOLICK; GUERRANT, 2019; DEBOER *et al.*, 2013; TICKELL; ATLAS; WALSON, 2019).

A desnutrição também pode estar associada à carência de micronutrientes, sendo o iodo, ferro e vitamina A considerados os mais significativos em termos de impacto na saúde pública global. Essa deficiência representa uma grande ameaça à saúde, especialmente para crianças e mulheres grávidas em países pouco desenvolvidos e com distribuição de renda insuficiente. Resultados encontrados em outros estudos revelaram que uma densidade adequada de macronutrientes e micronutrientes na alimentação complementar pode reduzir a ocorrência de disfunção entérica ambiental, também conhecida como enteropatia ambiental, e melhorar a função de barreira intestinal. Essas condições contribuem para o desenvolvimento de desnutrição em várias partes do mundo (BLACK *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2020; MACIEL *et al.*, 2021; MCCORMICK *et al.*, 2019; WHO, 2021).



### *1.2.1. Epidemiologia da desnutrição aguda*

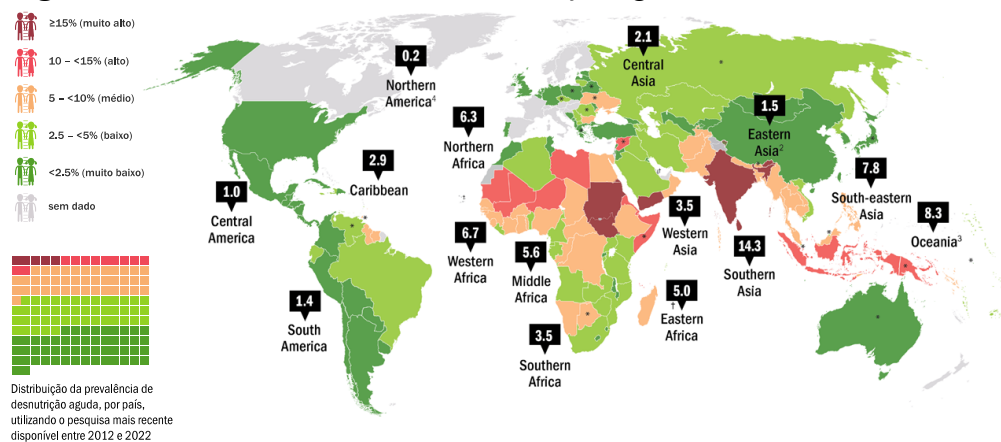
A disponibilidade de dados epidemiológicos sobre a desnutrição infantil nos últimos anos tem sido limitada devido, principalmente, ao isolamento social causado pela pandemia da COVID-19. No entanto, o mundo enfrenta uma grave crise global, com alguns países, incluindo o Brasil, retornando ao mapa da fome. Em 2021, aproximadamente 828 milhões de pessoas em escala mundial estavam vivenciando subnutrição crônica, e cerca de 193 milhões de pessoas sofriam de subnutrição aguda em 53 países. Além disso, cerca de 641 milhões de pessoas enfrentavam insegurança alimentar em 88 países (WORLD FOOD PROGRAMME, 2023).

Quanto à desnutrição infantil, o último relatório divulgado pelas autoridades competentes registrou que aproximadamente 45,4 milhões de crianças menores de 5 anos foram afetadas por desnutrição aguda, sendo que cerca de 13,6 milhões delas apresentaram casos graves. Essa estimativa mais recente sobre a prevalência da desnutrição infantil indica que a Ásia e a África continuam sendo os continentes mais afetados, seguidos pela América Latina/Caribe e Oceania (UNICEF/WHO/WORLD BANK GROUP, 2023; WHO, 2021).

Em 2020, aproximadamente 31,9 milhões de crianças menores de 5 anos foram afetadas por desnutrição aguda moderada a severa na Ásia. Dentre essas, 10,3 milhões foram diagnosticadas com desnutrição aguda grave. A maior prevalência de casos de desnutrição aguda na Ásia foi registrada no Sul da Ásia, com cerca de 25 milhões de crianças afetadas (14,1%), conforme mostrado na **Figura 1** (UNICEF/WHO/WORLD BANK GROUP, 2023).

No Brasil, segundo dados analisados pelo Instituto Desiderata, utilizando o Escore Z, e apresentados no Panorama da Obesidade de Crianças e Adolescentes, os quais foram coletados no Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) do Ministério da Saúde e divulgados pela Agência Brasil de Comunicação, o índice de desnutrição em crianças aumentou entre os anos de 2015 e 2021. Inicialmente, houve uma queda de 5,2% em 2015 para 4,8% em 2018, seguida por um aumento para 5,6% em 2019 e alcançando 5,3% em 2021, entre os grupos etários acompanhados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Quando considerado o grupo de meninos negros, esse índice aumenta em 2 pontos percentuais, alcançando o ápice de 7,5% em 2019 (BRASIL, 2022).

**Figura 1 – Prevalência mundial de desnutrição aguda infantil**



Fonte: Adaptado de UNICEF; WHO; WORLD BANK GROUP (2023).

1. Os dados dos países são as estimativas de pesquisa disponíveis mais recentes entre 2012 e 2022; as exceções, onde são mostrados dados mais antigos (2000–2011), são indicadas com um asterisco (\*) e onde apenas dados anteriores a 2000 estão disponíveis, a nota de rodapé † é usada, indicando que não há dados recentes. 2. Ásia Oriental, excluindo o Japão. 3. Oceania, excluindo Austrália e Nova Zelândia. 4. A estimativa sub-regional da América do Norte é baseada apenas em dados dos Estados Unidos. Não há estimativa disponível para as sub-regiões da Europa ou Austrália e Nova Zelândia devido à insuficiente cobertura populacional. Esses mapas são estilizados e não estão em escala; eles não refletem uma posição do UNICEF, OMS ou Grupo do Banco Mundial sobre o status legal de qualquer país ou território ou a delimitação de quaisquer fronteiras.

Um estudo recente aponta que a pandemia de COVID-19 pode ter exacerbado essa estimativa de desnutrição aguda em 14,3%, apesar de os efeitos da pandemia não estarem totalmente quantificados. Além disso, pouco se sabe qual será o impacto que a crise econômico-social gerada pela pandemia de COVID-19 terá na desnutrição crônica infantil nos próximos anos (HEADEY *et al.*, 2020).

Os gastos gerados na tentativa de reverter e tratar os danos causados pela desnutrição infantil geram um enorme impacto na economia da população. Estima-se que até US\$ 3,5 trilhões sejam gastos por ano, o que equivale a US\$ 500 por indivíduo (BEAUDREULT, 2019; GLOPAN, 2022), abrangendo custos de internações e tratamentos. Além disso, há impactos como baixo rendimento escolar e qualificação profissional, que levam a um déficit na produtividade na vida adulta devido a esses fatores e à má condição física (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007; VICTORA *et al.*, 2008).

Cada vez mais, reconhece-se que fatores ambientais e dietéticos têm uma influência significativa na composição e função da microbiota intestinal durante a infância. Em regiões com alta prevalência de desnutrição infantil, além das variações nos

parâmetros antropométricos, como peso e/ou altura para idade, é possível observar divergências na composição da dieta complementar consumida nessas áreas, em comparação com locais onde a desnutrição infantil é menos comum. Ao mesmo tempo, podem surgir semelhanças no perfil nutricional da dieta entre países afetados pela desnutrição infantil. Dietas consumidas por crianças de países pobres e em desenvolvimento, baseadas em plantas com pouco consumo proteico, como a consumida no Myanmar (HLAING *et al.*, 2016), ou baseadas em criação e pesca como no Camboja (SKAU *et al.*, 2014), na Indonésia (FAHMIDA *et al.*, 2015) e na Guatemala (USAID; FANTA; FHI, 2014), onde além da redução calórica e proteica no consumo, ainda apresentam baixa quantidade de vitaminas e minerais na composição. Pesquisas demonstraram que crianças desnutridas apresentam uma maior presença de enteropatógenos, e quanto maior o número de patógenos identificados nas fezes, menores são os escores Z de peso para idade e altura para idade (DE FILIPPO *et al.*, 2010; KOTLOFF, 2017; PLATTS-MILLS *et al.*, 2017).

Diante da complexidade da desnutrição e das limitações éticas para ensaios clínicos em seres humanos, diversos modelos animais têm contribuído para o entendimento da fisiopatologia associada a diferentes deficiências nutricionais (PARK *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2016).

### ***1.2.2. Modelos experimentais de desnutrição: importância e limitações***

Os modelos experimentais que induzem desnutrição têm sido fundamentais para a compreensão dos efeitos da deficiência proteica, energética e de micronutrientes específicos no desenvolvimento saudável (**Tabela 2**). Um dos enfoques é o uso de modelos de restrição calórica (**Tabela 2**), que são relevantes para demonstrar os impactos da carência energética em diversos sistemas corporais, incluindo o comprometimento da função imunológica, frequentemente observado em crianças desnutridas (IBRAHIM *et al.*, 2017).

Os modelos animais mais frequentemente utilizados são aqueles de deficiência proteica, uma vez que a desnutrição energético-proteica e a desnutrição aguda têm alta prevalência em países em desenvolvimento e estão associadas a altas taxas de mortalidade

infantil (NGO; ORTIZ-ANDRELLUCCHI; SERRA-MAJEM, 2016). A dieta com apenas 2% de proteína tem sido empregada em alguns estudos para avaliar os efeitos na barreira morfofuncional, no sistema imunológico e no metaboloma (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016; SANTOS et al., 2016), além de induzir modelos de desnutrição e infecção por patógenos específicos (GIALLOUROU *et al.*, 2018).

A recomendação da WHO (*World Health Organization*) e da FAO (*Food and Agriculture Organization*) quanto ao consumo diário de proteínas é de 15 a 20% nos primeiros 24 meses de vida (BUDHATHOKI *et al.*, 2019; FAIZAN; ROUSTER, 2023; GARCIA-IBORRA *et al.*, 2023; HÖRNELL *et al.*, 2013). Diante disso, dietas como a Dieta Básica Regional (DBR) com 7% de proteína têm sido amplamente utilizadas para demonstrar a relação entre a dieta e a exposição a uma microbiota específica para o desenvolvimento da enteropatia ambiental e suas consequências (**Tabela 2**) (BROWN *et al.*, 2015).

Além disso, modelos experimentais de deficiência de micronutrientes são importantes para compreender o papel desses nutrientes no desenvolvimento saudável. Entre eles, a deficiência de zinco se torna um alvo devido à sua alta prevalência em crianças lactentes de países de baixa renda, além de estar relacionada ao crescimento prejudicado, anomalias neuronais, anemia ferropriva e doenças cardiovasculares (AHSAN *et al.*, 2021). Até o momento, nenhum modelo animal de desnutrição avaliou a associação entre a deficiência de macronutrientes e zinco.

Dentre os quatro modelos de dieta baseados na composição alimentar de populações de regiões específicas, destacam-se a DBR (**Tabela 2**), a dieta de milho vegetal e a dieta M8. A DBR é uma dieta frequentemente utilizada em experimentos com animais, que mimetiza a composição alimentar da região semiárida do Brasil. Possui menor teor de proteína (7%) e lipídeos (5%), além de maior quantidade de carboidratos (88%), em comparação com a dieta controle, que consiste de 65% de carboidratos, 20% de proteína e 15% de lipídeos (TEODÓSIO *et al.*, 1990).

A dieta de milho vegetal (**Tabela 2**) foi desenvolvida com base nos alimentos mais consumidos por crianças com *kwashiorkor* no Malawi. Essa dieta apresenta uma redução de 35% na proteína, 47% nos lipídeos, um acréscimo de 134% de carboidratos e 53% de fibra (FOLLIS, 1957).

Por sua vez, a dieta M8 (**Tabela 2**) foi elaborada com base nos alimentos mais consumidos pela população do Malawi; possui menor teor de proteína (4,36%) e lipídeos (3,66%), e mais carboidratos (26,1%). Além de incluir no teste a influência de fibras (4,79%) (BLANTON *et al.*, 2016).

A dieta MAL-ED (**Tabela 2**), é derivada de um estudo recente que quantificou a energia, macronutrientes e micronutrientes da dieta complementar de crianças desnutridas de sete países de baixo poder socioeconômico, pertencentes ao estudo coorte de desnutrição e infecção entérica (MAL-ED, do inglês *Malnutrition - Enteric Diseases*). Em sua composição centesimal, a dieta MAL-ED apresenta -8.03% de energia, -37.46% de proteína, -24.20% de lipídeos, -10.83% de zinco, +5.93% de carboidratos e +45.17% de fibra, em comparação com a dieta controle. Esta última contém 391.69 Kcal, 21,25 g de proteínas, 6,57 g de lipídeos, 35 mg de zinco, 61,89 g de carboidrato e 2,9 g de fibra em sua composição (MACIEL *et al.*, 2021; RIBEIRO, 2022).

**Tabela 2** – Modelos experimentais de deficiência nutricional e efeitos nos parâmetros corporais, intestino, sistema imunológico e demais sistemas

| Modelo pré-clínico                                      | Parâmetros corporais          | Intestino  | Sistema imunológico                                    | Demais sistemas corporais  | Referência  |
|---|-------------------------------|--|--|--|---|
| <b>Restrição calórico</b>                               |                               |  |  |  |   |
| <b>-50% de energia</b>                                  | Redução do peso               | -  | -  | Aumento da ansiedade e depressão   | JAHNG et al., 2007                                  |
| <b>-30% de energia</b>                                  | Redução do peso               | Não alterou a permeabilidade intestinal  | Redução dos níveis sistêmicos de TNF                   | -  | PAN et al., 2018                                    |
| <b>-25% de energia</b>                                  | Redução de peso               | -  | Atrofia do timo  | Aumento dos níveis decorticosterona  | NÚÑEZ et al., 2013                                  |
| <b>-15% de energia</b>                                  | Redução de peso               | -  | Redução dos níveis de MCP-1 no fígado e nos adipócitos | -  | PARK et al., 2017                                   |
| <b>Deficiência proteica</b>                             |                               |  |  |  |   |
| <b>0% de proteína</b>                                   | -                             | -  | -  | -  | -   |
| <b>0,7% de proteína</b>                                 | -                             | -  | -  | -  | -   |
| <b>2% de proteína-desnutrição pós-desmame</b>           | Redução de peso               | -  | Aumento de MPO e lipocalina-2 nas fezes                | Diversidade da microbiota mais alta: expansão de Verrucomicobria, perda de abundância de Firmicutes e permanência de Bacteroidetes | BARTEL et al., 2017; MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016 |
| <b>4% de proteína-desnutrição pós-desmame</b>           | Redução de peso               | Aumento de permeabilidade a pequenas moléculas no íleo e cólon e diminuição da expressão de ocludina nos mesmo segmentos | -  | Redução dos níveis plasmáticos de zinco  | EYZAGUIRRE-VELASQUEZ et al., 2017                   |
| <b>6% de proteína – desnutrição materno-fetal</b>       | Redução de peso no nascimento | Aumento de dissacarídeos no intestino; aumento da expressão de SGLT-1, GLUT-2 e PEPT-1 no duodeno                        | -  | -  | PINHEIRO et al., 2013                               |
| <b>Dieta semelhante a DBR - desnutrição pós-desmame</b> | -                             | Sem atrofia de vilos, indicativo de dano a integridade intestinal, aumento de claudina-2 e redução de ZO-1               | -  | -  | BROWN et al., 2015                                  |

| Deficiência de zinco |   |   |   |  |                                |
|----------------------|---|---|---|--|--------------------------------|
| 0% de zinco          | Reduziu o peso apenas de animais infectados | Presença de diarreia, reduziu vilo/cripta e aumentou mucina no íleo, quando infectado por EAEC  | Aumento de KC e MCP-1 e redução de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 $\alpha$ e Csf3 quando infectado por EAEC | Aumento de suscetibilidade a infecção por EAEC   | BOLICK et al., 2014            |
|                      | Reduziu o peso de animais infectados        | Diarreia, aumento de secreção de muco, embotamento de vilos no íleo e aumento de infiltrado celular, edema e secreção de muco no cólon, quando infectados por <i>Campylobacter jejuni</i> | Aumento de lipocalina-2 e MPO no íleo, quando infectados por <i>Campylobacter jejuni</i>                                | Aumento de metabólitos associados a inflamação e estresse oxidativo, quando infectados por <i>Campylobacter jejuni</i> | GIALLOUROU et al., 2018        |
| < 1,5 ppm de zinco   | Não alterou o peso                          | -   | -   | Fator de risco para doença hepática alcoólica  | ZONG et al., 2013              |
| < 2 ppm de zinco     | Não alterou o peso                          | -   | Sem inflamação  | Alterações menos pronunciadas na microbiota e metaboloma que dieta deficiente em proteína (2%)                         | MAYNERIS-PERXACHS et al., 2016 |
|                      | Reduziu o peso de animais infectados        | Diarreia, fezes com sangue, maior colonização no cólon, sem aumentar os escores histopatológicos, quando infectados por <i>Shigella flexneri</i>  | Aumento de lipocalina-2, MPO, TNF- $\alpha$ e IL-10 no ceco, quando infectados por <i>Shigella flexneri</i>             | Aumento de suscetibilidade a infecção por <i>Shigella flexneri</i>   | QS MEDEIROS et al., 2019       |
| 30 mol/kg            | Retardo do crescimento                      | -   | -   | -  | VAN WOUWE; VELDHUIZEN, 1996    |

| Baseadas na composição alimentar de populações |  |  |   |   |                                      |
|--|--|--|---|---|--------------------------------------|
| DBR- desnutrição materno-fetal e pós-desmame   | Redução do peso e menor ganho de peso                    | Aumento da profundidade de criptas no jejuno e redução de células caliciformes, aumento de translocação de bactérias   | - | -   | QUEIROZ et al., 2014                 |
|  | Redução do peso e menor ganho de peso                    | Atrofia de cripta; redução da corrente curto-circuito basal no íleo; aumento dos níveis de transcritos de PEPT-1, SGLT-1, claudina-2 e ocludina e redução dos níveis de SN2  | - | -   | SAMPAIO et al., 2016                 |
|  |  | Redução da expressão de claudina-3 no jejuno; atrofia de vilos e criptas no jejuno; redução da resistência elétrica basal; indicativo de dano a integridade intestinal       | - | -   | UENO et al., 2011                    |
| Milho vegetal                                  | Redução de peso e menor crescimento                      | Embotamento de vilos e criptas   | - |   | LYKKE et al., 2013; MAY et al., 2018 |
|  |  | -  | - | Esteatose hepática e edema bilateral  | FOLLIS, 1957                         |
| M8   | Menor peso e menor massa magra                           | -  | - | Microbiota imatura (22 espécies), predominância de <i>Clostridium neonatale</i> | BLANTON et al., 2016                 |
| Dieta MAL-ED                                   | Redução de peso, menor ganho de peso e menor crescimento | Aumento da permeabilidade paracelular, dano na barreira epitelial intestinal, redução da área absorptiva, aumento da área intestinal e maior transcrição de RNAm de FATCD/36 |   |   | RIBEIRO, 2022                        |

Fonte: RIBEIRO, 2022.

Sumarização dos resultados encontrados para as diferentes dietas experimentais indutoras de desnutrição nos diversos sistemas corporais.



### 1.2.3. A busca por tratamentos eficazes

A busca por alternativas eficazes no tratamento da desnutrição é constante, dada a importância dessa condição para o desenvolvimento saudável. Blanton *et al.* (2016) demonstraram que o transplante de microbiota de crianças desnutridas foi capaz de induzir desnutrição em camundongos *germe free*, enquanto a suplementação com cinco bactérias da microbiota de crianças saudáveis (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus gnavus*, *Clostridium nexile*, *Clostridium symbiosum*, *Dorea formicigenerans*) melhorou a taxa de crescimento e as alterações metabólicas nos animais desnutridos pela dieta M8. Outro estudo demonstrou que a administração de *Lactobacillus plantarum* foi capaz de manter o crescimento em animais desnutridos, reduzindo a sensibilidade ao hormônio do crescimento induzida pela desnutrição crônica (SCHWARZER *et al.*, 2016).

Nutrientes específicos, como a glutamina isolada ou combinada com zinco e vitamina A, são considerados boas alternativas para prevenir a ruptura da função de barreira epitelial intestinal e melhorar o crescimento de crianças desnutridas (LIMA *et al.*, 2014). O tratamento com zinco em camundongos desnutridos melhorou o ganho de peso, reduziu os escores de diarreia induzida por lactose, diminuiu a translocação bacteriana e reduziu os níveis de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  para os níveis de controle (DE QUEIROZ *et al.*, 2014). Mais recentemente, um estudo identificou desregulações significativas no metabolismo de ácidos graxos em crianças com disfunção entérica ambiental, uma condição que resulta em déficit de crescimento, sugerindo que a restauração da homeostase dos ácidos biliares no intestino pode fornecer um novo alvo para o tratamento da desnutrição (ZHAO *et al.*, 2021).

### 1.3. Glutamina

A glutamina é um aminoácido não essencial, o que significa que pode ser sintetizado em quantidades necessárias para o consumo diário. No entanto, em certas condições, pode ser considerado essencial, sendo então denominado condicionalmente essencial (LACEY; WILMORE, 1990). A glutamina tem como precursores o glutamato, pela via da glutamina sintetase (glutamato+amônia+ATP) (HOLECEK, 2013).

Com um peso molecular de 146,14 g/mol e composição de 41,09% de carbono, 6,09% de hidrogênio, 32,84% de oxigênio e 19,17% de nitrogênio (ROTH, 2008; SHAH; WANG; MA, 2020; WERNERMAN, 2008), a glutamina está presente em muitas proteínas. Sua síntese diária em humanos saudáveis varia de 40 a 80 g e representa cerca de 20% do total dos aminoácidos livres do plasma, com concentrações entre 0,5 a 0,9 mM (ROTH, 2008; SHAH; WANG; MA, 2020; WERNERMAN, 2008). Descoberta como aminoácido pela primeira vez por Hlasiwetz e Habermann (1873), sugeriu-se que a amônia encontrada em hidrolisados proteicos resultava da liberação de glutamina e asparagina (HLASIWETZ; HABERMANN, 1873; LIMA, 2006). Hans Krebs, em 1935, identificou as enzimas que catalisam a síntese e hidrólise de glutamina em tecidos, utilizando rins de cobaias e ratos para este fim (KREBS, 1935).

A concentração sérica de glutamina, apesar de naturalmente alta, é altamente lábil, diminuindo rapidamente em situações de estados catabólicos, doenças graves, pós-operatório, infecções sistêmicas e no caso de transplante de medula óssea. A redução dos níveis séricos de glutamina durante estados catabólicos é mais acentuada em comparação com outros aminoácidos. Quando a demanda por glutamina excede sua produção natural no organismo, seus níveis diminuem proporcionalmente à gravidade da doença, como observado na diminuição plasmática em indivíduos com diabetes, obesidade e COVID-19 (CRUZAT *et al.*, 2018; KIM, 2011; MATSUYAMA *et al.*, 2021).

Estudos em modelos animais sobre o metabolismo da glutamina em estados catabólicos têm revelado que a redução dos níveis plasmáticos e teciduais de glutamina pode ser revertida através da administração de quantidades significativas desse aminoácido em soluções de nutrição parenteral. Isso resulta em benefícios, como aumento do peso corporal, melhora no balanço nitrogenado e aumento das células do epitélio gastrointestinal (FUKATSU, 2019; STEHLE; KUHN, 2015; SUKHOTNIK; LEVI; MORAN-LEV, 2023).

A glutamina desempenha um papel essencial em diversas células, atuando como doador de átomos de nitrogênio durante a síntese de purinas, pirimidinas e amino-açúcares (ARRIBAS-LÓPEZ *et al.*, 2021; MATSUYAMA *et al.*, 2021). Além disso, esse aminoácido assume uma função crucial como mediador em várias vias metabólicas em diferentes tipos de células.

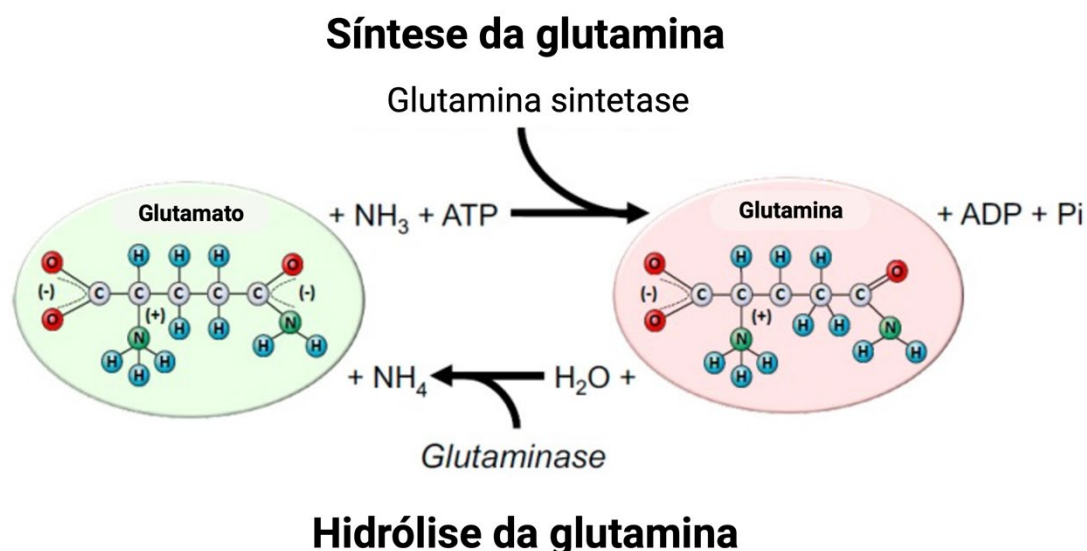
No músculo esquelético, existem evidências que sugerem um possível papel regulatório da glutamina, incluindo sua participação na síntese proteica e na inibição da degradação de proteínas. Adicionalmente, a glutamina é o substrato mais importante para a aminogênese renal (WEINER; VERLANDER, 2013), e desempenha a função de substrato para gliconeogênese e para a retenção de amônia no fígado (DURANTE, 2019; FUKATSU, 2019; PERNA *et al.*, 2019; SHAH; WANG; MA, 2020). Outra função relevante da glutamina é servir como substrato primário para células de crescimento rápido, como enterócitos, fibroblastos e linfócitos (ARRIBAS-LÓPEZ *et al.*, 2021; KIM, 2011).

### ***1.3.1. Estrutura Molecular, Síntese e Metabolismo da glutamina***

A glutamina apresenta em sua composição química dois átomos de nitrogênio: um no grupo  $\alpha$ -amino e outro no grupo amido, o que a categoriza como amino-amido-ácido e possibilita a execução de suas múltiplas funções, tais como o transporte de nitrogênio entre os tecidos, a atuação como substrato para aminogênese renal e seu papel como precursora de nucleotídeos e outras macromoléculas (CRUZAT *et al.*, 2018).

Dentro das células, a regulação da síntese e hidrólise da glutamina (GLN) é realizada por duas principais enzimas intracelulares: a glutaminase (GA), que promove a quebra do grupo amido terminal da glutamina, resultando na produção de glutamato e amônia; e a glutamina sintetase (GS), dependente de ATP, que catalisa a biossíntese de glutamina a partir do glutamato e amônia (**Figura 2**). A hidrólise da glutamina representa o primeiro passo em sua utilização, e o glutamato gerado nessa reação pode participar de outras vias metabólicas, especialmente na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico. Essa reação de hidrólise da glutamina é crucial para a liberação de amônia nos rins e desempenha um papel importante na homeostase ácido-base, além de contribuir para a formação de purinas e pirimidinas (CRUZAT *et al.*, 2018; HOLECEK, 2013).

**Figura 2** – Síntese da Glutamina

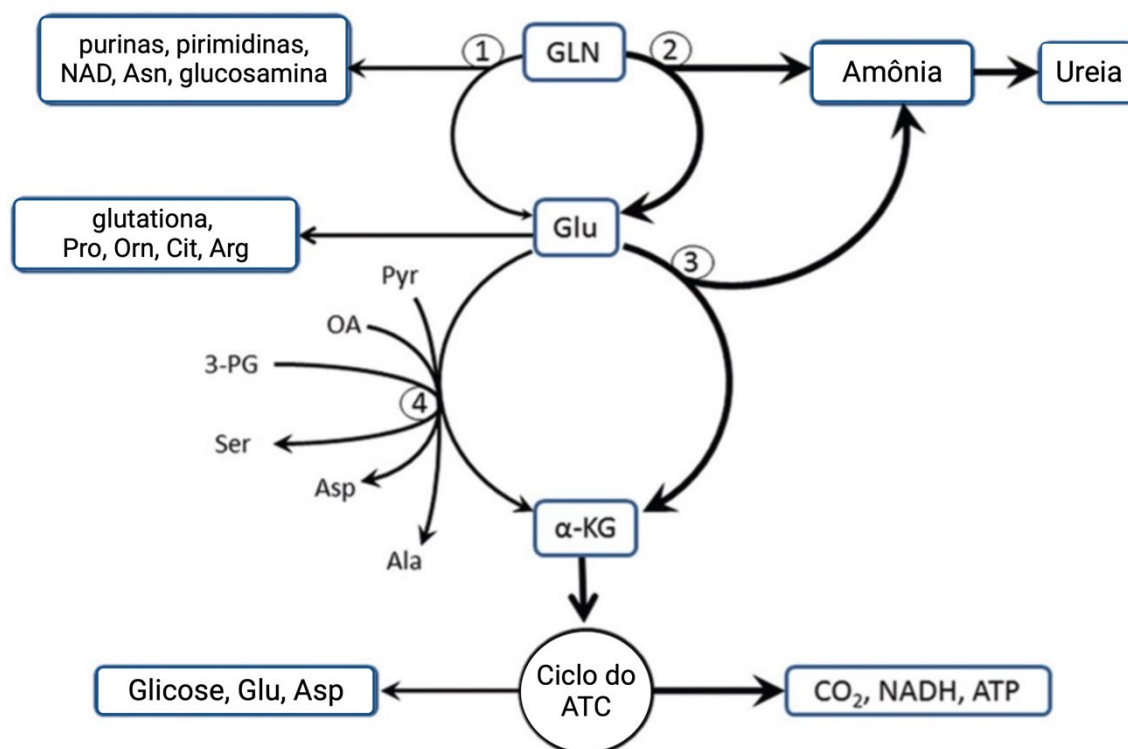


Fonte: Adaptado no BioRender.com (CRUZAT et al., 2018)

Legenda: Síntese e hidrólise da glutamina. A glutamina é principalmente sintetizada pela enzima glutamina sintetase (GS) e hidrolisada pela enzima glutaminase (GLS). A GS catalisa a biossíntese da glutamina utilizando o glutamato e amônia ( $\text{NH}_3$ ) como fonte. Nessa reação, um ATP é consumido. O glutamato pode ser doado por muitos aminoácidos obtidos exogenamente (ou seja, da dieta) e/ou provenientes do catabolismo de aminoácidos endógenos. Por outro lado, a GLS é responsável pela hidrólise da glutamina em glutamato e íon amônio ( $\text{NH}_4$ ). Quase todas as células do corpo expressam GS e GLS, e sua expressão e atividade predominantes determinarão se o tecido é mais propenso a produzir ou consumir glutamina em condições de saúde e doença.

A glutamina presente no sangue circulante ou proveniente da dieta é absorvida pelo enterócito, onde pode ser metabolizada por duas vias principais. Uma dessas vias resulta na formação de D-pirrolina-carboxilato, enquanto a outra leva à produção de  $\alpha$ -cetoglutarato, que atua como intermediário no ciclo de Krebs. Na primeira via, ocorre a síntese de prolina, ornitina e citrulina, que são liberadas do intestino delgado, correspondendo a cerca de 10% da glutamina utilizada. Outros 10-15% são incorporados às proteínas teciduais, enquanto a maior proporção (75%) é metabolizada através do ciclo de Krebs (**Figura 3**). Mais da metade (55%) dos carbonos da glutamina é oxidada para  $\text{CO}_2$ , enquanto o restante é utilizado para a produção de citrato, lactato, outros ácidos orgânicos e glicose (CRUZAT *et al.*, 2018; HOLECEK, 2013; SHAH; WANG; MA, 2020).

**Figura 3 – Metabolismo da Glutamina**



Fonte: Adaptado no BioRender.com(HOLECEK, 2013)

Legenda: As vias do metabolismo da glutamina (GLN). O primeiro passo no catabolismo da GLN é a perda do nitrogênio amídico e a conversão em glutamato (Glu) por meio de reações de glutaminase (GA) ou amidotransferase dependente de GLN. A amidotransferase possibilita que o nitrogênio amídico da GLN participe da síntese de nucleotídeos, aminoácidos (asparagina), coenzimas (nicotinamida adenina dinucleotídeo [NAD]) e açúcares aminados (glucosamina). O glutamato pode ser convertido em uma reação de glutamato desidrogenase em  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) e amônia, utilizados para a síntese de glutatona e metabolizados através de glutamato semialdeído para formar prolina, ornitina, citrulina e arginina ou atuar como doador de grupo aminado na síntese de alanina, aspartato e serina. A amônia produzida nas reações de GA e glutamato desidrogenase é detoxificada no ciclo da ureia ou excretada pelos rins. O  $\alpha$ -KG produzido por reações de aminotransferase ou glutamato desidrogenase pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e servir como fonte do esqueleto de carbono para a síntese de glicose, glutamato ou aspartato, e o NADH pode ser utilizado para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) nas mitocôndrias. 1, amidotransferase de GLN; 2, glutaminase; 3, glutamato desidrogenase; 4, reações de aminotransferase. 3-PG, 3-fosfoglicerato; *Ala*, alanina; *Arg*, arginina; *Asn*, asparagina; *Asp*, ácido aspártico; *Cit*, citrulina; *OA*, oxalacetato; *Orn*, ornitina; *Pro*, prolina; *Pyr*, piruvato; *Ser*, serina.

Estudos mostraram que o intestino remove até 25% da glutamina presente no plasma, posicionando o intestino delgado como o local de maior importância para o metabolismo da glutamina. Suas observações identificaram a glutamina como a principal fonte de energia para o enterócito e como precursora de vias metabólicas essenciais, especialmente aquelas que levam à síntese de ornitina, citrulina, prolina e arginina.

Posteriormente, a glutamina foi reconhecida como um substrato respiratório mais significativo para o enterócito do que a própria glicose, mesmo em animais recém-nascidos (HOLECEK, 2013; KIM, 2011; KIM; KIM, 2017; SHAH; WANG; MA, 2020; WEINER; VERLANDER, 2013; WERNERMAN, 2011).

Em 1996, o grupo de pesquisa da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará (UPC/UFC), em parceria com a Universidade de Virginia (UVA), EUA, produziu, utilizando um método químico, um composto contendo uma alta concentração de glutamina, conhecido como alanil-glutaminil-glutamina. Além disso, o mesmo grupo desenvolveu um peptídeo de cadeia longa, rico em glutamina e com adição de arginina, utilizando tecnologia de DNA recombinante (LIMA, 1998).

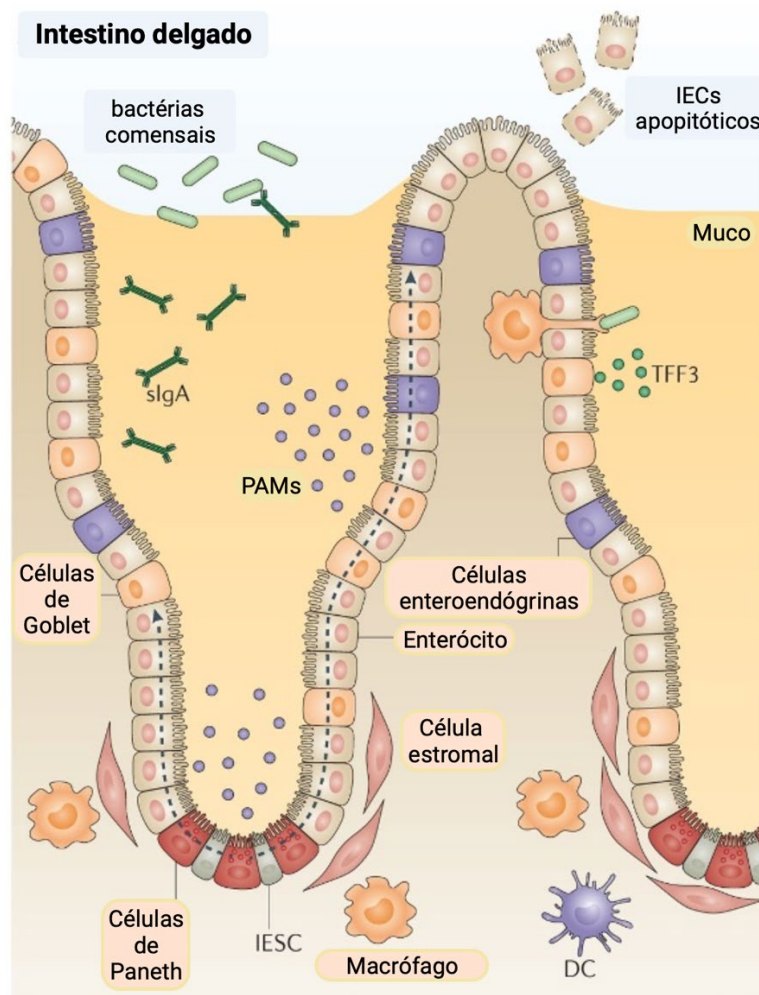
Diversas pesquisas têm confirmado os efeitos benéficos e de promoção do crescimento da mucosa gastrointestinal decorrentes da suplementação de glutamina ou dipeptídeos de glutamina por via parenteral ou enteral. Esses efeitos incluem a redução da atrofia intestinal, aumento da densidade celular no intestino delgado e grosso, bem como diminuição da permeabilidade intestinal e melhoria na função de barreira epitelial intestinal (CRUZAT *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2005, 2014, 2007; STEHLE; KUHN, 2015; VAN DEN BERG *et al.*, 2006; WERNERMAN, 2008, 2011).

#### **1.4. Barreira Morfofuncional Gastrointestinal e componentes extracelulares**

Além de conectar a microbiota intestinal com os diversos sistemas internos do hospedeiro, a barreira morfofuncional intestinal desempenha diversas e importantes funções, como a digestão e absorção de nutrientes, água e eletrólitos (**Figura 4**). Adicionalmente, contribui para a regulação da microbiota intestinal por meio da síntese e liberação de peptídeos antimicrobianos (ODENWALD; TURNER, 2013)

Conforme ilustrado na **Figura 4**, a barreira epitelial intestinal é composta por uma única camada de células colunares, localizada abaixo de uma camada de tecido conjuntivo conhecida como lâmina própria, responsável por nutrir as células epiteliais. Enquanto as vilosidades são projeções do epitélio em direção ao lúmen intestinal, as criptas são invaginações epiteliais presentes na mucosa do intestino (PETERSON; ARTIS, 2014).

**Figura 4** – Arquitetura do epitélio do intestino delgado e tipos de células presentes na barreira epitelial intestinal



Fonte: Adaptado no BioRender.com (PETERSON; ARTIS, 2014)

Desenho representativo e fotomicrografia da barreira morfofuncional intestinal. A) O esquema representa a barreira epitelial intestinal, mostrando as vilosidades e criptas. Na base da cripta, encontram-se as células-tronco, próximas às células de Paneth e células enteroendócrinas. Além dessas células, os enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas também compõem essa barreira. As células caliciformes são responsáveis pela secreção de muco, enquanto as células enteroendócrinas, de tamanho menor, secretam diversos hormônios intestinais. Já as células de Paneth secretam peptídeos antimicrobianos.

O epitélio intestinal passa por um processo contínuo de renovação, que pode levar de 5 a 7 dias para ser concluído. Esse processo é impulsionado pela atividade pluripotente das células-tronco intestinais, localizadas na base das criptas. Essas células-tronco proliferam, migram e se diferenciam em células absorptivas ou células secretoras, como as células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas (**Figura 4**) (PETERSON; ARTIS, 2014).

Os enterócitos, também conhecidos como células absorptivas ou células colunares, representam as células mais predominantes da barreira epitelial intestinal (**Figura 4**). Entre suas principais funções, destacam-se as atividades digestivas e metabólicas, facilitadas pela presença de microvilosidades em sua superfície apical (GHOSH *et al.*, 2021).

As células de Paneth estão localizadas na região inferior das criptas e desempenham o papel de secretar peptídeos antimicrobianos, como a lisozima e as defensinas, que desempenham um papel na modulação da microbiota intestinal e na proteção do hospedeiro contra agentes patogênicos. Essas células também sintetizam wnt e R-spondina, que contribuem para a atividade proliferativa das células tronco intestinais (HAYASE *et al.*, 2017).

As células caliciformes são responsáveis pela produção e secreção de mucinas, glicoproteínas cujo objetivo é lubrificar o epitélio intestinal e formar uma barreira que previne o contato de partículas grandes, incluindo patógenos, com a camada de células epiteliais (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). Enquanto as células enteroendócrinas desempenham a função de secretar diversos hormônios intestinais, como catecolaminas e peptídeos (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006).

Além das células epiteliais, linfócitos intraepiteliais também podem ser encontrados na barreira epitelial intestinal. Esses linfócitos estão localizados acima da membrana basal, mas subjacentes à junção firme, contribuindo para a resposta imune do hospedeiro (TURNER, 2009).

A absorção de nutrientes pela barreira epitelial intestinal ocorre por meio de duas vias: (1) a via transcelular, mediada por canais e proteínas transportadoras presentes na superfície celular, permitindo que as moléculas atravessem tanto a membrana apical quanto a membrana basolateral; e (2) a via paracelular, que ocorre por meio das junções apertadas (ou *Tight junctions*-TJs). (GENTON; CANI; SCHRENZEL, 2015; KEITA; SÖDERHOLM, 2018; MADARA, 1991; ZHANG *et al.*, 2020).

#### ***1.4.1. Morfologia da Barreira Gastrointestinal***

Uma das principais características morfológicas do intestino é a existência de vilosidades e criptas em sua arquitetura. As vilosidades se estendem para o lúmen



intestinal e são revestidas por uma única camada de epitélio colunar que contém células terminalmente diferenciadas. As criptas são invaginações epiteliais na mucosa do intestino, responsáveis pelo potencial proliferativo deste tecido (ORIA; BRITO, 2016).

À medida que as células migram das criptas em direção ao ápice, elas se diferenciam em enterócitos abortivos ou células secretórias, como células caliciformes, células de Paneth ou células enteroendócrinas. Esse processo reduz o ritmo de proliferação celular, levando à apoptose no ápice da vilosidade (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). O complexo juncional apical é necessário para a formação da barreira epitelial (ODENWALD; TURNER, 2016).

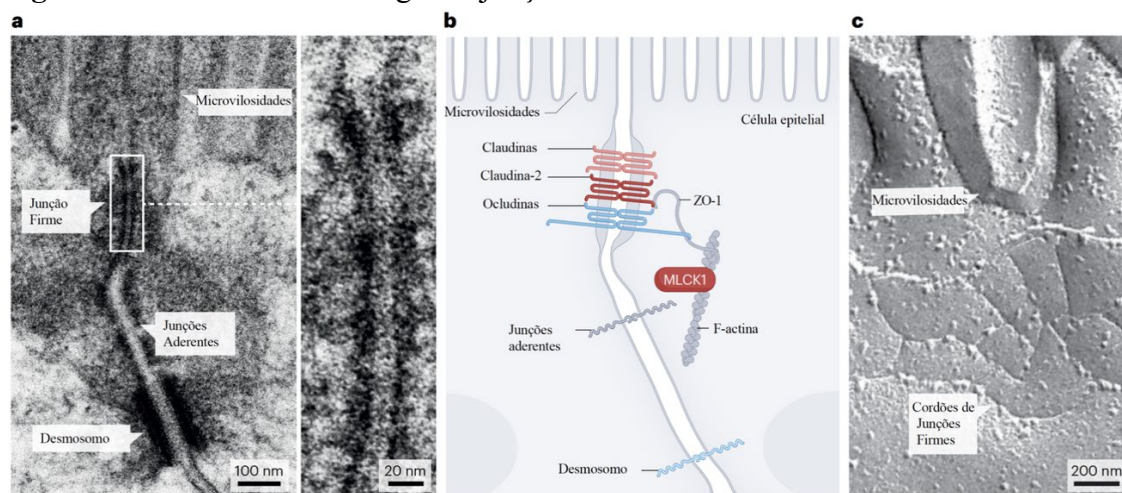
As células abortivas são reconhecidas pela presença de microvilosidades em sua superfície apical, enquanto as células caliciformes, em formato de cálice, se destacam pela produção contínua de mucina (uma glicoproteína) para lubrificar e proteger o epitélio intestinal (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). Já as células de Paneth estão localizadas na base das criptas e desempenham a função de secretar proteínas antibacterianas para proteger as células-tronco adjacentes (PETERSON; ARTIS, 2014). As células enteroendócrinas, por sua vez, são responsáveis pela secreção de diversos hormônios intestinais, incluindo catecolaminas (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006).

As células epiteliais intestinais interagem entre si através de três complexos juncionais: junções firmes, junções aderentes e desmossomos (**Figura 5**) (KARCZEWSKI *et al.*, 2010; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001).

O epitélio intestinal, quando íntegro, é composto por três complexos juncionais: junções firmes, junções aderentes e desmossomos, conforme ilustrado na Figura 5 (HOROWITZ, 2023). As junções firmes estão localizadas na região apical dos enterócitos e têm como função principal regular a permeabilidade paracelular a solutos. Elas são constituídas por um complexo de diversas proteínas transmembranares, proteínas citoplasmáticas e moléculas reguladoras (TURNER, 2009). Já as junções aderentes são formadas por proteínas transmembranares chamadas de caderinas, distribuídas da seguinte maneira: a cauda da E-caderina se liga à catenina- $\delta 1$  e à  $\beta$ -catenina, que, por sua vez, se liga à actina do citoesqueleto (TURNER, 2009). Esse complexo juncional é responsável pela adesão entre as células epiteliais, e sua ruptura resulta na perda do contato célula-célula e célula-matriz, bem como na perda da polarização celular, podendo

induzir à apoptose prematura por sinalização de células ineficazes (HERMISTON; GORDON, 1995).

**Figura 5** - Estrutura e morfologia da junção firmes



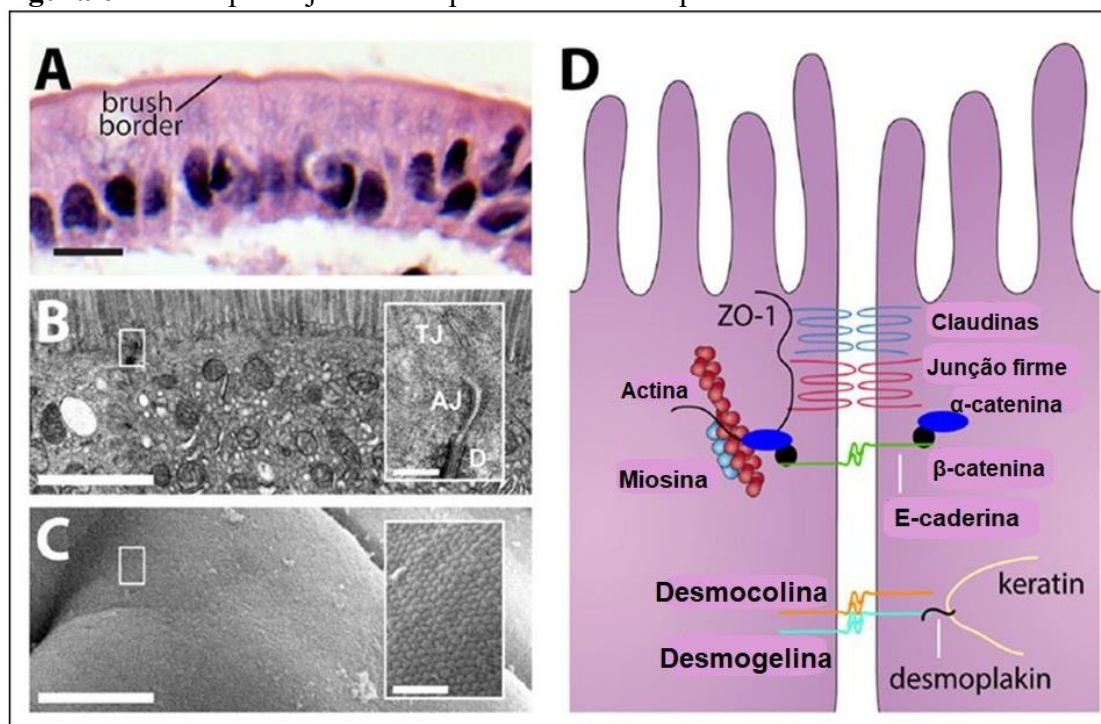
Fonte: Adaptado de ((HOROWITZ et al., 2023).

Estrutura e morfologia da junção apertada. **a)** Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a junção firme, a junção aderente e o desmossomo, que, juntos, compõem o complexo juncional apical. A junção firme está localizada logo abaixo da base das microvilosidades. A ampliação mostra a transição do espaço luminal, entre as microvilosidades, para a junção firme, onde o espaço paracelular morfologicamente detectável é obliterado. **b)** Esquema do complexo juncional apical mostrado na parte **a**, mostrando a localização das proteínas de junção firme zonula ocludens 1 (ZO-1), ocludina, claudina-2 e outros membros da família claudina. A quinase 1 de cadeia leve de miosina longa (MLCK1) está associada à actina F perijuncional e é um regulador chave da permeabilidade das junções estreitas. **c)** Micrografia eletrônica de fratura por congelamento mostrando cordões de junção firme na base das microvilosidades apicais.

#### 1.4.1.1. Junções Aderentes e Desmossomos

Fornecem as forças adesivas necessárias para manter as interações célula-célula. O componente mais conhecido das junções aderentes são as caderinas — proteínas transmembranares de uma única abrangência que interagem homotipicamente com a porção extracelular das caderinas nas células adjacentes. Na face citoplasmática, as caderinas interagem diretamente com a catenina p120 e a  $\beta$ -catenina, que por sua vez interagem com a  $\alpha$ -catenina. Entre outras funções, a  $\alpha$ -catenina regula a montagem de actina perijuncional, o que fornece mais resistência a essas estruturas. Além disso, a junção aderente é necessária para a montagem eficiente da junção apertada, uma função que estudos *in vitro* atribuíram à caderina epitelial (Ecadherin) e à  $\alpha$ -catenina (**Figura 6**) (ODENWALD; TURNER, 2017).

**Figura 6** - O complexo juncional apical da barreira epitelial intestinal



Fonte: Adaptado de (ODENWALD; TURNER, 2016)

O complexo juncional apical é necessário para a formação da barreira epitelial. A monocamada epitelial intestinal separa o conteúdo luminal da lâmina própria subjacente. **a)** Epitélio jejunal humano corado com hematoxilina e eosina, mostrando células formando uma borda em escova da comunidade. Barra de escala = 10 $\mu$ m. **b)** A microscopia eletrônica de transmissão do epitélio do intestino delgado mostra junções intercelulares, uma borda em escova de microvilosidades e exclusão de organelas da faixa densa de actina cortical logo abaixo da borda em escova. Barra de escala = 500 nm. Detalhe: complexo juncional apical, composto pela junção firme, junção aderente e desmossomo. Barra de escala = 200 nm. **c)** A microscopia eletrônica de varredura mostra a superfície da borda em escova contínua do intestino delgado. Barra de escala = 2  $\mu$ m. Detalhe: Matriz de microvilosidades densamente compactadas. Barra de escala = 500 nm. **d)** A microscopia eletrônica de fratura por congelamento mostra fios de junção rígida. Barra de escala = 100 nm. **e)** As células epiteliais são mantidas juntas e se comunicam por meio de junções. Esquemático representando proteínas transmembrana juncionais da junção firme (claudinas e proteínas MARVEL associadas à junção firme, junção aderente (E-caderina) e desmossomo (desmogelina e desmocolina) conectado ao citoesqueleto de actina via proteínas citosólicas (ZO1, cateninas e desmoplakin). Junções firmes e aderentes interagem com o citoesqueleto de actina e os desmossomos se conectam aos filamentos intermediários.

Os desmossomos formam estruturas que se conectam aos filamentos intermediários do citoesqueleto, proporcionando fortes ligações adesivas que mantêm a proximidade celular e servem como locais de comunicação intercelular. Recentemente, uma nova proteína humana conhecida como zonulina foi identificada como moduladora direta da permeabilidade intestinal. A expressão da zonulina de cadeia simples leva à ativação de moléculas de sinalização, como o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGR) e receptor ativado por proteínase 2 (PAR-2), resultando no aumento da permeabilidade (ORIÁ; BRITO, 2016).

### 1.4.1.2. Junções Firmes

As junções firmes estabelecem a formação de barreira em vários compartimentos dos corpos e sua principal função consiste em restringir o fluxo paracelular de acordo com o tamanho e carga dos solutos, contribuindo para manutenção da homeostase em órgãos e tecidos (ZIHNI *et al.*, 2016). Essas junções são estruturas complexas e dinâmicas, que incluem mais de 40 proteínas transmembranares e proteínas citoplasmáticas capazes de interagir com a célula adjacente (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004). São constituídas por três grupos de proteínas integrais de membrana — claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional — além de um número considerável de outras proteínas citoplasmáticas acessórias, como as zonula occluden (ZO), cingulina e outras proteínas guanilato-quinase associadas à membrana (ORIÁ; BRITO, 2016). As proteínas transmembranares coordenam e refinam os transportes via para celular, proporcionando assim uma barreira morfofuncional a diversas substâncias e moléculas (CAPLAN, 2008; TURNER, 2009).

As ocludinas, a família de claudinas e a tricelulina são proteínas que contêm quatro alças transmembranares e duas extracelulares, com os terminais N e C citoplasmático. As proteínas citoplasmáticas acessórias ZOs subdividem-se em ZO-1, ZO-2 e ZO-3 e conectam as proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina (**Figura 6**). Essa interação é necessária para a manutenção da integridade estrutural da função de barreira do epitélio intestinal (ORIÁ; BRITO, 2016; ZIHNI *et al.*, 2016).

Podendo esta função ser comprometida por diversos estímulos fisiológicos e patológicos (CAPLAN, 2008; TURNER, 2009). As junções firmes, localizadas no local de adesão celular mais apical entre as células epiteliais, são críticas para a formação da barreira paracelular seletiva através das interações hemofílicas e heterofílicas com as células adjacentes, que mantêm a hemóstase e determinam também o tamanho e a carga das moléculas que podem passar seletivamente pela barreira (SUZUKI, 2012; TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017).

As principais proteínas transmembranares são as claudinas e as proteínas do domínio MARVEL, que incluem as ocludinas, tricelulina e MARVEL3D (**Figura 7**) (ZIHNI *et al.*, 2016). O domínio MARVEL é um módulo hélice de quatro domínios transmembranares, geralmente associado a microdomínios de membrana ricos em

colesterol (ZIHNI et al., 2016). Outras proteínas também fazem parte do complexo transmembranares, como trispan, substância epicárdica de vasos sanguíneos (SEVS) e um grupo de proteínas de adesão transmembrana de intervalo único, que incluem as moléculas de adesão juncional (JAMs, do inglês *junctional adhesion molecules*), angulinas, receptor de adenovírus e vírus coxsackie (ZIHNI et al., 2016).

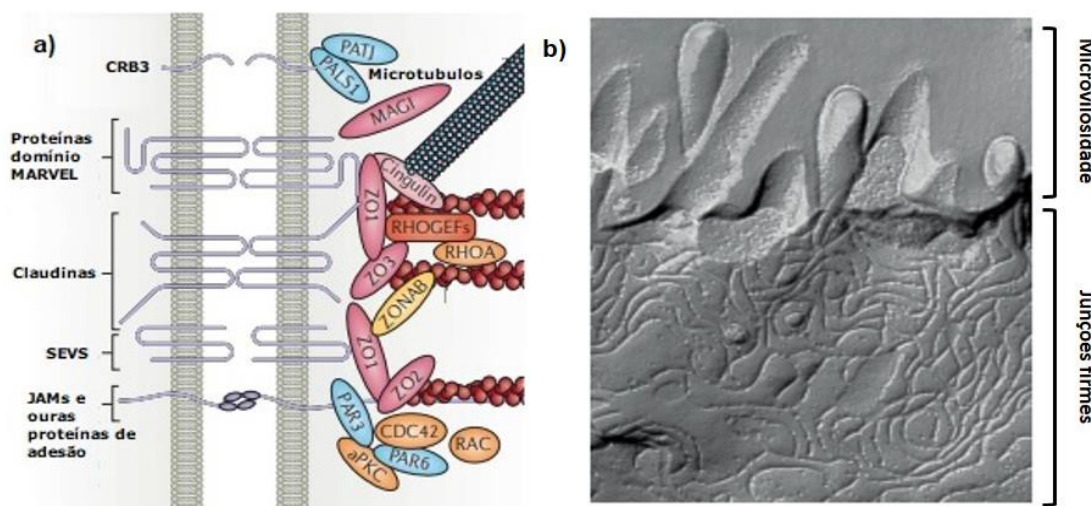
As proteínas citosólicas, também conhecidas como proteínas de placas, formam uma rede complexa que interage com os microtúbulos, a actina e os domínios citoplasmático das proteínas transmembranares, como mostrado na **Figura 7** (ZIHNI et al., 2016). Essas proteínas citoplasmáticas são caracterizadas por possuírem domínios PSD95–DlgA–ZO-1 (PDZ) e por regularem a função e a estrutura do complexo devido à sua associação com o citoesqueleto (SUZUKI, 2012; ULLUWISHEWA et al., 2011).

A regulação e interação das junções firmes com a actina e a miosina ocorre por diversas proteínas de sinalização, incluindo a proteína quinase C (PKC, do inglês *protein kinase C*), as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*), a miosina quinase de cadeia leve (MLCK, do inglês *mitogen-activated protein kinases*) e a família Rho de pequenas GTPases (ULLUWISHEWA et al., 2011). No intestino, existem diversas isoformas de PKC, como a PKC épsilon, que inibe a secreção de Cl<sup>-</sup> e a translocação apical PKC alfa, que diminui a resistência transepitelial (RT) (SONG et al., 2001). O MAPK é estimulado por fatores de crescimento e estresse, desempenhando um papel na prevenção da ruptura das junções sob estresse, como o gerado pelo peróxido de hidrogênio (PLOTNIKOV et al., 2011).

As MLCK, por sua vez, regulam a contração do anel actina e miosina, e sua inibição previne o aumento da permeabilidade nas junções firmes (TURNER et al., 1997). A família Rho de pequenas GTPases regula a estrutura e função das junções firmes, desempenhando também um papel importante no anel de actomiosina perijuncional (NUSRAT et al., 1995). A fosforilação das proteínas constituintes das junções firmes influencia a função de barreira. Por exemplo, foi relatado que uma menor fosforilação de ZO-1 em células de rim canino aumenta a resistência transepitelial (STEVENSON et al., 1989). Além disso, a fosforilação das ocludinas é importante para a sua associação nas junções firmes (WONG, 1997).

O transporte transcelular também pode ativar eventos de sinalização intracelular que regulam a função de barreira das junções firmes. Isso ocorre quando as concentrações de nutrientes no lúmen excedem a capacidade dos cotransportadores apicais de nutrientes e  $\text{Na}^+$ , como forma de amplificar a absorção transcelular de nutrientes (TURNER et al., 2009). Nesse caso, o cotransporte de  $\text{Na}^+$  e nutrientes desencadeia a contração do anel de actomiosina perijuncional (MADARA; PAPPENHEIMER, 1987), por meio da ativação de MLCK (TURNER et al., 2009). Dessa forma, as junções firmes apresentam uma ampla diversidade de proteínas formadoras e uma regulação extremamente complexa. Nesse contexto, iremos focar em três proteínas formadoras das junções firmes: claudinas, ocludinas e zonulas ocludens (ZO).

**Figura 7** – Anatomia das junções firmes das células epiteliais intestinais



Fonte: adaptado de Zihni et al. (2016, p. 2).

Legenda: a) Breve visão das principais proteínas formadoras de junções firmes. As proteínas transmembranas estão representados em cinza no lado esquerdo, dentre elas temos os fragmentos de proteínas homóloga 3 (CRB3); em seguida, as proteínas do domínio MARVEL, como a ocludina, tricelulina e proteína contendo domínio MARVEL 3. As claudinas são representadas mais abaixo, seguidas da substância epicárdica dos vasos sanguíneos (SEVS) e as moléculas de adesão juncional (JAMs) e outro tipo de proteínas de adesão. No lado direito, estão representadas as proteínas citosólicas adaptadoras e ligantes do citoesqueleto (ovais rosas) e bem como proteínas de polaridade (ovais azuis). As proteínas ligantes representadas são: zonula ocludens (ZO) ZO1, ZO2 e ZO3; cingulina; guanilato quinase associada à membrana invertida (MAGI). As proteínas de polaridade representadas incluem: particionamento defeituoso 3 (PAR3) e PAR6; proteína associada ao Lin-1 1 (PALS1); e junção estreita associada a PALS1 (PATJ). Alguns componentes de sinalização associados a junções firmes (ovais laranjas) representadas são: proteína quinase C atípica (aPKC); CDC42, RAC e RHOA, que são RHO GTPases; e seus reguladores, fatores de troca de nucleotídeos de guanina para RHO de pequenas GTPases (RHOGEFS; retângulo vermelho). Além disso, uma interação entre ZO1 e o regulador transcricional ZO1-associado proteína de ligação a ácido é mostrada (oval amarelo - ZONAB). A imagem também representa a associação das proteínas citosólicas com microtúbulos (filamentos em azul) e filamentos de actina (filamentos ovais em laranjas). b) Eletromicrografia de criofratura região apical de células epiteliais intestinais mostrando as microvilosidades e a rede de junções firmes.

#### 1.4.1.2.1. Ocludinas

A ocludina (do latim “*occludere*”, passagem restrita), uma fosfoproteína tetraspanina (65 kDa), foi a primeira proteína a ser identificada nas junções firmes (FURUSE *et al.*, 1993). Ela possui quatro domínios transmembranais, ligados a duas alças voltadas para o meio extracelular, ricas em tirosina no domínio intracelular C-terminal e N-terminal (SUZUKI *et al.*, 2015; SUZUKI, 2012). As duas alças extracelulares da ocludina interagem com as células adjacentes, criando uma barreira apenas para macromoléculas (AL-SADI *et al.*, 2011), enquanto o domínio C-terminal longo interage com ZO-1 para conectar a ocludina ao citoesqueleto, assegurando uma alta resistência elétrica das monocamadas das células epiteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (PERSIDSKY *et al.*, 2006; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Sua função deve ser vista mais em um contexto regulador do que como uma proteína estrutural importante no estabelecimento das propriedades da barreira (PERSIDSKY *et al.*, 2006).

No intestino, o nocaute de ocludina não afetou a densidade e organização de junções firmes, nem alterou a função de barreira e o transporte de íons (SAITOU *et al.*, 1998, 2000; SCHULZKE *et al.*, 2005). No entanto, um estudo mostrou que o nocaute de ocludina desencadeia inflamação e hiperplasia do epitélio gástrico, atrofia testicular e perda de grânulos citoplasmáticos da glândula salivar (SAITOU *et al.*, 2000). Além disso, o nocaute de ocludina tanto em células Caco-2, quanto em camundongos causam aumento da permeabilidade paracelular a macromoléculas (AL-SADI *et al.*, 2011). Um estudo também mostrou que a suplementação de zinco durante quadros diarreicos melhorou os escores fecais, diminuindo a permeabilidade intestinal associada ao aumento de ocludina e ZO-1 (ZHANG; GUO, 2009). Logo, esses trabalhos mostram um papel crucial dessa proteína na integridade da barreira e montagem das junções firmes.

#### 1.4.1.2.2. Claudinas

As claudinas (do latim *claudere*, fechar) compõem uma família de 27 proteínas (20-27 kDa) que possuem quatro domínios transmembranares, incluindo domínios C-terminal e N-terminal citoplasmáticos (TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). As alças

extracelulares das moléculas de claudinas estabelecem interações homofílicas e heterofílicas com células adjacentes, criando uma barreira ou poro, via paracelular, para a passagem seletiva de moléculas (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009; SUZUKI, 2020). Elas desempenham um papel amplo no controle da adesão celular e nas características da barreira paracelular (TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017). Dentre as proteínas transmembranares formadoras de junções firmes, as claudinas têm um papel fundamental na manutenção e função desse complexo (WADA et al., 2013; SUZUKI et al., 2013).

Estudos prévios determinaram vários subtipos de claudinas que estão envolvidos na estrutura e funcionamento das junções firmes (TAMURA *et al.*, 2011a; TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017; TSUKITA *et al.*, 2008; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001).

As claudinas identificadas até o momento possuem estrutura semelhante e padrões de expressão diferentes, com características seletivas de permeabilidade dependentes do número e das posições de aminoácidos carregados na primeira alça extracelular da proteína conferem propriedade funcionais diferentes para as diferentes claudinas (AMASHEH *et al.*, 2009; RAHNER; MITIC; ANDERSON, 2001). Como exemplo, as claudinas 2 e 15 que apresentam padrões de expressão e função diferentes entre a infância e a vida adulta (TAMURA *et al.*, 2011b; WADA *et al.*, 2013).

Estas proteínas podem ser classificadas como formadoras de função de barreira, diminuindo a permeabilidade paracelular; ou formadoras de poros, aumentando a permeabilidade paracelular (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009; SUZUKI, 2012; TSUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). As claudina-1, -3, -4, -5, -8, -9, -11, e -14 são exemplos de formadoras de barreira, enquanto claudina-2, -7, -12, e -15 são formadoras de poros (SUZUKI *et al.*, 2014). Diferentes padrões de expressão de claudinas em órgãos, tecidos e células epiteliais regulam sua variedade de funções (TOKUMASU; TAMURA; TSUKITA, 2017).

Claudinas formadoras de poros podem ser seletivas para cátions ou ânions. Por exemplo, as claudina-2 e -12 são formadoras de poros seletivas para cátions por possuírem 3 e 4 aminoácidos carregados negativamente na sua primeira alça extracelular (LU *et al.*, 2013; SUZUKI, 2012). Em geral, os poros têm o diâmetro de 4 a 8 Å, variando conforme o tecido, e permitem a difusão de macromoléculas de aproximadamente 30 a 40 Å (ZIHNI *et al.*, 2016). As claudinas formadoras de barreira possuem uma distribuição e orientação de aminoácidos que impedem a permeabilidade de moléculas carregadas e não carregadas



(LU *et al.*, 2013; SUZUKI, 2012). Além disso, a fosforilação de claudinas parecem desempenhar papel na localização e permeabilidade paracelular (SUZUKI, 2012).

Um estudo mostrou que a deficiência de claudina-1 gera uma perda severa de fluidos e eletrólitos, culminando em mortalidade no prazo de 24 horas após o nascimento (FURUSE *et al.*, 2002). Além disso, a manutenção adequada de claudina-2 e -15 são cruciais para o retorno de Na<sup>+</sup> ao lúmen intestinal, essencial para a adequada absorção de glicose, de aminoácidos e de lipídeos no intestino delgado (WADA *et al.*, 2013). Diversos estudos associaram ajuste de expressão de diferentes claudinas no intestino frente ao desafio com dietas deficientes (BROWN *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016; UENO *et al.*, 2011).

#### 1.4.1.2.3. Moléculas de Adesão Juncional

São o terceiro grupo de proteínas que compõem o grupo de proteínas membranares que estão envolvidas na construção das junções firmes. São membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig) e apresentam peso molecular de aproximadamente 43 kDa (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003). Três membros desta família (JAM-1, JAM-2 E JAM-3) já foram identificados e estruturalmente são constituídas por apenas um domínio transmembranar, um domínio extracelular N-terminal e pelo pequeno terminal carboxílico citoplasmático (SUZUKI, 2012).

#### 1.4.1.2.4. Zonulas ocludentes

As Zonulas ocludentes (ZOs) foram as primeiras proteínas específicas identificadas das junções firmes e foram identificadas como, ZO-1 (~220 kDa), ZO-2 (~160 kDa) e ZO-3 (~130 kDa) (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003; SUZUKI, 2012). As zonulas ocludentes (ZOs) são classificadas como membros homólogos da família de guanilato quinase associadas a membrana (MAGUK do inglês, *membrane-associated guanylate kinase*) (GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003). São proteínas compostas por três

domínios PDZ (PDZ-1, PDZ-2 e PDZ-3, do inglês *PSD95-DlgA-ZO-1,-2 e -3*), um domínio Src homologia-3 (SH3) e uma região homóloga para a guanilato kinase associada a membrana (GUK) no lado do N-terminal (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009; SUZUKI, 2012). Estes domínios são importantes por causa do seu papel no arranjo das proteínas, e consequentemente na integridade da membrana, regulação e manutenção dessa estrutura (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011).

As claudinas ligam-se ao primeiro domínio PDZ, as JAMs ligam-se ao terceiro domínio PDZ e a ocludina liga-se ao domínio GUK (ZIHNI *et al.*, 2016). O domínio SH3 liga ZO-1 a mecanismos de sinalização juncional por ligação à proteína de ligação de ácido nucleico associada a ZO1 (**Figura 7**), um regulador transcricional e pós-transcricional da expressão gênica, e a uma proteína de choque térmico APG2, também conhecida como HSP70RY (FANNING *et al.*, 1998; ZIHNI *et al.*, 2016). Nocautes de ZO-1 e ZO-2 individuais de ambos os adaptadores são letais ainda no período embrionário (KATSUNO *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2008). Estudo mostrou que a depleção de ZO-1 não é capaz de alterar a estrutura de junções firmes, mas desencadeia um atraso na organização de ocludina e claudinas (UMEDA *et al.*, 2004). Além disso, a depleção de um subtipo de zonula ocludentes parecem causar reajuste na expressão de outro. Por exemplo, o nocaute de ZO-3 em camundongos leva ao aumento do recrutamento juncional de ZO-2 (ADACHI *et al.*, 2006).

O trato gastrointestinal é o primeiro sistema afetado pela privação nutricional. A desnutrição é reportada por aumentar o transporte basal de íons de um estado neutro ou fluxo absorptivo para secretório, identificado pelo aumento da Corrente de Curto-Circuito basal (BUTZNER; GALL, 1988). Segundo estudo, o aumento do efluxo de íons para o lúmen intestinal na desnutrição pode ser uma resposta adaptativa do epitélio intestinal para aumentar o potencial de membrana e gerar uma força eletromotriz para o transporte de nutrientes (FERRARIS; CAREY, 2000). Alguns estudos corroboram essa hipótese ao mostrarem um aumento da Corrente de Curto-Circuito durante o desafio com glicose no jejuno e íleo desnutrido (BUTZNER; GALL, 1988; CAREY; COOKE, 1989; DARMON *et al.*, 1993; YOUNG; LEVIN, 1990). Apesar dos esforços, pouco se sabe sobre a absorção e expressão de transportadores de carboidratos, proteínas e lipídeos durante a desnutrição (JACOBI *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2023; SAMPAIO *et al.*, 2016). Além disso, a diversidade das deficiências nutricionais, a gravidade da desnutrição, o tempo de

desnutrição e o segmento intestinal avaliado tornam o estudo da fisiologia intestinal de absorção de nutrientes, bem como a barreira epitelial morfofuncional durante a desnutrição, um desafio para a ciência.

#### **1.4.2. Barreira Morfofuncional Gastrointestinal e Doenças**

Várias doenças intestinais e sistêmicas estão associadas ao aumento da permeabilidade gastrointestinal (GI), resultando no comprometimento da função de barreira intestinal e levando ao que é popularmente conhecido como síndrome do intestino permeável (MAES; KUBERA; LEUNIS, 2008; ODENWALD; TURNER, 2013).

Algumas doenças afetam principalmente o intestino, como a doença inflamatória intestinal, doença celíaca e síndrome do intestino irritável. Além dessas, existem doenças sistêmicas ou que envolvem outros sistemas orgânicos, como obesidade, diabetes tipo 2, doença do enxerto *versus host* (GVHD), AIDS, artrite reumatoide, Alzheimer, Parkinson, transtorno de depressão maior e transtorno do espectro do autismo (BARMAYER; FROMM; SCHULZKE, 2016; GENSER *et al.*, 2018; KEITA *et al.*, 2020; SCHOULTZ; KEITA, 2020; WANG *et al.*, 2020).

As doenças neuroinflamatórias são citadas como potencialmente causadoras de disfunção gastrointestinal. Entre essas doenças estão a esclerose múltipla, distúrbio do espectro da neuromielite óptica, distúrbio associado à glicoproteína de oligodendrócitos de mielina e encefalite autoimune. Doenças do sistema nervoso periférico que afetam o intestino incluem síndrome de Guillain-Barré, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, neuropatia sensorial-autonômica aguda/neuropatia motora-sensorial-autonômica aguda, ganglionopatia autonômica aguda, miastenia gravis e neuropatia autonômica aguda com síndrome paraneoplásica (SAKAKIBARA, 2021).

A análise funcional da barreira epitelial intestinal na doença pode ajudar na avaliação de intervenções dirigidas à prevenção de aumento da permeabilidade GI e melhoria da integridade do epitélio GI. Isso contribui para a otimização dos processos de digestão e absorção, melhorando assim o perfil nutricional. Além disso, pode fornecer suporte ao sistema imunológico, impedindo a passagem de microrganismos nocivos (VAN WIJCK *et al.*, 2011).

### 1.4.3. Permeabilidade Intestinal

A permeabilidade intestinal é quantificada pela facilidade com que substâncias e marcadores atravessam a superfície da mucosa intestinal por difusão, referindo-se à passagem não mediada de moléculas hidrofílicas de tamanho médio em direção a um gradiente de concentração, sem a assistência de um sistema transportador específico (FRANCE; TURNER, 2017; TRAVIS; MENZIES, 1992). Uma das funções cruciais do epitélio intestinal é manter uma barreira adequada, permitindo a passagem de nutrientes, água e íons, mas limitando a entrada de patógenos e toxinas bacterianas. Portanto, um aumento na permeabilidade intestinal indica uma disfunção na barreira intestinal (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Uma vez que a definição de permeabilidade intestinal está relacionada à passagem de solutos através de uma membrana simples, embora a membrana intestinal seja composta por várias camadas e tipos de células distintos, é necessário simplificar as medições da permeabilidade intestinal. Dessa forma, a permeabilidade intestinal pode ser avaliada medindo a resistência transepitelial (RT), que é a capacidade de difusão passiva da carga iônica através do epitélio, ou medindo a passagem de solutos através do epitélio por diferentes rotas de passagem (ANDERSON, 2001).

Os solutos podem atravessar o epitélio intestinal pela via paracelular, entre as células, ou pela via transcelular, passando através das células. A escolha da rota de passagem depende das propriedades do soluto, sugerindo que as alterações na forma como peptídeos e outros solutos atravessam o epitélio sejam de grande importância para compreender a fisiopatologia dos distúrbios gastrointestinais (HAROUN *et al.*, 2023; SCHAERER; NEUTRA; KRAEHENBUHL, 1991; SCHOULTZ; KEITA, 2020).

A rota paracelular refere-se à passagem entre as células por meio das junções apertadas e espaços intercelulares. Esse caminho é utilizado por moléculas hidrofílicas de tamanho médio ( $\leq 600$  Da *in vivo*;  $\leq 10$  kDa *in vitro* em linhagens celulares) e normalmente impede a passagem de moléculas proteicas, tornando-se uma barreira eficaz para macromoléculas antigênicas. As células epiteliais estão unidas entre si por complexos juncionais que consistem em junções apertadas, junções aderentes, desmossomos e junções gap (FARQUHAR; PALADE, 1963; HOLLANDER; KAUNITZ, 2020).

A via transcelular refere-se à difusão passiva através das células, sendo utilizada por lipídios solúveis e pequenos compostos hidrofílicos. Além disso, ocorre captação ativa e dependente de energia pelas células. Partículas e moléculas grandes, como proteínas e produtos bacterianos, que não podem atravessar a membrana celular ou o espaço paracelular, podem ser capturados por meio da endocitose. Nesse processo, a célula os engloba através da invaginação da membrana plasmática, seguida pela formação de vesículas. Após a endocitose, as substâncias engolidas são ativamente transportadas pelo citoplasma através da transcitose, o que é essencial para a vigilância de antígenos no trato gastrointestinal (GARCIA-CASTILLO; CHINNAPEN; LENCER, 2017). Tanto a endocitose quanto a transcitose são vias exploradas por microrganismos invasores para estabelecer a entrada no hospedeiro. Uma barreira intacta depende do correto funcionamento dessas vias e da capacidade das células de eliminar substâncias estranhas (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

A via pela qual moléculas, biomarcadores ou bactérias específicas utilizam para atravessar o epitélio pode ser uma informação relevante, dependendo do estudo. Diante disto, vários compostos são conhecidos por atuarem na modulação de vias paracelular e transcelular, como o IFN- $\gamma$  e TNF, que induzem rápidas mudanças na via paracelular, sem alterar a expressão das proteínas de junção, ou o dynasone, que inibe a endocitose/transcitose por meio da inibição da dinaína (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

## **1.5. Métodos de avaliação de Barreira Morfofuncional Gastrointestinal**

### ***1.5.1. Avaliação da Permeabilidade e Função de Barreira Intestinal In Vitro***

Diferentemente das metodologias *in vivo*, as técnicas *in vitro* proporcionam oportunidades para estudar processos mecanísticos da barreira intestinal, como sinalizadores de síntese proteica, moduladores da resistência transepitelial e aumento da permeabilidade. Além disso, é possível estudar células individuais humanas. Como resultado, é possível realizar estudos mais aprofundados utilizando os inibidores/estimuladores mencionados anteriormente nesses sistemas (YAKYMENKO *et al.*, 2018). A maior parte do conhecimento fundamental da fisiologia gastrointestinal foi

adquirida por meio de técnicas *in vitro*, e diversos métodos para estudos da mucosa intestinal *in vitro* foram desenvolvidos (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Uma das linhagens celulares amplamente utilizadas para estudar a função da barreira intestinal é a linhagem celular Caco-2, devido às suas expressas propriedades de transporte (SUN *et al.*, 2008). Originadas do cólon e desenvolvidas a partir de um adenocarcinoma do cólon humano, as células Caco-2 diferenciam-se espontaneamente em uma monocamada polarizada, exibindo diversas características morfológicas e funcionais semelhantes às do enterócito, típicas do intestino delgado. Isso é evidenciado pela morfologia cilíndrica polarizada das células, com microvilosidades na superfície apical e pela formação de junções apertadas entre elas, além da capacidade de sintetizar hidrolases, como a sacarose-isomaltase, conforme observado no intestino delgado (ZWEIBAUM *et al.*, 1983). As características específicas da linhagem celular Caco-2 podem variar dependendo do tempo de cultivo, sendo que um período mais longo resulta em características mais semelhantes ao intestino delgado (ENGLE; GOETZ; ALPERS, 1998). Além disso, um aumento no número de passagens celulares leva à seleção de células que crescem mais rapidamente, resultando em um aumento na Resistência Elétrica Transcelular (RT) e em uma expressão alterada de vários transportadores importantes para a função da barreira intestinal (SAMBUI *et al.*, 2005).

Além das células Caco-2, a linhagem celular T84 é amplamente utilizada em pesquisas voltadas para a função da barreira intestinal. Originárias do cólon, assim como as células Caco-2, as células T84 foram derivadas de uma metástase pulmonar de um adenocarcinoma colorretal. Essas células diferenciam-se espontaneamente em uma monocamada e, quando atingem a confluência, exibem características epiteliais absorptivas que são estrutural e funcionalmente maduras. No entanto, ao contrário da linhagem Caco-2, as células T84 não adquirem características semelhantes às do intestino delgado, mantendo, ao longo do processo de diferenciação, grande parte das características originais do cólon. Portanto, a linhagem celular T84 é considerada um modelo mais apropriado para estudos da função de barreira no cólon em comparação com a Caco-2 (DEVRIESE *et al.*, 2017).

A linhagem celular SK-CO15 é derivada de um adenocarcinoma de cólon humano e, quando cultivada em suportes de cultura celular impermeáveis, forma um epitélio

polarizado com complexos juncionais apicais e cúpulas (LE BIVIC; REAL; RODRIGUEZ-BOULAN, 1989; YOO *et al.*, 2012).

Essas células compartilham semelhanças com o epitélio cólico e não possuem os marcadores típicos de diferenciação encontrados no intestino delgado, diferentemente da sacarose-isomaltase (LE BIVIC; REAL; RODRIGUEZ-BOULAN, 1989). A linhagem celular SK-CO15 é particularmente reconhecida como um modelo para estudos que investigam a absorção de Na<sup>+</sup> através do epitélio intestinal, devido à sua expressão abundante do trocador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> primário do tipo 3 na borda em escova (YOO *et al.*, 2012). Além disso, as células SK-CO15 têm sido utilizadas em pesquisas que exploram a ruptura da barreira intestinal induzida por etanol (CHOPYK *et al.*, 2017), bem como na investigação da regulação da função da barreira intestinal por meio de adesões e junções apertadas (NAYDENOV *et al.*, 2012; SEVERSON *et al.*, 2010).

A linhagem celular HT29, derivada de um adenocarcinoma heterogêneo, assume uma estrutura que se assemelha ao epitélio intestinal quando diferenciada (ZWEIBAUM *et al.*, 1985). No entanto, é importante notar que as células HT29 não podem ser completamente comparadas aos enterócitos absorventes do intestino delgado, uma vez que não expressam todas as hidrolases e suas propriedades de transporte de íons são diferentes em comparação com os enterócitos presentes no intestino delgado (KLEIVELAND *et al.*, 2015).

Inicialmente utilizada para estudar diferentes aspectos dos cânceres humanos, a linhagem celular HT29 tem recebido atenção crescente devido à sua capacidade de expressar diversas características das células epiteliais intestinais. Graças à sua habilidade de produzir muco, essas variantes da linhagem celular HT29 são amplamente empregadas como modelos para investigar a adesão de bactérias comensais e patogênicas às células do hospedeiro (BERNET *et al.*, 1994; KLEIVELAND *et al.*, 2015). Além disso, essas linhas celulares são valiosas em estudos de permeabilidade, pois a camada de muco desempenha um papel essencial na barreira intestinal (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Embora seja fácil estabelecer linhas celulares separadas, é importante considerá-las como modelos simplificados do epitélio intestinal. Essas células não têm contato com células imunes e não recebem os sinais nervosos e estímulos luminiais que normalmente ocorrem no intestino, os quais têm um grande impacto na função da barreira intestinal (KEITA; SÖDERHOLM, 2010). Para desenvolver modelos *in vitro* mais realistas que

imitem o ambiente intestinal, foram criados ao longo do tempo diversos modelos de co-cultura, e até mesmo culturas triplas (DOSH *et al.*, 2018).

Para representar o intestino delgado, foram estabelecidos modelos de co-cultura combinando células Caco-2 com clones HT29-MTX, que produzem muco no epitélio intestinal (WALTER *et al.*, 1996; WIKMAN *et al.*, 1993). Diferentes proporções dessas duas linhas celulares na co-cultura foram investigadas anteriormente para criar condições que se assemelham à fisiologia mais relevante do ambiente *in vivo* do intestino delgado, mimetizando as diferentes regiões do intestino. Essas co-culturas formam uma monocamada com uma camada contínua de muco e têm sido utilizadas em estudos de permeabilidade intestinal (FERRARETTO *et al.*, 2018; ROCHA; VÉLEZ; DEVESA, 2012).

Recentemente, houve um foco significativo no desenvolvimento de técnicas que permitem a manutenção de células epiteliais intestinais (IECs) *in vitro* como organoides intestinais. Quando cultivadas em novos sistemas, as IECs recapitulam a fisiologia da estrutura tridimensional e a assinatura genética do epitélio intestinal original, formando organoides intestinais (SCHUTGENS; CLEVERS, 2020). Esses organoides contêm todas as células diferenciadas encontradas no epitélio intestinal, incluindo enterócitos absorptivos, células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth, células tuft e células M, o que os torna um modelo altamente interessante e útil para estudos sobre a função da barreira intestinal, conforme revisado por Nakamura (NAKAMURA, 2019). As células diferenciadas do epitélio intestinal têm origem em múltiplas linhagens derivadas de células-tronco intestinais (ISCs) (KURASHIMA *et al.*, 2017). As ISCs residem na base das criptas do epitélio intestinal e são capazes de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens (BEUMER; CLEVERS, 2016; BJERKNES; CHENG, 1999; MARSHMAN; BOOTH; POTTEN, 2002).

Sato *et al.* (SATO *et al.*, 2009) isolaram células das criptas do intestino delgado de camundongos, incorporaram-nas em matriz e permitiram que crescessem por um período prolongado, observando que as células se auto-organizaram em estruturas tridimensionais, os organoides do epitélio intestinal, na presença de fatores de crescimento. Atualmente, várias metodologias diferentes foram desenvolvidas para cultivar organoides de outras células intestinais, tornando possível gerar organoides a partir de células do cólon e células progenitoras intestinais fetais de roedores e humanos



(FORDHAM *et al.*, 2013; JUNG *et al.*, 2011; MUSTATA *et al.*, 2013; OOTANI *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2011; YUI *et al.*, 2012).

Essa metodologia também é utilizada para estabelecer organoides de pacientes que sofrem de diferentes doenças, como doença celíaca (FREIRE *et al.*, 2019) e doenças inflamatórias intestinais (DII) (NOBEN *et al.*, 2017). Os organoides intestinais cultivados em uma estrutura tridimensional proporcionam um modelo ideal para estudar as diferentes funções das células especializadas no epitélio intestinal. Por exemplo, estudos foram conduzidos usando sistemas de organoides intestinais para examinar a função das células caliciformes na fibrose cística (SCHWANK *et al.*, 2013), o controle da desgranulação pelas células de Paneth (FARIN *et al.*, 2014) e, mais recentemente, a função das células tuft (GERBE *et al.*, 2016; HOWITT *et al.*, 2016; VON MOLTKE *et al.*, 2016). Além disso, os organoides intestinais oferecem um modelo empolgante para estudar a função da barreira intestinal e as interações hospedeiro-micróbio (NAKAMURA, 2019).

### ***1.5.2 Avaliação da Permeabilidade e Função de Barreira Intestinal Ex Vivo***

#### *1.5.2.1. Método de Câmara de Ussing*

A técnica da Câmara de Ussing, desenvolvida inicialmente por Ussing e Zerhan em 1951 (USSING; ZERAHN, 1951), possui uma ampla gama de aplicações em estudos sobre transporte de íons, absorção de drogas, absorção de proteínas e processos fisiopatológicos em animais e humanos (HOLTUG; HANSEN; SKADHAUGE, 1996; SMITH, 1996; USSING; ZERAHN, 1951). Desenvolvida a mais de 70 anos, pelo biólogo dinamarquês Hans H. Ussing na busca do entendimento sobre o fenômeno do transporte ativo do sal NaCl, a técnica de avaliação de transporte iônico Câmara de Ussing (*Ussing's Chamber* or UC), veio fornecer um método valioso, e a muito tempo comprovado, de medição do transporte de eletrólitos, nutrientes e drogas através dos tecidos epiteliais (CLARKE, 2009; HAMILTON, 2011). O transporte ativo é a capacidade de um epitélio de mover íons ou nutrientes contra um gradiente elétrico e/ou de concentração, já tendo sido demonstrado por meio de experimentos com traçadores isotópicos (THOMSON *et al.*, 2019).

A pele de rã foi utilizada por Ussing e seus colaboradores devido sua capacidade de movimentar o NaCl da superfície da pele para o seu interior, agindo contra uma diferença de concentração de mais de 100 vezes. Nesta época existia uma grande dificuldade em distinguir o movimento de íons transportados de forma ativa pelas células epiteliais do que seria transportado de forma passiva através do transporte paracelular. Diante disto, Ussing utilizando a pele de rã dissecada e montada entre duas metades de câmaras, resolveu esse problema. Em ambos os lados da câmara, lado seroso e lado mucoso da pele de rã, ele perfundiou com soluções eletrolíticas idênticas e em mesmo volume. Assim, os movimentos de íons paracelulares impulsionados pelas forças passivas de concentração transepitelial e gradientes osmóticos e hidrostáticos foram eliminados (CLARKE, 2009; USSING; ZERAHN, 1951; VIDYASAGAR; MACGREGOR, 2016).

O método experimental idealizado por Ussing proporciona um sistema avançado que permite estudos mecanísticos abrangentes da barreira intestinal, permitindo o uso de inibidores e estimuladores. Atualmente, ainda é considerada a metodologia padrão ouro para avaliar a função da barreira intestinal, embora seja importante notar que o tecido é retirado de seu contexto natural, perdendo contato com nervos e conteúdo luminal (SCHOULTZ; KEITA, 2020). O princípio básico envolve a montagem do epitélio entre duas hemicâmaras contendo tampão constantemente oxigenado. Marcadores de permeabilidade podem ser adicionados ao perfusato na hemicâmara em contato com o lado mucoso, enquanto amostras são coletadas em intervalos de tempo específicos na câmara em contato com o lado basolateral. Eletrodos fornecem corrente ao sistema, e eletrodos de referência com pontes de sal de ágar monitoram parâmetros eletrofisiológicos (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

A técnica da câmara de Ussing oferece várias vantagens em comparação a outras técnicas *in vitro* para experimentos com tecido intestinal (SMITH, 1996). A possibilidade de suporte à viabilidade com oxigenação e circulação efetiva do fluido em ambos os lados do tecido, combinada com a capacidade de monitorar parâmetros eletrofisiológicos de membrana, a torna poderosa. Durante o experimento, as câmaras são mantidas a 37 °C, e os parâmetros eletrofisiológicos, como a diferença de potencial (DP), Corrente de Curto-Circuito (CCC) e resistência elétrica transmembranar (RT), que reflete a resistência elétrica das rotas paracelulares, são monitorados para verificar a viabilidade do tecido ao longo do experimento (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Uma das características comuns a todos os epitélios é a capacidade de manter uma DP, que depende da atividade das bombas de íons eletrogênicos na membrana celular epitelial. A força motriz transepitelial passiva criada pelo potencial elétrico espontâneo através do epitélio é eliminada pela fixação do potencial a zero com uma corrente externa passada através do epitélio. Ou seja, a corrente necessária para anular a DP é definida como CCC e reflete a atividade das bombas de íons. A RT, por sua vez, representa a resistência elétrica das rotas paracelulares, especialmente através das junções apertadas, sendo a mesma equivalente à soma do movimento de íons eletrogênicos através do transporte ativo (CLARKE, 2009; LI; SHEPPARD; HUG, 2004; SCHOULTZ; KEITA, 2020b; THOMSON et al., 2019).

Sendo assim, o movimento de íons medido pela CCC na UC (*Ussing Chamber*) é resultado do transporte ativo. Transportes epiteliais como acontece na membrana apical que é permeável ao íon sódio, ou na membrana basolateral permeável ao potássio, podem ser estudados utilizando a UC (CLARKE, 2009). Atualmente, o método é amplamente difundido e utilizado para praticamente todos os epitélios de origem animal, como o trato gastrointestinal, trato reprodutivo, vias aéreas, ductos exócrinos/endócrinos, plexo coroide e olhos (ABDULNOUR-NAKHOUL; NAKHOUL, 2021; CLARKE, 2009). Ademais, o método tem sido amplamente utilizado para estudos em culturas de células epiteliais, como um modelo alternativo e/ou complementar ao modelo *ex vivo* (ABDULNOUR-NAKHOUL; NAKHOUL, 2021; CLARKE, 2009; SCHOULTZ; KEITA, 2020).

A utilização de informações eletrofisiológicas, como Potencial Elétrico Transepitelial ( $V_t$ ), Corrente de Curto-Circuito (CCC), Resistência Transepitelial ( $R_t$ ), Condutância ( $G_t$ ) e Impedância ( $Z_t$ ), fornecidas pelo sistema de UC, é fundamental para compreender e avaliar a funcionalidade do epitélio intestinal e seus processos de transporte da mucosa em uma base molecular. As informações coletadas a partir da tensão ou potencial elétrico transepitelial (VT) e CCC em experimentações utilizando UC, foram capazes de mostrar que a secreção eletrogênica de  $Cl^-$  é um importante parâmetro não apenas para o estudo da fisiologia digestiva normal, mas também como um alvo para avaliação da diarreia secretora causadas por toxinas e mediada por inflamação (CLARKE, 2009; LI; SHEPPARD; HUG, 2004; SCHOULTZ; KEITA, 2020; THOMSON et al., 2019).

Alguns dos transportadores mais estudados envolvidos nesse processo de troca iônica incluem o regulador dos canais de  $\text{Cl}^-$  na membrana apical, conhecido como regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), os mecanismos de captação do cotransportador de  $\text{Cl}^-$  do  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (NKCC1) e o trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE2) na membrana basolateral. Além disso, há o transporte de glicose acoplado ao  $\text{Na}^+$  e a absorção de nutrientes acoplados ao  $\text{Na}^+$ , que foram importantes para a eventual descoberta do SGLT-1 e uma família de transportadores de hexose. Também se destaca o transporte eletroneutro de  $\text{NaCl}$  (AALBERS et al., 2022; LI; SHEPPARD; HUG, 2004; SEIDLER et al., 1997; WALKER et al., 2002).

Com o sistema de UC, é possível avaliar o transporte/absorção de moléculas, nutrientes, fármacos e toxinas, utilizando informações relacionadas à corrente detectada em transporte passivo, à diferença de potencial gerado sob uma corrente específica, ao bloqueio ou à estimulação de determinadas vias, bem como à corrente necessária para a ativação de determinados canais, proporcionando uma análise funcional direcionada (CLARKE, 2009; HAMILTON, 2011; HERRMANN; TURNER, 2016; LINDEMANN, 2001; SCHOULTZ; KEITA, 2020). Além dessas, outras investigações podem se beneficiar da utilização do método de UC, como pesquisas que busquem avaliar distúrbios ou doenças metabólicas, como obesidade e desnutrição, associadas, por exemplo, a disbiose intestinal e enteropatia ambiental a curto e longo prazo (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Em estudos realizados em modelos de infecção, utilizando proteínas bacterianas, como a toxina da cólera, e com proteínas de superfície viral, como a proteína Spike (proteína S) do SARS-CoV-2, a UC tem se mostrado como uma ferramenta valiosa no entendimento da dinâmica fisiológica destas partículas. Ademais, estudos que abordam as bases moleculares de entendimento sobre a COVID-19 propõem uma possível relação da interação por afinidade do SARS-CoV-2 com o canal de cloreto CFTR em epitélios estudados, o que pode ser investigado com o auxílio da UC (NASCIMENTO, 2022). Por exemplo, em um estudo realizado utilizando UC, foi verificado em intestino de camundongos Knockout para os canais CFTR, alterações na CCC, o que indicava mudança nos níveis de cAMP, presente na regulação da absorção de glicose acoplada ao  $\text{Na}^+$  (GRUBB, 1995; SEIDLER et al., 1997; WALKER et al., 2002).

É possível realizar estudos dinâmicos e/ou cinéticos de determinados fenômenos, bem como obter uma visão funcional do transporte ativo por meio de bombas, transportadores e trocadores via transcelular. Além disso, com a utilização do método de câmaras de Ussing, é possível estudar a permeabilidade ou permiselectividade proporcionada pela via paracelular. Esse método também permite o estudo e entendimento funcional das junções firmes, como as famílias de proteínas de adesão celular, nomeadamente as claudinas, presentes na superfície de cada célula epitelial. Essas proteínas são responsáveis por formar filamentos da barreira juncional apertada (AGUANNO *et al.*, 2021; CLARKE, 2009; SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Além da família de proteínas presentes em todos os epitélios, existem outras classes de proteínas intimamente envolvidas na formação das junções apertadas, entre as quais podemos citar as ocludinas e as proteínas ZO, bem como outros protagonistas dessa via. Qualquer alteração na conformação, arranjo ou estrutura dessas proteínas pode resultar em mudanças na função ou até mesmo na perda da função propriamente dita, dependendo do nível de alteração ou mutação e do epitélio afetado. Diante disso, informações relacionadas à funcionalidade e à natureza molecular do complexo formador das junções firmes podem ser estudadas pelo método de câmaras de Ussing, tanto a nível funcional quanto molecular, de dano e atividade. Essa abordagem, em associação com outros métodos, fornece um excelente suporte no estudo da barreira funcional intestinal (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Dentre os métodos, o mais utilizado na avaliação da permeabilidade e da integridade da barreira intestinal é o teste de permeação dos carboidratos lactulose/manitol, que permite avaliar tanto a permeabilidade quanto possíveis danos na barreira intestinal (CLARKE, 2009; SCHOULTZ; KEITA, 2020). O método consiste em administrar uma solução composta por 5 g de lactulose e 1 g de manitol por via oral ao paciente. Após a ingestão, a urina excretada é coletada ao longo de um período de 2 a 5 horas. Posteriormente, a urina é processada e submetida à análise por meio da técnica de cromatografia em HPLC, que, em plataformas mais robustas, pode ser acoplada à espectrometria de massa. Isso permite avaliar a presença e quantificação dos carboidratos ingeridos, estabelecendo uma associação entre lactulose/manitol e os processos de transporte, permeação, absorção e danos na barreira intestinal (MAGALHÃES, 2021).

Já se tem feito algo similar utilizando UC, como por exemplo, a medições de fluxo isotópico, o que levou a entendimento sobre uma ampla variedade de características e regulação dos trocadores acoplados de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (FIELD, 2003; KIELA; GHISHAN, 2016). A técnica consiste em medir o fluxo de passagem de íons, moléculas ou substratos, do lado apical para o lado basolateral ou virse-versa, por meio da utilização de isótopos detectáveis ou realizando a marcação dessas estruturas por fluorescência, sendo possível a detecção por espectrometria (CLARKE, 2009).

Partindo desse princípio versátil de utilização das câmaras de Ussing (UC) e da busca pela otimização dos métodos de avaliação da barreira funcional intestinal e permeabilidade, especialmente no contexto da pesquisa, nosso grupo tem realizado estudos iniciais. Utilizamos o teste de lactulose/manitol já existente, porém com uma abordagem *ex vivo*. Isso torna a análise da barreira funcional intestinal ainda mais robusta e versátil, permitindo que a permeabilidade seja avaliada em conjunto com a técnica de microscopia de luz (LM) em UC. Além disso, estudamos o transporte e/ou cotransporte através do fluxo de íons e substratos, como glicose, glutamina e alanil-glutamina, em experimentos *ex vivo* em UC usando segmentos de intestino.

Existem técnicas de investigação mais atualizadas que fornecem uma melhor resolução da fisiologia molecular das proteínas e transportadores presentes no epitélio. Entre essas técnicas, destacam-se o patch-clamp e a microscopia de fluorescência, como marcações por anticorpos específicos. Essas técnicas são vantajosas por possibilitar uma definição baseada no isolamento e amplificação de sistemas de expressão heterólogos (CLARKE, 2009). No entanto, a aplicação dessas técnicas em modelos animais de função de barreira ou em epitélio/biópsias *ex vivo* é um tanto limitada pelas dificuldades técnicas de execução.

### ***1.5.3. Avaliação da Permeabilidade e Função de Barreira Intestinal In Vivo***

Muitas são as condições associadas ao aumento da permeabilidade paracelular e transcelular do epitélio intestinal. Além disso, novas abordagens interessantes que avaliam de diferentes formas a funcionalidade da barreira epitelial poderiam ser complementadas umas com outras técnicas para fortalecer esses achados. Novas técnicas

de avaliação funcional do intestino, investigando a permeabilidade pelas vias paracelular e transcelular, podem ser utilizadas em abordagens *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Os marcadores inflamatórios intestinais e a composição da microbiota intestinal desempenham um papel essencial na homeostase da barreira intestinal e são complementos importantes em estudos da função da barreira intestinal — principalmente ao investigar os mecanismos subjacentes de uma barreira intestinal perturbada (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Há vários testes e marcadores utilizados para avaliar a permeabilidade intestinal e as doenças a ela associada, alguns dos quais podem ser relacionados com a função de barreira intestinal. Alguns deles avaliam biomarcadores relacionados à inflamação intestinal ou sistêmica e à resposta imune associadas a doenças relacionadas com a permeabilidade, como biomarcadores auto-anticorpos (anticorpo anticitoplasma de neutrófilos), biomarcadores sorológicos (Proteína C-reativa) e biomarcadores mais complexos e refinados por métodos de biologia molecular (Padrões Moleculares Associados a Patógenos – PMAPs), bem como também a composição da microbiota intestinal (ORIÁ; BRITO, 2016; SCHOULTZ; KEITA, 2020).

As primeiras abordagens empregadas para investigar a integridade da função da barreira intestinal consistiram em testes de permeabilidade *in vivo*, nos quais solutos eram administrados por via oral e posteriormente excretados na urina (FORDTRAN *et al.*, 1965). Essas observações iniciais foram seguidas por estudos que utilizaram biomarcadores de diferentes tamanhos, capazes de serem absorvidos em várias partes ao longo do trato gastrointestinal e, então, excretadas na urina. A análise das concentrações urinárias destes marcadores proporciona uma visão geral da permeabilidade intestinal, sendo aplicável tanto para avaliar a permeabilidade do intestino delgado quanto do intestino grosso. A aplicação dessa metodologia tem sido direcionada para estudos iniciais sobre a permeabilidade do intestino delgado em pacientes com DII (Doenças Inflamatórias Intestinais) e em análises da Disfunção Entérica Ambiental (DEA) (KOSEK *et al.*, 2017; SCHOULTZ; KEITA, 2020).

O método envolve o uso simultâneo de marcadores de tamanho de poros pequenos (5-8 Å) e marcadores de tamanho de poros grandes (9,5-11 Å). A permeabilidade intestinal é calculada a partir da relação entre a passagem do marcador de poros grandes

e o marcador de poros pequenos, em que o marcador de poros pequenos representa o fluxo consistente através da mucosa (VAN WIJCK *et al.*, 2013). Ao utilizar essa proporção, os fatores de confusão dentro de cada indivíduo são levados em consideração e ajustados (GROOTJANS *et al.*, 2010).

As alterações nas junções apertadas são prontamente detectadas por mudanças no RT (TANG; GOODENOUGH, 2003). No entanto, para investigar a permeabilidade intestinal e a integridade de tecidos ou modelos de cultura celular, são necessárias medições de marcadores de permeação de diferentes tamanhos. Dependendo do tamanho, esses marcadores são utilizados como sondas paracelulares ou transcelulares em estudos *in vitro* e *ex vivo*. Além disso, as bactérias podem ser utilizadas não apenas como marcadores de permeabilidade, mas também para estudar interações com o epitélio (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Em alguns estudos de permeabilidade intestinal, são utilizados marcadores de passagem paracelular, isto é, aqueles cuja passagem ocorre através da via paracelular, como o 51Cr-EDTA, uma molécula com peso molecular de 384 Da. Quando o 51Cr-EDTA é ligado a um marcador radioativo de ligação extremamente forte como o Cr, ambos passam juntos, permitindo uma avaliação precisa da permeabilidade cólica tanto em estudos *in vivo* quanto *ex vivo* (DAHLGREN *et al.*, 2017; IRVINE; MARSHALL, 2000; KEITA *et al.*, 2006). Já o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)-Dextrano, traz uma alternativa para o uso de marcadores radiomarcados conjugados aos fluorocromos. O FITC-dextran 4000 é um sacarídeo fluorescentemente marcado com um peso molecular de 4 kDa. Essa sonda paracelular de FITC-dextran 4000 é amplamente utilizada para investigar a permeabilidade intestinal *in vitro* (BEHRENS *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2015). Uma vantagem significativa do uso do FITC-dextran 4000 em relação ao 51Cr-EDTA, por exemplo, é que ele não é radiomarcado, tornando o seu uso mais prático. Estudos com biópsias realizadas em câmaras de Ussing confirmaram que tanto o FITC-dextran 4000 quanto o 51Cr-EDTA fornecem resultados semelhantes em relação à permeabilidade paracelular (WALLON *et al.*, 2011).

Os polietilenoglicóis (PEG) são polímeros disponíveis em diferentes tamanhos (por exemplo, 400, 600, 900, 1000, 3000, 4000 Da) que podem ser analisados por espectrometria de massa. Em contraste com outras sondas paracelulares, que fornecem informações limitadas sobre alterações de permeabilidade, o método que envolve o uso



de PEG de diferentes tamanhos permite medir o nível de dano na permeabilidade a partir do tamanho do polímero capaz de permear o epitélio. Portanto, os experimentos que utilizam PEG com diferentes pesos moleculares proporcionam uma investigação da regulação funcional da via paracelular e são uma ferramenta essencial para determinar tanto o tamanho do poro quanto a via de vazamento paracelular. Como mencionado anteriormente, PEG de 400 e 1000 Da são sondas comuns em experimentos *in vivo* (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2011; WATSON; ROWLAND; WARHURST, 2001).

O LúCIFer Amarelo é uma molécula fluorescente de tamanho 444 Da que é conhecida por atravessar as células por difusão passiva. Sua presença pode ser detectada usando microscópio de fluorescência para estudos de captação e fluorimetria para estudos de passagem (com um comprimento de onda de excitação de 424 nm e comprimento de onda de emissão de 525 nm). O LúCIFer Amarelo tem sido amplamente utilizado em estudos de permeabilidade paracelular tanto em configurações *in vitro* (STRUGARI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2014) como *in vivo*, especialmente em pesquisas relacionadas à absorção de drogas (ROZEHNAL *et al.*, 2012; THOMSON *et al.*, 2019).

Uma maneira de visualizar a passagem paracelular de macromoléculas é por meio do uso de sondas marcadas com biotina. Em 2016, Richter *et al.* desenvolveram um novo método para a imagem dos locais de passagem paracelular (RICHTER *et al.*, 2016); esse método foi recentemente aprimorado por Krug *et al.* (2018). O ensaio sanduíche é baseado no sistema avidina-biotina e inclui dextrans biotinilados e conjugados com fluorescência, que se ligam às membranas basolaterais das células epiteliais previamente marcadas com avidina aderente a células. A solução da sonda pode consistir em um único dextrano biotinilado ou uma sequência de dextrans biotinilados de vários tamanhos e rótulos fluorescentes (Krug *et al.*, 2018; Schoultz & Keita, 2020).

Já como marcadores de passagem transcelular, o HRP é um antígeno proteico com um peso molecular de 45 kDa, utilizado como um marcador para investigar a captação de proteínas com potencial antigênico, que pode desencadear respostas imunes em seres humanos. Sob condições normais, observou-se que a HRP atravessa as células por meio de macropinocitose. A detecção da HRP é facilitada por ensaios de ELISA e tem sido frequentemente empregada em estudos de permeabilidade realizados em câmaras de Ussing. Uma vantagem adicional da HRP é a possibilidade de ser visualizada por microscopia eletrônica (SCHOULTZ; KEITA, 2020). Outra opção é usar partículas ou

bactérias conjugadas com marcadores fluorescentes, que podem ser estudadas, inclusive, em câmaras de Ussing (DESAI *et al.*, 1997; MCCLEAN *et al.*, 1998; WAN; PARK; LAU, 1993).

Após o reconhecimento de sua existência e a necessidade de aprimorar a compreensão associada à Disfunção Entérica Ambiental (DEA) (ROGAWSKI; GUERRANT, 2017), o número de biomarcadores não invasivos para esse propósito tem aumentado consideravelmente, abrangendo diferentes aspectos da fisiologia e integridade do intestino. Um dos biomarcadores mais comumente utilizados para a DEA é o teste que avalia a razão lactulose:manitol (L:M), o qual tem sido empregado para demonstrar modificações na permeabilidade intestinal (KOSEK *et al.*, 2017; LOSTIA *et al.*, 2008).

#### *1.5.3.1. Teste Lactulose: Manitol*

Para o teste é utilizado os carboidratos lactulose e manitol, que são administrados misturados em solução única aos pacientes. A passagem de ambos pela barreira epitelial intestinal ocorre, respectivamente, pela via paracelular e transcelular (MAGALHÃES, 2021). Na primeira via de passagem, moléculas com tamanho maiores do que 0,5 nm, que permeiam a mucosa intestinal, passam através de canais maiores (6,5 nm de raio), presentes nas junções firmes (VOJDANI, 2013). Já na segunda via, a transcelular, moléculas com tamanho menores do que 0,4 nanômetros (nm) passam pela membrana celular dos enterócitos através de pequenos poros aquosos (0,4 a 0,7 nm).

A avaliação da passagem destes carboidratos, é feita por meio do cálculo da razão destes sacarídeos na urina (taxa de Lactulose:Manitol) e mensurada após 2-5 horas da ingestão da solução teste (MAGALHÃES, 2021; VANUYTSEL; TACK; FARRE, 2021; VOJDANI, 2013). A base do teste consiste na permeação passiva do manitol através da mucosa, fornecendo uma indicação da área de superfície do intestino delgado. Por outro lado, a lactulose não é absorvida pelo enterócito e, em um intestino delgado saudável, apenas uma pequena quantidade é absorvida via paracelular. No entanto, em caso de dano ou alteração do epitélio mucoso, uma quantidade maior de lactulose atravessa a barreira funcional intestinal. Esses carboidratos permanecem no líquido extracelular do organismo e são prontamente excretados, sem sofrer alterações, pelos rins. Conseqüentemente, a

quantidade excretada na urina reflete a quantidade que atravessa o epitélio intestinal (MAGALHÃES, 2021; VAN WIJCK *et al.*, 2013; VANUYTSEL; TACK; FARRE, 2021; VOJDANI, 2013).

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para quantificar lactulose e manitol em amostras de urina. Além dos métodos enzimáticos, destacam-se a cromatografia gasosa, cromatografia líquida, cromatografia de troca iônica e eletroforese capilar. Entre essas alternativas, a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography*) ganhou destaque como um dos métodos mais prevalentes devido à sua simplicidade, precisão, velocidade e capacidade de automação. Recentemente, a Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-MS) tem sido considerada a plataforma ideal devido à sua alta seletividade, sensibilidade e eficiência (GERVASONI *et al.*, 2018; KUBICA *et al.*, 2012; MAGALHÃES, 2021).

#### ***1.5.4 Biomarcadores para avaliação de Função de Barreira Intestinal***

A busca por identificar biomarcadores confiáveis, que, a partir da corrente sanguínea, possam ser utilizados na avaliação da permeabilidade intestinal, tem sido o foco de muitos pesquisadores da área na última década. Dentro desta perspectiva, uma das primeiras proteínas utilizadas com resultados promissores está a zonulina (47 kDa), um análogo endógeno humano da enterotoxina bacteriana zonula occludes toxina.

Foi sugerido que a zonulina exerce um papel na regulação da permeabilidade intestinal ao desmontar os complexos proteicos das junções apertadas no epitélio intestinal (FASANO *et al.*, 2000). Pertencente à família de proteínas de reação aguda, a zonulina é um precursor da haptoglobina-2 (TRIPATHI *et al.*, 2009). Acredita-se que os níveis séricos ou plasmáticos de zonulina possam refletir a permeabilidade intestinal, e vários distúrbios têm sido associados ao aumento desses níveis (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Outro biomarcador de disfunção de barreira intestinal são as Proteínas de Ligação de Ácidos Graxos (FABP do inglês: *Fatty Acid Binding Proteins*). Elas são proteínas citosólicas com aproximadamente 15 kDa que têm a função de se ligar e transportar ácidos graxos. Além de serem encontrados no intestino, também são presentes no coração,

fígado, músculos e tecido adiposo (NIEWOLD; MEINEN; VAN DER MEULEN, 2004). Nos enterócitos intestinais, principalmente na parte absorvente do epitélio das vilosidades intestinais, são expressas tanto as proteínas de ligação de ácido graxo do tipo hepático (L-FABP; FABP1) quanto as proteínas de ligação de ácido graxo intestinal (I-FABP; FABP2) (GAJDA; STORCH, 2015). Durante episódios de isquemia intestinal e diversas doenças do intestino delgado, o epitélio intestinal sofre danos e o I-FABP é liberado para a corrente sanguínea, podendo ser detectado no plasma (KANDA *et al.*, 1992).

Também usado como biomarcador, a Citrulina é um aminoácido não proteico produzido principalmente pelos enterócitos presentes no intestino delgado, tendo a glutamina como seu precursor (DECHELOTTE *et al.*, 1991; VAN DE POLL *et al.*, 2007). Acredita-se que a citrulina possa ser um marcador de redução da massa epitelial do intestino (CRENN; MESSING; CYNOBER, 2008). Uma revisão sistemática recente demonstrou que a citrulina está inversamente correlacionada com a gravidade das doenças intestinais, como a doença celíaca e a doença de Crohn (FRAGKOS; FORBES, 2018). Portanto, acredita-se que a perda de massa epitelial no intestino delgado resulte em um aumento na permeabilidade intestinal. Estudos revelaram que os níveis circulantes de citrulina diminuem em pacientes submetidos a transplantes de células-tronco hematopoéticas devido à ocorrência de mucosite oral e gastrointestinal, que leva à perda de massa epitelial, resultado da terapia mieloablativa intensiva (CRENN; MESSING; CYNOBER, 2008; SCHOULTZ; KEITA, 2020).

O Peptídeo Semelhante ao Glucagon – 2 (GLP-2 do inglês: *Glucagon-Like Peptide - 2*), também tem sido usado como biomarcador de função de barreira. Este é um produto derivado do glucagon e considerado um fator de crescimento específico para o intestino. Ele é secretado pelas células L, uma categoria de células enteroendócrinas, presentes no epitélio intestinal (HOLST, 2007). O papel primordial do GLP-2 é sugerido como sendo a manutenção do crescimento e da função absorvente das vilosidades intestinais, conforme revisado por Drucker e Yusta (DRUCKER; YUSTA, 2014). Em estudos com camundongos, o GLP-2 demonstrou reduzir o transporte paracelular de íons e pequenas moléculas, bem como inibir a captação endocítica de macromoléculas. Portanto, uma diminuição nos níveis de GLP-2 pode indicar uma possível perturbação na função de barreira intestinal (BENJAMIN *et al.*, 2000).

Os níveis da endotoxina presente na membrana externa na maioria das bacteriana gram-negativas, LPS, têm sido considerados como um possível marcador de aumento da permeabilidade intestinal, mais especificamente, um indicador de translocação bacteriana (HOLLANDER; KAUNITZ, 2020). A endotoxemia, ou seja, o aumento dos níveis séricos de LPS originários da microbiota intestinal, devido ao aumento da permeabilidade intestinal, tem sido associada a várias doenças (MUNFORD, 2016). A hipótese sugere que estressores fisiológicos, como componentes da dieta, estresse psicológico ou condições que causam um desequilíbrio na microbiota intestinal, podem perturbar a barreira intestinal, levando a um aumento na permeabilidade e, conseqüentemente, a uma maior entrada de bactérias e endotoxinas na circulação sistêmica, o que poderia contribuir para a inflamação sistêmica e desencadear diversas doenças (HOLLANDER; KAUNITZ, 2020). A barreira intestinal evoluiu para proteger o corpo contra substâncias inofensivas e interações diretas com a microbiota intestinal. Portanto, a toxicidade só ocorre quando a barreira é comprometida, permitindo que bactérias e endotoxinas bacterianas, como o LPS, alcancem a membrana basal dos enterócitos e o tecido subjacente. Na maioria dos casos, o sistema imunológico lida com a inflamação, mas em casos raros, as bactérias podem atingir a corrente sanguínea e, se produzirem altas quantidades de LPS, podem causar choque séptico (OPAL, 2010).

Diante das dificuldades em mensurar e interpretar o LPS, a Proteína de Ligação ao LPS (LBP do inglês *LPS-Binding Protein*), tem despertado muito interesse como um marcador da reação imune ao LPS e, portanto, como um indicador indireto de endotoxemia (CITRONBERG *et al.*, 2016). A LBP é uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos, que se liga ao LPS bacteriano. O complexo LPS-LBP interage ainda mais com o CD14, o que desencadeia uma cascata de resposta inflamatória (FENTON; GOLENBOCK, 1998). Os níveis de LBP na circulação sistêmica têm sido associados a dietas ricas em gordura, obesidade e DII (CITRONBERG *et al.*, 2016).

Outros importantes biomarcadores são os marcadores fecais de permeabilidade intestinal e marcadores de inflamação intestinal, como a alfa ( $\alpha$ )-1-antitripsina (AAT), um dos inibidores de serina protease mais comuns na corrente sanguínea (GOOPTU; LOMAS, 2009). Essa proteína é principalmente produzida pelo fígado, mas também é secretada por várias células, incluindo macrófagos, enterócitos (MULGREW; TAGGART; MCELVANEY, 2007) e células Paneth (MOLMENTI; PERLMUTTER;

RUBIN, 1993). Uma das principais funções da AAT é proteger os tecidos da atividade proteolítica das células do sistema imunológico, especialmente os neutrófilos (GOOPTU; LOMAS, 2009). Observou-se que o nível de AAT está correlacionado com a atividade da doença na doença de Crohn, e a depuração fecal de AAT é um indicador da gravidade clínica da DII (KARBACH; EWE; BODENSTEIN, 1983). Devido à sua resistência à degradação por enzimas intestinais, a AAT tem sido utilizada como um marcador de permeabilidade intestinal, especialmente em estudos que investigam a permeabilidade em disfunções entéricas ambientais (DEA) (CAMPBELL *et al.*, 2017; MCCORMICK *et al.*, 2019), doença hepática (WANG *et al.*, 2015) e, mais recentemente, na doença de Parkinson (SCHWIERTZ *et al.*, 2018).

Portanto, a AAT é frequentemente avaliada juntamente com a mieloperoxidase fecal e a calproteína (CAMPBELL *et al.*, 2017; KEUSCH *et al.*, 2014; MCCORMICK *et al.*, 2019), como uma medida da atividade dos neutrófilos e da inflamação intestinal subclínica (DI RUSCIO *et al.*, 2018). Outros marcadores de inflamação intestinal que podem ser avaliados para complementar as medições de AAT e outros marcadores de permeabilidade *in vivo* incluem a lipocalina fecal ou sérica 2 (LCN2) (DE BRUYN *et al.*, 2014, 2015; DI RUSCIO *et al.*, 2018; ZOLLNER *et al.*, 2021) e a proteína amiloide A sérica (YARUR *et al.*, 2017).

A LCN2 é produzida por células epiteliais intestinais, entre outros tipos de células (MOSCHEN *et al.*, 2017), e seu nível aumenta em resposta a estímulos pró-inflamatórios, como citocinas ou ativação de receptores tipo Toll (CHAKRABORTY *et al.*, 2012). O nível sérico de LCN2, em complexo com metaloproteinase 9, demonstrou estar correlacionado com a atividade da doença na DII (DE BRUYN *et al.*, 2014, 2015) e é proposto como um marcador substituto para a cicatrização da mucosa. Da mesma forma, a proteína amiloide A de fase aguda tem sido investigada na DII (YARUR *et al.*, 2017). O amiloide sérico A é uma proteína de fase aguda produzida em níveis elevados em resposta a citocinas pró-inflamatórias (SACK, 2020).

Além dos potenciais biomarcadores mencionados acima, outros marcadores têm sido investigados e sugeridos como possíveis biomarcadores sorológicos da função da barreira intestinal. Por exemplo, a enzima diamina oxidase, cuja atividade está inversamente relacionada à permeabilidade do intestino delgado (HONZAWA *et al.*, 2011), tem sido proposta como um marcador. Embora nenhum biomarcador até o

momento seja específico o suficiente para determinar uma barreira disfuncional e/ou aumento da permeabilidade intestinal por si só, os biomarcadores sorológicos oferecem um complemento importante para outras metodologias, como o teste multissacarídeo *in vivo* (SCHOULTZ; KEITA, 2020).

Pesquisas realizadas pelo Instituto de Biomedicina (IBIMED/NUBIMED) da Universidade Federal do Ceará, com ênfase na fisiologia funcional da barreira epitelial intestinal, têm utilizado, ao longo de décadas, algumas das técnicas acima citadas. Trabalhos como o de Soares (1996) que avaliou por meio do método da Câmara de Ussing, a secreção de sódio paracelular durante a absorção de substratos sódio dependentes no íleo de coelhos, colaborando para o entendimento mecanísticos fisiológico deste processo. Já Lima (1998), que em seu trabalho sintetizou um derivado estável da glutamina, a alanil-glutamil-glutamina, utilizou em sua pesquisa o método de Câmaras de Ussing para estudar, de forma funcional em modelo *ex vivo*, o efeito da glutamina e alanil-glutamil-glutamina no transporte de água, eletrólitos e sobre a permeabilidade intestinal em modelo de diarreia secretória induzida pela toxina da cólera.

No estudo citado acima, também foi utilizado outro método para avaliação de permeabilidade e dano da integridade da barreira epitelial intestinal, sendo utilizado o teste de Lactulose:Manitol avaliado pelo método de cromatografia líquida de alta resolução para medidas de monossacarídeos e dissacarídeos (LIMA, 1998).

Este último método de avaliação de integridade de barreira intestinal, foi amplamente utilizado, em colaboração com o IBIMED/NUBIMED-UFC, no estudo coorte multicêntrico que reuniu um total de oito países (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Paquistão, Peru, África do Sul e Tanzânia). Neste coorte foi estudada a interação da desnutrição e as infecções entéricas, e suas consequências para a saúde e o desenvolvimento infantil, de crianças de 0 a 2 anos de vida, consolidando assim o teste de Lactulose:Manirol como um dos principais testes para avaliar a integridade do epitélio intestinal (GUERRANT *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2014).

Ademais, Silva (2002) realizou um estudo comparativo de parâmetros elétricos na absorção de substratos  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dependentes em epitélio jejunal e ileal de coelhos em Câmaras de Ussing. Na pesquisa de Sampaio (2016) foi avaliado o transporte iônico no íleo de camundongos em modelo de desnutrição pela dieta DBR infectados pela

*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), sendo utilizado o método de Câmaras de Ussing para avaliação de transporte.

Ribeiro (2022) também empregou o Método de Câmaras de Ussing em seu modelo de desnutrição pela nova dieta MAL-ED, a fim de avaliar o transporte iônico utilizando os substratos glutamina, alanil-glutamina e glicina. Esse estudo destaca a ampla aplicabilidade do método de UC na compreensão das interações moleculares dos transportadores e canais do epitélio intestinal, evidenciando que ainda há muitas possibilidades a serem exploradas.

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Mesmo com dados limitados sobre a real situação do índice de desnutrição infantil nos últimos anos, devido à pandemia do COVID-19, é um fato que o mundo enfrenta uma grave crise global, com alguns países, incluindo o Brasil, retornando ao mapa da fome. No ano de 2021, aproximadamente 828 milhões de pessoas estavam em situação de subnutrição crônica, com 193 milhões de pessoas em estado de subnutrição aguda, em um total de 53 países. Além disso, cerca de 641 milhões de pessoas enfrentam insegurança alimentar em 88 países (WORLD FOOD PROGRAMME, 2023). Os gastos para reverter os danos causados pela desnutrição geram um impacto econômico significativo, chegando a até US\$ 3,5 trilhões (BEAUDREAULT, 2019; GLOPAN, 2022), incluindo despesas hospitalares e tratamentos. Isso impacta diretamente no rendimento escolar e na qualificação profissional, resultando em um déficit na produtividade na vida adulta (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007; VICTORA *et al.*, 2008). Pesquisas já demonstraram que crianças com desnutrição apresentam uma maior suscetibilidade a enteropatógenos, resultando em infecções clínicas e subclínicas, o que se traduz em menores escores Z de peso para idade e altura para idade (DE FILIPPO *et al.*, 2010; KOTLOFF, 2017; PLATTS-MILLS *et al.*, 2017).

O trato gastrointestinal é o primeiro sistema afetado pela privação nutricional. Apesar dos esforços, pouco se sabe sobre a absorção e expressão de transportadores de carboidratos, proteínas e lipídeos durante a desnutrição (JACOBI *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2023; SAMPAIO *et al.*, 2016). Além disso, a diversidade das deficiências



nutricionais, gravidade da desnutrição, tempo de desnutrição e segmento intestinal avaliado tornam o estudo da fisiologia intestinal de absorção de nutrientes, bem como a barreira epitelial morfofuncional durante a desnutrição um desafio para ciência. A barreira morfofuncional gastrointestinal é a maior fronteira entre o ambiente externo e interno do corpo. Essa passagem pode ser por dois caminhos, pela via transcelular, através de transportadores, canais e demais facilitadores presentes na superfície celular, ou pela via paracelular, que é regulada pelas junções firmes e as proteínas que a compõe. Diante disso, a barreira intestinal atua diretamente na regulação do balanço energético, nutricional, hídrico e na tolerância passagem de antígenos alimentares e processos inflamatórios, em condições fisiológicas ou patológicas (GENTON; CANI; SCHRENZEL, 2015; KEITA; SÖDERHOLM, 2018; ZHANG et al., 2020).

Ademais, quando a desnutrição ocorre nos primeiros anos de vida o risco de mortalidade aumenta (BLACK et al., 2008), podendo levar a um ciclo vicioso de infecções entéricas subclínica e clínica (SCHORLING et al., 1990; GUERRANT et al., 2008), como observado pelo estudo coorte MAL-ED (MILLER *et al.*, 2014) o que compromete o desenvolvimento físico (BLACK et al., 2008) e cognitivo das crianças afetadas (GALLER et al., 2012), bem como leva ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (DEBOER et al., 2013; GUERRANT et al., 2012). Dessa forma, o entendimento dos processos associados à alteração da barreira epitelial intestinal e ao estabelecimento da desnutrição, como ocorre em comunidades que consomem uma dieta deficiente, similarmente ao padrão de consumo alimentar observado no estudo MAL-ED (CAULFIELD *et al.*, 2014; PSAKI *et al.*, 2012), é de suma importância para acelerar o diagnóstico e direcionar melhor a busca por tratamento mais eficazes. Portanto, a implementação de tratamentos mais eficazes torna-se urgente para evitar o aumento da morbidade gerada pela desnutrição tanto no indivíduo quanto na nação.

O aprimoramento de métodos e técnicas utilizadas para a análise da função de barreira e da permeabilidade, como a utilização de um modelo automatizado e detalhista para avaliação dos transportes no epitélio intestinal, ajudarão a identificar alterações fisiológicas funcionais, levando mais celeridade e eficiência no diagnóstico, o que favorece a tomada de medidas direcionadas à prevenção de aumento da permeabilidade e consequente melhoria da integridade do epitélio GI (VAN WIJCK et al., 2011).

Diante do exposto, este trabalho avalia, por meio de um sistema automatizado de Câmaras de Ussing, se a glutamina tem o potencial de reverter os sinais clínicos de desnutrição causados pela nova dieta experimental MAL-ED, associados à melhora nos danos na barreira morfofuncional intestinal documentados em um trabalho anterior do grupo (RIBEIRO, 2022). Desta forma, este estudo não apenas demonstra a importância da utilização do sistema de Câmaras de Ussing automatizado na investigação das alterações e funcionalidade da barreira morfofuncional gastrointestinal e permeabilidade intestinal, mas também propõe um possível tratamento eficaz para este importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo é avaliar a função da barreira epitelial intestinal em camundongos submetidos a um modelo animal de desnutrição aguda baseado na dieta complementar de crianças com desnutrição, conforme descrito no estudo COORTE multicêntrico MAL-ED.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Verificar os efeitos da dieta complementar MAL-ED em parâmetros corporais, como peso, ganho de peso, crescimento e composição corporal de camundongos C57BL/6;

2. Investigar os efeitos da dieta complementar MAL-ED sobre a permeabilidade da barreira epitelial intestinal em modelo *ex vivo* do teste de Lactulose/Manitol adaptado para câmaras de Ussing;

3. Analisar os efeitos agudos da dieta complementar MAL-ED em modelo *ex vivo* de absorção de substratos glicose, glutamina e alanil-glutamina pelo epitélio intestinal de camundongos C57BL/6 em sistema automatizado de câmaras de Ussing;

4. Verificar se o tratamento com glutamina em modelo animal de desnutrição aguda induzida pela dieta complementar MAL-ED induz melhorias nos efeitos da desnutrição aguda, por meio da avaliação de parâmetros corporais de peso, ganho de peso, crescimento e composição corporal;

5. Avaliar se o tratamento com glutamina promove melhorias na absorção e função de barreira epitelial intestinal em modelo animal de desnutrição induzida pela dieta MAL-ED, por meio sistema automatizado de Câmaras de Ussing.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais e Comitê de Ética

Para o desenvolvimento da presente pesquisa, foram usados camundongos machos C57BL/6 fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade do Ceará (UFC) logo após o desmame (21-30 dias de idade), sendo esses mantidos em constante ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambientação com temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, com água e “*ad libitum*” e ração com quantidade controlada diariamente. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas e determinações do CONCEA (Comitê Nacional de Controle de Experimentação Animal) e submetidos para aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, de número 9077011220.

### 4.2. Dietas e substratos testados

#### 4.2.1. Dieta MAL-ED

A dieta MAL-ED foi baseada na quantificação das dietas complementares das crianças de sete países com baixo poder socioeconômicos pertencentes ao estudo MAL-ED (MACIEL et al., 2021). Para que a formulação da dieta MAL-ED tivesse os padrões exigidos para roedores, utilizamos a dieta padrão comercial AIN-93M (Rhooster®, São Paulo, Brasil) e subtraímos da sua composição os valores de energia, macronutrientes, fibra e zinco referente ao percentual de diferença da composição da alimentação das crianças sem desnutrição vs. crianças com desnutrição (HAZ < -2) aos 24 meses. A partir disto, obtivemos uma dieta com redução de energia, proteínas, lipídeos e zinco e aumento de carboidratos e fibras em relação à dieta controle (AIN-93M) (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Composição nutricional da dieta MAL-ED e controle

|                                   | <b>Dieta Controle</b> | <b>Dieta MAL-ED*</b> | <b>Diferença (%)</b> |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Energia (Kcal)                    | 391.69                | 360.22               | -8.03                |
| <i>Macronutrientes</i>            |                       |                      |                      |
| Carboidrato (g)                   | 61.89                 | 65.66                | 5.93                 |
| Proteína (g)                      | 21.25                 | 13.29                | -37.46               |
| Lipídeo (g)                       | 6.57                  | 4.98                 | -24.20               |
| Fibras                            | 2.9                   | 4.21                 | 45.17                |
| <i>Micronutrientes</i>            |                       |                      |                      |
| Zinco (mg)                        | 35.0                  | 31.21                | -10.83               |
| <i>Ingredientes</i>               |                       |                      |                      |
| Semola grits (g)                  | -                     | 54.61                | -                    |
| Caseína (78,79% de proteínas) (g) | 16.40                 | 9.89                 | -                    |
| Amido dextrinizado (g)            | 15.50                 | 0.00                 | -                    |
| Sacarose (g)                      | 10.00                 | 0.00                 | -                    |
| Óleo de soja (g)                  | 4.00                  | 5.10                 | -                    |
| Celulose MC-101 (g)               | 5.00                  | 26.00                | -                    |
| Mix mineral (g)                   | 3.50                  | 3.50                 | -                    |
| Mix vitamínico (g)                | 1.00                  | 1.00                 | -                    |
| L-cisteína (g)                    | 0.18                  | 0.30                 | -                    |
| Bitartarato de colina (g)         | 0.25                  | 0.25                 | -                    |
| Tert-butilhidroquinona (g)        | 0.0008                | 0.0014               | -                    |

Fonte: (RIBEIRO, 2022).

Valores referentes a análise da composição centesimal da dieta MAL-ED e dieta AIN-93M (controle) e a quantidade de ingredientes usados para formulação de cada dieta.

#### 4.2.2. Substratos testados

Foram utilizados a L-glutamina (Sigma, Saint Luis, Missouri, EUA) e a glicina (Sigma, San Luis, Missouri, EUA) como tratamentos neste trabalho.

### 4.3 Desenho experimental

Os animais foram recebidos do biotério com 21 dias de vida, logo após o desmame. Eles foram divididos, de forma randomizada, em seis grupos: 1) nutridos não tratados; 2) desnutridos não tratados 3) nutridos tratados com glutamina; 4) desnutridos tratados com glutamina; 5) nutridos tratados com glicina; 6) desnutridos tratados com glicina.

Durante toda a linha experimental, foram realizadas análises de espectroscopia de bioimpedância animal com o Vet BIS 1 - ImpediVet® (Impeimed, Carlsbad, California, EUA) em três momentos: após um período de 48 horas de adaptação ao biotério do pré-clínico, sendo este considerado tempo **0**; no dia **7** de indução de desnutrição pela dieta MAL-ED; e no dia **12**, após cinco dias de tratamento com Glutamina, que marca o final da linha experimental (**Figura 8**).

Dito isso, após um período de 48 horas de adaptação ao novo ambiente no biotério do pré-clínico, os animais dos grupos foram anestesiados com isoflurano 3 a 4% via inalatória e mantidos sob estado de anestesia com 1 a 2% de isoflurano para realização da primeira análise de espectroscopia de bioimpedância animal com o Vet BIS 1 - ImpediVet® (Impeimed, Carlsbad, California, EUA) para coleta de dados referentes a composição corporal. Logo em seguida, os animais dos grupos desnutridos foram induzidos à desnutrição, iniciando o consumo da dieta MAL-ED, já os animais dos grupos nutridos, consumiram a dieta normocalórica (AIN93-M). Ambas as dietas foram fornecidas em quantidade igual de peso por dia para ambos os grupos (**Figura 8**) (BROWN et al., 2015; RIBEIRO, 2022; RIBEIRO et al., 2023).

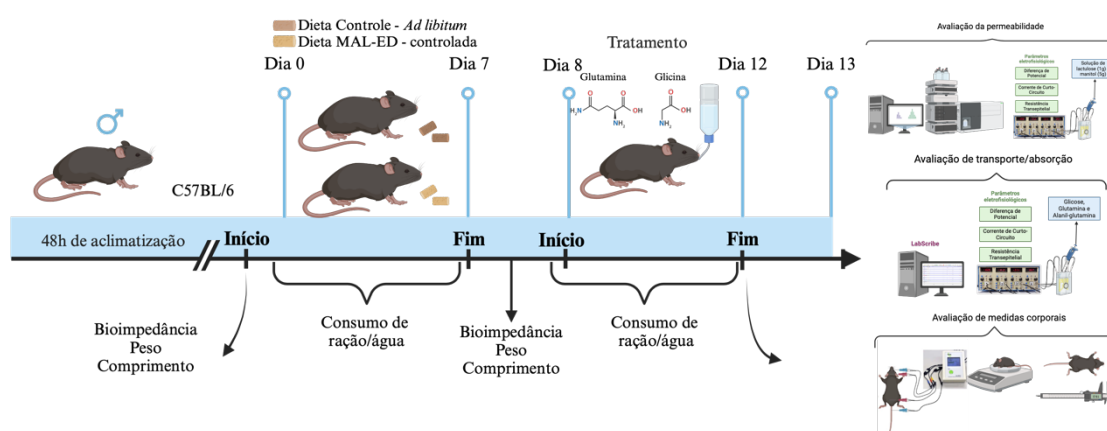
Para evitar viés de diferença na quantidade de consumo entre grupos nutridos e desnutridos, foram ofertadas as mesmas quantidades de ração consumidas pelos grupos nutridos no dia anterior à oferta da ração. Após o início da administração das dietas, os animais de ambos os grupos foram avaliados diariamente com relação ao peso corporal, consumo de comida, de água e comprimento da cauda. Com base em outros estudos do grupo, determinamos que o período de desnutrição iniciaria a partir do dia 7, escolhendo este momento como tempo adequado para iniciarmos a realização do tratamento (**Figura 8**) (RIBEIRO, 2022; RIBEIRO et al., 2023).

Após os sete dias de indução da desnutrição, ou seja, no oitavo dia, foi realizada a segunda análise de espectroscopia de bioimpedância animal. Posteriormente, foi dado início ao tratamento com glutamina (0,1256 mM/mL) e glicina (0,1256 mM/mL), que foram administradas *ad libitum*, com consumo médio de média 3,3 mL por dia/animal (LIMA et al., 2005).

O tratamento teve duração de 5 dias, após este período foi realizada a terceira análise de espectroscopia de bioimpedância animal. Em seguida, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg), seguido de laparotomia mediana longitudinal, para a coleta de cerca de 8 cm de amostra de tecido intestinal.

O intestino foi identificado, seccionado, e seu tamanho total foi mensurado. Uma porção  $\pm$  8 centímetros da porção medial do intestino delgado foi coletada para realização dos experimentos de avaliação de permeabilidade intestinal com lactulose e manitol no Sistema de Câmaras de Ussing (SCU) e avaliação de absorção também no SCU. Para os experimentos nas câmaras de Ussing, foram feitos dois grupos por semana, um animal de cada grupo por dia, sendo necessárias três semanas para realização de todos os grupos para cada teste realizado as UCs. Por fim, os animais foram eutanasiados por meio de exsanguinação.

**Figura 8:** Protocolo experimental



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

Primeiro os animais foram colocados em aclimatação de 48 horas antes de começar o protocolo experimental. Após isto, no dia 0 foi coletado o peso, comprimento e foi mensurada a bioimpedância dos animais. Em seguida deu-se início a indução da desnutrição com a dieta MAL-ED por 7 dias, medindo diariamente o consumo de ração e água. No oitavo dia realizou-se a segunda coleta de peso, comprimento e bioimpedância, iniciando na sequência o tratamento com glutamina e glicina por 5 dias. Ao final do tratamento foi mensurado novamente o peso, comprimento e bioimpedância. Em seguida, os animais foram eutanasiados para realização das outras análises experimentais.

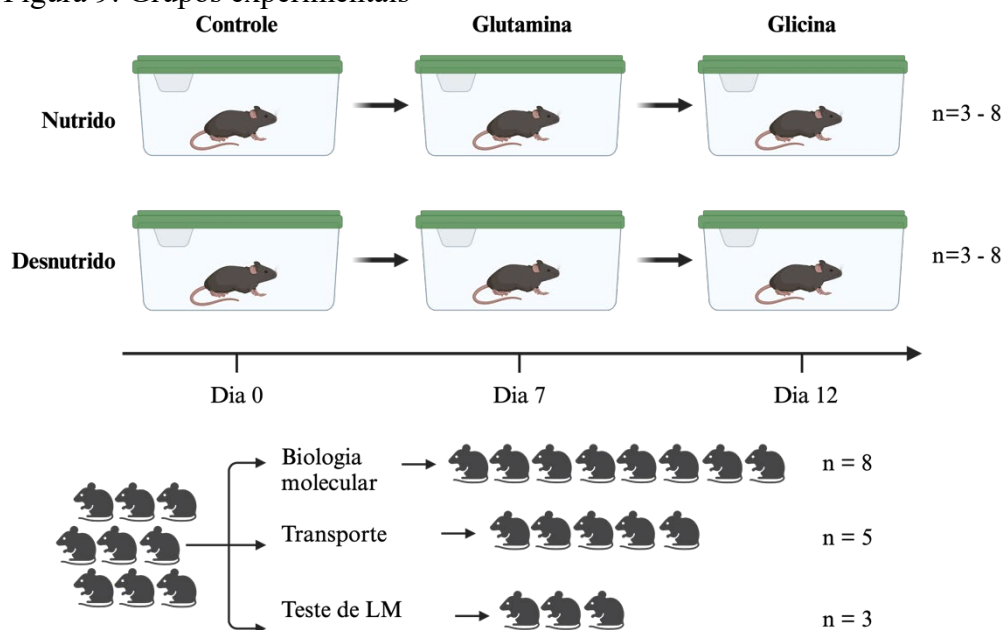
#### 4.4. Grupos Experimentais

Os grupos experimentais utilizados foram os seguintes (**Figura 9**):

1. **Nutrido:** os animais consumiram a dieta controle (AIN-93M) por um total de 7 dias;
2. **Desnutrido:** os animais consumiram a dieta MAL-ED por um total de 7 dias;
3. **Nutrido Tratado com Glutamina:** os animais consumiram a dieta controle (AIN-93M) por um total de 7 dias e receberam o tratamento subsequente com Glutamina a 0,1256 mM/mL por 5 dias adicionais;
4. **Desnutrido Tratado com Glutamina:** os animais consumiram a dieta MAL-ED por um total de 7 dias e receberam o tratamento subsequente com Glutamina a 0,1256 mM/mL por 5 dias adicionais.
5. **Nutrido Tratado com Glicina:** os animais consumiram a dieta controle (AIN-93M) por um total de 7 dias e receberam o tratamento subsequente com Glicina a 0,1256 mM/mL por 5 dias adicionais;
6. **Desnutrido Tratado com Glicina:** os animais consumiram a dieta MAL-ED por um total de 7 dias e receberam o tratamento subsequente com Glicina a 0,1256 mM/mL por 5 dias adicionais.



Figura 9: Grupos experimentais



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

Os animais foram separados em caixas por grupo controle, dieta MAL-ED, controle tratado com glutamina, controle tratado com glicina e dieta MAL-ED tratado com glutamina e dieta MAL-ED tratado com glicina. Esta divisão foi realizada em três linhas de tempo diferentes e com quantidade de animais por grupo diferentes. A Primeira linha experimental foi utilizada para realização de experimentos de biologia molecular, nesta linha o n era de 8 animais por grupo. A segunda linha experimental foi direcionada para os experimentos de avaliação de transporte em câmaras de Ussing, com n de 5 animais. Por fim, a terceira linha experimental foi utilizada para realização do experimento de permeabilidade com o teste de lactulose:manitol realizado em câmaras de Ussing, com n de 3 animais por grupo.

#### 4.5. Análise da composição corporal: Bioimpedância elétrica

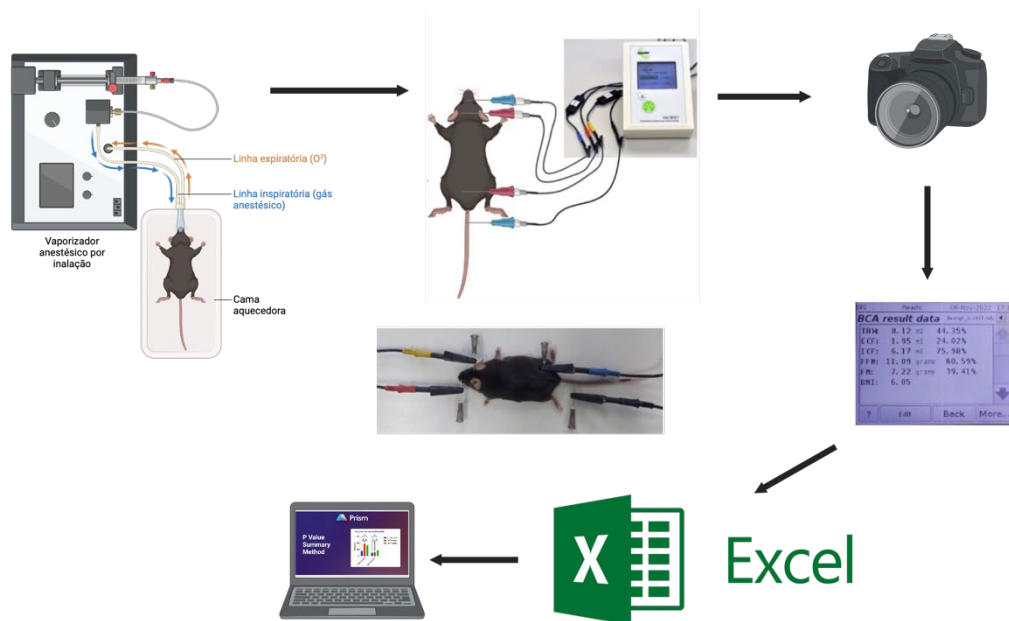
Neste estudo foi utilizado o ImpediVET® (Carlsbad, California, EUA), um dispositivo de espectroscopia de bioimpedância tetra polar (BIS) de canal único que varre 256 frequências entre 4 kHz e 1000 kHz em menos de um segundo. O dispositivo utiliza uma plotagem de impedância complexa para determinar a água corporal, o fluido extracelular e o fluido intracelular. A massa livre de gordura, a massa gorda e o índice de massa corporal são calculados através de um software acoplado ao dispositivo (**Figura 10**).

O procedimento de avaliação corporal seguiu o protocolo especificado pelo fabricante. Os animais foram anestesiados com isoflurano 3 a 4% (manutenção 1 a 2%) por via inalatória. Eles foram colocados sobre uma superfície não condutora, com os

membros posteriores e anteriores em perpendiculares ao corpo, e a cauda foi estendida distalmente. Quatro agulhas (calibre 25x12) foram usadas como eletrodos, sendo inseridas na região subdérmica, ao longo da linha média dorsal. Os eletrodos centrais foram inseridos na região medial entre as orelhas e entre as patas posteriores (**Figura 10**), interceptando a linha média do corpo. Enquanto isso, os eletrodos periféricos foram inseridos entre os olhos, aproximadamente a 1,0 cm do eletrodo entre as orelhas, e na cauda, aproximadamente a 1,0 cm do eletrodo da base da cauda (**Figura 10**). As agulhas foram acopladas ao dispositivo. O comprimento entre os eletrodos centrais foi mensurado e registrado no equipamento, assim como o peso do animal. Em seguida, a corrente elétrica foi acionada, e os parâmetros de bioimpedância de resistência e reatância foram obtidos por um único espectro de 4 a 1 MHz numa série de 256 pontos. Valores predefinidos pelo fabricante para camundongos foram utilizados para calcular os parâmetros de composição corporal (CARLE, 2010). O procedimento ocorreu com todos os grupos experimentais descritos nos dias 0, 8 e 13.

O dispositivo utilizou uma plotagem de impedância complexa para determinar a água corporal total, o fluido extracelular e o fluido intracelular, enquanto a massa livre de gordura, massa gorda e índice de massa corporal foram calculadas através de um software acoplado ao dispositivo (CARLE, 2010). Os valores de água corporal total foram divididos pelo peso do respectivo animal, com o intuito de normalizar o resultado, e expresso em percentual.

**Figura 10** - Esquemática do procedimento experimental da bioimpedância elétrica



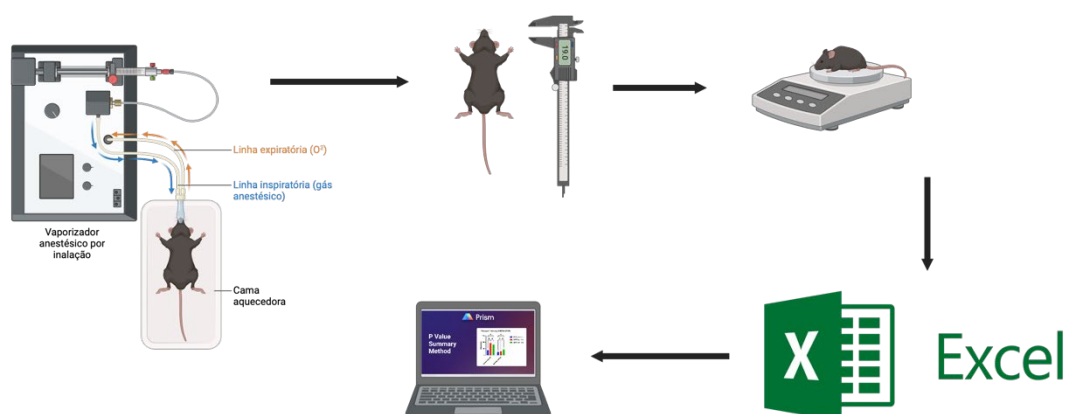
Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

Primeiro os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e, em seguida, foram dispostos sob superfície não condutora com membros anteriores e posteriores dispostos de forma perpendicular ao corpo. Foram utilizadas quatro agulhas, que foram inseridas em região subdérmica, entre os olhos, entre as orelhas entre os músculos das patas anteriores e na base da cauda. As agulhas foram acopladas em eletrodos acoplados ao equipamento. As medidas de comprimento entre os eletrodos centrais (agulhas vermelhas) e o peso foram adicionados no equipamento e, por fim, acionado a mensuração.

#### 4.6. Avaliação do desenvolvimento corporal

O comprimento corporal dos animais foi mensurado nos dias 0, 7 e 12 para a avaliação do desenvolvimento corporal dos animais. Para isso, os camundongos foram rapidamente anestesiados por isoflurano (Cristália®, São Paulo, Itapira) (SCHWARZER et al., 2016), em seguida, foram posicionados sob uma superfície plana, de forma alinhada e o comprimento corporal total (comprimento corporal + comprimento da cauda) foi medido com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo®, Suzano, São Paulo, Brasil) como mostrado na **Figura 11**.

**Figura 11:** Avaliação do comprimento corporal



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

Primeiro os animais foram pesados em balança analítica, depois foram anestesiados por via inalatória com isoflurano e, em seguida, foram dispostos sob superfície plana, alinhando a cauda e o corpo. Utilizando um paquímetro, mediu-se primeiro o comprimento da ponta ao tronco da cauda e, em seguida, o comprimento do troco da cauda até a ponta do focinho.

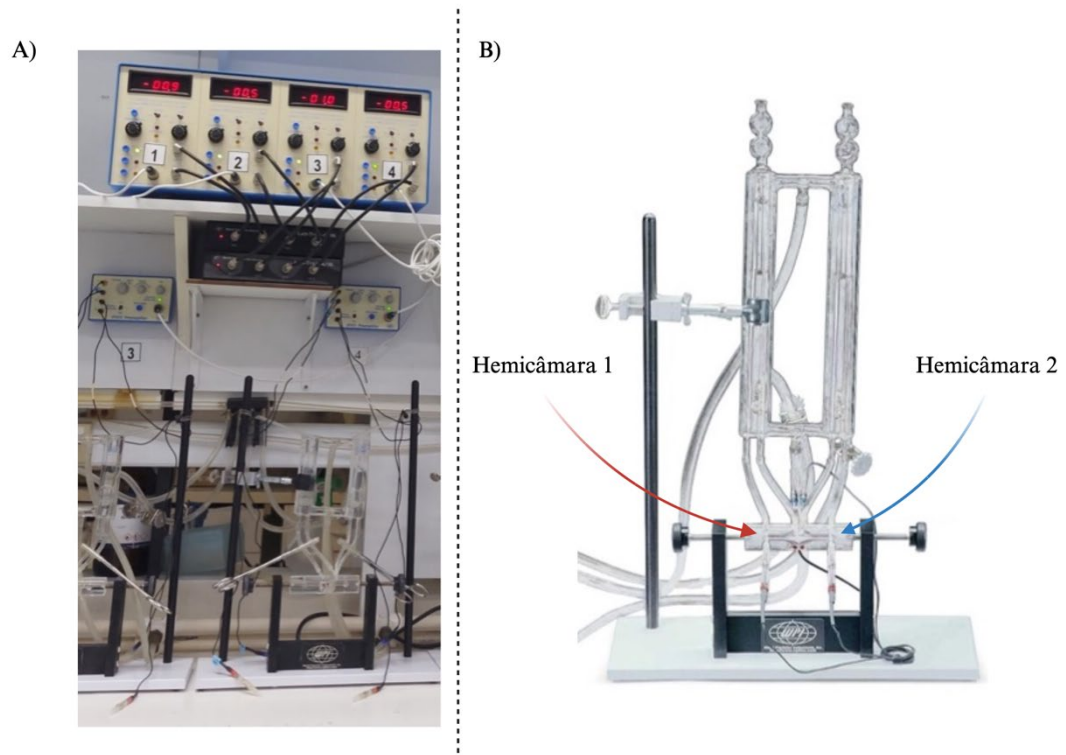
#### 4.8. Avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos basais e durante o transporte de peptídeos e carboidratos por Câmara de Ussing

O Sistema de Câmaras de Ussing (SCU) (**Figura 12A**) fornece um método valioso, comprovado e amplamente utilizado para a medição do transporte de eletrólitos, absorção de nutrientes e drogas. Além disso, fornece dados de resistência transepitelial,

os quais têm relação direta com a permeabilidade e função de barreira em tecidos epiteliais.

Utilizamos o método de câmaras de Ussing para avaliar a Corrente de Curto-Circuito (CCC), a Resistência transepitelial (RT) e a Diferença de Potencial (DP) em segmentos do segmento medial do intestino delgado de animais controles e animais submetidos ao consumo da dieta MAL-ED por 7 dias, como forma de indução de desnutrição. Essas avaliações foram realizadas sob condições basais e durante o desafio com concentrações crescentes de glutamina, Alanil-glutamina e glicose. A porção medial do intestinal delgado foi escolhida para ser analisada por ser um dos maiores segmentos de absorção no intestino delgado. Todo o protocolo foi seguido conforme descrito por Soares (1996), com adaptações.

**Figura 12** – Sistema de Câmaras de Ussing para pesquisa epitelial



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

A) Sistema de Câmaras de Ussing, composto por sistema de aeração por solução carbogênica, uma bomba termostável de manutenção de temperatura, Pré-amplificadores, amplificadores acoplados ao sistema de automação, B) Sistema de Ussing para pesquisa epitelial, composto por um estande de apoio para o sistema de Câmaras de Ussing, reservatórios de soluções perfusoras, duas hemicâmaras 1 (seta vermelha) e 2 (seta azul) que compõe a câmara de Ussing, eletrodos de voltagem e eletrodos de corrente.

O sistema das câmaras de Ussing (**Figura 12A**) pode ser dividido em três partes. A primeira parte compreende duas hemicâmaras (**Figura 12B**), onde são fixados os tecidos intestinais e os reservatórios de soluções perfusantes; um sistema de aeração composto por uma mistura carbogênica de 5% de dióxido de carbono e 95% de oxigênio, responsável por manter o tecido oxigenado; e uma bomba de circulação termoestável aquecedora - *Haake FE Laboratory Scientific 115V Recirculating Lab Water Bath* (Haake FE2, Berlin, Germany), conectada aos reservatórios de perfusato utilizada para manter a temperatura das soluções a  $\pm 37$  °C.

A segunda parte é constituída por eletrodos e pelo sistema analógico de pré-amplificadores *EVC3 Preamplifier Module* (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) e amplificadores *EVC4000 Precision V/I Clamp* (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) (**Figura 13A**). Esses componentes são utilizados, como o próprio nome sugere, para amplificar os sinais elétricos gerados pelo tecido, além de gerar a fixação automático de voltagem e corrente.

Já a terceira parte é composta por um sistema de aquisição de dados analógicos e um sistema de conversão digital para dados analógicos, responsável por converter os dados analógicos em digitais por meio dos conversores *LABTRAX 4-Channel Data Acquisition* (World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) e *IX/408 Data Acquisition System* (iWorx, Dover, New Hampshire, USA) (**Figura 13A**). Para a visualização dos dados, é utilizado o software *LabScribe* versão 2022 (iWorx, Dover, New Hampshire, USA) (**Figura 13B**).

**Figura 13** – Amplificador, pré-amplificador e Software de aquisição de dados



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

A) Amplificadores e pré-amplificadores, B) Layout do software *LabScribe* de automação e aquisição de dados de tensão transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e resistência transepitelial.

As pontes de ágar, junto com os eletrodos de corrente e voltagem, entram em contato com a solução perfusora que preenche as câmaras e, por sua vez, entra em contato com o tecido. Esse contato possibilita os processos de difusão de íons nas interfaces, resultando na geração de potenciais de junção líquida. Portanto, mesmo sem os fragmentos dos tecidos, pode ser gerado uma diferença de potencial (DP) devido as junções entre os componentes citados acima. A diferença de potencial gerada, é dependente de alguns fatores, como a da qualidade das pontes de ágar, da solução perfusora, da manutenção dos eletrodos e da calibração dos pré-amplificadores e amplificadores. A diferença de potencial do sistema sem tecido animal, pode variar entre zero, menor que zero ou maior que zero. Dessa forma, o sistema foi montado buscando se ter uma DP final sem tecido de  $\pm 0,5$  mV.

O princípio da técnica consiste na medição da voltagem e da corrente produzidas pelos tecidos vivos em respostas às propriedades do mesmo em gerar fluxos iônicos. Para isto, foi acionado uma tensão antagônica à preparação, cuja resultante foi uma DP desejada, utilizada para medir a CCC produzida e calcular a RT inerente do tecido.

#### 4.9. Solução perfusora e soluções teste

Duas soluções fisiológicas principais foram preparadas para realizar o experimento nas câmaras de Ussing: *Ringer* e *Krebs-Ringer Bicarbonate* (KRB). O *Ringer* foi utilizado para a irrigação durante a cirurgia e a limpeza de resíduos fecais do lúmen no segmento de segmento medial do intestino delgado após a coleta. Já o KRB, foi usado tanto como solução perfusora do epitélio jejunal montado no SCU, quanto como diluente das outras soluções utilizadas no teste. O Ringer foi constituído de 111,2 mM de NaCl (6,5 g), 1,878 mM de KCl (0,14 g), 1,081 mM de CaCl<sub>2</sub> (0,12 g), 2,381 mM de NaHCO<sub>3</sub> (0,20 g), 0,08335 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 g) (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany). Os componentes foram dissolvidos em 1 L de água destilada em temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético com placa aquecedora modelo NUOVA™ II THERMOLYNE® *stirring hotplate* (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa, USA) (CLARKE, 2009; SAMPAIO et al., 2016; SOARES, 1996).

A solução de KRB, por outro lado, foi composta por 115 mM de NaCl (6,72 g), 25 mM de NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (2,1003 g), 2,4 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,4181 g), 1,2 mM de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,1764 g), 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,2439 g), 0,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,0544 g); os compostos foram fornecidos pela MERK (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany). Essa solução também foi preparada com auxílio de um agitador magnético com placa aquecedora modelo NUOVA™ II THERMOLYNE®, e dissolvida em 1 L de água destilada em temperatura ambiente (CLARKE, 2009; SAMPAIO et al., 2016; SOARES, 1996). Todos os solutos foram pesados na balança analítica METTLER TOLEDO AB104-S (Mettler instrument Corporation, Hightstown, New Jersey, USA). A osmolaridade das soluções foi confirmada em osmômetro WIDE-RANGE OSMOMETER (*Advance Instruments Inc.*, Newton Highlnds, Massachusetts, USA) ficando em torno de 280 a 300 mOsm/L e o pH foi corrigido para pH 7,4 usando um pHmetro QUIMIS® Q400AS (Quimis Aparelhos Científicos, Diadema, São Paulo, Brasil), para se assemelhar às condições fisiológicas, e a solução foi armazenada em geladeira de 2 a 8 °C.



Logo após a preparação das soluções descritas acima, foram feitas as pontes de KRB-ágar utilizadas no SCU para conectar os eletrodos de corrente e voltagem às câmaras, mantendo assim os eletrodos em contato com a solução perfusora que banha o tecido montado no SCU. Para preparação das pontes de ágar, foi pesado 2,4 g de Ágar (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na balança analítica METTLER TOLEDO AB104-S e adicionado a 50 ml de KRB dentro de um Becker de 100 ml. Em seguida, o Becker contendo a solução de KRB-ágar foi colocado em banho-maria dentro de um outro Becker de 1 L contendo 150 ml de água, que foi fervida em temperatura de 80 a 100 °C e homogeneizada com uma bala magnética pequena em agitação na velocidade 3 por um período de 30 minutos, utilizando um agitador magnético com placa aquecedora modelo NUOVA™ II THERMOLYNE®.

Após o tempo de aquecimento, verifica-se se o ágar está homogêneo e totalmente diluído, e se já começou a solidificar, sinalizando que está pronto para ser distribuído nos cartuchos dos eletrodos. Isso é feito evitando a formação de bolhas, que poderiam interferir na captação do sinal elétrico pelos eletrodos. No SCU, são utilizados 16 cartuchos para os eletrodos de voltagem e a mesma quantidade para os eletrodos de corrente — no entanto, devido à necessidade de trocas de cartuchos durante a calibração do sistema, foram preparados para cada experimento 20 cartuchos para os eletrodos de corrente, que geralmente apresentam menos problemas, e 34 cartuchos para os eletrodos de voltagem.

Foram preparadas duas soluções de perfusão: uma solução de KRB glicosada e outra de KRB-Manitol, ambas na concentração de 10 mM por ml de KRB. Para a preparação do KRB glicosado, 0,0901 g de glicose (MERK Chemicals, Darmstadt, Alemanha), foram dissolvidos em 50 ml de KRB a temperatura ambiente e pH 7,4. Essa solução foi utilizada para a perfusão do lado basolateral do epitélio jejunal no SCU. Paralelamente, foi preparada a solução de KRB-Manitol na mesma concentração, adicionando-se 0,0911 g de manitol (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany) em 50 ml de KRB a temperatura ambiente e pH 7,4. Essa solução foi destinada para a perfusão do lado luminal do segmento medial do intestino delgado montado no SCU (SAMPAIO, 2013; SAMPAIO et al., 2016; SOARES, 1996).

Entre as soluções preparadas, foram feitas duas soluções de viabilidade: uma solução de teofilina e outra de glicose, que foram utilizadas para confirmar se o tecido testado estava viável ao final do experimento e validar os resultados da câmara em que esse tecido foi utilizado. Ambas as soluções de teofilina e glicose foram preparadas na concentração de 250 Mm. Para isso, foram pesados 0,0901 g de *Theophylline* (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e 0,09008 g de *L-Glucose* (MERK Chemicals, Darmstadt, Germany), cada um deles foi dissolvido em 2 ml de KRB separadamente. Essas soluções foram preparadas nesta concentração para que, ao serem adicionadas 0,2 ml aos 4,8 ml da solução de perfusão, chegassem ao volume de 5 ml e concentração final de 10 mM (SAMPAIO, 2013; SAMPAIO et al., 2016).

A utilização destas duas soluções em lados opostos do tecido no SCU, tem o propósito de manter o equilíbrio eletrolítico, favorecer o mínimo transporte ativo e passivo basal do epitélio intestinal testado. Este transporte iônico proporcionado por meio do fornecimento dos sais presentes no KRB e dos carboidratos a ele adicionados, gera uma diferença de tensão entre os dois lados do tecido, o que resulta em uma diferença de potencial por ação do gradiente eletroquímico, que permite identificar a viabilidade inicial do epitélio.

Utilizamos soluções a 1 mM, 20 mM, 70mM, 200 mM e 700 mM de glicose, L-glutamina (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e L-alanil-glutamina (Rexim SA, Courbevoie, França) neste trabalho (**Figura 14**). As soluções desses substratos foram dissolvidas em KRB, de modo que cada uma delas apresentasse 300 mOsm e a concentração desejada. As soluções com substratos foram preparadas de forma a obter cada ponto experimental na concentração desejada para realização da curva dose-resposta. Foi adicionado o volume de 100 µl da solução final de cada concentração dos substratos no reservatório de circulação do SCU, do lado apical do segmento medial do intestino delgado montado. Antes da adição, foi retirado um volume igual do reservatório, reduzindo assim a margem de erro no momento da adição e prevenindo alterações no pH e na osmolaridade inicial (SOARES, 1996).

Inicialmente, o substrato testado é dissolvido em 3 ml de KRB, formando a solução inicial ( $S_0$ ) de cada substrato. Este volume foi suficiente para que cada uma das 8 câmaras pudesse atingir a concentração mínima de  $10^{-3}$  Molar e a concentração máxima de  $2 \times 10^{-1}$  Molar, com adições cumulativas de 100  $\mu$ l. Foi adicionado 0,54048 g de L-Glucose, 0,43842 g de *L-Glutamine* (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e 0,6516 g *L-Alanyl-L-Glutamine* (Rexim SA, Courbevoie, França) a um tubo falcon de 15 ml para cada substrato, contendo 3 ml de KRB cada, para se obter uma solução na concentração de 1 Molar de substrato por ml de KRB no tubo  $S_0$ , mantendo-se corrigido o pH em 7,4 (SOARES, 1996) (**Figura 14**).

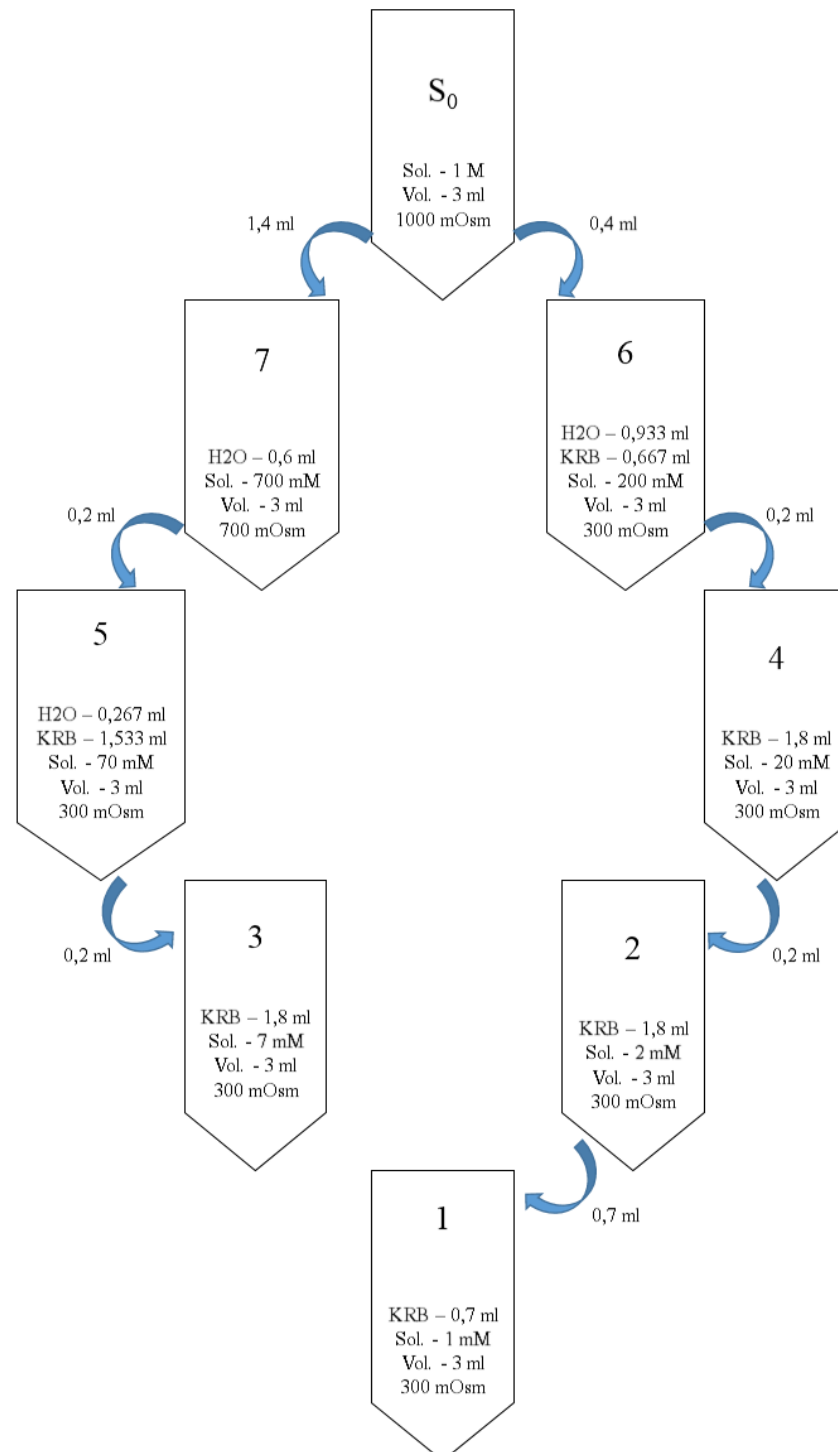
Em paralelo, foram numerados 7 tubos falcon de 15 ml, com números de 1 a 7 para cada substrato. Em seguida, foram retirados do tubo  $S_0$  1.400  $\mu$ l para o tubo número 7 e 400  $\mu$ l para o tubo '6'. Em seguida foi adicionado 600  $\mu$ l de água destilada estéril ao tubo '7', formando uma solução final de 0,7 Molar a 700 mOsm. Desta solução foi retirado 200  $\mu$ l e transferido para o tubo '5', adicionando também 267  $\mu$ l de água destilada estéril e 1.533  $\mu$ l de KRB, obtendo neste tubo, uma solução final de 0,07 Molar a 300 mOsm. Em seguida, é retirado do tubo '5' o volume de 200  $\mu$ l e transferido para o tubo '3', no qual foi adicionado 1.800  $\mu$ l de KRB (0,007 M e 300 mOsm) (SOARES, 1996) (**Figura 14**).

No tubo '6' foi adicionado o volume de 933  $\mu$ l de  $H_2O$  e 667  $\mu$ l de KRB, formando uma solução com 0,2 Molar e 300 mOsm. Do tubo '6' foi retirado 200  $\mu$ l e transferido para o tubo '4' e adicionado 1.800  $\mu$ l de KRB, o que resultou em uma solução de 0,02 Molar e 300 mOsm. A partir do '4' retiramos 200  $\mu$ l e colocamos no tubo '2', adicionando a este o volume de 1.800  $\mu$ l de KRB (0,002 M e 300 mOsm). Por fim, foi coletado 700  $\mu$ l do tubo 2' e transferido para o tubo '1', seguido da adição de 700  $\mu$ l de KRB, obtendo assim, uma solução final na concentração de 0,001 M do substrato na osmolaridade de 300 mOsm. Para essas pipetagens foram utilizadas duas Pipetas, uma P100 e uma P1000, ambas PIPETMAN GILSON (*Rainin Instruments Co.*, Woburn, Massachusetts, USA) (SOARES, 1996) (**Figura 14**).

#### 4.10. Montagem das Câmaras Ussing e calibração do sistema

O amplificador EVC4000 PRECISION V/I CLAMP (*World Precision Instruments*, Sarasota, Florida, USA) e pré-amplificadores EVC3 *Preamplifier* (*World Precision Instruments*, Sarasota, Florida, USA) (**Figura 13A**) foram ligados pelo menos 1 hora antes de iniciar o experimento para permitir a estabilização de todo o circuito elétrico do SCU. O amplificador foi ligado com o botão *Meter* na posição mV (*millivolts*), o botão *Zero* na posição (+), os potenciômetros do *Fluid Res. Compensation* e *Set Clamp I/V* foram ajustados para zero e o botão *PD* (*Potential Difference*) foi acionado. Após ligados, com o pré-amplificador na posição de *Standby* e o botão *Dummy Membrane* na posição *out*, a diferença de potencial do sistema sem solução foi zerada no voltímetro, mostrada no *display* do amplificador em mV. Para isso, foram utilizados o botão de controle grosseiro (*Coarse*) e o botão de controle fino (*Fine*), ambos localizados no pré-amplificador.

**Figura 14** – Preparo de soluções para teste de curva cumulativa de substratos no SCU



Fonte: elaborado pelo autor.

Diluições dos substratos para preparação das soluções para realização dos testes de permeabilidade e absorção destes substratos em câmara de Ussing.

Em seguida, os cartuchos contendo as pontes de KRB-ágar foram acopladas a 2 eletrodos de voltagem vermelhos (V1 e V2) e 2 eletrodos azuis de prata para corrente (I1 e I2) (*World Precision Instruments*, Sarasota, Florida, USA), que foram conectados as câmaras de Ussing, I1 e V1 em uma hemicâmara e, I2 e V2 na outra hemicâmara complementar. Após conectar os cartuchos e eletrodos, foram adicionados 5 ml de KRB em cada reservatório de circulação. Como ainda não havia tecido montado, o líquido fluiu livremente de um lado para o outro da câmara sem encontrar nenhuma resistência.

Após todo SCU montado, com solução de KRB adicionada nas 8 câmaras, a aeração carbogênica foi ligada, a bomba termoestável começou a aquecer o KRB para a temperatura de 37,8 °C e o período de 1 a 2 h passou a ser contado para a estabilização do sistema com os eletrodos em contato com a solução de KRB. Em seguida, após o período de estabilização, girou-se o botão de *Standby* para *Operate* no pré-amplificador e foi feita a avaliação de qualidade das pontes de ágar feitas pela conexão dos eletrodos com os cartuchos contendo KRB-ágar em seu interior. A avaliação foi inicialmente feita observando a diferença de potencial espontâneo gerada em cada câmara apenas com o uso do KRB. Se a diferença de potencial (DP) fosse maior que 3 mV, verificava-se se havia bolhas nos cartuchos e, em seguida, eram feitas as trocas dos cartuchos dos eletrodos de corrente I1 e I2. Essas substituições tinham como objetivo ajustar a DP o mais próximo possível de -0,5 a +0,5 mV para cada câmara.

Após a troca dos cartuchos, aguardou-se alguns minutos até que a redução da diferença de potencial DP fosse o mais próximo possível de  $\pm 0,5$ . Somente então esta DP foi zerada utilizando o botão *Coarse* no pré-amplificador. Em seguida, a resistência do fluido (solução de KRB) também foi ajustada para zero apertando o botão *Fluid Res. Compensation*, que aplica uma corrente ( $\mu\text{A}$ ) pré-definida pelo sistema, permitindo assim, ver a DP (mV) no *display* do voltímetro do amplificador. Com base nessa informação, o potenciômetro do *Fluid Res. Compensation* foi girado até que o *display* do voltímetro mostrasse 0 mV de DP, indicando que a resistência do KRB foi zerada. Isso assegura que apenas a resistência do tecido será observada posteriormente (FIELD, 1976; SOARES, 1996).

A fim de evitar que a resistência elétrica do sistema fosse muito alta e que prejudicasse a leitura da resistência do tecido, caso esta fosse muito baixa, não mostrando o real valor, foram verificadas as resistências do sistema de eletrodos, de voltagem e de corrente com a utilização de um multímetro LUATEK modelo LK-96 (China). Ainda foi criado um sistema com resistores com valores conhecidos, para se avaliar a precisão do SCU para realização da leitura da resistência, caso a leitura fosse imprecisa os eletrodos eram trocados (SOARES, 1996). Dessa forma, foram ligados e o amperímetro zerado a fim de ser medido e registrado o potencial elétrico (DP1) espontaneamente gerado pelo sistema. Para medir a resistência elétrica do sistema, foi aplicada uma corrente de 50  $\mu$ A, possibilitando o registro de um novo valor apresentado pelo voltímetro (DP2), com as duas diferenças, calculou-se a resistência do sistema, usando a Lei de Ohm,  $R = \Delta V/i$ , onde  $\Delta V$  corresponde DP2 menos DP1 e  $i$  corresponde a corrente de 50  $\mu$ A aplicada pelo SCU. Como os valores de DP eram registrados em mV (milivolts), o valor da corrente foi corrigido para mA (miliampères) para aplicação na fórmula de Ohm na mesma unidade.

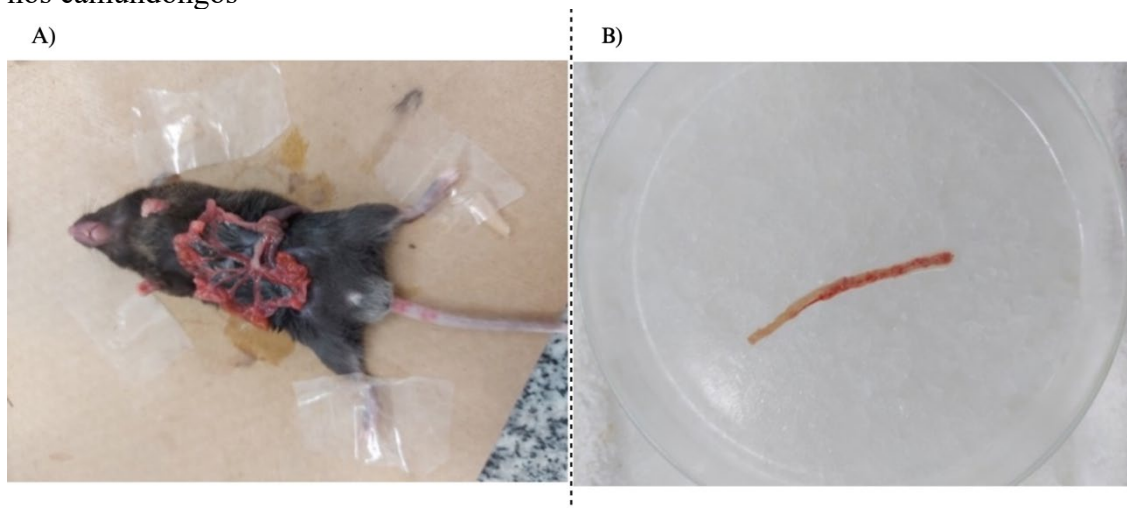
#### 4.11. Coleta da amostra e montagem das câmaras

No décimo segundo dia do protocolo experimental, após os 7 dias de consumo da dieta e 5 dias de tratamento com glutamina, os animais anestesiados com cloridrato de cetamina 10% (90 mg/Kg corporal) (DOPALEN, Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (10 mg/Kg corporal) (ANASEDAN, Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil) por via intramuscular, foi feita uma incisão de cerca de 2 cm na porção média do abdômen sobre a linha Alba. O intestino delgado foi exposto (**Figura 15A**) e a região correspondente ao segmento medial do intestino delgado foi devidamente identificada, quanto a sua localização anatômica. Cerca de 8 cm do segmento medial do intestino delgado foi seccionado e transferido para uma placa de Petri de 100 mm contendo 2 ml de solução de Ringer a 4 °C, onde este foi imergido (**Figura 15B**). Esta placa de Petri estava assentada sobre o gelo que estava acondicionado dentro de uma caixa de isopor de dimensões 20x25 cm (SCHULTZ; ZALUSKY, 1964; SOARES, 1996).

A porção foi limpa com solução de Ringer, utilizando uma seringa de lavagem auricular, para retirada de eventual conteúdo intestinal. Logo após, o tecido foi

cateterizado utilizando uma cânula de vidro com 2 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento contendo Ringer gelado em seu interior. Em seguida, foi feita uma incisão longitudinal superficial à margem da inserção mesentérica, profunda o suficiente para cesurar as camadas serosa, muscular longitudinal externa e muscular circular interna.

**Figura 15** – Cirurgia para coleta de segmento do segmento medial do intestino delgado nos camundongos



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

A) Cirurgia para coleta de segmento medial do intestino delgado, com exposição de todo intestino delgado e B) Segmento medial do intestino delgado coletado e acondicionado placa de petri sobre o gelo e irrigado com solução de Ringer a 4° C.

No tecido foi rapidamente dissecado as camadas musculares do lado seroso, aberto completamente com o aprofundamento da incisão longitudinal feita anteriormente com bisturi e cortado em segmentos de 1 cm. Cada segmento foi retirado da placa de Petri e montado com o lado da mucosa voltado para cima sobre a hemicâmara de acrílico com *O-ring* (anel de borracha utilizado para prender o tecido e vedar os dois lados da câmara) de 2 mm de raio, sendo, em seguida, encaixada a sua outra metade e fixadas no suporte de câmara correspondente. Simultaneamente, as câmaras foram preenchidas com 5,0 mL da solução de Krebs glicosado do lado seroso do tecido, banhando a submucosa, e igual volume da solução de Krebs-Manitol do lado mucoso, banhando o lúmen jejunal, ambas a temperatura ambiente. Por conseguinte, as câmaras foram conectadas aos eletrodos e a circulação do perfusato previamente aquecido e aerado com a mistura carbogênica foi liberada (FIELD, 1971; SOARES, 1996; SAMPAIO, 2016).



A circulação e aeração dos 5 mL das soluções perfusoras Krebs Glicosado e Krebs-Manitol, através da hemicâmara e do seu reservatório de circulação/aeração, foi obtida por aborbulhamento, utilizando uma mistura carbogênica composta por 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono (White Martins Gases Industriais do Nordeste S.A., Fortaleza, Ceará, Brasil).

A temperatura do perfusato foi mantida em 37,8 °C pela circulação constante de água aquecida entre as paredes da camisa dos reservatórios de circulação dos perfusatos do SCU, que eram conectados a uma bomba de circulação termoestável (Haake FE2, Berlin, Germany), ligada pelo menos 2 h antes de começar a experimentação.

Com o objetivo de contornar a perda de perfusato por meio da evaporação, uma marcação com um traço horizontal no reservatório de circulação foi feita utilizando uma caneta Marcador CD/Retroprojektor 2.0 azul. Dessa forma, quando o volume nos reservatórios diminuía abaixo da marcação, ele era reabastecido, tanto no lado mucoso quanto no seroso, garantindo assim que o volume de 5 ml utilizado em cada reservatório permanecesse praticamente constante (SOARES, 1996).

#### 4.12 Medidas elétricas

Foram coletados dados referentes a Diferença de Potencial basal (DP), a Resistência transepitelial (RT) e a Corrente de Curto-Circuito (CCC). Para registrar a DP, o botão PD foi apertado, uma luz verde ao lado deste botão acendeu, o botão *Meter* foi mantido virado para mV e no *display* foi mostrada a diferença de potencial basal espontâneo entre o lado mucoso e seroso do epitélio do segmento medial do intestino delgado montado, sem a aplicação de corrente pelo sistema. Já para registrar a RT, usa-se o botão CC (*Current Clamp*), que, quando acionado, aplica uma corrente predefinida fixa de 50  $\mu$ A através do tecido. Essa corrente foi determinada pelo operador por meio do potenciômetro *Set Clamp I/V*, permitindo calcular a RT.

Com a aplicação de uma corrente, uma voltagem foi gerada pela diferença de potencial desencadeada pela corrente e sua ação no transporte de cargas através do tecido. O valor da voltagem é registrado e mostrado no *display* do amplificador, como o valor de corrente é de conhecimento do operador, o cálculo da RT é feito por meio da Lei de Ohm, com a fórmula  $RT = \Delta DP/i$ , onde  $\Delta DP$  corresponde a voltagem registrada logo após a

aplicação da corrente de 50  $\mu\text{A}$  (DP2) menos a voltagem mostrada na diferença de potencial basal (DP1), e  $i$  corresponde a corrente aplicada pelo sistema, que neste caso foi de 50  $\mu\text{A}$ . Já a CCC corresponde a corrente necessária para anular ou torna desprezível a resistência de um sistema, neste caso o sistema foi o epitélio intestinal.

Para se mensurar a CCC foi apertado o botão VC (*Voltage Clamp*) e uma luz laranja acendeu ao lado do botão, mostrando que, uma voltagem/tensão/DP foi fixada naquele momento. O objetivo agora foi zerar a voltagem/tensão/DP por meio da aplicação de uma corrente capaz de anular a  $R_{te}$  do tecido estudado. Para adicionar a corrente foi utilizado o potenciômetro *Set Clamp I/V*, logo, quando a DP mostrada o *display* do amplificador foi 0,0 mV, o valor mostrado no potenciômetro foi considerado o valor de CCC.

Após a montagem dos tecidos nas câmaras, a resistência inicial do tecido foi observada por meio da corrente, ativando a função *Voltage Clamp* através do botão VC. Em certos casos, o tecido precisaria ser substituído, a saber: se ao acionar o botão VC a corrente do tecido fosse de 0  $\mu\text{A}$ , indicando ausência de transporte e possível morte tecidual; ou se houvesse sobrecarga de corrente no sistema, reconhecível por um sinal sonoro e uma corrente superior a 1000  $\mu\text{A}$  exibida no *display* do amplificador. Após a montagem dos tecidos em todas as câmaras e as substituições necessárias, foi aguardado um período de 20 minutos para estabilização da diferença de potencial nas câmaras montadas.

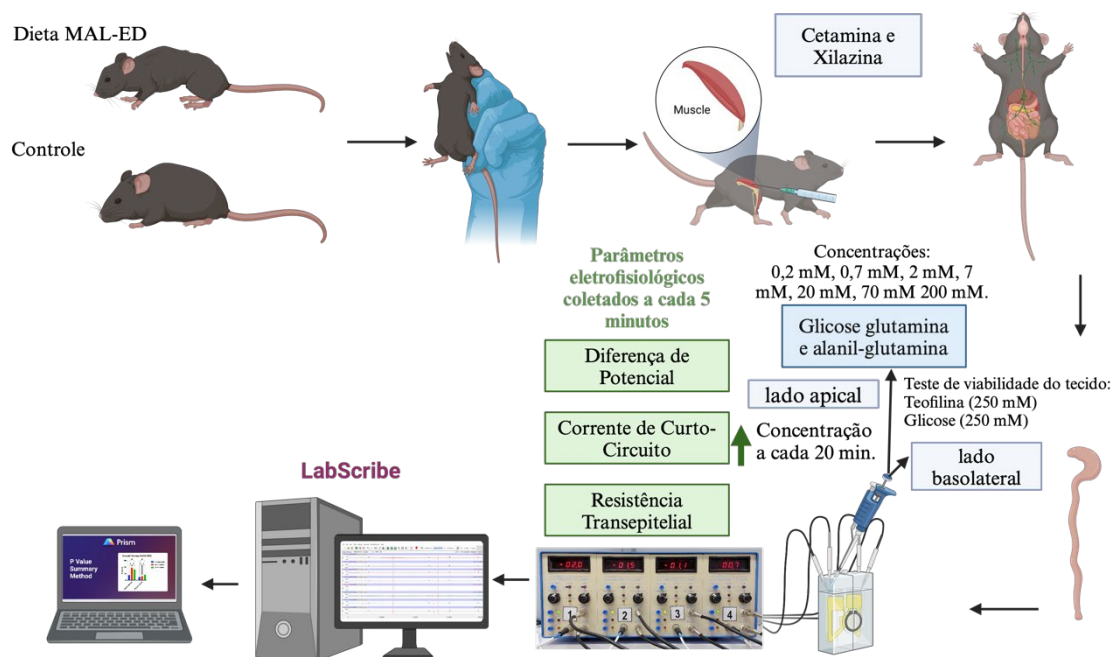
#### 4.13 Curva dose-resposta da glutamina, alanil-glutamina e glicose

Durante os primeiros 20 minutos, realizamos registros das medidas elétricas para monitorar a viabilidade dos tecidos e a estabilização da diferença de potencial. Para o teste de cotransporte com glutamina, alanil-glutamina e glicose, foram retirados a cada 20 minutos durante 100 minutos, tempo necessário para testar as 5 concentrações, 100  $\mu\text{L}$  da solução perfusora de KRB-Manitol e adicionados 100  $\mu\text{L}$  de concentrações crescentes das soluções de substratos/teste (**Figura 16**) mencionadas no subitem 4.10.

No final do experimento, para avaliar a viabilidade final do epitélio, substituímos 200  $\mu\text{L}$  da solução perfusora de Krebs glicosado por 200  $\mu\text{L}$  de solução de viabilidade contendo teofilina a 250 mM no lado seroso e avaliamos por 10 minutos. Da mesma

forma, utilizamos a solução de viabilidade com glicose a 250 mM, substituindo 200  $\mu$ L da solução perfusora de Krebs-Manitol por 200  $\mu$ L da solução de viabilidade com glicose 250 mM no lado mucoso e avaliamos por 10 minutos (**Figura 16**).

**Figura 16:** Experimento Curva Dose-Resposta



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com cetamina e xilazina, após isto o segmento medial do intestino foi coletado, dissecado a camada serosa e contado nas câmaras de Ussing em tamanhos de 1 cm. Em seguida foram adicionadas a primeira concentração de cada substrato e coletada os valores elétricos registrados a cada 5 min. por 20 min. e adicionado em seguida a próxima concentração testada. Ao final foi realizado teste de viabilidade do tecido adicionando do lado basolateral 250 mM de teofilina e 250 mM de glicose do lado apical.

O teste de viabilidade com teofilina e glicose foi conduzido para avaliar a estabilidade elétrica da membrana. Se, ao acionar o botão de clampeador de voltagem (VC), o tecido apresentasse uma sobrecarga de corrente, com um valor acima de 1.000  $\mu$ A, resultando em um *overload*, indicando possivelmente morte ou dano tecidual, os dados obtidos dessa câmara foram descartados. Câmaras que não apresentaram alterações na corrente ao clampear a voltagem com o botão VC após a adição de teofilina, o que pode indicar rompimento do tecido, foram excluídas da análise final. Os registros e coletas de dados das medidas elétricas da Corrente de Curto-Circuito, diferença de

potencial e resistência transepitelial foram realizados a cada 5 minutos durante todo o período experimental (120 minutos).

#### 4.14 Avaliação de permeabilidade por meio de teste de LM em SCU

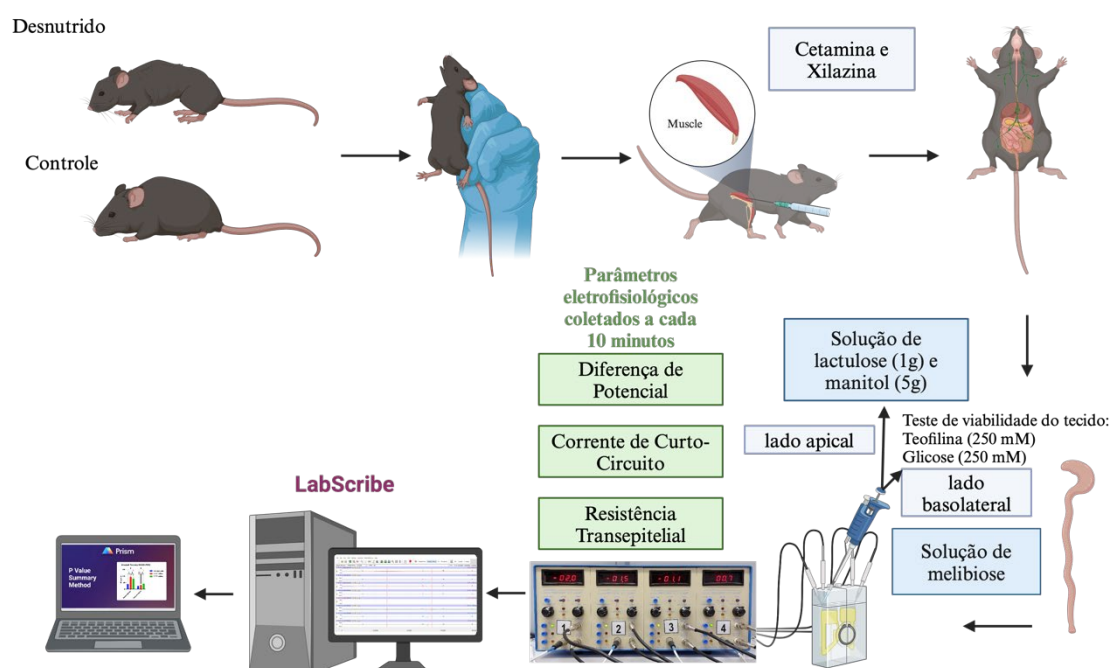
Para avaliação da permeabilidade e função de barreira com teste de LM em câmaras de Ussing, foi utilizada a mesma solução administrada em crianças nos testes clínicos, uma solução contendo 5,0 g de Lactulose (Duphar Laboratories, Southampton, Reino Unido) e 1,0 g de Manitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA, São Paulo, Brasil) dissolvido em 20 ml de água. Previamente, foi feita uma curva dose-resposta e avaliada por cromatografia líquida de alta performance (*HPLC – High-Performance Liquid Chromatography*) no equipamento UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA), visto que as condições do experimento nas câmaras de Ussing são diferentes das feitas em estudos clínicos e pré-clínicos (**Figura 17**).

Após avaliar os volumes de 1ml - 0,3 ml – 0,1 ml – 0,03 ml e 0,01 ml da solução mãe, citada acima, de lactulose/manitol dissolvidos em 5 ml da solução perfusora de Krebs, para avaliar informações como osmolaridade final após adição na solução de perfusão e limite de detecção pelo HPLC. Após os testes, optou-se pelo volume de 0,03 ml, por com uma concentração final de 0,0015 g/ml (0,0044 mM) de lactulose e 0,0003 g/ml (0,0016 mM), por apresentar muito pouca influência na osmolaridade e pela quantidade de tecido exposto ser muito menor que quando administrada por gavagem em modelo *in vivo*. Para a realização do teste, buscando facilitar a quantificação do manitol absorvido, foi trocado no perfusato do lado mucoso os 10 mM de manitol pela mesma concentração de melibiose, mantendo-se assim o equilíbrio osmótico. Ou seja, após adicionar 30 µL da solução de lactulose+manitol do lado mucoso, foi adicionado 30 µL de melibiose à 6 mM do lado basolateral para manter o equilíbrio osmótico (**Figura 17**).

Para este experimento, o mesmo protocolo mencionado no tópico 4.3 foi seguido. Os animais continuaram a consumir normalmente as dietas e tratamentos de acordo com cada grupo. No 13º dia do protocolo experimental, os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de cetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), seguido de laparotomia mediana longitudinal para a coleta de aproximadamente 8

centímetros do segmento medial do intestino delgado para realização do experimento. Logo em seguida, os animais foram eutanasiados por meio de exsanguinação. Em seguida, o tecido foi montado no SCU como mencionado no tópico 4.11, após isto, seguiu-se monitorando e coletando dados eletrofisiológicos, como citado no tópico 4.12, durante 90 minutos.

**Figura 17:** Teste Permeabilidade *ex vivo* em Câmaras de Ussing

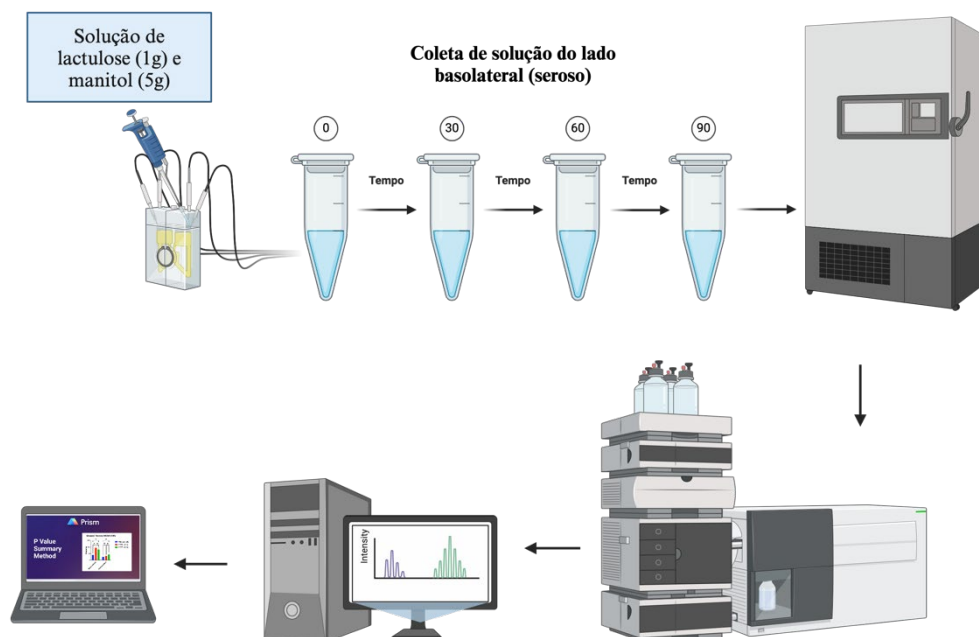


Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com cetamina e xilazina, após isto o segmento medial do intestino foi coletado, dissecado a camada serosa e contado nas câmaras de Ussing em tamanhos de 1 cm. Em seguida foi adicionada 30  $\mu$ L solução de lactulose e manitol do lado mucoso e 30  $\mu$ L de solução de melibiose do lado basolateral, visando manter a osmolaridade, e coletada os valores elétricos registrados a cada 10 min. por 90 min. Ao final foi realizado teste de viabilidade do tecido adicionando do lado basolateral 250 mM de teofilina e 250 mM de glicose do lado apical.

Após a adição da lactulose/manitol, foram realizadas coletas de 200  $\mu$ L de perfusato do reservatório do lado seroso nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos. Essas amostras foram armazenadas em microtubos devidamente identificados para a realização de uma curva log de tempo-efeito. Após as coletas, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até sua posterior análise por cromatografia, com o objetivo de quantificar a permeação dos dois carboidratos, lactulose e manitol, e avaliar a integridade da barreira funcional intestinal (**Figura 18**).

**Figura 18:** Teste Permeabilidade *ex vivo* por HPLC



Fonte: elaborado pelo autor no BioRender.com.

As amostras foram coletadas e armazenadas em freezer – 20 para análise em HPLC.

#### 4.15 Cálculo dos parâmetros eletrofisiológicos

Quando a coleta de dados era feita manualmente, os valores de DP1, DP2 e CCC eram inicialmente registrados à mão em uma planilha impressa em papel, onde os campos correspondentes eram separados por tempo, câmara e parâmetro elétrico. No entanto, devido ao tempo necessário para esse processo e ao risco de causar danos no tecido devido à aplicação contínua de corrente, foi decidido coletar os dados através de fotos do *display* do amplificador. A cada intervalo de coleta, que era de 5 minutos, eram tiradas fotos dos valores de PD1, PD2 e CCC. Posteriormente, os valores registrados nas fotos eram transferidos para planilhas no programa Microsoft® Excel versão 16.74/Office 2019 (Redmond, Washington, EUA). Dessa forma, os valores de CCC, DP e RT eram adquiridos e registrados para análise subsequente.

**- Cálculo da Área:**

$$\text{Área} = \pi R^2 = 3.14 \times 4 = 12.56 \text{ mm}^2 = 0.1256 \text{ cm}^2$$

$$DP_{\text{basal}} = V1/\text{Área}$$

$$\text{Unidade} = \text{mV}/\text{cm}^2$$

$$\text{UC raio} = 2 \text{ mm}$$

**- Cálculo da Corrente de Curto-Circuito do sistema:**

$$\text{CCC} = V_t / R_t \text{ ou } PD/R_t$$

$$\text{CCC} = 4 \text{ } \mu\text{A} \text{ — } 0.1256 \text{ cm}^2 \Rightarrow x = \underline{31.85 \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2}$$

$$X \text{ } \mu\text{A} \text{ } 1.0 \text{ cm}^2$$

$$\text{Unidade} = \text{ } \mu\text{A}/\text{cm}^2$$

**- Cálculo da Resistência tecidual:**

$$R_t = \text{Lei de Ohm} \times \text{área de exposição do tecido}$$

Ou seja

$$R_t = (V_2 - V_1) \text{ mV} / (50 \text{ } \mu\text{A} / 1000) \text{ mA} =$$

$$[(V_2 - V_1) \times 20] \Omega \times (\text{Área}) \text{ cm}^2$$

$$\text{Unidade} = \Omega \times \text{cm}^2$$

$$\text{Lei de Ohm } R_t = V_2 - V_1 / i$$

$V_1 = DP_1$  = Diferença de potencial basal existente entre os dois lados do tecido antes do acionamento do clampeamento de corrente.

$V_2 = PD_2$  = Diferença de potencial gerado após o clampeamento de corrente com a aplicação de uma corrente de 50  $\mu\text{A}$  (microampéres).

$i$  = corrente de 50  $\mu\text{A}$  (microampéres) aplicada com o acionamento do *Current Clamp*, corrigida para 0,050 milivolts.

Área de exposição do tecido = orifício circular presente na hemicâmara de acrílico com *O-ring* (anel de borracha utilizado para prender o tecido e vedar os dois lados da câmara) de 2 mm raio. Este valor foi transformado em área com valor de 12.56  $\text{mm}^2$  e corrigido para 0.1256  $\text{cm}^2$ .

No ano de 2022, o SCU foi automatizado com a aquisição do *software LabScribe* versão 2022 da iWorx Corporation. Com esse *software*, os cálculos anteriormente realizados manualmente passaram a ser feitos automaticamente após a configuração adequada. Os resultados de CCC, RT e DP foram apresentados em função do tempo para cada desafio com os substratos, enquanto a resposta basal se referia àquela gerada antes da adição dos substratos.

#### **4.16 Análise estatística**

Os dados coletados foram digitados em planilha de Microsoft Excel® versão 16.75/Office 365 (Redmond, Washington, USA) e verificados duplamente para validar a entrada dos dados. Os dados foram avaliados quanto a normalidade utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos normalizados seguiram para a análise pelo múltiplo teste t quando comparados dois grupos e Análise de Variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni para os dados pareados. Os dados não paramétricos, por sua vez, foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis. Todos os testes foram aplicados no software GraphPad Prism® versão 10.0.0 (131) (Califórnia, Estados Unidos). Os resultados foram representados por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) quando indicado. Dados foram considerados significativos quando obtiveram valores de  $p < 0,05$ .



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Composição da Dieta MAL-ED

A dieta de indução de desnutrição baseada no COORTE MAL-ED possui 8,03% de energia, 37,46% de proteína, 24,20% de lipídios e 10,83% de zinco a menos que na dieta controle. No entanto, ela contém 5,93% a mais de carboidratos e 45,17% a mais de fibra em comparação com a dieta controle (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Composição nutricional da dieta controle e MAL-ED

|                                   | Dieta Controle | Dieta MAL-ED* | Diferença (%) |
|-----------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| Energia (Kcal)                    | 391,69         | 360,22        | -8,03         |
| <i>Macronutrientes</i>            |                |               |               |
| Carboidrato (g)                   | 61,89          | 65,66         | 5,93          |
| Proteína (g)                      | 21,25          | 13,29         | -37,46        |
| Lípido (g)                        | 6,57           | 4,98          | -24,20        |
| Fibras (g)                        | 2,9            | 4,21          | 45,17         |
| <i>Micronutrientes</i>            |                |               |               |
| Zinco (mg)                        | 35,0           | 31,21         | -10,83        |
| <i>Ingredientes</i>               |                |               |               |
| Semola grits (g)                  | -              | 54,61         | -             |
| Caseína (78,79% de proteínas) (g) | 16,40          | 9,89          | -             |
| Amido dextrinizado (g)            | 15,50          | 0,00          | -             |
| Sacarose (g)                      | 10,00          | 0,00          | -             |
| Óleo de soja (g)                  | 4,00           | 5,10          | -             |
| Celulose MC-101 (g)               | 5,00           | 26,00         | -             |
| Mix mineral (g)                   | 3,50           | 3,50          | -             |
| Mix vitamínico (g)                | 1,00           | 1,00          | -             |
| L-cisteína (g)                    | 0,18           | 0,30          | -             |
| Bitartarato de colina (g)         | 0,25           | 0,25          | -             |
| Tert- butilhidroquinona (g)       | 0,0008         | 0,0014        | -             |

Fonte: (RIBEIRO, 2022)

Valores referentes a análise da composição centesimal da dieta MAL-ED e dieta controle (AIN-93M), assim como a quantidade de ingredientes usados para formulação de cada dieta.

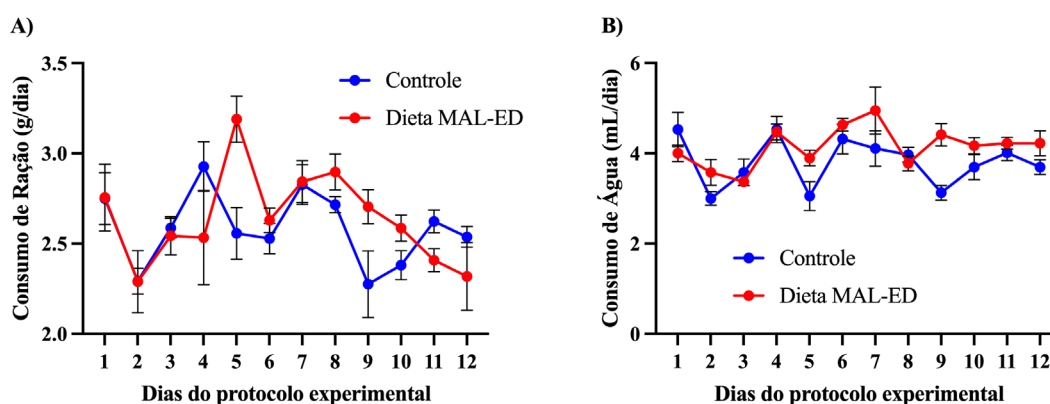
## 5.2. Indução de desnutrição pela dieta MAL-ED em camundongos recém-desmamados

### 5.2.1. Sinais clínicos registrados após o consumo agudo da dieta MAL-ED em camundongos recém-desmamados

O consumo das dietas controle (**Figura 19A**), com quantidades nutricionais, calóricas e energéticas padrão, e a dieta de indução de desnutrição MAL-ED com valores reduzidos desses parâmetros (**Figura 19A**), foi monitorado. O consumo da ração pelo grupo da dieta MAL-ED desnutrido foi ajustado com base no consumo da dieta pelo grupo controle no dia anterior.

O consumo de água, fornecida de forma *ad libitum* (**Figura 19B**), não revelou diferenças significativas no seu consumo, sugerindo uma tendência de manutenção de uma média similar ao longo dos 12 dias do experimento.

**Figura 19** – Consumo de Ração durante o período experimental

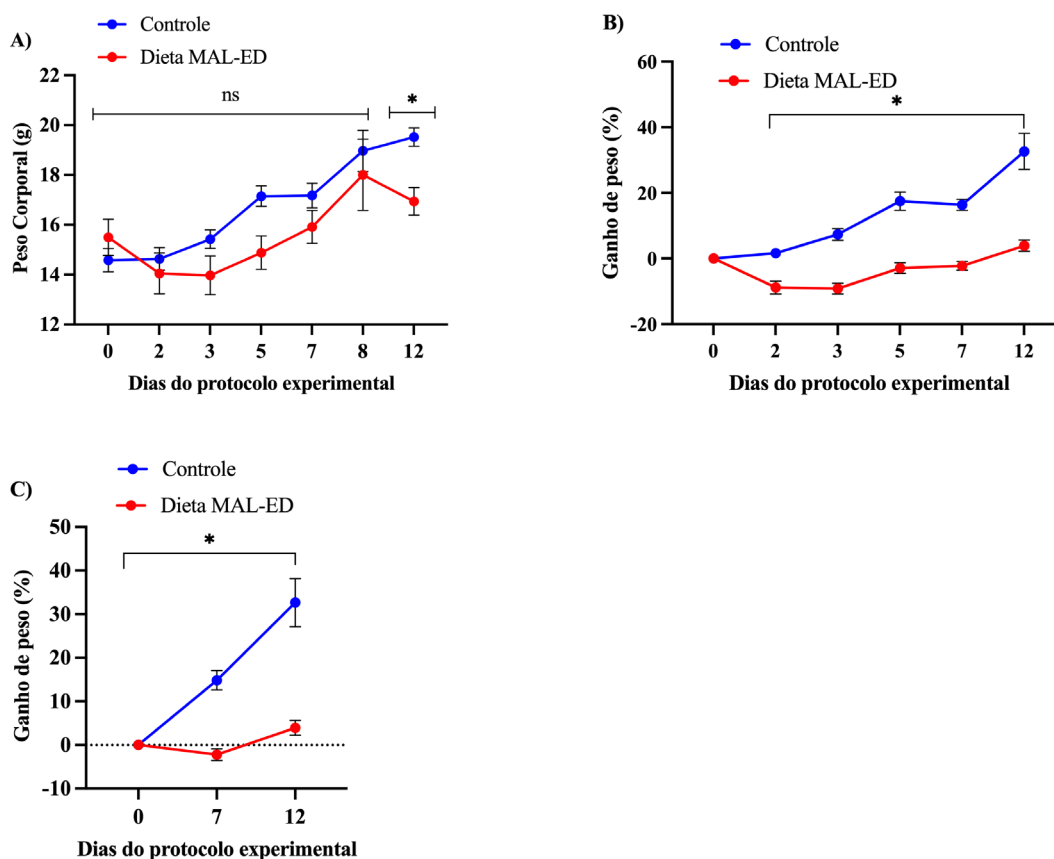


A) Consumo de ração em gramas por dia e B) Consumo de água em mililitros por dia pelos animais ( $n=8$  por grupo) submetidos à dieta controle vs. dieta MAL-ED para cada dia durante os 12 dias experimentais ( $* = p = 0.000404$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

O consumo da dieta de desnutrição MAL-ED durante os 12 dias experimentais mostrou, quando avaliado o peso dos animais em gramas (**Figura 20A**), diminuição significativa ( $p = 0,000444$ ) no dia 12 da linha de tempo experimental, dos animais do grupo da dieta MAL-ED ( $16,94 \pm 0,6672$ ) quando comparado aos animais do grupo controle ( $19,52 \pm 0,6672$ ).

Quando foi avaliado o percentual de ganho de peso dos animais (**Figura 20B**), a partir do dia 2, já foi possível encontrar diferença entre o grupo controle e desnutrido. No grupo controle nos dias 2 ( $p = 0.000283$ ;  $1.611 \pm 2.179$ ), 3 ( $p = 0.000008$ ;  $7.339 \pm 2.415$ ), 5 ( $p = 0.000017$ ;  $17.47 \pm 3.193$ ), 7 ( $p < 0.000001$ ;  $16.40 \pm 2.176$ ) e 12 ( $p = 0.000057$ ;  $32.66 \pm 6.227$ ) o percentual do ganho de peso dos animais foi estatisticamente maior que o do grupo da dieta MAL-ED (2 [ $p = 0.000283$ ;  $-8.844 \pm 2.179$ ], 3 [ $p = 0.000008$ ;  $-9.198 \pm 2.415$ ], 5 [ $p = 0.000017$ ;  $-2.916 \pm 3.193$ ], 7 [ $p < 0.000001$ ;  $-2.241 \pm 2.176$ ] e 12 [ $p = 0.000057$ ;  $3.920 \pm 6.227$ ]) (**Figura 20B**). Na **figura 20 C** é possível ver o comportamento referente ao ganho de peso em cada estágio experimental.

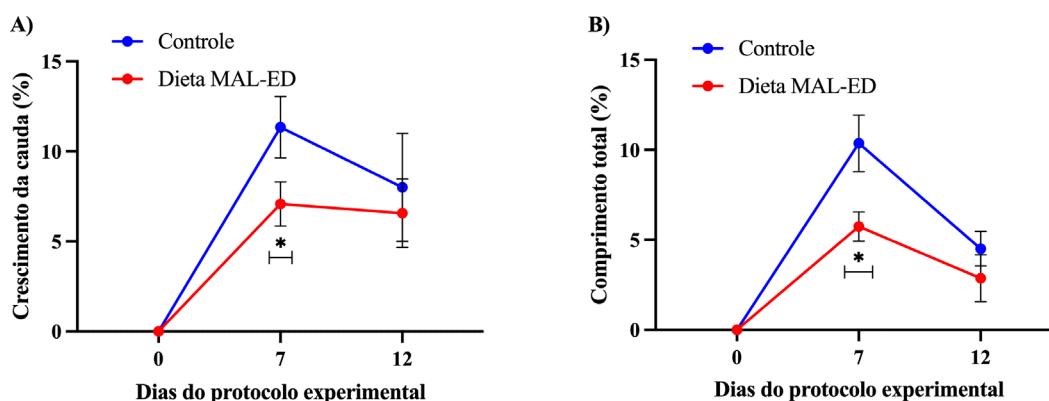
**Figura 20** – Ganho de peso durante o período experimental



A) Peso corporal dos animais em gramas a cada dia, B) Percentual de ganho de peso dos animais ( $n=8$  por grupo) a cada dia, C) Percentual de ganho de peso dos animais ao início e final de cada etapa experimental consumindo a dieta controle vs. dieta MAL-ED durante os 12 dias experimentais ( $* = p < 0,05$  e  $ns = p > 0,05$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

Foi avaliado o crescimento da cauda dos animais (**Figura 21A**), e observou-se uma diminuição no tamanho da cauda dos animais do grupo da dieta MAL-ED ( $p = 0.010833$ ;  $7.083 \pm 1.612$ ) em comparação com o grupo controle ( $p = 0.010833$ ;  $11.34 \pm 1.612$ ), no dia 7 de indução de desnutrição ( $p = 0,010833$ ). Ao avaliar o crescimento corporal total dos animais, um resultado semelhante foi encontrado, também no dia 7 ( $p = 0,000221$ ), os animais desnutridos ( $5,748 \pm 1,157$ ) apresentaram um menor tamanho corporal quando comparado ao grupo controle ( $10,36 \pm 1,157$ ) (**Figura 21B**).

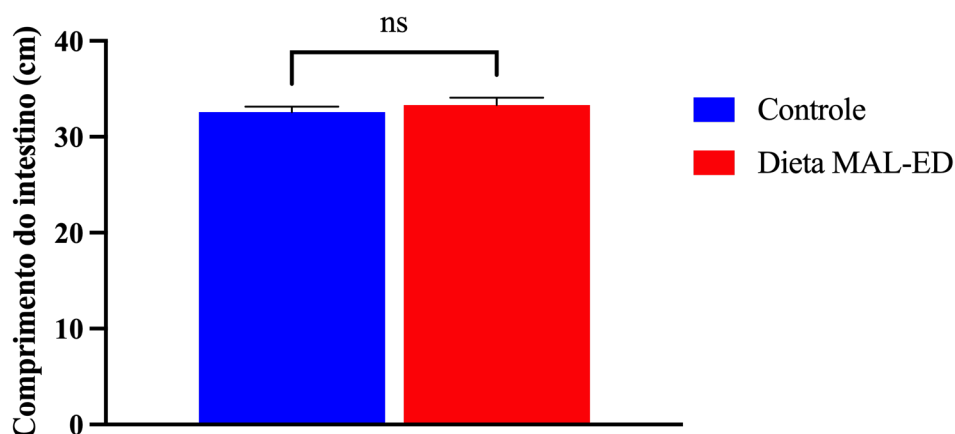
**Figura 21** – Crescimento dos animais submetidos as dietas



A) Percentual do crescimento da cauda dos animais e B) Percentual de comprimento total dos animais ( $n=8$  por grupo), nos períodos 0 (antes do consumo da dieta experimental), 7 (após sete dias de consumo da dieta) e 12 (após doze dias do consumo da dieta), após o consumo da dieta controle vs. dieta MAL-ED para cada estágio experimental (\*= $p<0,05$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

### 5.2.2. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre o tamanho total do intestino delgado de camundongos recém-desmamados

A avaliação do tamanho total do intestino dos camundongos foi realizada ao final do período experimental, no dia 12, e não foi encontrada diferença estatística entre os grupos avaliados ( $p>0,05$ ) (**Gráfico 1**).

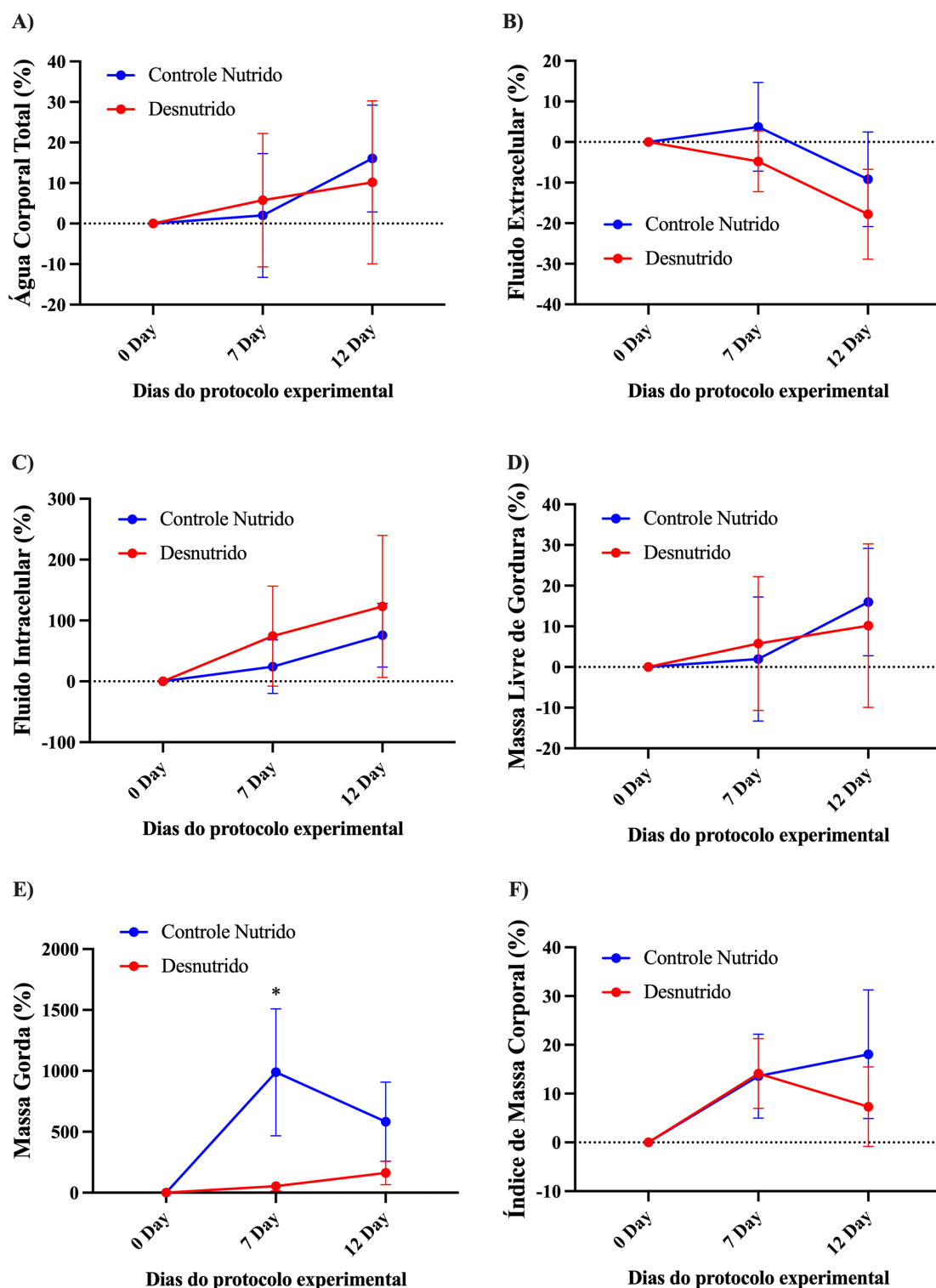
**Gráfico 1** – Comprimento total do intestino delgado

Comprimento total do intestino delgado ao final do período experimental nos animais ( $n=8$  por grupo) que consumiram a dieta controle vs. dieta MAL-ED ( $ns = p>0,05$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

### 5.2.3. Composição corporal de camundongos recém-desmamados após consumo agudo de dieta MAL-ED

Foi avaliada a composição corporal total (**Figura 22A**), fluido extracelular (**Figura 22B**), fluido intracelular (**Figura 22C**) e massa livre de gordura (**Figura 22D**), e nestes parâmetros nenhuma diferença significativa foi encontrada em nenhum dos tempos (7 e 12 dias) analisados. Por outro lado, observou-se redução significativa ( $p = 0,006039$ ; Controle  $988,07 \pm 328,6$  vs desnutrido  $53,44 \pm 328,6$ ) da massa gorda no grupo da dieta MAL-ED no dia 7 (**Figura 22E**). Já no índice de massa corporal não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos dias mensurados (7 e 12) (**Figura 22F**).

**Figura 22** – Avaliação da composição corporal dos animais submetidos as dietas



A) Água corporal total (%), B) Fluido extracelular (%), C) Fluido intracelular (%), D) Massa livre de gordura (%), E) Massa gorda (%) e F) Índice de massa corporal (%) dos animais controle (linha azul) e dieta MAL-ED (linha vermelha) nos dias 7 e 12 (n=8 por grupo). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística (\* $p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

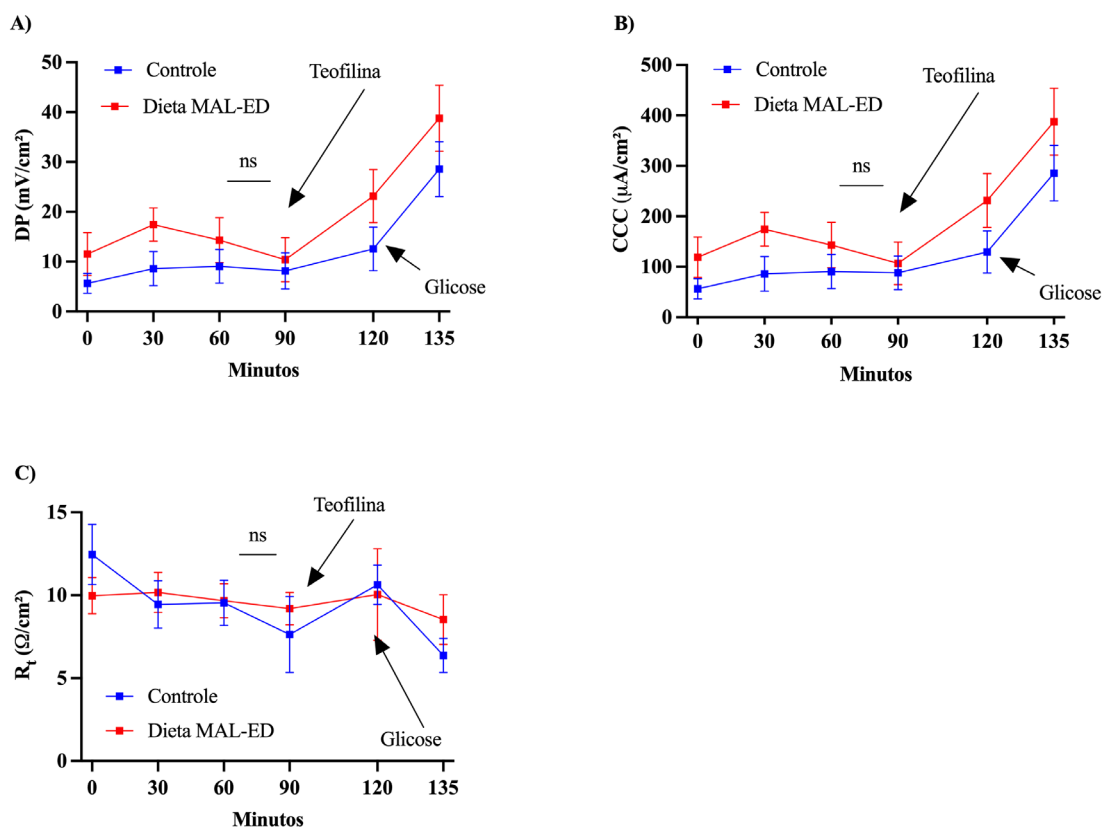
### **5.3. Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a barreira funcional gastrointestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados**

#### ***5.3.1. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados***

##### *5.3.2.1. Avaliação da Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial no segmento medial do intestino delgado durante o transporte dos carboidratos lactulose e manitol em Câmara de Ussing*

Na busca de uma nova abordagem para teste de lactulose:manitol, que até o momento era realizado somente *in vivo*, foi utilizado o sistema de câmaras de Ussing para implementação do mesmo teste só que *ex vivo*. O segmento medial do intestino delgado foi coletado e montado no SCU, banhado com 5 ml de cada lado do tecido de solução perfusora de Krebs e, em seguida, foi adicionado 30  $\mu$ L da solução de lactulose e manitol no banho do lado apical do epitélio intestinal avaliado. Após 60 minutos foi coletado um volume de 200  $\mu$ l do reservatório do perfusato que banha o lado basolateral do tecido. O volume coletado foi armazenado refrigerado para futura análise pelo HPLC, e durante os 90 minutos de experimento, os dados elétricos gerados pelo tecido foram coletados pelo SCU automatizado para análise posterior dos parâmetros eletrofisiológicos. Após a análise dos parâmetros eletrofisiológicos (**Figura 23**), de tensão transepitelial (**Figura 23A**), Corrente de Curto-Circuito (**Figura 23B**) e resistência transepitelial (**Figura 23C**), entre o grupo controle com o grupo da dieta MAL-ED, não foi encontrada diferença estatística entre os dois grupos em nenhum dos parâmetros avaliados ( $p>0,05$ ).

**Figura 23** – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre parâmetros eletrofisiológicos da permeabilidade intestinal



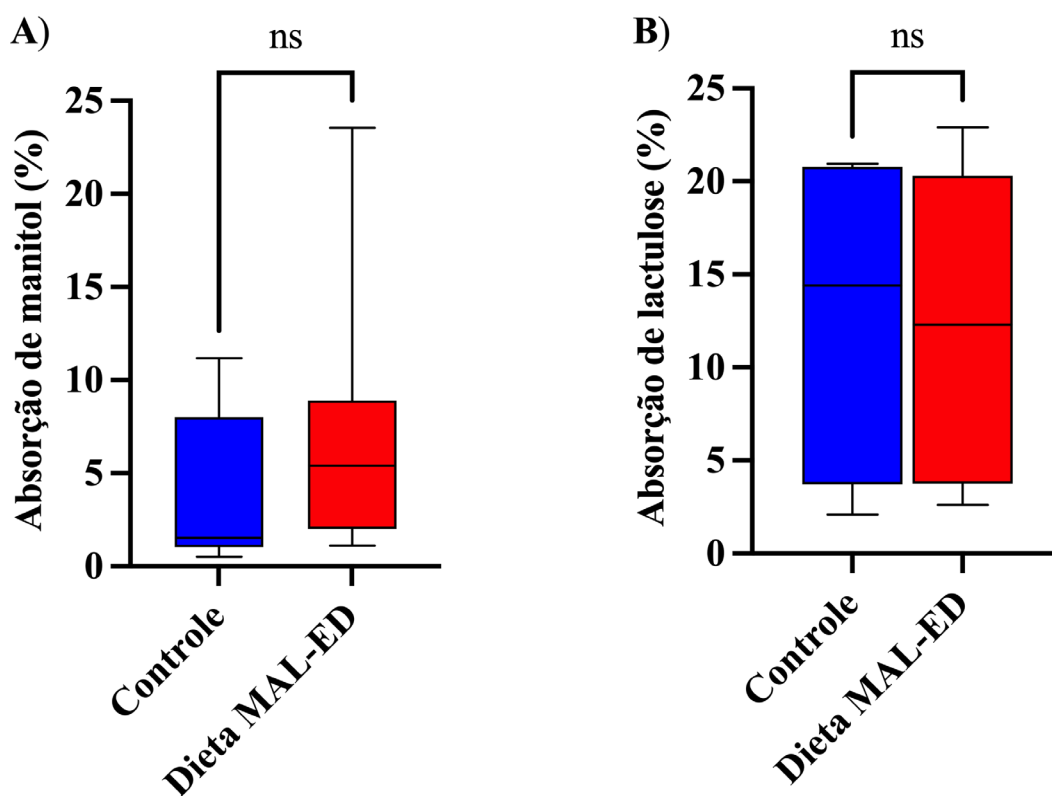
A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial dos animais (n=3 por grupo) **controle** (linha azul) e **dieta MAL-ED** (linha vermelha) no dia 13. T corresponde a teofilina e G a glicose. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de Student não pareados para dados não pareados na análise estatística (\* $p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

### 5.3.2.2. Avaliação da permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino delgado por meio do teste de lactulose:manitol *ex vivo*

Posterior ao experimento de permeabilidade nas câmaras de Ussing, foram feitas as análises das alíquotas coletadas das soluções de banho, presentes no reservatório do lado seroso de cada câmara, por meio da HPLC (**Figura 24**). Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos controle e desnutrido ( $p > 0,05$ ), quanto a permeação de lactulose (**Figura 24A**) e a permeação de manitol (**Figura 24B**).



**Figura 24** – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal



A) Percentual de permeação de manitol, B) Percentual de permeação de lactulose dos animais (n=3 por grupo) **controle** (linha azul) e **dieta MAL-ED** (linha vermelha) no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística (\* $p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

### **5.3.3. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre o transporte de substratos de glicose, glutamina e alanil-glutamina no intestino de camundongos recém-desmamados**

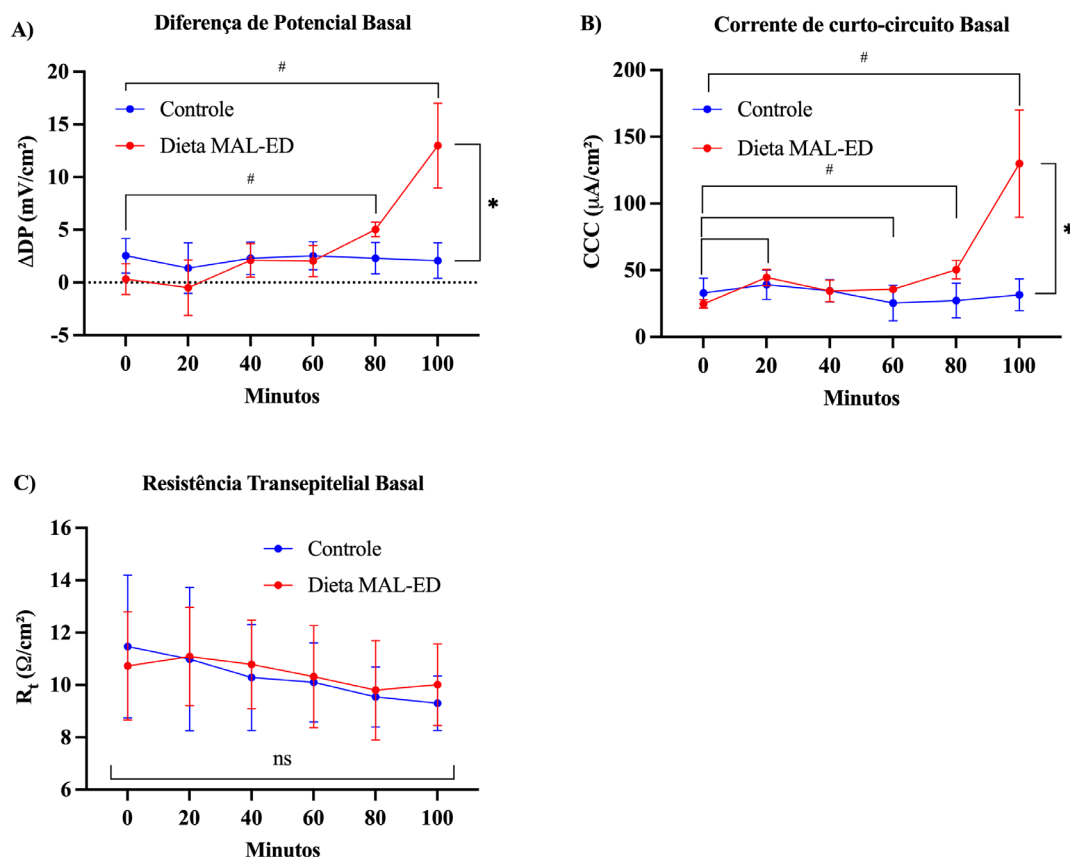
#### *5.3.3.1. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de glicose no intestino de camundongos recém-desmamados*

Foi avaliada a Diferença de Potencial (DP), a Corrente de Curto-Circuito (CCC) e a Resistência Transepitelial (Rt) basal dos segmentos mediais do intestino delgado dos animais dos grupos estudados. Ou seja, antes da adição dos substratos de glicose, glutamina ou alanil-glutamina, foram mensurados os parâmetros eletrofisiológicos citados acima, por um período de 100 minutos.

Após a análise, foi observado que a DP (**Figura 25A**) do grupo que consumiu a dieta MAL-ED ( $12,99 \pm 2,729$ ) começou inferior ao grupo controle ( $2,078 \pm 2,729$ ) que consumiu a dieta padrão, mas foi aumentando com o passar do tempo, apresentando diferença estatística ( $p = 0,000240$ ) aos 100 minutos de experimentação. Quando comparada a DP dentro do grupo da dieta MAL-ED, foi observado diferença entre o tempo 0 vs 80 min ( $p = 0,0159$ ) e entre o tempo 0 vs 100 min ( $p = 0,0317$ ).

A Corrente de Curto-Circuito (**Figura 25B**) apresentou comportamento semelhante, o grupo que ingeriu a dieta MAL-ED ( $129,9 \pm 21,17$ ) apresentou aumento com diferença estatística ( $p = 0,000031$ ) também no tempo de 100 minutos, quando comparado ao grupo controle ( $31,54 \pm 21,17$ ). Foi observado também diferença de CCC em quase todos os tempos do grupo da dieta MAL-ED comparando com o tempo 0, sendo encontrado diferença entre 0 vs 20 min ( $p = 0,0286$ ), 0 vs 60 min ( $p = 0,0317$ ), 0 vs 80 min ( $p = 0,0159$ ) e 0 vs 100 min ( $p = 0,0317$ ). Já a Rt (**Figura 25C**) se manteve estatisticamente semelhante, sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

**Figura 25** - Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na Corrente de Curto-Circuito, diferença de potencial e resistência transepitelial em condições basais



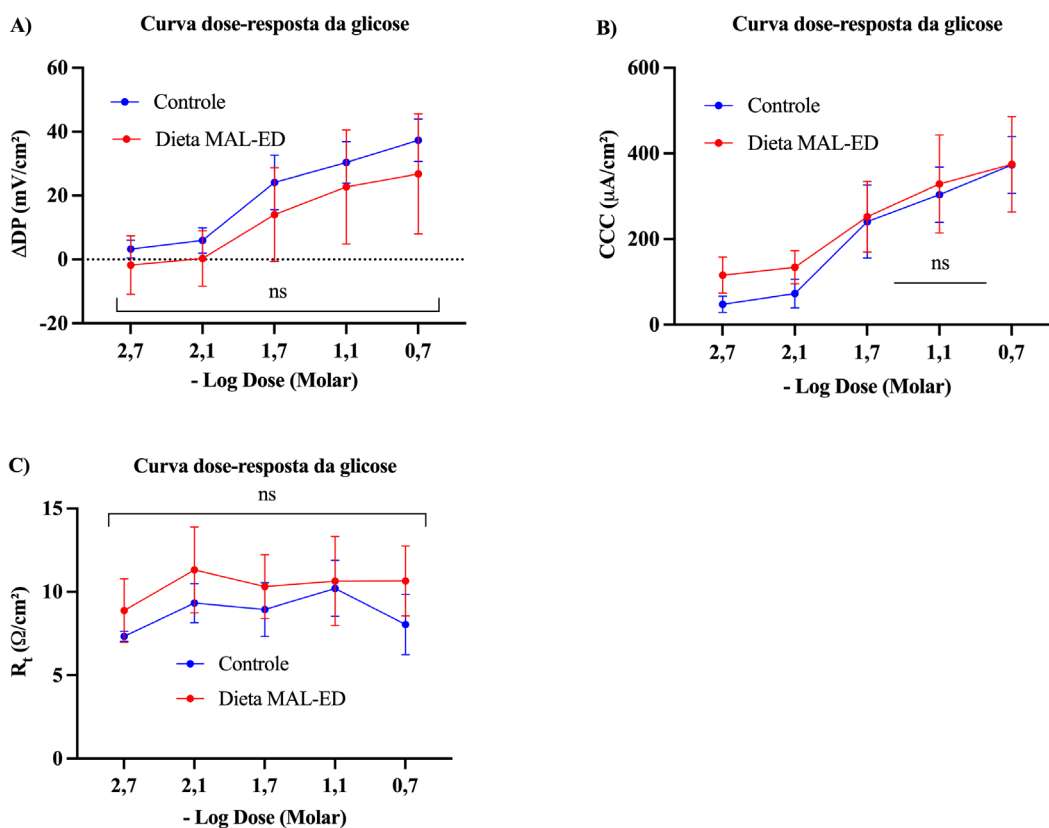
A) Tensão transepitelial basal, B) Corrente de Curto-Circuito basal, C) Resistência transepitelial basal dos animais ( $n=5$  por grupo) **controle** e da **dieta MAL-ED** no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística o asterisco (\*) =  $p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$  na comparação dos tempos entre controle e desnutrido, a cerquilha (#) corresponde a comparação dos tempos dentro do grupo da dieta MAL-ED.

Ao analisar a curva dose-resposta da glicose, foi observado que a DP (**Figura 26A**) do grupo alimentado com a dieta MAL-ED não apresentou diferença de potencial durante todo o experimento, em comparação com o grupo controle. A cada concentração adicionada, ambas os grupos tendiam a aumentar sua DP, mesmo não apresentando diferença estatística entre ambos ( $p > 0,05$ ). Já a CCC (**Figura 26B**), iniciou maior no grupo da dieta MAL-ED durante as duas primeiras concentrações testadas, mas sem diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ), porém, a partir da terceira concentração de glicose a 20 mM, a corrente se igualou a do grupo controle.

Quando avaliado a  $R_t$  (**Figura 26C**), foi possível observar que a resistência do grupo da dieta MAL-ED era maior que a do grupo nutrido durante a adição de todas as

concentrações de glicose, mas, assim como nos resultados de DP e CCC, não foi encontrada diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

**Figura 26** – Efeitos das concentrações cumulativas da glicose no segmento medial do intestino delgado



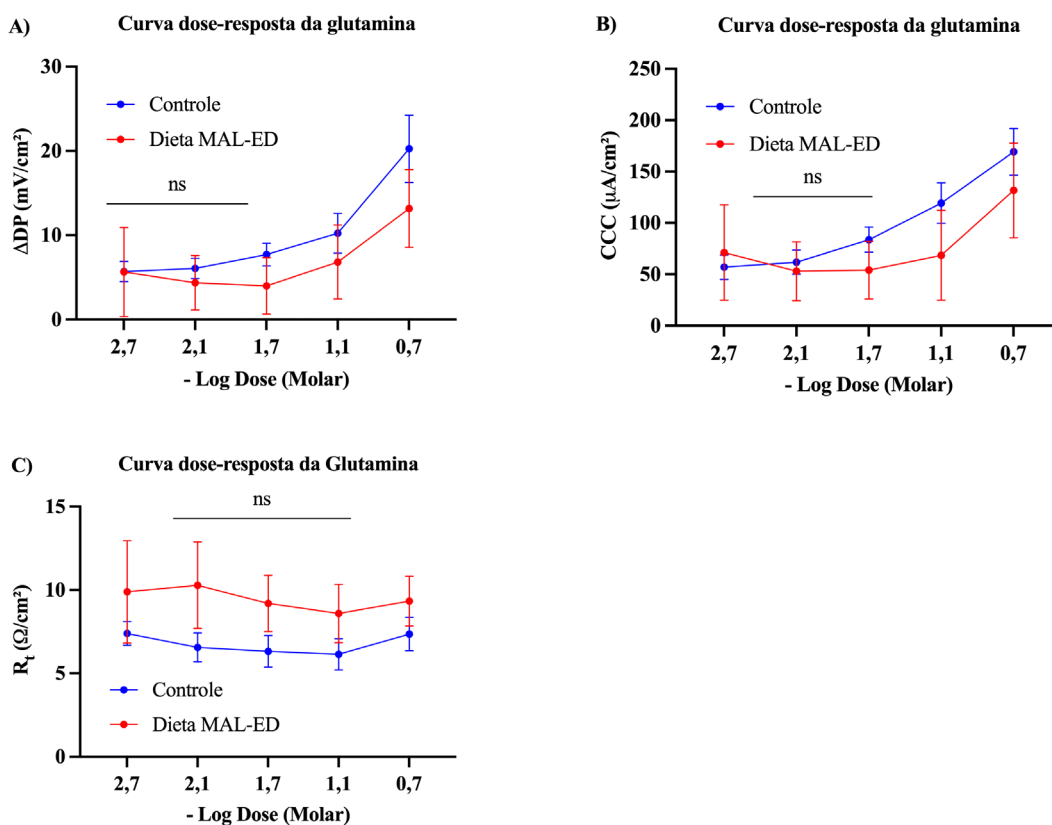
A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial frente a adição de glicose em concentrações cumulativas no segmento jejunal dos animais ( $n=5$  por grupo) **controle** e **dieta MAL-ED** no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes *t* de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e  $ns = p > 0,05$ ).

### 5.3.3.2. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de glutamina no intestino de camundongos recém-desmamados

Ao avaliar a curva dose-resposta da glutamina, notamos que a DP (**Figura 27A**), similar à resposta à glicose, não teve diferença significativa durante todo o experimento em relação ao grupo nutrido. Porém, diferentemente do comportamento frente à glicose, a resposta tanto do grupo controle, quanto do grupo da dieta MAL-ED, em contato com

a glutamina, apresentou um crescimento mais suave, com uma tendência inicial à redução da DP, nas concentrações de 2, 7, e 20 mM, e só após a adição da concentração de 70 mM a DP começou a aumentar em ambos os grupos, no entanto, não foi encontrada diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

**Figura 27** – Efeitos das concentrações cumulativas da glutamina no segmento medial do intestino delgado



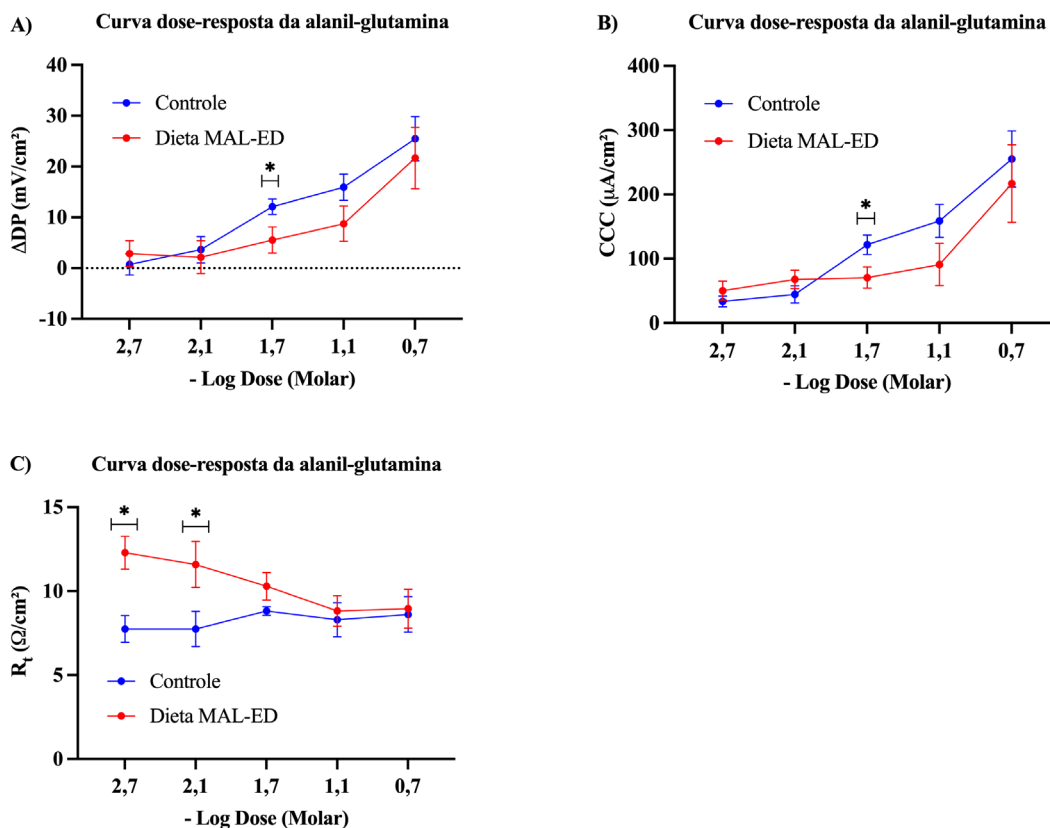
A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial frente a adição de glutamina em concentrações cumulativas no segmento jejunal dos animais ( $n=5$  por grupo) **controle** e **dieta MAL-ED** no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

A CCC (**Figura 27B**) começou maior no grupo da dieta MAL-ED e reduziu, seguindo o comportamento da DP, ficando menor que a CCC do grupo controle após a segunda concentração de glutamina adicionada (7 mM). Mesmo aumentando a partir da concentração de 20 mM, continuou inferior ao grupo controle até o fim do experimento ( $p>0,05$ ). A Rt (**Figura 27C**), como visto também frente à glicose, apresentou uma tendência a ser maior no grupo desnutrido durante todo o período experimental, mas não teve diferença estatística ( $p>0,05$ ).

#### *5.3.3.3. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados*

Como visto com a glutamina, na presença da alanil-glutamina a DP (**Figura 28A**) foi menor na concentração de 20 mM ( $p = 0,0331$ ) no grupo da dieta MAL-ED. Durante quase todo o período de teste, permaneceu inferior, mesmo sem diferença estatística, apresentando comportamento semelhante à CCC em relação à glutamina. Inicialmente, a CCC foi maior, diminuindo na segunda concentração testada e permanecendo inferior ao controle durante todo o experimento ( $p>0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado com a CCC (**Figura 28B**), em que o grupo controle foi estatisticamente maior ( $p = 0,0488$ ) que o grupo da dieta MAL-ED na concentração de 2 mM e 7 mM. No entanto, a Rt (**Figura 28C**) já se mostrou maior ( $p = 0,0106$  e  $0,0392$ ) no grupo da dieta MAL-ED ( $12,29 \pm 1,263$ ) que consumiu a dieta MAL-ED, em comparação com o grupo controle ( $7,749 \pm 1,263$ ), mesmo nas primeiras concentrações de alanil-glutamina.

**Figura 28** - Efeitos das concentrações cumulativas da alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado



A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial frente a adição de alanil-glutamina em concentrações cumulativas no segmento jejunal dos animais (n=5 por grupo) **controle** e **dieta MAL-ED** no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média, e foram utilizados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística (\* $p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

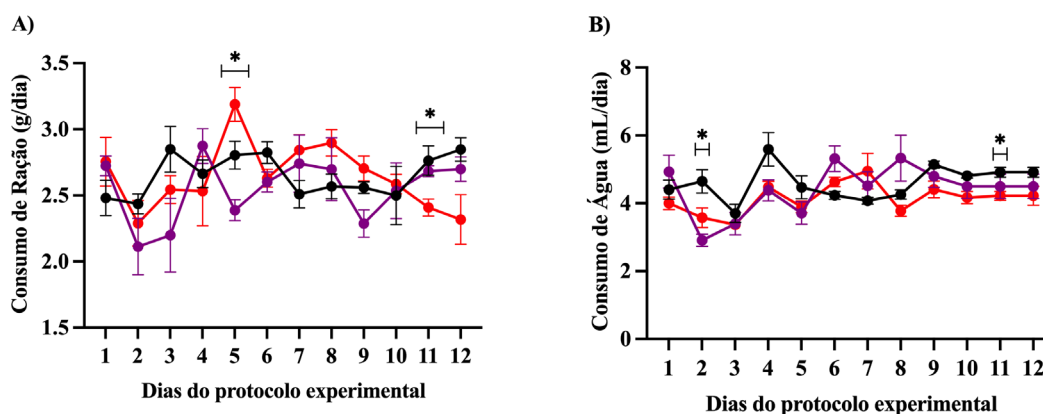
#### 5.4. Tratamento com glutamina após indução de desnutrição aguda pela dieta MAL-ED em camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina

##### 5.4.1. Avaliação dos sinais clínicos de desnutrição após tratamento com glutamina ou glicina

Do dia 8 ao dia 12 de experimentação, foi administrado glutamina ou glicina no bebedouro dos animais para consumo *ad libitum*. O consumo de ração mostrou diferença também no quinto dia experimental ( $p = 0,000019$ ), entre o grupo da dieta MAL-ED ( $3,189 \pm 0,1600$ ) e o grupo glutamina ( $2,388 \pm 0,1600$ ), e entre o grupo glutamina ( $p =$

0,004161;  $2,388 \pm 0,1343$ ) e glicina ( $2,805 \pm 0,1343$ ). No dia 11, também foi observada diferença significativa ( $p = 0,001933$ ) entre os grupos desnutrido ( $2,408 \pm 0,08099$ ) e o grupo glutamina ( $2,682 \pm 0,08099$ ) (**Figura 29A**). O consumo de água (*ad libitum*) (**Figura 29B**) mostrou diferença estatística ( $p = 0,000173$ ) no dia 2, entre o grupo glutamina ( $2,911 \pm 0,4051$ ) e o grupo glicina ( $4,647 \pm 0,4051$ ). Uma diferença significativa ( $p = 0,001340$ ) também foi observada entre o grupo da dieta MAL-ED ( $4,221 \pm 0,1967$ ) e o grupo glicina ( $4,914 \pm 0,1967$ ), no dia 11 do tempo experimental.

**Figura 29** - Consumo de Ração e água após o tratamento com glutamina ou glicina

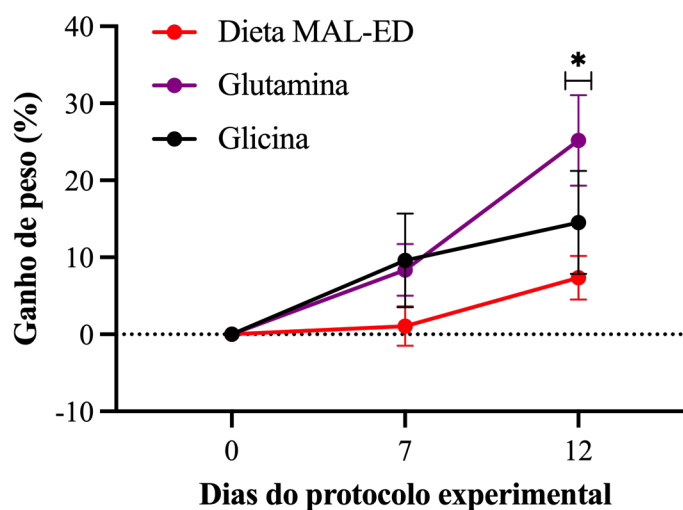


A) Consumo de ração em gramas por dia, B) Consumo de água em mililitros por dia pelos animais ( $n=8$  por grupo) que consumiram a dieta MAL-ED durante os 12 dias experimentais e foram tratados com glutamina e glicina do dia 8 ao dia 12 (\* =  $p < 0,05$ ). Grupo **dieta MAL-ED** (linha vermelha), **glutamina** (linha lilás) e **glicina** (linha preta). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

O ganho de peso dos animais desnutridos tratados com glutamina ou glicina (**Gráfico 2**), evidenciou um aumento significativo ( $p = 0,006442$ ) no grupo que recebeu glutamina ( $25,19 \pm 6,090$ ), em comparação com o grupo que consumiu a dieta MAL-ED ( $7,354 \pm 6,090$ ).

Já o grupo tratado com glicina (**Gráfico 2**) não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo da dieta MAL-ED ou grupo tratado com glutamina ( $p > 0,05$ ).

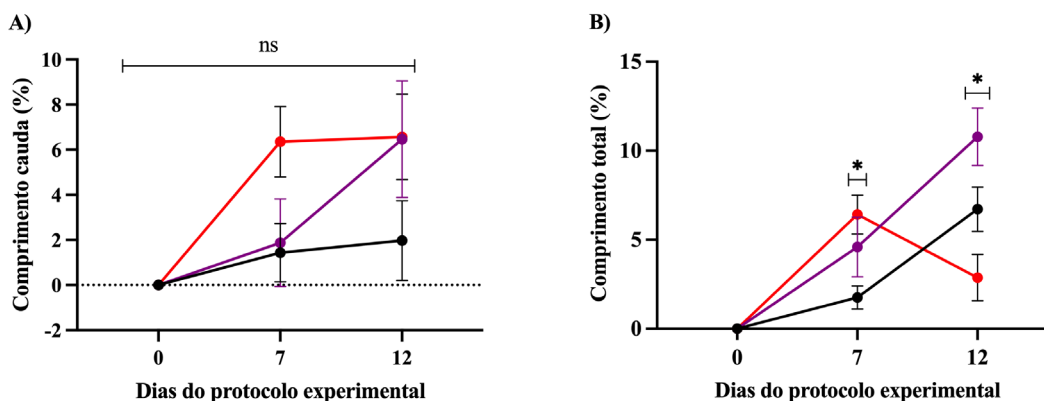


**Gráfico 2** – Ganho de peso dos animais após o tratamento com glutamina ou glicina

Percentual de ganho de peso dos animais (n=8 por grupo) antes e depois do tratamento consumindo a dieta MAL-ED durante os 12 dias experimentais (\* =  $p < 0,05$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

Foi mensurado o tamanho da cauda dos animais (**Figura 30A**) nos períodos pré e pós-tratamento com glutamina ou glicina, e foi percebido que, mesmo não encontrando diferença estatística, o grupo da dieta MAL-ED tratado com glutamina mostrou uma tendência a aumentar de tamanho após o início do tratamento, enquanto os outros grupos, tanto os animais não tratados quanto os animais tratados com glicina, mostraram seguir para um comportamento de platô após o dia 7. Quando avaliado o comprimento total dos animais tratados com glutamina ou glicina (**Figura 30B**) foi verificado que no dia 7 uma diferença estatística ( $p = 0,002089$ ) entre o grupo da dieta MAL-ED ( $6,414 \pm 1,193$ ) e glicina ( $1,757 \pm 1,193$ ), onde estes últimos era menores que os desnutridos não tratados. Já quando comparamos os animais tratados com glutamina com os animais não tratados (**Figura 30B**), foi visto que os animais tratados ( $10,78 \pm 2,070$ ) era estatisticamente ( $p = 0,005083$ ) maiores que os animais não tratados ( $1,872 \pm 2,070$ ).

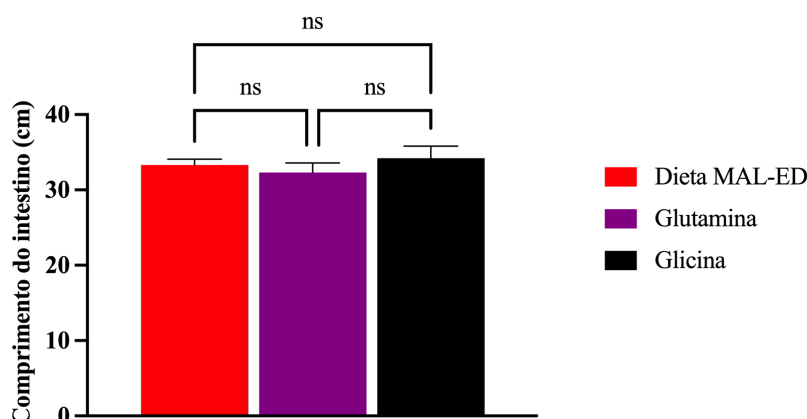
**Figura 30** – Comprimento de cauda e total após o tratamento com glutamina ou glicina



A) Percentual do crescimento da cauda dos animais e B) Percentual de comprimento total dos animais ( $n=8$  por grupo), nos períodos 0 (antes do consumo da dieta experimental), 7 (após sete dias de consumo da dieta) e 12 (após doze dias do consumo da dieta), após o consumo da dieta controle *vs.* dieta MAL-ED e tratamento com glutamina ou glicina a partir do dia 8 ( $*=p<0,05$  e  $ns = p>0,05$ ). Grupo **dieta MAL-ED** (linha vermelha), **glutamina** (linha lilás) e **glicina** (linha preta). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

#### 5.4.2. Tamanho total do intestino delgado de camundongos desnutridos pela dieta MAL-ED após tratamento com glutamina

O intestino delgado dos camundongos pertencentes aos grupos de animais que foram induzidos à desnutrição pela dieta MAL-ED e, após o oitavo dia, foram tratados com glutamina ou glicina, foram avaliados quanto ao tamanho total no dia 12. Não foram encontradas quaisquer diferenças estatísticas ( $p>0,05$ ) (**Gráfico 3**).

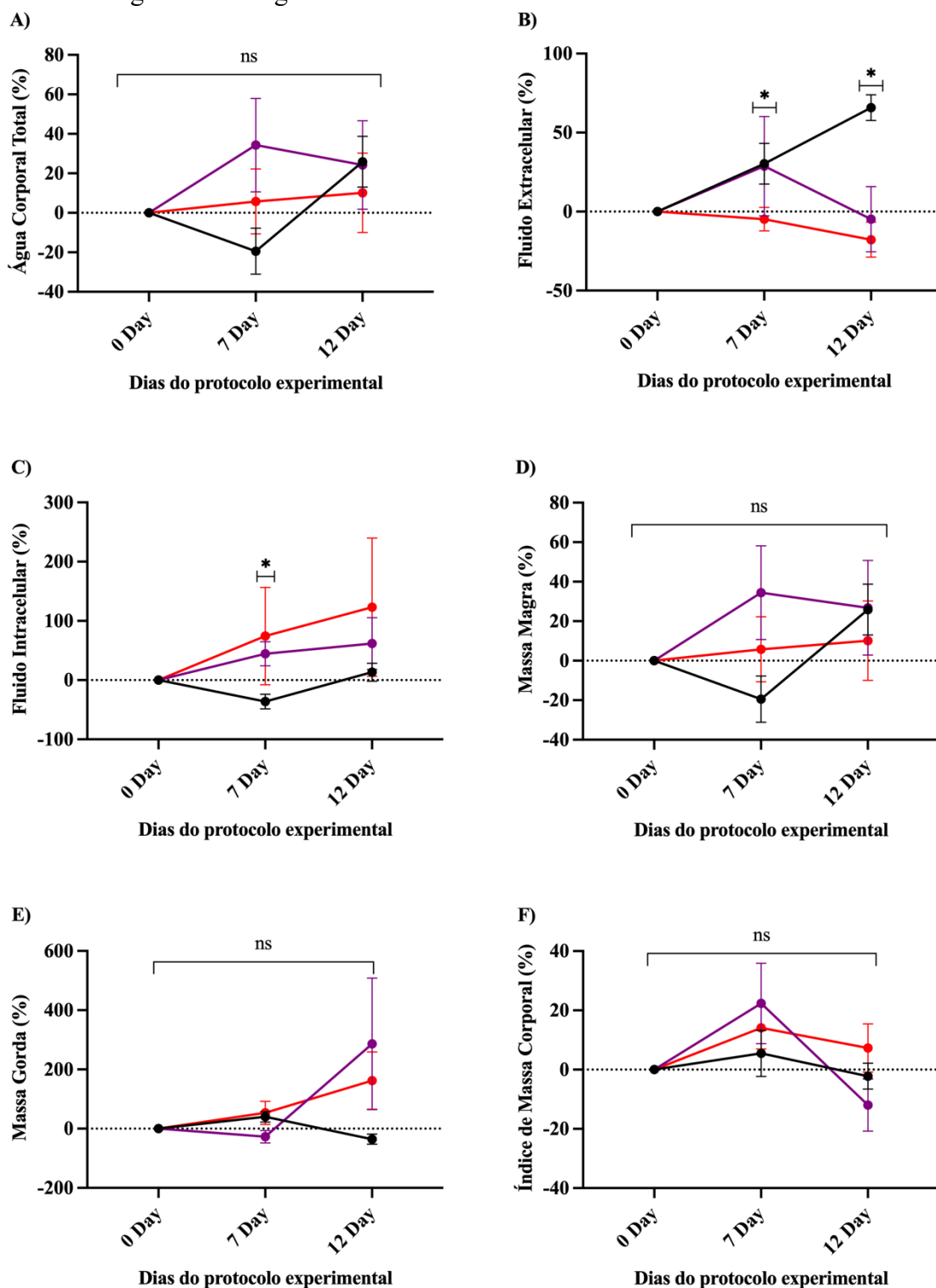
**Gráfico 3** – Comprimento total do intestino delgado após o tratamento

Comprimento total do intestino delgado ao final do período experimental nos animais ( $n=8$  por grupo) que consumiram a dieta MAL-ED e foram tratados com glutamina ou glicina ( $ns = p>0,05$ ). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística.

#### 5.4.3. Avaliação da composição corporal de camundongos desnutridos pela MAL-ED após tratamento com glutamina

Ao avaliar a composição corporal dos grupos submetidos à dieta MAL-ED e que, a partir do dia 8, receberam tratamento na água com glutamina ou glicina, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos em relação à água corporal total (**Figura 31A**), massa livre de gordura (**Figura 31D**), massa gorda (**Figura 31E**) e índice de massa corporal (**Figura 31F**) em cada tempo avaliado. Quanto ao fluido extracelular (**Figura 31B**), o grupo glicina no dia 7 ( $30,34 \pm 13,89$ ) apresentou maior quantidade ( $p = 0,022459$ ) de fluido extracelular em comparação com o grupo da dieta MAL-ED ( $-4,754 \pm 13,89$ ). Quando comparado no dia 12 (**Figura 31B**), o mesmo comportamento foi observado, o grupo glicina ( $65,84 \pm 16,85$ ) apresentou maior quantidade ( $p = 0,000141$ ) de fluido extracelular em comparação com o grupo da dieta MAL-ED ( $-17,78 \pm 16,85$ ). Já quando foi avaliado o grupo glutamina ( $-4,817 \pm 22,21$ ) e comparado com o grupo glicina ( $65,84 \pm 22,21$ ), foi observada (**Figura 31B**) diferença estatisticamente significativa no dia 12 ( $p = 0,009805$ ). O parâmetro de fluido intracelular (**Figura 31C**) foi maior ( $p = 0,006910$ ) no grupo glutamina ( $44,56 \pm 23,81$ ) quando comparado com o grupo glicina ( $-36,10 \pm 23,81$ ) no dia 7 da linha de tempo experimental.

**Figura 31** - Avaliação da composição corporal dos animais submetidos à dieta MAL-ED tratados com glutamina ou glicina



A) Água corporal total (%), B) Fluido extracelular (%), C) Fluido intracelular (%), D) Massa livre de gordura (%), E) Massa gorda (%) e F) Índice de massa corporal (%) dos animais ( $n=8$  por grupo) que consumiram a dieta MAL-ED e foram tratados com glutamina ou glicina do dia 8 ao dia 12. **Grupo dieta MAL-ED** (linha vermelha), **glutamina** (linha lilás) e **glicina** (linha preta). Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

## **5.5. Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade e barreira funcional gastrointestinal no intestino de camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina**

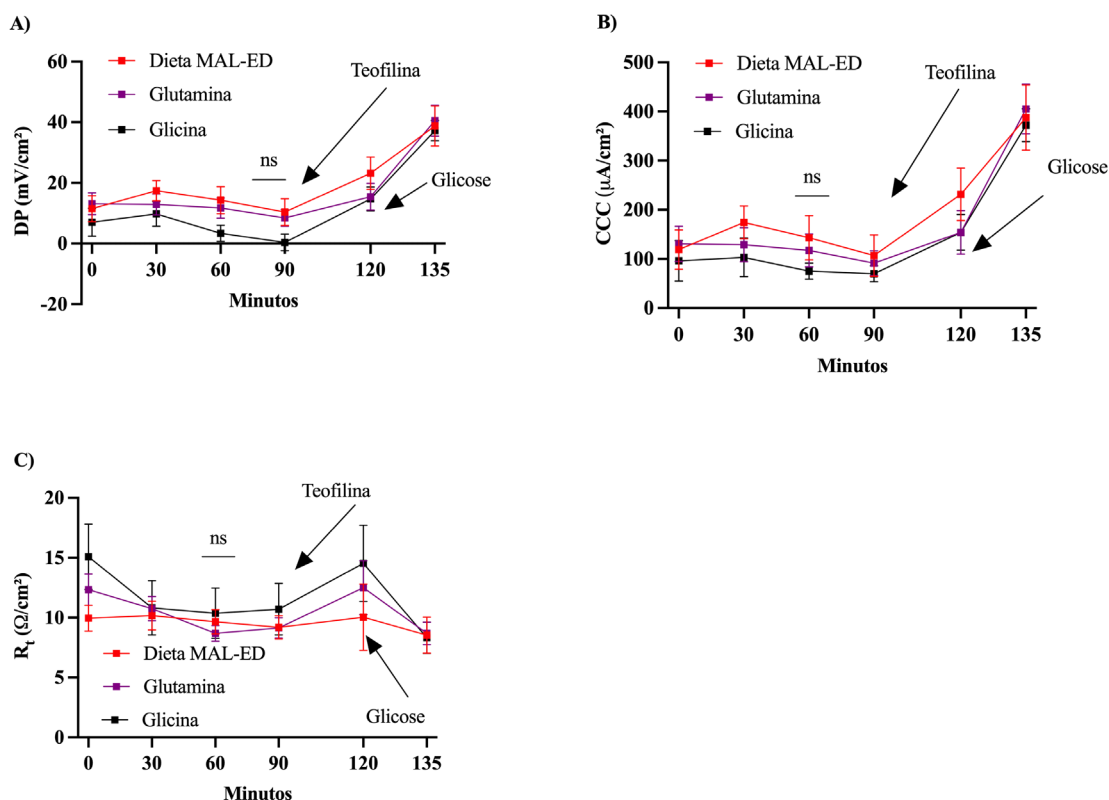
### ***5.5.1. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina***

#### ***5.5.1.1. Avaliação da Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial no segmento medial do intestino delgado de camundongos durante o transporte dos carboidratos lactulose e manitol em Câmara de Ussing***

A partir daqui todos os resultados serão referentes aos animais que consumiram a dieta MAL-ED. Será realizado um comparativo entre o grupo da dieta MAL-ED que não recebeu tratamento e os grupos que receberam tratamento *ad libitum* com glutamina ou glicina na água de consumo diário.

Ao realizar a avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos pela Câmara de Ussing, durante a realização da nova abordagem *ex vivo* do teste de lactulose:manitol, foi verificado que ambos os grupos avaliados — desnutrido, desnutrido tratado com glutamina e desnutrido tratado com glicina —, apresentaram comportamento semelhante em relação a DP (**Figura 32A**), onde eles se mantiveram com valores próximos e lineares, sem diferença entre ambos ( $p>0,05$ ). Da mesma forma, a CCC (**Figura 32B**) e a Rt (**Figura 32C**), também permaneceram equivalentes durante todo o período experimental ( $p>0,05$ ), seguindo o mesmo comportamento linear e em aumento, com exceção do momento em que foi adicionado a teofilina (T) e a glicose(G), substratos usados para teste funcional de membrana, ao final do experimento, onde é possível ver o aumento da DP e da CCC em todos os grupos.

**Figura 32** – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre parâmetros eletrofisiológicos da permeabilidade intestinal de animais tratados

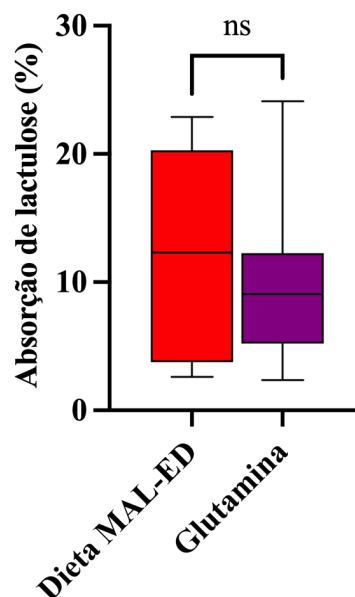


A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial dos animais ( $n=3$  por grupo) do grupo **dieta MAL-ED** (linha vermelha), e dos grupos tratados **glutamina** (linha lilás) e **glicina** (linha preta) no dia 13. T corresponde a teofilina e G a glicose. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e  $ns = p > 0,05$ ).

### 5.5.1.2. Avaliação da permeabilidade intestinal no segmento medial do intestino delgado de camundongos por meio do teste de lactulose:manitol *ex vivo*

A análise do conteúdo coletado do lado seroso da membrana jejunal dos grupos desnutrido e desnutrido tratado com glutamina, após a adição da solução de lactulose e manitol do lado mucoso (**Gráfico 4**), evidenciou que a média percentual de permeação de lactulose do grupo tratado com glutamina (9,63) foi menor ( $p > 0,05$ ) que a do grupo da dieta MAL-ED que não recebeu tratamento (12,26).

**Gráfico 4** – Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a permeabilidade intestinal de animais tratados



A) Percentual de permeação de manitol, B) Percentual de permeação de lactulose dos animais (n=3 por grupo) do grupo da **dieta MAL-ED** tratado com **glutamina** no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).

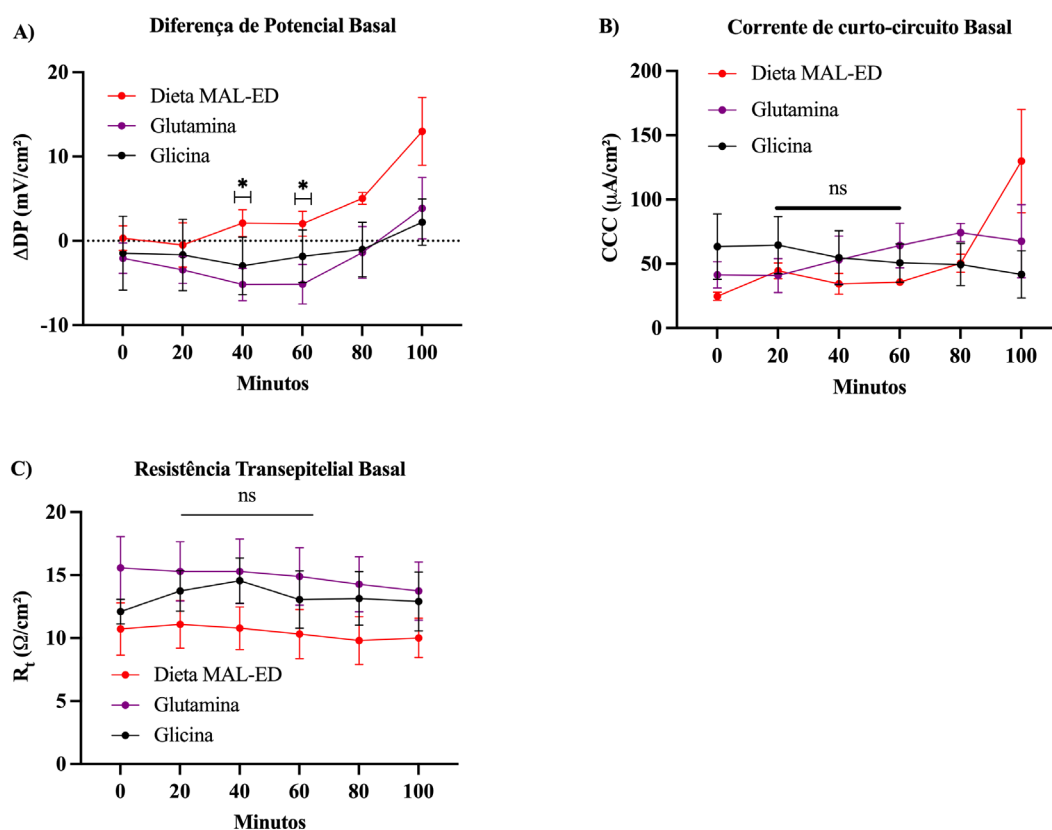
### ***5.5.2. Efeito do consumo agudo da dieta de desnutrição MAL-ED sobre o transporte de substratos de glicose, glutamina e alanil-glutamina no intestino de camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina***

#### ***5.5.2.1. Efeito do consumo agudo da dieta de desnutrição MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de glicose no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina***

Foi feita uma análise basal dos parâmetros eletrofisiológicos de DP, CCC e Rt dos animais que consumiram a dieta MAL-ED e os que receberam tratamento com glutamina ou glicina, buscando observar o comportamento prévio do segmento medial do intestino delgado destes animais, antes da exposição aos substratos de glicose, glutamina e alanil-glutamina. Ao avaliar o comportamento basal dos tecidos, foi observado que o grupo da dieta MAL-ED não tratado tinha uma maior DP (**Figura 33A**) em relação aos outros dois

grupos, sendo que entre estes dois a glutamina apresentava a menor DP em relação ao grupo não tratado. Ambos os grupos analisados, iniciaram diminuindo a DP e foram aumentando com o passar do tempo. Nos tempos 40 ( $p = 0,0151$ ) e 60 minutos ( $p = 0,0278$ ) o grupo não tratado estava com a DP maior que os animais do grupo glutamina tratado ( $p < 0,05$ ). Quanto à CCC (**Figura 33B**), o grupo sem tratamento manteve-se por quase todo o experimento menor ( $p > 0,05$ ) que os grupos tratados, entretanto, aos 100 minutos o grupo não tratado ultrapassou os dois grupos no valor da CCC. A  $R_t$  (**Figura 33C**) do grupo da dieta MAL-ED não tratado foi menor que a dos grupos tratados por todo tempo de avaliação, mas sem diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Figura 33** – Efeitos do consumo agudo da dieta MAL-ED na Corrente de Curto-Circuito, diferença de potencial e resistência transepitelial em condições basais após tratamento

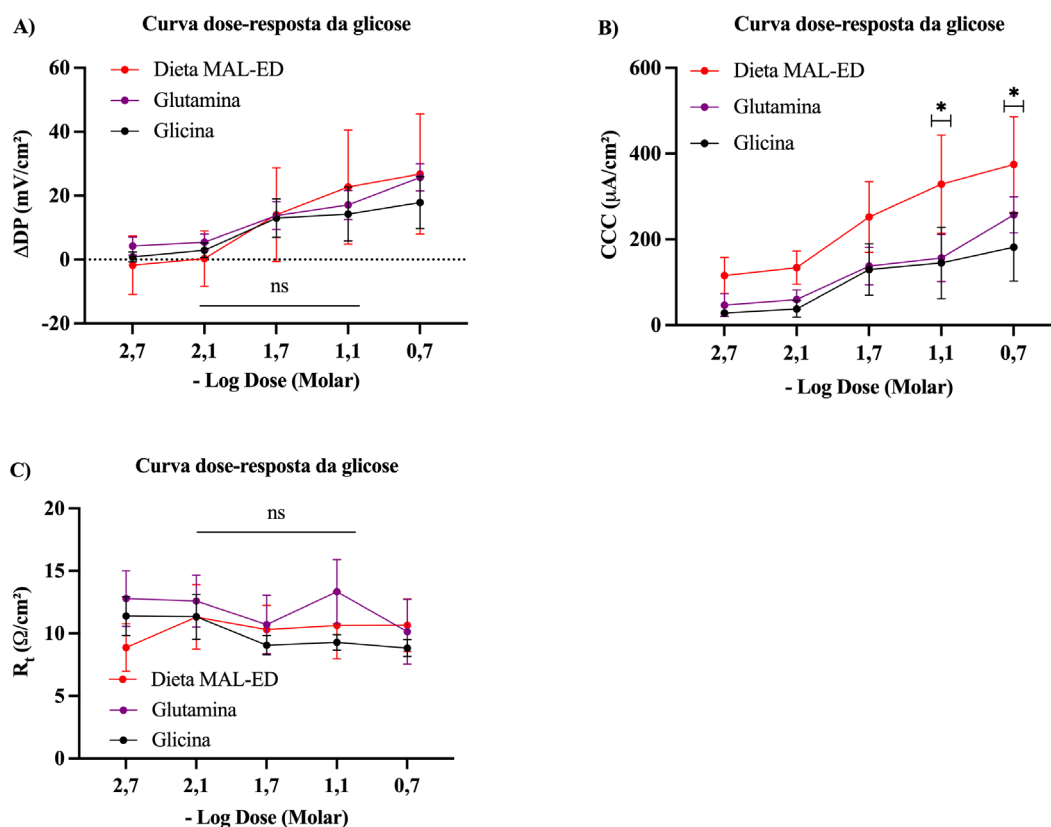


A) Tensão transepitelial basal, B) Corrente de Curto-Circuito basal, C) Resistência transepitelial basal dos animais ( $n=5$  por grupo) do grupo da **dieta MAL-ED** (linha vermelha), tratados com **glutamina** (linha lilás) ou **glicina** (linha preta) no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e ns =  $p > 0,05$ ).



Quando avaliado a resposta da DP frente à glicose (**Figura 34A**) não foi encontrada diferença estatística em nenhuma das concentrações entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Já a CCC (**Figura 34B**), foi encontrada diferença estatística nas duas maiores concentrações de 70 mM ( $p = 0,0444$ ) entre o grupo da dieta MAL-ED e o grupo tratado com glicina, e na concentração de 200 mM ( $p = 0,0349$ ), também entre o não tratado e o tratado com glicina ( $p < 0,05$ ). Já a  $R_t$  (**Figura 34C**) mostrou valores semelhantes entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Figura 34** - Efeitos das concentrações cumulativas da glicose no segmento medial do intestino delgado de animais tratados com glutamina ou glicina

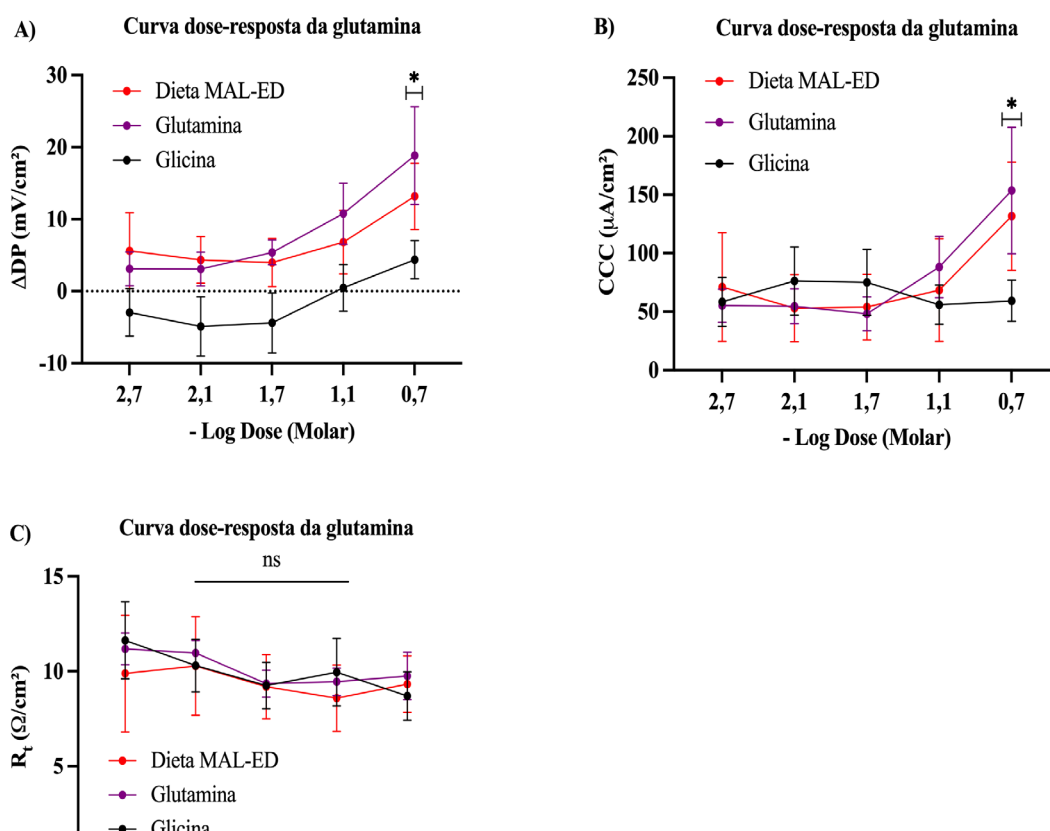


A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial frente a adição de glicose em concentrações cumulativas no segmento jejunal dos animais ( $n=5$  por grupo) do grupo da **dieta MAL-ED** (linha vermelha), tratados com **glutamina** (linha lilás) ou **glicina** (linha preta) no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e  $ns = p > 0,05$ ).

5.5.3.2. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de glutamina no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina

Já quando exposto a concentrações de glutamina, a DP (**Figura 35A**) no intestino dos animais não tratados começou maior que nos grupos tratados. No entanto, após a adição da concentração de 20 mM de glutamina, o grupo tratado com glutamina ultrapassou o valor de DP do grupo não tratado, mantendo-se maior até o final do experimento. Na concentração de 200 mM o grupo tratado com glutamina apresentou uma DP maior ( $p = 0,0212$ ) que o grupo tratado com glicina, este com a menor DP durante todo o período experimental.

**Figura 35** – Efeitos das concentrações cumulativas da glutamina no segmento medial do intestino delgado de animais tratados com glutamina ou glicina



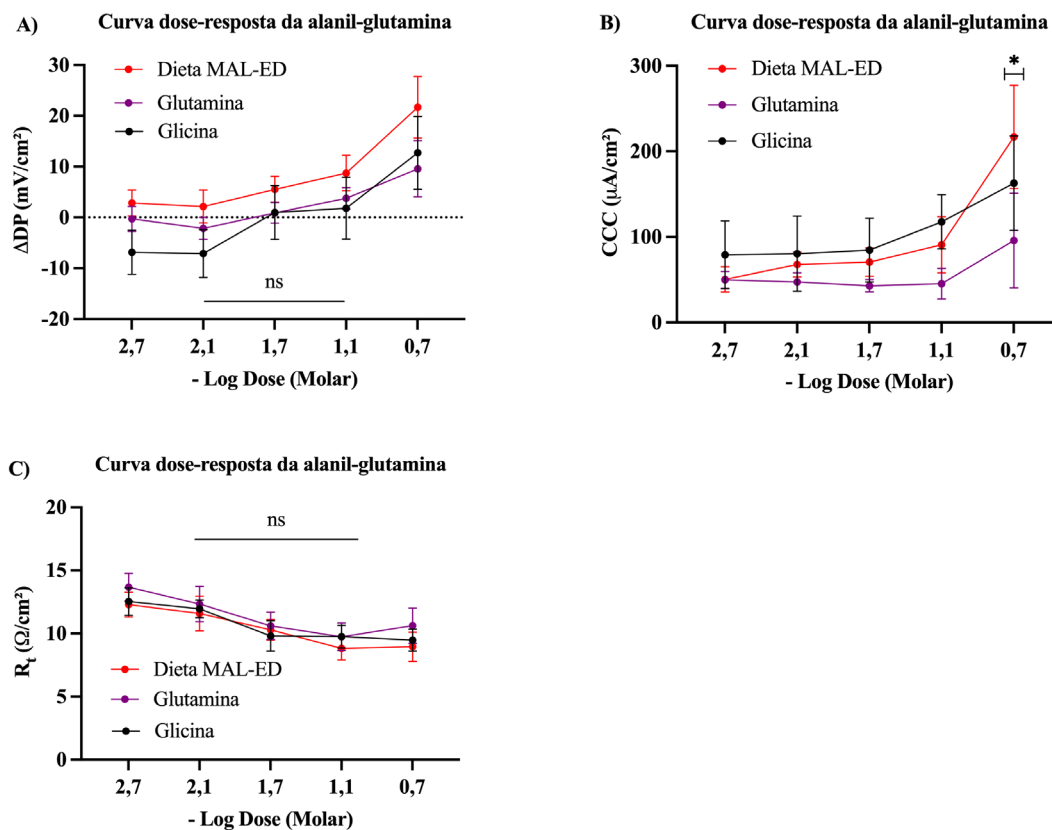
A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial frente a adição de glutamina em concentrações cumulativas no segmento jejunal dos animais ( $n=5$  por grupo) do grupo da **dieta MAL-ED** (linha vermelha), tratados com **glutamina** (linha lilás) ou **glicina** (linha preta) no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de Student não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e  $ns = p > 0,05$ ).

A CCC (**Figura 35B**) teve comportamento similar a DP, com o grupo tratado com glutamina apresentando maior CCC ( $p = 0,0247$ ) em comparação ao grupo tratado com glicina, especialmente na concentração de 200 mM de glutamina. No entanto, a Rt (**Figura 35C**) não apresentou diferença significativa entre os grupos frente às concentrações cumulativas de glutamina ( $p > 0,05$ ).

*5.5.3.3. Efeito do consumo agudo da dieta MAL-ED sobre a Resistência Transepitelial, Corrente de Curto-Circuito e Tensão Transepitelial durante o transporte de alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado de camundongos recém-desmamados tratados com glutamina ou glicina*

Por fim, foram avaliadas as respostas elétricas do segmento medial do intestino delgado dos camundongos frente à exposição a concentrações cumulativas de alanil-glutamina (**Figura 36**). O grupo não tratado, quando exposto à alanil-glutamina, manteve a DP (**Figura 36A**) mais elevada do que os outros dois grupos tratados, em todas as concentrações administradas ao longo do experimento, mas não foi encontrada diferença estatística entre os grupos em relação à DP ( $p > 0,05$ ). Quanto à CCC (**Figura 36B**), o grupo não tratado começou com o menor valor, assim como o grupo tratado com glutamina. Após a adição da primeira concentração de alanil-glutamina (2 mM) o valor de CCC (**Figura 36C**) começou a aumentar, ultrapassando o valor de CCC dos grupos tratados. Ao final do experimento, diante da concentração cumulativa de 200 mM, o valor da CCC do grupo não tratado foi estatisticamente maior ( $p = 0,0161$ ) em comparação com o grupo tratado com glutamina.

**Figura 36** – Efeitos das concentrações cumulativas da alanil-glutamina no segmento medial do intestino delgado de animais tratados com glutamina ou glicina



A) Tensão transepitelial, B) Corrente de Curto-Circuito, C) Resistência transepitelial frente a adição de alanil-glutamina em concentrações cumulativas no segmento jejunal dos animais ( $n=5$  por grupo) do grupo da **dieta MAL-ED** (linha vermelha), tratados com **glutamina** (linha lilás) ou **glicina** (linha preta) no dia 13. Os valores estão representados em média  $\pm$  erro padrão da média e foram usados múltiplos testes t de *Student* não pareados para dados não pareados na análise estatística ( $*p < 0,05$  e  $ns = p > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A desnutrição tem suas consequências para a saúde e o desenvolvimento infantil, impactando no crescimento linear, desenvolvimento cognitivo e aumentando a morbidade e mortalidade, além de causar danos na reprodução e capacidade de trabalho na idade adulta, quando exposta a condições promotoras da desnutrição (HOROWITZ *et al.*, 2023; NGO; ORTIZ-ANDRELLUCCHI; SERRA-MAJEM, 2016). Esse conhecimento vem sendo construído ao longo de várias décadas, devido à grande relevância que esse tema tem frente ao cenário de saúde pública mundial. Já está comprovado que a desnutrição nos primeiros anos de vida da criança aumenta os riscos de desenvolvimento de doenças metabólicas, como diabetes e obesidade, bem como doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial e outras doenças coronarianas na idade adulta (GUERRANT *et al.*, 2008; IBRAHIM *et al.*, 2017; UNICEF/WHO/WORLD BANK GROUP, 2023; WELLS *et al.*, 2020).

Diante desse cenário, a intervenção, seja por parte de órgãos governamentais ou não, por meio de políticas e ações de conscientização da importância da amamentação e da alimentação complementar de qualidade, estimulando a implementação da nutrição saudável, vem sendo realizada por todo o mundo. Estudos de coorte desenvolvidos em todos os continentes (MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS, 2017; MILLER *et al.*, 2014; MUNIRUL ISLAM *et al.*, 2019; WOON *et al.*, 2018), permitiram o acompanhamento e monitoramento de crianças residentes em países subdesenvolvidos, possibilitando a coleta de informações referentes à dieta consumida pela mãe e pela criança, crescimento corporal, desenvolvimento cognitivo, incidência de infecções, entre outras doenças, acompanhando essas crianças até a idade escolar (MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS, 2017; WOON *et al.*, 2018). Em alguns desses estudos, foram realizadas intervenções, como o emprego de soluções de reidratação oral, campanhas de vacinação, orientação e estímulo ao emprego da amamentação como primeira fonte de alimentação, e administração suplementar de micronutrientes, na tentativa de diminuir a morbidade e mortalidade infantil (LIMA, 1998; LIMA *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2021; ZHANG; GUO, 2009).

Na visão de agências internacionais, como a UNICEF e o World Bank, bem como observa-se em vários países desenvolvidos, a melhoria da nutrição promove o aumento do capital humano e crescimento econômico da nação (UNICEF/WHO/WORLD BANK GROUP, 2023).

Quanto mais se compreende sobre as consequências da desnutrição, mais evidente se torna a necessidade de prevenir o desenvolvimento dessa condição, evitando assim seus impactos sobre o indivíduo a curto e longo prazo. Esses impactos incluem o comprometimento do crescimento linear, do desenvolvimento cognitivo e o aumento do risco de desenvolver doenças metabólicas e cardiovasculares na idade adulta. Além disso, a desnutrição também afeta o desenvolvimento humano e econômico do país (DEBOER *et al.*, 2013; GUERRANT *et al.*, 2008; HOFFMAN, 2021; MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS, 2017). Um compromisso deve ser assumido pela esfera pública com a saúde infantil, especialmente em países subdesenvolvidos, e desenvolva estratégias para melhorar o estado nutricional das crianças.

Diante da necessidade de uma melhor compreensão sobre a patofisiologia desencadeada pela desnutrição, decidimos utilizar a dieta experimental MAL-ED, desenvolvida pelo nosso grupo. A dieta MAL-ED é baseada no consumo alimentar de crianças desnutridas residentes de sete diferentes países com baixo poder socioeconômico. Esta dieta demonstrou ser capaz de reduzir, em curto período, o peso e o ganho de peso, comprometendo também o crescimento da cauda e o crescimento corporal total, sem causar edema, em camundongos C57BL/6 recém-desmamados. A dieta MAL-ED foi capaz de reduzir a massa gorda dos animais, aumentar a DP e CCC basais, aumentar a RT quando exposta a concentrações cumulativas de glutamina e diminuição da DP e CCC com aumento da RT quando exposta a concentrações cumulativas de alanil-glutamina, quando os animais foram submetidos a consumo por período agudo da dieta MAL-ED.

Estudos prévios realizados pelo grupo observaram que a dieta MAL-ED foi capaz de causar o embotamento da área dos vilos nas regiões do duodeno e jejuno, além de diminuição do peso e ganho de peso nos primeiros dias de consumo, como reproduzido em nosso estudo (RIBEIRO, 2022). Outros estudos demonstram que um dos principais motivos dos altos índices de desnutrição infantil em países de baixa renda está relacionado a uma alimentação complementar deficiente. No entanto, poucos são os estudos que

abordam a correlação entre a quantidade de nutrientes na dieta complementar (CAMPBELL *et al.*, 2018; ERSINO; HENRY; ZELLO, 2016; RAYMOND *et al.*, 2017). Ademais, muitos dos modelos experimentais fazem uso de dietas com altas taxas de redução de nutrientes, variando de 7% (BROWN *et al.*, 2015) a 0% de proteínas (BELMONTE *et al.*, 2007), e redução calórica de até 50% a menos em relação à dieta controle (PAN *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2017), além de redução de micronutrientes, como o zinco, por exemplo (BOLICK *et al.*, 2014; MAYNERIS-PERXACHS *et al.*, 2016).

As dietas experimentais variam consideravelmente de acordo com o modelo, sendo em grande parte baseadas no consumo alimentar de crianças desnutridas em regiões específicas. Por exemplo, temos a dieta vegetal do milho consumida por crianças do Malawi (MAY *et al.*, 2018), a dieta M8 também baseada no consumo de crianças do Malawi (BLANTON *et al.*, 2016) e a DRB representando o semiárido brasileiro. As quantidades de proteínas dessas dietas são em torno de 65% a menos, os lipídeos de 50 a 90% menos, até 56% menos fibras e elevada quantidade de carboidratos chegando a até 37% a mais em relação à dieta padrão. Em estudos feitos por Maciel *et al.*, (2020), foi possível observar uma redução da quantidade de proteínas de até 6,6% a menos, lipídeos com deficiência de até -12,4 a +6,0%, calorias com quantidades não inferiores a -25,9 a +11,2%, carboidratos em quantidades de até -1,5 a +7,1%, fibras -8,9 a +37,7% e zinco com no máximo 8,6% a menos na dieta de crianças desnutridas em comparação com crianças saudáveis. Esses valores mostram concentrações mais atenuadas do que as praticadas nos modelos animais até o momento.

Com base no exposto acima, a dieta experimental MAL-ED utilizada neste estudo foi desenvolvida a partir de informações coletadas sobre a alimentação complementar de crianças com 24 meses de idade e desnutrição crônica, acompanhadas pelo COORTE MAL-ED em oito diferentes países (CAULFIELD *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2014). Esses países apresentavam características econômicas semelhantes, sendo comunidades de baixa classe econômica com infraestrutura residencial e sanitária precária. Comunidades urbanas, como o Brasil, Bangladesh e Índia, bem como comunidades semiurbanas ou periurbanas, como Nepal e Peru, respectivamente, e comunidades rurais, como Paquistão, África do Sul e Tanzânia, compunham o conjunto. Em relação à densidade demográfica, o estudo abrangeu países com populações variando de dezenas

de milhões, como Nepal, Peru, África do Sul e Tanzânia, a centenas de milhões, como Bangladesh, Brasil e Paquistão, e a Índia, com sua população superior a 1 bilhão de habitantes (PSAKI *et al.*, 2012).

A dieta experimental MAL-ED utiliza quantidades moderadamente deficientes de proteínas em -37%, carboidratos +5,93%, lipídeos -24,20%, fibras +45,17%, zinco -10,83% e energia com redução de -8,03% Kcal em relação à dieta controle utilizada. Essa maior quantidade de fibra e menor quantidade de zinco, representada na dieta MAL-ED, tem sido associada à desnutrição infantil crônica (COSTA *et al.*, 2020; MACIEL *et al.*, 2018, 2021). Mesmo a dieta MAL-ED possuindo maior deficiência de proteínas (-37%) e de lipídeos (-27%) que as dietas consumidas por crianças aos 24 meses de idade com desnutrição crônica, outros modelos experimentais desenvolvidos utilizam reduções totais ou próximo disto dessas macromoléculas, chegando a -100% de proteínas e -90% de lipídeos (MACIEL *et al.*, 2021). Estudos já mostram a importância do zinco no desenvolvimento de desnutrição crônica (MACIEL *et al.*, 2021), no crescimento linear de crianças menores de 5 anos (LIU *et al.*, 2018), e na suscetibilidade a doenças infecciosas (BOLICK *et al.*, 2015; GIALLOUROU *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2019). Já outros modelos experimentais que focaram na redução de fibras usam como base a dieta alimentar de populações específicas (BLANTON *et al.*, 2016; MAY *et al.*, 2018; TEODÓSIO *et al.*, 1990).

A dieta MAL-ED foi capaz de reduzir o peso bruto e o percentual de ganho de peso dos animais e comprometeu o crescimento dos animais durante o período agudo de 7 dias de consumo da dieta. Redução dos valores de parâmetros corporais são quase sempre indicativos de desnutrição, como relatado em estudos com outros modelos de deficiência nutricional, que já mostraram comprometimento na primeira semana de indução de desnutrição (BROWN *et al.*, 2015; DE QUEIROZ *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2023). Além dos estudos com modelos animais, dados de pesquisa clínica do estudo coorte MAL-ED também mostraram resultados semelhantes em crianças com desnutrição crônica (MACIEL *et al.*, 2021).

Em grande parte dos estudos anteriores, não é relatado em quantidade o consumo da ração pelos modelos experimentais de desnutrição, nem é feita uma comparação entre o consumo da dieta controle e a dieta indutora de desnutrição, ou avaliação do apetite entre os grupos (BROWN *et al.*, 2015; UENO *et al.*, 2011). Como já mostrado no trabalho



de Ribeiro (2022), os animais submetidos à dieta MAL-ED *ad libitum* consumiam maior quantidade de ração, em gramas, do que o controle. Diante disso, só foi possível causar desnutrição nos animais que consumiram a dieta experimental MAL-ED, quanto estes tiveram o consumo da dieta controlado diariamente, oferecendo a mesma quantidade de ração consumida por dia pelo grupo controle. Além disso, nos estudos em que foram reduzidas as quantidades de calorias disponibilizadas na dieta (PAN *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2017), foi possível observar a diminuição da concentração sérica de leptina. A leptina é um hormônio derivado do tecido adiposo presente no intestino delgado, que atua regulando o balanço energético, diminuindo a fome, o que leva a aumento da sensação de saciedade e pode estar associada com a redução de peso e de massa gorda (AL-HUSSANIY; ALBURGHAIF; NAJI, 2021). Logo, o consumo da dieta MAL-ED pode levar à diminuição dos níveis séricos de leptina, aumentar a sensação de fome, o que gera o aumento do consumo da dieta em relação ao grupo controle, quando fornecida de forma *ad libitum*.

Uma importante ferramenta na avaliação do estado nutricional é a análise da composição corporal, que apesar de ser um recurso poderoso, é pouco utilizado em modelo de desnutrição *in vivo*. Após avaliação da composição corporal, foi observado que a dieta MAL-ED causou diminuição da massa gorda aos 7 dias de consumo. Esse resultado pode estar associado ao desbalanço energético, após o consumo de dieta com déficit calórico dieta, e consequente redução da biodisponibilidade de leptina sérica (AL-HUSSANIY; ALBURGHAIF; NAJI, 2021; PAN *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2017). Resposta semelhante foi observada no modelo de desnutrição induzida pela dieta DBR, onde as alterações na composição corporal foram observadas a partir do sétimo dia de indução. Outras alterações encontradas em estudos anteriores, como a redução de água corporal total e as alterações de fluidos intracelular e extracelular, não foram observadas (RIBEIRO, 2022; TEODÓSIO *et al.*, 1990). Já é estabelecido pela literatura que a massa gorda é a principal fonte de energia utilizada durante o metabolismo de diversos órgãos em um organismo desnutrido, e que as reservas de proteínas só são acionadas quando essa fonte de energia se torna insuficiente (CAHILL, 2006).

Como também demonstrado no trabalho de Ribeiro (2022), o consumo da dieta MAL-ED foi capaz de causar uma redução de peso com comprometimento da reserva energética, no caso deste trabalho reserva lipídica, sem formação de edema, causando

também déficit de crescimento linear, alterações semelhantes ao que encontramos no marasmo (SOETERS *et al.*, 2017).

Outra alteração também presente na desnutrição infantil ocorre na função de barreira epitelial intestinal, principalmente com a presença de atrofia das vilosidades e aumento da permeabilidade intestinal (AMADI *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2005, 2007; SULLIVAN *et al.*, 1991). Em estudos como o de Brown *et al.*, (2015), não foram encontradas alterações morfológicas ou comprometimento da integridade da barreira morfofuncional do epitélio intestinal em nenhum dos segmentos distal, medial e proximal do intestino delgado de camundongos induzidos à desnutrição por meio de uma dieta semelhante à DBR, durante um período crônico. No entanto, o trabalho de Ueno *et al.*, (2011), realizado em um modelo de desnutrição materno-fetal induzido pela dieta DBR, revelou resultados distintos. Observou-se a presença de atrofia do comprimento das vilosidades, associada à diminuição da área absorptiva e à redução da profundidade das criptas intestinais. Vale ressaltar que um valor mais elevado de profundidade de cripta corresponde a uma maior atividade de proliferação ou hiperplasia celular, o que garante uma taxa adequada de renovação para compensar as perdas nas extremidades dos vilos. Além disso, também foi encontrada uma menor razão vilo/cripta e evidências de dano na função de barreira epitelial intestinal (UENO *et al.*, 2011). Entretanto, outros trabalhos, que também utilizaram a dieta DBR por período agudo, observaram diminuição da profundidade das criptas, mas não encontraram alterações na resistência elétrica (SAMPAIO *et al.*, 2016), já em outro estudo, foi mostrado um aumento da profundidade das criptas no jejuno (JACOBI *et al.*, 2013).

Para avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos utilizamos o Sistema Clássico de Câmaras de Ussing automatizado, onde montamos os segmentos jejunais entre as hemicâmaras de forma padronizada, com a mucosa virada para o lado direito e o seroso do lado esquerdo. Foi utilizado como solução perfusora Krebs–Henseleit (KBR) em ambos os lados da membrana montada, permitindo assim, anular o transporte iônico que ocorre por via paracelular de forma passiva entre os dois lados epitélio intestinal montado, por meio da aplicação de uma corrente de 50  $\mu\text{A}$  no tecido. Esse procedimento torna possível a realização da análise do transporte iônico transcelular ativo, utilizando para isso os valores de CCC que corresponde a soma das correntes iônicas, principalmente, dos íons sódio, potássio, cloreto e bicarbonato (CLARKE, 2009; SAMPAIO, 2013).

Durante a realização dos experimentos, foram utilizados critérios para se considerar quais resultados foram viáveis, com valores de CCC e RT dentro do considerado valores aceitáveis. Utilizamos os valores dos animais controle para corrente com intervalos de  $-200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  a  $200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , já que a CCC em intestinos de camundongos pode ser levemente negativa (CLARKE, 2009). Já a RT, validamos como viável, resultados com valores entre  $8 \Omega/\mu\text{A}/\text{cm}^2$  e  $30 \Omega/\mu\text{A}/\text{cm}^2$  aproximadamente, sendo desconsiderados valores negativos ou muito elevados. Para os animais da dieta MAL-ED, devido à falta de valores de referência para os limites aceitáveis considerados basais, a seleção foi realizada com base na observação dos resultados, buscando valores semelhantes entre os animais do grupo. Aqueles que apresentaram valores muito discrepantes foram excluídos da análise.

Como teste de viabilidade ao final do experimento e critério de seleção de resultados, foi adicionada uma solução de teofilina com uma concentração final de 10 mM ao lado seroso do epitélio intestinal montado. Isso ocorreu porque a teofilina aumenta a concentração intracelular de cAMP, a CCC aumenta em resposta ao aumento da secreção de  $\text{Cl}^-$  por meio dos canais CFTR presentes na região apical (CERMAK; FÖLLMER; WOLFFRAM, 1998). A diferença entre o potencial de membrana e o potencial elétrico de equilíbrio do íon cloreto, impulsiona esse efluxo de  $\text{Cl}^-$ , entretanto, a passagem de cloreto proveniente do lado basolateral, por meio do cotransportador  $\text{NaKCCl}$ , causa uma certa compensação deste ânion. Ademais, altas concentrações de  $\text{Cl}^-$  no lúmen intestinal causa perturbação da eletroneutralidade, o que é corrigido em seguida com difusão de sódio e água pela via paracelular (SILVA, 2002). Logo após 15 minutos da adição da teofilina, adicionamos glicose com a mesma concentração, mas do lado mucoso do epitélio. Isso causou um aumento ainda maior na CCC devido ao cotransporte de  $\text{Na}^+$  acoplado à glicose, mediado pelo cotransportador SGLT1 presente na borda em escova dos enterócitos no lado do lúmen intestinal. Essa glicose sai para o lado basolateral por meio do GLUT2 (HOROWITZ *et al.*, 2023; KOEPESELL, 2020).

Mesmo após a adição da teofilina e glicose, é importante ressaltar que, em tecidos vivos e montados adequadamente, a CCC aumentará rapidamente logo após a adição da teofilina e aumentará ainda mais com subsequente adição da glicose. No entanto, mesmo com uma overdose desses substratos, a CCC não deve ultrapassar seu valor máximo. Isso permite validar os resultados obtidos na câmara em questão (AALBERS *et al.*, 2022;

FIELD; FROMM; MCCOLL, 1971; SEIDLER *et al.*, 1997). Diante disso, todos os resultados aqui analisados responderam de forma consistente a teofilina e glicose, sem causar sobrecarga ou ausência de resposta, mostrando que a falta de resposta ou resposta irrelevantes aos substratos aplicados do lado apical, estão relacionadas a alteração a nível de transporte e não por morte tecidual.

Trabalhos que avaliaram a eletrofisiologia do intestino na desnutrição mostraram que a CCC basal dos tecidos de jejuno e íleo aumenta (SAMPAIO, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2016; SILVA, 2002; SOARES, 1996), o que sugere um aumento da secreção, principalmente de ânions, como o cloreto (DECKER BUTZNER; GRANT GALL, 1988; FERRARIS; CAREY, 2003). O estado secretório observado no aumento da CCC durante a desnutrição pode estar associado a uma resposta adaptativa para melhora da absorção de nutrientes, aumentando assim, a força eletromotriz gerada pelo potencial eletrogênico desencadeado na membrana celular (FERRARIS; CAREY, 2000). A maioria dos modelos de desnutrição estudados não trazem informações sobre a DP basal (JACOBI *et al.*, 2013; SAMPAIO, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2016; UENO *et al.*, 2011), entretanto, quando adicionamos glicose, é possível verificar aumento da CCC na mucosa do intestino de animais da dieta MAL-ED (CAREY; COOKE, 1989; DARMON *et al.*, 1993; SAMPAIO *et al.*, 2016; YOUNG; LEVIN, 1990). Comportamento semelhante foi observado com o consumo da dieta MAL-ED, que causou aumento da DP e CCC basais no segmento do jejuno durante o experimento na câmara de Ussing.

O teste de curva dose-resposta frente aos substratos de glicose, glutamina e alanil-glutamina mostrou inicialmente uma DP e CCC maiores nas menores concentrações, que foram diminuindo com o aumento das concentrações dos substratos. Esse padrão foi observado em relação à adição de alanil-glutamina, glutamina e glicose, sendo que estes dois últimos não apresentaram diferença estatística significativa. Outros estudos também não demonstraram aumento de CCC durante a absorção de glicose (SAMPAIO, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2016; SILVA, 2002; SOARES, 1996) entretanto, em modelo crônico de restrição calórica, com redução de 70% do aporte calórico na dieta, foi possível observar o aumento do transporte de glicose entre outros carboidratos (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006; KOEPESELL, 2020; P. FERRARIS, 2001). No trabalho de Sampaio *et al.*, 2016, que avaliou o segmento intestinal do íleo de camundongos após induzir desnutrição aguda por dieta DBR, foi possível observar uma redução da CCC basal.

Estudos têm mostrado que o aumento ou diminuição da expressão de transportadores de carboidratos e proteínas está relacionado com a quantidade desses nutrientes na dieta. No caso dos carboidratos, quanto maior for a quantidade na dieta, maiores serão os níveis de transcritos de SGLT-1 (KOESELL, 2020; MIYAMOTO *et al.*, 1993). Já no que se refere a proteínas, quanto menor a disponibilidade, maior será a expressão do transportador de peptídeos PEPT-1 (ADIBI, 2003; GILBERT; WONG; WEBB KE, 2008). Entretanto, estudos que buscaram avaliar a expressão destes transportadores intestinais durante a desnutrição aguda, não encontraram diferença na expressão (RIBEIRO, 2022; SAMPAIO *et al.*, 2016).

A absorção ou passagem do lado luminal para o lado basolateral do epitélio intestinal também depende de um sistema complexo das proteínas formadoras das junções firmes. Apesar do extenso volume de publicações a respeito, ainda é pouco compreendida a respeito de seu comportamento durante o desenvolvimento da desnutrição. O transporte das principais macromoléculas nutricionais depende da expressão de claudina-2 e claudina-15, devido a sua importância na manutenção dos níveis de sódio luminal, o que favorece o cotransporte de nutrientes por meio da borda escova (WADA *et al.*, 2013). As junções firmes têm um importante papel na homeostase da barreira morfofuncional do epitelial intestinal, principalmente no que se refere a permeabilidade intestinal e consequente RT. O aumento, por si só da expressão de claudinas, pode aumentar a RT (BALDA *et al.*, 1996; LI; SHEPPARD; HUG, 2004).

O modelo de desnutrição materno fetal induzida pela dieta DBR, causou redução da RT (UENO *et al.*, 2011). Entretanto, ausência de alteração na RT foi observada em estudo de indução aguda de 7 dias de desnutrição, também pela dieta DBR, realizado no segmento ileal (SAMPAIO *et al.*, 2016). Jacobi *et al.*, 2013, que mostrou diminuição da RT, após indução de desnutrição energético-proteica em leitões. Nesse estudo, a dieta MAL-ED foi capaz de aumentar a RT no segmento de jejuno exposto as concentrações cumulativas de glutamina, o que também foi observado frente a alanil-glutamina. Entretanto, é preciso avaliar esses mesmos parâmetros nos demais segmentos do intestino delgado para um melhor entendimento sobre os efeitos da dieta MAL-ED sobre toda área absorptiva intestinal. Além dos parâmetros eletrofisiológicos, seria importante avaliar a transcrição e expressão das proteínas de junção firme, durante o período agudo de indução

de desnutrição pela dieta MAL-ED, a fim de compreender o que pode estar causando esse aumento de RT.

Diante dos resultados mostrados neste modelo de indução de desnutrição com a dieta MAL-ED, é possível entender um pouco sobre as consequências que o consumo deficiente de nutrientes pode causar, em uma análise a curto prazo. Como, de forma similar, a desnutrição infantil tem causado preocupação entre as organizações internacionais de saúde, devido seus danos, como déficit de estatura e com pouco peso, deixando a criança susceptível a adquirir doenças infecciosas, entre outros males, inclusive a morte (CAULFIELD *et al.*, 2004; GUERRANT *et al.*, 2008; IBRAHIM *et al.*, 2017; MILLER *et al.*, 2014; WELLS *et al.*, 2020; WOON *et al.*, 2018). Este cenário de má nutrição continua sendo um importante fator de risco para o aumento de doenças em países subdesenvolvidos (AMADI *et al.*, 2017; ISANAKA *et al.*, 2011; KOWALSKI *et al.*, 2023; MUNIRUL ISLAM *et al.*, 2019; MURRAY; LOPEZ, 1997; SCHORLING *et al.*, 1990). Portanto, são realizados esforços em busca de soluções efetivas que previnam as consequências causadas pela deficiência nutricional e restabeleçam a saúde de crianças em estado de desnutrição. Dentre as estratégias de intervenção no tratamento da desnutrição, está a suplementação nutricional de crianças que apresentam déficit desses nutrientes. Durante um período adequado, essa prática pode reduzir a mortalidade e a incidência de doenças tanto nas mães quanto nas crianças (FILTEAU; TOMKINS, 1999; LIMA, 2006; LIMA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2018; SELIMOGLU *et al.*, 2021).

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de parâmetros eletrofisiológicos coletados por sistema automatizado de Câmaras de Ussing, os efeitos da suplementação da glutamina por 5 dias na função de barreira morfofuncional intestinal em modelo murino de desnutrição pela dieta MAL-ED. Os resultados encontrados são consistentes e mostram o efeito que a glutamina tem na melhora dos danos causados pela desnutrição observados em camundongos que consumiram a dieta MAL-ED. Neste estudo, a glicina foi utilizada como placebo, e como as concentrações são isonitrogênicas, os resultados obtidos sugerem que são independentes da quantidade de nitrogênio, e podem estar relacionados com a via metabólica ou com regulação da glutamina sobre a expressão de proteínas (KIM *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2007; RHOADS *et al.*, 1997). Os dados obtidos mostram que, ao contrário do placebo glicina, a glutamina melhora o ganho de peso dos animais após os cinco dias de tratamento, avaliado pelo percentual de ganho de peso.

Além disso, a glutamina foi capaz de proporcionar um aumento do comprimento total dos animais ao final do tratamento, o que não foi observado no grupo placebo glicina.

Foi observado em estudos anteriores, que existe uma associação entre desnutrição, atrofia dos vilos do epitélio intestinal e alterações da barreira morfofuncional intestinal (LIMA *et al.*, 2005; LUNN, 2000; LUNN; NORTHROP-CLEWES; DOWNES, 1991; RIBEIRO, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2023; SAMPAIO *et al.*, 2016; SULLIVAN *et al.*, 1992). Em nosso estudo, foi medido o comprimento total do intestino delgado dos animais dos grupos estudados, e não foi observada diferença entre os tamanhos desses intestinos. Isso pode ser atribuído ao fato de que o estudo abordou a desnutrição aguda e, portanto, não houve tempo suficiente para uma maior adaptação à desnutrição, incluindo o aumento da área de absorção e consequente aumento do tamanho total do intestino delgado. No estudo de Ribeiro (2022), onde foi utilizada a dieta MAL-ED, a mesma usada neste estudo, também não foi encontrada diferença no tamanho total do intestino delgado dos animais durante o período agudo de 7 dias de indução de desnutrição, sendo observada diferença entre o grupo controle e desnutrido apenas no dia 28, em período crônico.

Quanto à composição corporal, não foi encontrada diferença nos parâmetros avaliados entre o grupo que consumiu a dieta MAL-ED e recebeu tratamento com glutamina e o grupo sem tratamento, que também recebeu a dieta MAL-ED. No entanto, ao compararmos o grupo da dieta MAL-ED tratado com glutamina e o grupo da dieta MAL-ED tratado com glicina, observamos uma maior quantidade de fluido extracelular no grupo tratado com glicina. Além disso, o consumo diário de água por ambos os grupos foi semelhante. Os resultados sugerem que os animais tratados com glicina desenvolveram algum tipo de edema, possivelmente devido ao extravasamento de fluido intracelular, o que não foi observado nos animais tratados com glutamina. Estudos anteriores mostraram que a deficiência de claudina-1 pode resultar em uma perda severa de fluidos e eletrólitos, podendo levar à morte em recém-nascidos (FURUSE *et al.*, 2002). Em outro estudo realizado com 107 crianças de um bairro periférico em Fortaleza-CE, que foram suplementadas com alanil-glutamina e glicina, observou-se que a alanil-glutamina promoveu melhora no ganho ponderal de peso e na função de barreira intestinal, enquanto com a glicina não foi encontrada melhora significativa nos mesmos parâmetros avaliados (LIMA, 2006; LIMA *et al.*, 2007).

Um estudo anterior de ensaio clínico de nível III tem demonstrado a importância da glutamina na melhora da função de barreira epitelial intestinal em crianças desnutridas (LIMA et al., 2005). Diante disso, o efeito da glutamina no reparo da função de barreira intestinal pode ter contribuído para o ganho de peso observado nos animais. Em uma pesquisa clínica realizada em Fortaleza-CE, com crianças admitidas em um hospital infantil da mesma cidade, foi examinado o efeito da suplementação padrão, utilizada para recuperação de desnutrição grave, somada à suplementação com glutamina ou glicina para avaliar a barreira funcional do epitélio intestinal dessas crianças. Foi observada uma melhora significativa na taxa de Lactulose:Manitol nas crianças que foram suplementadas com glutamina pelo período de 10 dias, o que não foi observado naquelas que receberam glicina ou fórmula sem enriquecimento (LIMA et al., 2005). Outro estudo, utilizando alanil-glutamina, glutamina e glicina, realizado em pacientes com AIDS, demonstrou melhora na absorção e na diarreia quando foi utilizada glutamina ou alanil-glutamina por um período de 5 a 10 dias. Já aqueles que receberam glicina não apresentaram alterações nestes mesmos parâmetros (BUSHEN et al., 2004). Nesse estudo, não foi possível avaliar a relação de Lactulose:Manitol devido à impossibilidade de detectar manitol em alguns grupos no período estudado.

Os resultados de eletrofisiologia coletados pelo sistema de Câmaras de Ussing mostraram um aumento significativo da DP basal, com um  $\Delta DP$  de aproximadamente +13 mV nos animais da dieta MAL-ED para +5 mV/cm<sup>2</sup> nos animais tratados com glutamina, e  $\Delta RT$  basal quase sem variação, mas com a RT em média 50% maior para o grupo tratado com glutamina. Já a CCC, nos animais da dieta MAL-ED apresentou um aumento do  $\Delta CCC$  de aproximadamente 105  $\mu A/cm^2$  entre os animais da dieta MAL-ED, já os animais tratados com glutamina tiveram pouca variação, com  $\Delta CCC$  de aproximadamente 25  $\mu A/cm^2$ . Estudos realizados previamente têm mostrado que, em animais controle saudáveis, a DP tende a acompanhar o comportamento da CCC, aumentando ao longo do tempo experimental (RIBEIRO, 2022; SAMPAIO *et al.*, 2016; SILVA, 2002; SOARES, 1996). Quanto aos valores basais de RT, tendem a se manter constantes e lineares sem muita variação (SILVA, 2002; SOARES, 1996). Esses valores elétricos fornecem informações cruciais sobre as condições de transporte eletrogênico que ocorrem tanto pela via paracelular de transporte, onde as proteínas de junção desempenham um papel importante no transporte, quanto pela via transcelular, com transportadores como o



SGLT1 e PEPT1, cotransportadores sódio e hidrogênio-dependentes, respectivamente, extremamente importantes na manutenção da homeostase da barreira epitelial intestinal. A glutamina já demonstrou seu valor energético e reparador estrutural no epitélio intestinal, estimulando a produção de fatores de crescimento e prevenindo os danos destrutivos da desnutrição sobre as junções firmes e, conseqüentemente, melhorando a função de barreira e diminuindo a permeabilidade intestinal (GUERRANT *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2005; LUISE *et al.*, 2023; MOORE *et al.*, 2015; SONDEHEIMER, 2005). Como não realizamos avaliação histológica estrutural do epitélio intestinal, a nível de vilosidades e criptas, não sabemos se a diminuição da RT está relacionada a danos na arquitetura epitelial, alterando a conformação e arranjo das proteínas de junção, como claudinas, ocludina e ZO, ou se, para se adaptar ao pouco aporte nutricional fornecido, o epitélio otimiza o influxo e efluxo iônico na tentativa de melhorar a captação de nutrientes, pelo cotransporte íon-dependente.

Já quando expostos às concentrações cumulativas de glicose, observou-se que a CCC foi menor no grupo tratado com glutamina ( $\Delta CCC = 210 \mu A/cm^2$ ) em relação ao grupo da dieta MAL-ED ( $\Delta CCC = 259 \mu A/cm^2$ ), mas ambas aumentaram conforme o aumento da concentração de glicose fornecida. O aumento da CCC em contato com a glicose é esperado, e esse mesmo comportamento foi observado em outros estudos que avaliaram a ação da glicose sobre o jejuno, como no trabalho de Ribeiro (2022), que utilizou a mesma dieta MAL-ED e o mesmo modelo animal de desnutrição nos tempos agudo e crônico. No estudo de Soares (1996), o aumento da CCC passou dos 150%, assim como no trabalho de Silva (2002), com aumento de 174% da CCC no jejuno, ambos em animais coelhos nutridos. No estudo de Sampaio (2013), que avaliou o comportamento da CCC em modelos murinos de desnutrição semelhantes ao que utilizamos, foi observada uma CCC aproximadamente 60% maior entre os animais desnutridos em comparação com o grupo controle, na maior concentração. Esses resultados sugerem uma maior permeação de glicose entre os animais desnutridos, provavelmente pela maior efetividade dos transportadores carga-seletivos como o SGLT1 e SGLT2, bem como os poros formados pelas proteínas de junção na via paracelular, que são seletivos quanto ao tamanho da molécula a ser permeada (HOROWITZ *et al.*, 2023). O mesmo comportamento de CCC foi observado quando em contato com concentrações cumulativas de alanil-glutamina, onde foi visto que a CCC do grupo tratado com

glutamina ( $\Delta\text{CCC} = 46 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), foi diminuindo em relação ao grupo da dieta MAL-ED ( $\Delta\text{CCC} = 166 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), com diferença estatística na maior concentração de alanil-glutamina testada. A DP também apresentou uma tendência a ser maior no grupo dos animais da dieta MAL-ED, mas sem diferença estatística. Nos trabalhos de Soares (1996), o aumento foi de ( $\Delta\text{CCC} = 190 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), no de Silva (2002) foi de 83,5%, já no estudo de Sampaio (2013) com  $\Delta\text{CCC} = 272 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Trabalhos realizados com o dipéptido alanil-glutamina tem mostrado o seu potencial protetor na destruição das criptas no segmento do jejuno, melhora da função de barreira e permeabilidade, entre outros benefícios (ACHAMRAH; DECHELOTTE; COEFFIER, 2017; LIMA *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2015, 2020; SHARIATPANAHI *et al.*, 2019; UENO *et al.*, 2011; VAN DEN BERG *et al.*, 2006). Muito similar à glutamina, mas com uma melhor absorção e maior rendimento no epitélio intestinal, a alanil-glutamina tem permeado melhor que a glutamina no epitélio jejunal do nosso modelo.

Muitos são os estudos utilizando glutamina como alvo farmacológico, terapêutico e como suplementação nutricional (ARRIBAS-LÓPEZ *et al.*, 2021; LUISE *et al.*, 2023; SHAH; WANG; MA, 2020). Há diversas evidências que comprovam ou ao menos sugerem seu imenso potencial clínico e biológico (ANDERSON; LALLA, 2020; COQUEIRO; ROGERO; TIRAPEGUI, 2019; QUARESMA *et al.*, 2020), tanto como substrato principal quanto como colaborador junto com seus precursores, como o alfa-cetoglutarato (GYANWALI *et al.*, 2022). A glutamina é de alto valor biológico para os enterócitos, atuando como combustível celular (COQUEIRO; ROGERO; TIRAPEGUI, 2019; CRUZAT *et al.*, 2018; LECOUTRE *et al.*, 2020; SMITH, 1990; WERNERMAN, 2011), fortalecendo o sistema imune, modulando a microbiota intestinal e reduzindo a obesidade (PERNA *et al.*, 2019). Além disso, ela é capaz de restaurar o epitélio intestinal, melhorar a função de barreira morfofuncional e diminuir a permeabilidade intestinal (ACHAMRAH; DECHELOTTE; COEFFIER, 2017; AMASHEH *et al.*, 2009; SHARIATPANAHI *et al.*, 2019), proporcionando melhora considerável dos danos causados pela desnutrição infantil (LIMA *et al.*, 2005, 2007; SAMPURNA *et al.*, 2018; UENO *et al.*, 2011; VAN DEN BERG *et al.*, 2006).

Estudos adicionais sobre a desnutrição e a fisiopatologia envolvida são necessários para um completo entendimento dessa condição nutricional, e suas repercussões na saúde pública e na sociedade como um todo. Diante dessa necessidade, percebemos o método de

Câmaras de Ussing automatizado como uma poderosa ferramenta para a avaliação eletrofisiológica e funcional do trato gastrointestinal. O sistema automatizado de Câmaras de Ussing permite a realização de ensaios com maior precisão e versatilidade de análises, gerando dados robustos e com uma alta produtividade de resultados, o que o torna uma ferramenta padrão-ouro no estudo da fisiologia intestinal.

Dentre as limitações deste estudo está a ausência de análise de outros segmentos distal e proximal do intestino, como duodeno e íleo, frente a desnutrição induzida pela dieta MAL-ED; a ausência da análise da transcrição e expressão de proteínas de junção, como claudinas, ocludinas e ZO, que desempenham um papel importantíssimo na permeabilidade e por consequência na função de barreira epitelial intestinal (HOROWITZ *et al.*, 2023; SUZUKI, 2020); a falta de análise da transcrição e expressão dos transportadores e cotransportadores associados ao transporte de nutrientes no epitélio intestinal, como o cotransportador de sódio e glicose (SGLT1), o transportador de peptídeos (PEPT1) entre outros transportadores importantes no entendimento da dinâmica funcional do intestino delgado.

Não foram realizadas análises morfológicas ou histopatológicas da arquitetura e relação vilo/cripta e sua correlação com os resultados encontrados. A análise de alterações no perfil da microbiota e possíveis metabólitos gerados durante a desnutrição, também não foi realizada. Seria necessário um refinamento do teste de permeabilidade com lactulose e manitol *ex vivo* em Câmaras de Ussing, com um maior número de animais e tempo de análise de 30 minutos, pois, aparentemente, este parece ser o melhor tempo. Por fim, a análise dos níveis de biomarcadores sorológicos da desnutrição poderia fornecer insights adicionais sobre os resultados fisiológicos observados neste estudo.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos através do presente estudo, o modelo de desnutrição baseado na dieta MAL-ED inibiu o ganho de peso e crescimento do animal, além de reduzir a massa gorda, reproduzindo assim esse modelo.

Conclui-se ainda que o sistema automatizado de Câmara de *Ussing* mostrou-se ser efetivo em identificar alterações funcionais da barreira epitelial intestinal em camundongos submetidos à dieta MAL-ED, translacionando os achados evidenciados em crianças desnutridas. Esse novo sistema possibilitou a identificação de alterações específicas na função da barreira epitelial intestinal como aumento da  $R_t$ , culminando na redução da absorção de importantes nutrientes como glutamina e alanil-glutamina. Além disso, esse sistema automatizado também apontou um novo mecanismo para a efetividade do uso da glutamina para melhorar o ganho de peso e crescimento de animais desnutridos via restauração da função da barreira epitelial intestinal (redução da  $R_t$ , resultando em aumento da absorção de glutamina, alanil-glutamina e glicose).

Serão necessárias futuras análises para verificar as alterações da função da barreira epitelial intestinal em outros segmentos intestinais, como o duodeno e o íleo, e para analisar o mecanismo intracelular envolvido no efeito protetor da glutamina em animais desnutridos. Além disso, é necessário estudar a persistência dessas alterações da função da barreira, bem como o efeito da glutamina, em modelos crônicos de desnutrição.

Para um melhor entendimento do mecanismo envolvido no efeito protetor da glutamina em animais desnutridos, serão realizadas análises do transcriptoma, utilizando a técnica de transcriptômica espacial, bem como qPCR para avaliar a expressão gênica de transportadores e proteínas de junção firmes. Além disso, serão realizadas análises histopatológicas, as quais serão incluídas na publicação do artigo relacionado a este estudo.

## REFERÊNCIAS

AALBERS, B.; AMATNGALIM, G.; AARTS, E.; RODENBURG, L.; OOSTERHOFF, L.; HEIJERMAN, H.; BEEKMAN, J. P017 Using chamber measurement of CFTR modulator effects in airway epithelial cells and its correlation to clinical effects of treatment. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 21, p. S65, 1 jun. 2022. Disponível em: <<http://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569199322003502/fulltext>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

ABDULNOUR-NAKHOUL, S. M.; NAKHOUL, N. L. Ussing Chamber Methods to Study the Esophageal Epithelial Barrier. *Methods in Molecular Biology*, v. 2367, p. 215–233, 2021. Disponível em: <[https://link.springer.com/protocol/10.1007/7651\\_2020\\_324](https://link.springer.com/protocol/10.1007/7651_2020_324)>. Acesso em: 1 ago. 2023.

ACHAMRAH, N.; DECHELOTTE, P.; COEFFIER, M. Glutamine and the regulation of intestinal permeability: From bench to bedside. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 20, n. 1, p. 86–91, 2017. Disponível em: <[https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2017/01000/Glutamine\\_and\\_the\\_regulation\\_of\\_intestinal.13.aspx](https://journals.lww.com/clinicalnutrition/Fulltext/2017/01000/Glutamine_and_the_regulation_of_intestinal.13.aspx)>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ADACHI, M.; INOKO, A.; HATA, M.; FURUSE, K.; UMEDA, K.; ITOH, M.; TSUKITA, S. Normal Establishment of Epithelial Tight Junctions in Mice and Cultured Cells Lacking Expression of ZO-3, a Tight-Junction MAGUK Protein. *Molecular and Cellular Biology*, v. 26, n. 23, p. 9003, 1 dez. 2006. Disponível em: <[pmc/articles/PMC1636814/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1636814/)>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ADEGOKE, O.; ARIF, S.; BAHWERE, P.; HARB, J.; HUG, J.; JASPER, P.; MUDZONGO, P.; NANAMA, S.; OLISENEKWU, G.; VISRAM, A. Incidence of severe acute malnutrition after treatment: A prospective matched cohort study in Sokoto, Nigeria. *Maternal & Child Nutrition*, v. 17, n. 1, p. e13070, 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mcn.13070>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

AGUANNO, D.; POSTAL, B. G.; CARRIÈRE, V.; THENET, S. Use of Ussing Chambers to Measure Paracellular Permeability to Macromolecules in Mouse Intestine. *Methods in Molecular Biology*, v. 2367, p. 1–11, 2021. Disponível em: <[https://link.springer.com/protocol/10.1007/7651\\_2021\\_367](https://link.springer.com/protocol/10.1007/7651_2021_367)>. Acesso em: 1 ago. 2023.

AHSAN, A. K.; TEBHA, S. S.; SANGI, R.; KAMRAN, A.; ZAIDI, Z. A.; HAQUE, T.; ALI HAMZA, M. S. Zinc Micronutrient Deficiency and Its Prevalence in Malnourished Pediatric Children as Compared to Well-Nourished Children: A Nutritional Emergency. *Global Pediatric Health*, v. 8, 8 out. 2021. Disponível em: <[https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2333794X211050316?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2333794X211050316?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org)>. Acesso em: 23 jul. 2023.

ALAM, M. A.; RICHARD, S. A.; FAHIM, S. M.; MAHFUZ, M.; NAHAR, B.; DAS, S.; SHRESTHA, B.; KOSHY, B.; MDUMA, E.; SEIDMAN, J. C.; MURRAY-KOLB, L. E.; CAULFIELD, L. E.; LIMA, A. A. M.; BESSONG, P.; AHMED, T. Correction: Impact of early-onset persistent stunting on cognitive development at 5 years of age: Results from a multi-country cohort study. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0229663, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0229663>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

AL-HUSSANIY, H. A.; ALBURGHAI, A. H.; NAJI, M. A. Leptin hormone and its effectiveness in reproduction, metabolism, immunity, diabetes, hopes and ambitions. **Journal of Medicine and Life**, v. 14, n. 5, p. 600, 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8742898/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3542898/)>. Acesso em: 17 set. 2023.

AL-SADI, R.; KHATIB, K.; GUO, S.; YE, D.; YOUSSEF, M.; MA, T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 6, p. G1054, 2011. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3119114/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2119114/)>. Acesso em: 26 jul. 2023.

AMADI, B.; BESA, E.; ZYAMBO, K.; KAONGA, P.; LOUIS-AUGUSTE, J.; CHANDWE, K.; TARR, P. I.; DENNO, D. M.; NATARO, J. P.; FAUBION, W.; SAILER, A.; YERUVA, S.; BRANTNER, T.; MURRAY, J.; PRENDERGAST, A. J.; TURNER, J. R.; KELLY, P. Impaired Barrier Function and Autoantibody Generation in Malnutrition Enteropathy in Zambia. **EBioMedicine**, v. 22, p. 191, 1 ago. 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5552244/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2552244/)>. Acesso em: 8 out. 2023.

AMASHEH, M.; ANDRES, S.; AMASHEH, S.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Barrier Effects of Nutritional Factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1165, n. 1, p. 267–273, 1 maio 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2009.04063.x>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ANDERSON, J. M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. **News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 16, n. 3, p. 126–130, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11443232/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Physiology and Function of the Tight Junction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. 2584–2585, 2009. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2742087/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2742087/)>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ANDERSON, P. M.; LALLA, R. V. Glutamine for Amelioration of Radiation and Chemotherapy Associated Mucositis during Cancer Therapy. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1–15, 1 jun. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7352314/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37352314/)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ARCIERI, S. T.; CHEUNG, S.; BELKIN, A.; PILLAI, A.; GUPTA, R. Kwashiorkor on the south shore. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, v. 11, n. 4, p. 528–530, 4 jul. 2021. Acesso em: 23 jul. 2023.

ARRIBAS-LÓPEZ, E.; ZAND, N.; OJO, O.; SNOWDEN, M. J.; KOCHHAR, T. The Effect of Amino Acids on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis on Arginine and Glutamine. **Nutrients**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8399682/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ASSIMAKOPOULOS, S. F.; PAPAGEORGIOU, I.; CHARONIS, A. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 2, n. 6, p. 123, 12 dez. 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3241743/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

BALDA, M. S.; WHITNEY, J. A.; FLORES, C.; GONZÁLEZ, S.; CERREJIDO, M.; MATTER, K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. **The Journal of cell biology**, v. 134, n. 4, p. 1031–1049, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8769425/>. Acesso em: 8 out. 2023.

BARMEYER, C.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology** 2016 **469:1**, v. 469, n. 1, p. 15–26, 30 nov. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-016-1914-6>. Acesso em: 18 jul. 2023.

BARTELT, L. A.; BOLICK, D. T.; GUERRANT, R. L. Disentangling Microbial Mediators of Malnutrition: Modeling Environmental Enteric Dysfunction. **CMGH**, v. 7, n. 3, p. 692–707, 1 jan. 2019. Disponível em: <http://www.cmghjournal.org/article/S2352345X18301814/fulltext>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BEAUDREAULT, A. R. **Nutrition + Prosperity**. Disponível em: <https://www.csis.org/analysis/nutrition-prosperity>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BECKER, P.; CARNEY, L. N.; CORKINS, M. R.; MONCZKA, J.; SMITH, E.; SMITH, S. E.; SPEAR, B. A.; WHITE, J. V. Consensus Statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 30, n. 1, p. 147–161, 1 fev. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1177/0884533614557642>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BEHRENS, I.; STENBERG, P.; ARTURSSON, P.; KISSEL, T. Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 8, p. 1138–1145, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11587485/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

- BELMONTE, L.; COËFFIER, M.; LE PESSOT, F.; MIRALLES-BARRACHINA, O.; HIRON, M.; LEPLINGARD, A.; LEMELAND, J.-F.; HECKETSWEILER, B.; DAVEAU, M.; DUCROTTÉ, P.; DÉCHELOTTE, P. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock RAPID COMMUNICATION. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 20, p. 2833–2840, 2007. Disponível em: <www.wjgnet.com>.
- BENJAMIN, M. A.; MCKAY, D. M.; YANG, P. C.; CAMERON, H.; PERDUE, M. H. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. **Gut**, v. 47, n. 1, p. 112, 2000. Disponível em: </pmc/articles/PMC1727982/>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- BERNET, M. F.; BRASSART, D.; NEESER, J. R.; SERVIN, A. L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**, v. 35, n. 4, p. 483, 1994. Disponível em: </pmc/articles/PMC1374796/?report=abstract>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- BEUMER, J.; CLEVERS, H. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. **Development**, v. 143, n. 20, p. 3639–3649, 15 out. 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1242/dev.133132>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- BJERKNES, M.; CHENG, H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 1999. Disponível em: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508599702222/fulltext>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- BLACK, R. E.; ALLEN, L. H.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; EZZATI, M.; MATHERS, C.; RIVERA, J. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **The Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243–260, 19 jan. 2008. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673607616900/fulltext>. Acesso em: 23 jul. 2023.
- BLANTON, L. V.; CHARBONNEAU, M. R.; SALIH, T.; BARRATT, M. J.; VENKATESH, S.; ILKAVEYA, O.; SUBRAMANIAN, S.; MANARY, M. J.; TREHAN, I.; JORGENSEN, J. M.; FAN, Y. M.; HENRISSAT, B.; LEYN, S. A.; RODIONOV, D. A.; OSTERMAN, A. L.; MALETA, K. M.; NEWGARD, C. B.; ASHORN, P.; DEWEY, K. G.; GORDON, J. I. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. **Science**, v. 351, n. 6275, 19 fev. 2016. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad3311>. Acesso em: 23 jul. 2023.
- BOLICK, D. T.; CHEN, T.; ALVES, L. A. O.; TONG, Y.; WU, D.; JOYNER, L. T.; ORIA, R. B.; GUERRANT, R. L.; FU, Z. Intestinal cell kinase is a novel participant in intestinal cell signaling responses to protein malnutrition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.



BOLICK, D. T.; KOLLING, G. L.; MOORE, J. H.; DE OLIVEIRA, L. A.; TUNG, K.; PHILIPSON, C.; VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J.; GUERRANT, R. L. Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of Enteroaggregative *Escherichia coli*-induced diarrhea. **Gut Microbes**, v. 5, n. 5, p. 618–627, 3 jan. 2015.

BOSWELL, N. Complementary Feeding Methods—A Review of the Benefits and Risks. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2021, Vol. 18, Page 7165, v. 18, n. 13, p. 7165, 4 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/18/13/7165/htm>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BOUMA, S. Diagnosing Pediatric Malnutrition. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 32, n. 1, p. 52–67, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1177/0884533616671861>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BRASIL. **Desnutrição aumenta no Brasil; índice é maior entre meninos negros | Agência Brasil**. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2022-07/desnutricao-no-brasil-e-maior-entre-meninos-negros-aponta-pesquisa#>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BROWN, E. M.; WLODARSKA, M.; WILLING, B. P.; VONAESCH, P.; HAN, J.; REYNOLDS, L. A.; ARRIETA, M. C.; UHRIG, M.; SCHOLZ, R.; PARTIDA, O.; BORCHERS, C. H.; SANSONETTI, P. J.; FINLAY, B. B. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nature Communications** 2015 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–16, 4 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms8806>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

BUDHATHOKI, S.; SAWADA, N.; IWASAKI, M.; YAMAJI, T.; GOTO, A.; KOTEMORI, A.; ISHIHARA, J.; TAKACHI, R.; CHARVAT, H.; MIZOUE, T.; ISO, H.; TSUGANE, S. Association of Animal and Plant Protein Intake With All-Cause and Cause-Specific Mortality in a Japanese Cohort. **JAMA Internal Medicine**, v. 179, n. 11, p. 1509, 1 nov. 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6714005/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34714005/)>. Acesso em: 3 mar. 2024.

BUSHEN, O. Y.; DAVENPORT, J. A.; LIMA, A. B.; PISCITELLI, S. C.; UZGIRIS, A. J.; SILVA, T. M. J.; LEITE, R.; KOSEK, M.; DILLINGHAM, R. A.; GIRAO, A.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Diarrhea and reduced levels of antiretroviral drugs: improvement with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial in northeast Brazil. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 12, p. 1764–1770, 15 jun. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15227625/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

BUTZNER, J. D.; GALL, D. G. Effects of Chronic Protein-Calorie Malnutrition on Small Intestinal Repair after an Acute Bacterial Enteritis: A Study in Infant Rabbits. **Pediatric Research** 1988 23:4, v. 23, n. 4, p. 408–413, 1988. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/pr1988283>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

CAHILL, G. F. **Fuel metabolism in starvation**. *Annual review of nutrition* 2006.

CAMPBELL, R. K.; AGUAYO, V.; KANG, Y.; DZED, L.; JOSHI, V.; WAID, J.; GUPTA, S. D.; HASELOW, N.; WEST, K. P. Infant and young child feeding practices and nutritional status in Bhutan. **Maternal and Child Nutrition**, v. 14, n. 3, 1 jul. 2018.

CAMPBELL, R. K.; SCHULZE, K. J.; SHAIKH, S.; MEHRA, S.; ALI, H.; WU, L.; RAQIB, R.; BAKER, S.; LABRIQUE, A.; WEST, K. P.; CHRISTIAN, P. Biomarkers of environmental enteric dysfunction among children in rural Bangladesh. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 65, n. 1, p. 40, 1 jul. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5492885/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

CAPLAN, A. I. All MSCs Are Pericytes? **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 229–230, 11 set. 2008. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1934590908004062/fulltext>. Acesso em: 25 jul. 2023.

CAREY, H. V.; COOKE, H. J. Tonic activity of submucosal neurons influences basal ion transport. **Life Sciences**, v. 44, n. 16, p. 1083–1088, 1 jan. 1989. Acesso em: 26 jul. 2023.

CAULFIELD, L. E.; BOSE, A.; CHANDYO, R. K.; NESAMVUNI, C.; DE MORAES, M. L.; TURAB, A.; PATIL, C.; MAHFUZ, M.; AMBIKAPATHI, R.; AHMED, T.; ACOSTA, A. M.; CHAVEZ, C. B.; FLORES, J. T.; OLOTEGUI, M. P.; PINEDO, S. R.; TRIGOSO, D. R.; VASQUEZ, A. O.; AHMED, I.; ALAM, D.; ALI, A.; BHUTTA, Z. A.; QURESHI, S.; SHAKOOR, S.; SOOFI, S.; YOUSAFZAI, A. K.; ZAIDI, A. K.; BODHIDATTA, L.; MASON, C. J.; BABJI, S.; JOHN, S.; KANG, G.; KURIEN, B.; MULIYIL, J.; RAGHAVA, M. V.; RAMACHANDRAN, A.; ROSE, A.; PAN, W.; CARREON, D.; CHARU, V.; DABO, L.; DOAN, V.; GRAHAM, J.; HOEST, C.; KNOBLER, S.; LANG, D.; MCGRATH, M.; MILLER, M.; MOHALE, A.; NAYYAR, G.; PSAKI, S.; RASMUSSEN, Z.; RICHARD, S.; SEIDMAN, J.; WANG, V.; BLANK, R.; GOTTLIEB, M.; TOUNTAS, K.; AMOUR, C.; MDUMA, E.; AHMED, A. M.; DINESH, M.; TOFAIL, F.; HAQUE, R.; HOSSAIN, I.; ISLAM, M.; SHRESTHA, P. S.; SHRESTHA, R.; ULAK, M.; BLACK, R.; CHECKLEY, W.; CHEN, P.; KOSEK, M.; LEE, G.; YORI, P. P.; MURRAY-KOLB, L.; SCHAEFER, B.; PENDERGAST, L.; ABREU, C.; BINDÁ, A.; COSTA, H.; DI MOURA, A.; FILHO, J. Q.; LEITE, A.; LIMA, A.; LIMA, N.; LIMA, I.; MACIEL, B.; MOTA, F.; ORIA, R.; QUETZ, J.; SOARES, A.; SVENSEN, E.; TOR, S.; BESSONG, P.; MAHOPO, C.; MAPULA, A.; NYATHI, E.; SAMIE, A.; BARRETT, L.; GRATZ, J.; GUERRANT, R.; HOUP, E.; OLMSTED, L.; PETRI, W.; PLATTS-MILLS, J.; SCHARF, R.; SHRESTHA, B.; SHRESTHA, S. K. Infant Feeding Practices, Dietary Adequacy, and Micronutrient Status Measures in the MAL-ED Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. suppl\_4, p. S248–S254, 1 nov. 2014. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu421>. Acesso em: 17 mar. 2024.

CAULFIELD, L. E.; DE ONIS, M.; BLÖSSNER, M.; BLACK, R. E. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 1, p. 193–198, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15213048/>. Acesso em: 8 out. 2023.

CERMAK, R.; FÖLLMER, U.; WOLFFRAM, S. Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 5, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9815047/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

CHAKRABORTY, S.; KAUR, S.; GUHA, S.; BATRA, S. K. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 1, p. 129–169, 1 ago. 2012. Acesso em: 30 jul. 2023.

CHOPYK, D. M.; KUMAR, P.; RAEMAN, R.; LIU, Y.; SMITH, T.; ANANIA, F. A. Dysregulation of junctional adhesion molecule-A contributes to ethanol-induced barrier disruption in intestinal epithelial cell monolayers. **Physiological Reports**, v. 5, n. 23, 1 dez. 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5727288/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35727288/)>. Acesso em: 31 jul. 2023.

CITRONBERG, J. S.; WILKENS, L. R.; LIM, U.; HULLAR, M. A. J.; WHITE, E.; NEWCOMB, P. A.; LE MARCHAND, L.; LAMPE, J. W. Reliability of plasma lipopolysaccharide-binding protein (LBP) from repeated measures in healthy adults. **Cancer causes & control: CCC**, v. 27, n. 9, p. 1163, 1 set. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5068910/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27068910/)>. Acesso em: 30 jul. 2023.

CLARKE, L. L. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 6, p. G1151, jun. 2009. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2697950/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19797950/)>. Acesso em: 28 ago. 2022.

COQUEIRO, A. Y.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Glutamine as an Anti-Fatigue Amino Acid in Sports Nutrition. **Nutrients**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6520936/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3520936/)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

COSTA, P. N.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q.; JUNIOR, F. S.; AMBIKAPATHI, R.; ROGAWSKI MCQUADE, E. T.; GUERRANT, R. L.; CAULFIELD, L. E.; LIMA, A. A. M.; MACIEL, B. L. L. Dietary intake from complementary feeding is associated with intestinal barrier function and environmental enteropathy in Brazilian children from the MAL-ED cohort study. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 9, p. 1003–1012, 2020. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/dietary-intake-from-complementary-feeding-is-associated-with-intestinal-barrier-function-and-environmental-enteropathy-in-brazilian-children-from-the-maled-cohort-study/AEA7FB4B6EF6F7A7838E97FA356FBCDA>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

COULTHARD, M. G. Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia. <http://dx.doi.org/10.1179/2046905514Y.0000000154>, v. 35, n. 2, p. 83–89, 2014. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/2046905514Y.0000000154>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

CRENN, P.; MESSING, B.; CYNOBER, L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 328–339, 1 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S026156140800040X/fulltext>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature Reviews Genetics** 2006 7:5, v. 7, n. 5, p. 349–359, maio 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg1840>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

CRUZAT, V.; ROGERO, M. M.; KEANE, K. N.; CURI, R.; NEWSHOLME, P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30666414/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

DAHLGREN, D.; ROOS, C.; LUNDQVIST, A.; TANNERGREN, C.; LANGGUTH, P.; SJÖBLOM, M.; SJÖGREN, E.; LENNERNÄS, H. Preclinical Effect of Absorption Modifying Excipients on Rat Intestinal Transport of Model Compounds and the Mucosal Barrier Marker 51Cr-EDTA. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 4243–4251, 4 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00353>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

DARMON, N.; PÉLISSIER, M.; HEYMAN, M.; ALBRECHT, R.; DESJEUX, J. Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 6, p. 604S–615S, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8505667/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

DE BRUYN, M.; ARIJS, I.; DE HERTOOGH, G.; FERRANTE, M.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P.; VERMEIRE, S.; OPDENAKKER, G. Serum Neutrophil Gelatinase B-associated Lipocalin and Matrix Metalloproteinase-9 Complex as a Surrogate Marker for Mucosal Healing in Patients with Crohn's Disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 9, n. 12, p. 1079–1087, 1 dez. 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv148>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

DE BRUYN, M.; ARIJS, I.; WOLLANTS, W. J.; MACHIELS, K.; VAN STEEN, K.; VAN ASSCHE, G.; FERRANTE, M.; RUTGEERTS, P.; VERMEIRE, S.; OPDENAKKER, G. Neutrophil Gelatinase B-associated Lipocalin and Matrix Metalloproteinase-9 Complex as a Surrogate Serum Marker of Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1198–1207, 1 jul. 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1097/MIB.000000000000068>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–14696, 17 ago. 2010. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1005963107>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

DE ONIS, M.; HABICHT, J. P. Anthropometric reference data for international use: Recommendations from a World Health Organization Expert Committee. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 4, p. 650–658, 1996. Acesso em: 21 fev. 2024.

DE QUEIROZ, C. A. A.; FONSECA, S. G. C.; FROTA, P. B.; FIGUEIREDO, Í. L.; ARAGÃO, K. S.; MAGALHÃES, C. E. C.; DE CARVALHO, C. B. M.; LIMA, A. Â. M.; RIBEIRO, R. A.; GUERRANT, R. L.; MOORE, S. R.; ORIA, R. B. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, 5 ago. 2014. Acesso em: 3 jul. 2023.

DEBOER, M. D.; CHEN, D.; BURT, D. R.; RAMIREZ-ZEA, M.; GUERRANT, R. L.; STEIN, A. D.; MARTORELL, R.; LUNA, M. A. Early childhood diarrhea and cardiometabolic risk factors in adulthood: the Institute of Nutrition of Central America and Panama Nutritional Supplementation Longitudinal Study. **Annals of Epidemiology**, v. 23, n. 6, p. 314–320, 1 jun. 2013. Acesso em: 23 jul. 2023.

DECHELOTTE, P.; DARMAUN, D.; RONGIER, M.; HECKETSWEILER, B.; RIGAL, O.; DESJEUX, J. F. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1991.260.5.G677>, v. 260, n. 5 23–5, 1991. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1991.260.5.G677>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

DECKER BUTZNER, J.; GRANT GALL, D. Impact of protein-calorie malnutrition on the developing intestine. A model in young rabbits. **Biology of the neonate**, v. 54, n. 3, p. 151–159, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3146354/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; WALTER, E.; LEVY, R. J.; AMIDON, G. L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 1568–1573, 1997. Acesso em: 30 jul. 2023.

DEVRIESE, S.; VAN DEN BOSSCHE, L.; VAN WELDEN, S.; HOLVOET, T.; PINHEIRO, I.; HINDRYCKX, P.; DE VOS, M.; LAUKENS, D. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 148, n. 1, p. 85–93, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00418-017-1539-7>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

DI RUSCIO, M.; VERNIA, F.; CICCONE, A.; FRIERI, G.; LATELLA, G. Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 24, n. 1, p. 78–92, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/ibd/izx011>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

DOSH, R. H.; JORDAN-MAHY, N.; SAMMON, C.; LE MAITRE, C. L. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 24, n. 2, p. 98–111, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2017.0276>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

DROZDOWSKI, L.; THOMSON, A. B. R. Intestinal sugar transport. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 11, p. 1657–1670, 21 mar. 2006. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v12/i11/1657.htm>>. Acesso em: 8 out. 2023.

DRUCKER, D. J.; YUSTA, B. Physiology and Pharmacology of the Enteroendocrine Hormone Glucagon-Like Peptide-2. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170317>, v. 76, p. 561–583, 10 fev. 2014. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-021113-170317>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

DURANTE, W. The Emerging Role of l-Glutamine in Cardiovascular Health and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 9, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3546761/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ENGLE, M. J.; GOETZ, G. S.; ALPERS, D. H. Caco-2 Cells Express a Combination of Colonocyte and Enterocyte Phenotypes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 174, p. 362–369, 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

ERSINO, G.; HENRY, C. J.; ZELLO, G. A. Suboptimal Feeding Practices and High Levels of Undernutrition among Infants and Young Children in the Rural Communities of Halaba and Zeway, Ethiopia. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 37, n. 3, p. 409–424, 1 set. 2016.

FAHMIDA, U.; KOLOPAKING, R.; SANTIKA, O.; SRIANI, S.; UMAR, J.; HTET, M. K.; FERGUSON, E. Effectiveness in improving knowledge, practices, and intakes of “key problem nutrients” of a complementary feeding intervention developed by using linear programming: experience in Lombok, Indonesia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 3, p. 455–461, 1 mar. 2015. Acesso em: 3 mar. 2024.

FAIZAN, U.; ROUSTER, A. S. Nutrition and Hydration Requirements In Children and Adults. **StatPearls**, 28 ago. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562207/>>. Acesso em: 3 mar. 2024.

- FANNING, A. S.; JAMESON, B. J.; JESAITIS, L. A.; ANDERSON, J. M. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29745–29753, 6 nov. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925819593772/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- FARIN, H. F.; KARTHAUS, W. R.; KUJALA, P.; RAKHSHANDEHROO, M.; SCHWANK, G.; VRIES, R. G. J.; KALKHOVEN, E.; NIEUWENHUIS, E. E. S.; CLEVERS, H. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN- $\gamma$ . **The Journal of experimental medicine**, v. 211, n. 7, p. 1393–1405, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24980747/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. Junctional complexes in various epithelia. **The Journal of cell biology**, v. 17, p. 375–412, 1963. Acesso em: 23 jul. 2023.
- FASANO, A.; NOT, T.; WANG, W.; UZZAU, S.; BERTI, I.; TOMMASINI, A.; GOLDBLUM, S. E. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. **Lancet**, v. 355, n. 9214, p. 1518–1519, 29 abr. 2000. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673600021693/fulltext>>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 1, p. 25–32, 1 jul. 1998. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1002/jlb.64.1.25>>. Acesso em: 30 jul. 2023.
- FERRARETTO, A.; BOTTANI, M.; DE LUCA, P.; CORNAGHI, L.; ARNABOLDI, F.; MAGGIONI, M.; FIORILLI, A.; DONETTI, E. Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, 4 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3041134/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- FERRARIS, R. P.; CAREY, H. V. Intestinal transport during fasting and malnutrition. **Annual review of nutrition**, v. 20, p. 195–219, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10940332/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- FERRARIS, R. P.; CAREY, H. V. Intestinal Transport During Fasting and Malnutrition. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.195>, v. 20, p. 195–219, 28 nov. 2003. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.20.1.195>>. Acesso em: 8 out. 2023.
- FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 7, p. 931, 4 abr. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1252597/>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

FIELD, M.; FROMM, D.; MCCOLL, I. Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.5.1388>, v. 220, n. 5, p. 1388–1396, 1971. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajplegacy.1971.220.5.1388>>. Acesso em: 4 jul. 2023.

FILTEAU, S. M.; TOMKINS, A. M. Promoting vitamin A status in low-income countries. *Lancet*, v. 353, n. 9163, p. 1458–1459, 1 maio 1999. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673698003912/fulltext>>. Acesso em: 8 out. 2023.

FOLLIS, R. H. A kwashiorkor-like syndrome observed in monkeys fed maize. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, v. 96, n. 2, p. 523–528, 1957. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13485152/>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

FORDHAM, R. P.; YUI, S.; HANNAN, N. R. F.; SOENDERGAARD, C.; MADGWICK, A.; SCHWEIGER, P. J.; NIELSEN, O. H.; VALLIER, L.; PEDERSEN, R. A.; NAKAMURA, T.; WATANABE, M.; JENSEN, K. B. Transplantation of Expanded Fetal Intestinal Progenitors Contributes to Colon Regeneration after Injury. *Cell Stem Cell*, v. 13, n. 6, p. 734, 12 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385813/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

FORDTRAN, J. S.; RECTOR, F. C.; EWTON, M. F.; SOTER, N.; KINNEY, J. Permeability characteristics of the human small intestine. *Journal of Clinical Investigation*, v. 44, n. 12, p. 1935, 1965. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC289695/>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

FRAGKOS, K. C.; FORBES, A. Citrulline as a marker of intestinal function and absorption in clinical settings: A systematic review and meta-analysis. *UEG Journal*, v. 6, n. 2, p. 181–191, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1177/2050640617737632>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

FRANCE, M. M.; TURNER, J. R. The mucosal barrier at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 130, n. 2, p. 307, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/278669/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

FREIRE, R.; INGANO, L.; SERENA, G.; CETINBAS, M.; ANSELMO, A.; SAPONE, A.; SADREYEV, R. I.; FASANO, A.; SENGER, S. Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota-derived molecules in celiac disease. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3505524/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.



FUKATSU, K. Role of nutrition in gastroenterological surgery. **Annals of Gastroenterological Surgery**, v. 3, n. 2, p. 160, 1 mar. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6422822/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

FURUSE, M.; HATA, M.; FURUSE, K.; YOSHIDA, Y.; HARATAKE, A.; SUGITANI, Y.; NODA, T.; KUBO, A.; TSUKITA, S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 6, p. 1099, 3 mar. 2002. Disponível em: </pmc/articles/PMC2173463/>. Acesso em: 8 out. 2023.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 6 II, p. 1777–1788, 1993. Acesso em: 23 jul. 2023.

GAJDA, A. M.; STORCH, J. Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- FABPs in the Intestine. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 93, p. 9, 1 fev. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4323920/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

GARCIA-CASTILLO, M. D.; CHINNAPEN, D. J. F.; LENCER, W. I. Membrane Transport across Polarized Epithelia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 9, 1 set. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5585844/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

GARCIA-IBORRA, M.; CASTANYS-MUNOZ, E.; OLIVEROS, E.; RAMIREZ, M. Optimal Protein Intake in Healthy Children and Adolescents: Evaluating Current Evidence. **Nutrients**, v. 15, n. 7, 1 abr. 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10097334/>. Acesso em: 3 mar. 2024.

GENSER, L.; AGUANNO, D.; SOULA, H. A.; DONG, L.; TRYSTRAM, L.; ASSMANN, K.; SALEM, J. E.; VAILLANT, J. C.; OPPERT, J. M.; LAUGERETTE, F.; MICHALSKI, M. C.; WIND, P.; ROUSSET, M.; BROT-LAROCHE, E.; LETURQUE, A.; CLÉMENT, K.; THENET, S.; POITOU, C. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. **The Journal of pathology**, v. 246, n. 2, p. 217–230, 1 out. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29984492/>. Acesso em: 18 jul. 2023.

GENTON, L.; CANI, P. D.; SCHRENZEL, J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 34, n. 3, p. 341–349, 1 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25459400/>. Acesso em: 9 jul. 2023.

GERBE, F.; SIDOT, E.; SMYTH, D. J.; OHMOTO, M.; MATSUMOTO, I.; DARDALHON, V.; CESSÉS, P.; GARNIER, L.; POUZOLLES, M.; BRULIN, B.; BRUSCHI, M.; HARCUS, Y.; ZIMMERMANN, V. S.; TAYLOR, N.; MAIZELS, R. M.; JAY, P. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, v. 529, n. 7585, p. 226–230, 13 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26762460/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

GERVASONI, J.; PRIMIANO, A.; GRAZIANI, C.; SCALDAFERRI, F.; GASBARRINI, A.; URBANI, A.; PERSICHILLI, S. Validation of UPLC-MS/MS Method for Determination of Urinary Lactulose/Mannitol. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, v. 23, n. 10, 20 out. 2018. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6222320/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31222320/)>. Acesso em: 27 jul. 2023.

GHOSH, S.; WHITLEY, C. S.; HARIBABU, B.; JALA, V. R. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, v. 11, n. 5, p. 1463–1482, 1 jan. 2021. Disponível em: <<http://www.cmghjournal.org/article/S2352345X21000400/fulltext>>. Acesso em: 16 ago. 2023.

GIALLOUROU, N.; MEDLOCK, G. L.; BOLICK, D. T.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; LEDWABA, S. E.; KOLLING, G. L.; TUNG, K.; GUERRY, P.; SWANN, J. R.; GUERRANT, R. L. A novel mouse model of *Campylobacter jejuni* enteropathy and diarrhea. *PLOS Pathogens*, v. 14, n. 3, p. e1007083, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007083>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

GLOPAN. **Global Panel - Cost of Malnutrition**. Disponível em: <<https://www.glopan.org/cost-of-malnutrition/>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; BETANZOS, A.; NAVA, P.; JARAMILLO, B. E. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 81, n. 1, p. 1–44, 1 jan. 2003. Acesso em: 26 jul. 2023.

GOOPTU, B.; LOMAS, D. A. Conformational Pathology of the Serpins: Themes, Variations, and Therapeutic Strategies. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082107.133320>, v. 78, p. 147–176, 2 jun. 2009. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.78.082107.133320>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

GRANTHAM-MCGREGOR, S.; CHEUNG, Y. B.; CUETO, S.; GLEWWE, P.; RICHTER, L.; STRUPP, B. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet*, v. 369, n. 9555, p. 60–70, 6 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673607600324/fulltext>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

GROOTJANS, J.; THUIJLS, G.; VERDAM, F.; DERIKX, J. P.; LENAERTS, K.; BUURMAN, W. A. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 2, n. 3, p. 61, 3 mar. 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC2999221/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

GRUBB, B. R. Ion transport across the jejunum in normal and cystic fibrosis mice. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.3.G505>, v. 268, n. 3 31-3, 1995. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1995.268.3.G505>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B.; MOORE, S. R.; ORIÁ, M. O. B.; LIMA, A. A. A. M. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutr Rev**, v. 66, n. 9, p. 487–505, set. 2008. Acesso em: 16 jul. 2023.

GYANWALI, B.; LIM, Z. X.; SOH, J.; LIM, C.; GUAN, S. P.; GOH, J.; MAIER, A. B.; KENNEDY, B. K. Alpha-Ketoglutarate dietary supplementation to improve health in humans. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 136–146, 1 fev. 2022. Acesso em: 8 out. 2023.

HAMILTON, K. L. Ussing's "Little Chamber": 60 Years+ Old and Counting. **Frontiers in Physiology**, v. 2, n. 1, 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3093741/>. Acesso em: 1 ago. 2023.

HAROUN, E.; KUMAR, P. A.; SABA, L.; KASSAB, J.; GHIMIRE, K.; DUTTA, D.; LIM, S. H. Intestinal barrier functions in hematologic and oncologic diseases. **Journal of Translational Medicine** 2023 21:1, v. 21, n. 1, p. 1–19, 31 mar. 2023. Disponível em: <<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-023-04091-w>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

HAYASE, E.; HASHIMOTO, D.; NAKAMURA, K.; NOIZAT, C.; OGASAWARA, R.; TAKAHASHI, S.; OHIGASHI, H.; YOKOI, Y.; SUGIMOTO, R.; MATSUOKA, S.; ARA, T.; YOKOYAMA, E.; YAMAKAWA, T.; EBATA, K.; KONDO, T.; HIRAMINE, R.; AIZAWA, T.; OGURA, Y.; HAYASHI, T.; MORI, H.; KUROKAWA, K.; TOMIZUKA, K.; AYABE, T.; TESHIMA, T. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 12, p. 3507, 12 dez. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5716036/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

HEADEY, D.; HEIDKAMP, R.; OSENDARP, S.; RUEL, M.; SCOTT, N.; BLACK, R.; SHEKAR, M.; BOUIS, H.; FLORY, A.; HADDAD, L.; WALKER, N. Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. **The Lancet**, v. 396, n. 10250, p. 519–521, 22 ago. 2020. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673620316470/fulltext>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

HERMISTON, M. L.; GORDON, J. I. *In vivo* analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 2, p. 489–506, 15 abr. 1995. Disponível em: <<http://rupress.org/jcb/article-pdf/129/2/489/1478655/489.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

HERRMANN, J. R.; TURNER, J. R. Beyond Ussing's chambers: contemporary thoughts on integration of transepithelial transport. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 310, n. 6, p. C423, 3 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26811111/>>. Acesso em: 28 ago. 2022.

HLAING, L. M.; FAHMIDA, U.; HTET, M. K.; UTOMO, B.; FIRMANSYAH, A.; FERGUSON, E. L. Local food-based complementary feeding recommendations developed by the linear programming approach to improve the intake of problem nutrients among 12–23-month-old Myanmar children. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. S1, p. S16–S26, 1 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/local-foodbased-complementary-feeding-recommendations-developed-by-the-linear-programming-approach-to-improve-the-intake-of-problem-nutrients-among-1223monthold-myanmar-children/F1DD4A8918A8FC664AC881779D2F44C7>>. Acesso em: 3 mar. 2024.

HLASIWETZ, H.; HABERMANN, J. Ueber die Proteinstoffe. **Ann. Chem.**, v. 169, p. 150–166, 1873.

HOFFMAN, D. J. Nutrients in complementary feeding protect against wasting, but not stunting: Results from a multi-country longitudinal cohort study. **Journal of Nutrition**, v. 151, n. 1, p. 5–6, 1 jan. 2021. Acesso em: 4 jul. 2023.

HOLECEK, M. Side Effects of Long-Term Glutamine Supplementation. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 37, n. 5, p. 607–616, 1 set. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1177/0148607112460682>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

HOLLANDER, D.; KAUNITZ, J. D. The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 65, n. 5, p. 1277–1287, 1 maio 2020. Acesso em: 23 jul. 2023.

HOLST, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1409–1439, out. 2007. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00034.2006>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

HOLTUG, K.; HANSEN, M. B.; SKADHAUGE, E. Experimental studies of intestinal ion and water transport. **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement**, v. 216, n. 216, p. 95–110, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8726283/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

HONZAWA, Y.; NAKASE, H.; MATSUURA, M.; CHIBA, T. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17, n. 2, fev. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21225906/>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

HÖRNELL, A.; LAGSTRÖM, H.; LANDE, B.; THORSODDOTTIR, I. Protein intake from 0 to 18 years of age and its relation to health: a systematic literature review for the 5th Nordic Nutrition Recommendations. **Food & Nutrition Research**, v. 57, n. 1, p. 21083, jan. 2013. Disponível em: <</pmc/articles/PMC3664059/>>. Acesso em: 3 mar. 2024.

HOROWITZ, A.; CHANEZ-PAREDES, S. D.; HAEST, X.; TURNER, J. R. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2023 20:7, v. 20, n. 7, p. 417–432, 25 abr. 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41575-023-00766-3>>. Acesso em: 1 out. 2023.

HOWITT, M. R.; LAVOIE, S.; MICHAUD, M.; BLUM, A. M.; TRAN, S. V.; WEINSTOCK, J. V.; GALLINI, C. A.; REDDING, K.; MARGOLSKEE, R. F.; OSBORNE, L. C.; ARTIS, D.; GARRETT, W. S. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. **Science (New York, N.Y.)**, v. 351, n. 6279, p. 1329–1333, 18 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26847546/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

IBRAHIM, M. K.; ZAMBRUNI, M.; MELBY, C. L.; MELBY, P. C. Impact of childhood malnutrition on host defense and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 919–971, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00119-16>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

IDDRISU, I.; MONTEAGUDO-MERA, A.; POVEDA, C.; PYLE, S.; SHAHZAD, M.; ANDREWS, S.; WALTON, G. E. Malnutrition and Gut Microbiota in Children. **Nutrients** 2021, Vol. 13, Page 2727, v. 13, n. 8, p. 2727, 8 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/13/8/2727/htm>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

IRVINE, E. J.; MARSHALL, J. K. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1740–1744, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11113095/>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

ISANAKA, S.; GRAIS, R. F.; BRIEND, A.; CHECCHI, F. Estimates of the duration of untreated acute malnutrition in children from Niger. **American Journal of Epidemiology**, v. 173, n. 8, p. 932–940, 15 abr. 2011. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/aje/kwq436>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

JACOBI, S. K.; MOESER, A. J.; BLIKSLAGER, A. T.; RHOADS, J. M.; CORL, B. A.; HARRELL, R. J.; ODLE, J. Acute effects of rotavirus and malnutrition on intestinal barrier function in neonatal piglets. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 31, p. 5094–5102, 31 ago. 2013. Acesso em: 3 jul. 2023.

JUNG, P.; SATO, T.; MERLOS-SUÁREZ, A.; BARRIGA, F. M.; IGLESIAS, M.; ROSSELL, D.; AUER, H.; GALLARDO, M.; BLASCO, M. A.; SANCHO, E.; CLEVERS, H.; BATLLE, E. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. **Nature Medicine** 2011 17:10, v. 17, n. 10, p. 1225–1227, 4 set. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm.2470>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

KANDA, T.; NAKATOMI, Y.; ISHIKAWA, H.; HITOMI, M.; MATSUBARA, Y.; ONO, T.; MUTO, T. Intestinal fatty acid-binding protein as a sensitive marker of intestinal ischemia. **Digestive diseases and sciences**, v. 37, n. 9, p. 1362–1367, set. 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1505286/>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

KARBACH, U.; EWE, K.; BODENSTEIN, H. Alpha 1-antitrypsin, a reliable endogenous marker for intestinal protein loss and its application in patients with Crohn's disease. **Gut**, v. 24, n. 8, p. 718, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1420239/>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

KARCZEWSKI, J.; TROOST, F. J.; KONINGS, I.; DEKKER, J.; KLEEREBEZEM, M.; BRUMMER, R. J. M.; WELLS, J. M. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 6, p. 851–859, jun. 2010. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00327.2009>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KATSUNO, T.; UMEDA, K.; MATSUI, T.; HATA, M.; TAMURA, A.; ITOH, M.; TAKEUCHI, K.; FUJIMORI, T.; NABESHIMA, Y. I.; NODA, T.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 6, p. 2465, jun. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17397322/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

KEBEDE, F. Time to readmission and associated factors after post treatment discharge of severe acute malnourished under-five children in Pawe General Hospital. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2022. Disponível em: <<https://jhpn.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41043-022-00308-8>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

KEITA, Å. V.; ALKAISSI, L. Y.; HOLM, E. B.; HEIL, S. D. S.; CHASSAING, B.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; MCKAY, D. M.; SÖDERHOLM, J. D. Enhanced *E. coli* LF82 Translocation through the Follicle-associated Epithelium in Crohn's Disease is Dependent on Long Polar Fimbriae and CEACAM6 expression, and Increases Paracellular Permeability. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 14, n. 2, p. 216–229, 10 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31393983/>>. Acesso em: 18 jul. 2023.

KEITA, Å. V.; GULLBERG, E.; ERICSON, A. C.; SALIM, S. Y.; WALLON, C.; KALD, A.; ARTURSSON, P.; SÖDERHOLM, J. D. Characterization of antigen and bacterial transport in the follicle-associated epithelium of human ileum. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 5, p. 504–516, 1 maio 2006. Disponível em: <<http://www.laboratoryinvestigation.org/article/S0023683722032846/fulltext>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

KEITA, Å. V.; SÖDERHOLM, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 7, p. 718–733, 1 jul. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

KEITA, Å. V.; SÖDERHOLM, J. D. Mucosal permeability and mast cells as targets for functional gastrointestinal disorders. **Current opinion in pharmacology**, v. 43, p. 66–71, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30216901/>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

KEUSCH, G. T.; DENNO, D. M.; BLACK, R. E.; DUGGAN, C.; GUERRANT, R. L.; LAVERY, J. V.; NATARO, J. P.; ROSENBERG, I. H.; RYAN, E. T.; TARR, P. I.; WARD, H.; BHUTTA, Z. A.; COOVADIA, H.; LIMA, A.; RAMAKRISHNA, B.; ZAIDI, A. K. M.; HAY BURGESS, D. C.; BREWER, T. Environmental Enteric Dysfunction: Pathogenesis, Diagnosis, and Clinical Consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. suppl\_4, p. S207–S212, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu485>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 30, n. 2, p. 145, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27144471/>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

KIM, H. Glutamine as an Immunonutrient. **Yonsei Medical Journal**, v. 52, n. 6, p. 892, 11 nov. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2202259/>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KIM, K. A.; KAKITANI, M.; ZHAO, J.; OSHIMA, T.; TANG, T.; BINNERTS, M.; LIU, Y.; BOYLE, B.; PARK, E.; EMTAGE, P.; FUNK, W. D.; TOMIZUKA, K. Medicine: Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. **Science**, v. 309, n. 5738, p. 1256–1259, 19 ago. 2005. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1112521>>. Acesso em: 8 out. 2023.

KIM, M. H.; KIM, H. The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 12 maio 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5454963/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KLEIVELAND, C.; LEA, T.; MACKIE, A.; REQUENA, T.; SWIATECKA, D.; WICHERS, H. The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models. 2015. Disponível em: <https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/28028/1001968.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2023.

KOEPSSELL, H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. **Pflugers Archiv**, v. 472, n. 9, p. 1207, 1 set. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7462918/>. Acesso em: 8 out. 2023.

KOSEK, M. N.; AHMED, T.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L.; GUERRANT, R. L.; HOUP, E.; KANG, G.; LEE, G.; LIMA, A. A. M.; MCCORMICK, B. J. J.; PLATTSMILLS, J.; SEIDMAN, J. C.; BLANK, R. R.; GOTTLIEB, M.; KNOBLER, S. L.; LANG, D. R.; MILLER, M. A.; TOUNTAS, K. H.; CHECKLEY, W.; MASON, C. J.; MURRAY-KOLB, L. E.; PETRI, W. A.; BESSONG, P.; HAQUE, R.; JOHN, S.; MDUMA, E. R.; ORIÁ, R. B.; SHRESTHA, P. S.; SHRESTHA, S. K.; SVENSEN, E.; ZAIDI, A. K. M.; ABREU, C. B.; ACOSTA, A. M.; AHMED, I.; SHAMSIR AHMED, A. M.; ALI, A.; AMBIKAPATHI, R.; BARRETT, L.; BAUCK, A.; BAYYO, E.; BODHIDATTA, L.; BOSE, A.; DANIEL CARREON, J.; CHANDYO, R. K.; CHARU, V.; COSTA, H.; DILLINGHAM, R.; DI MOURA, A.; DOAN, V.; FILHO, J. Q.; GRAHAM, J.; HOEST, C.; HOSSAIN, I.; ISLAM, M.; STEFFI JENNIFER, M.; KAKI, S.; KOSHY, B.; LEITE, Á. M.; LIMA, N. L.; MACIEL, B. L. L.; MAHFUZ, M.; MAHOPO, C.; MAPHULA, A.; MCGRATH, M.; MOHALE, A.; MORAES, M.; MOTA, F. S.; MULIYIL, J.; MVUNGI, R.; NAYYAR, G.; NYATHI, E.; OLORTEGUI, M. P.; VASQUEZ, A. O.; PAN, W. K.; PASCAL, J.; PATIL, C. L.; PENDERGAST, L.; PINEDO, S. R.; PSAKI, S.; RAGHAVA, M. V.; RAMANUJAM, K.; RASHEED, M.; RASMUSSEN, Z. A.; RICHARD, S. A.; ROSE, A.; ROSHAN, R.; SCHAEFER, B.; SCHARF, R.; SHARMA, S. L.; SHRESTHA, B.; SHRESTHA, R.; SIMONS, S.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; SOOFI, S.; STRAND, T.; TOFAIL, F.; THOMAS, R. J.; TURAB, A.; ULAK, M.; WANG, V.; YARROT, L.; YORI, P. P.; ALAM, D.; AMOUR, C.; CHAVEZ, C. B.; BABJI, S.; DE BURGA, R. R.; FLORES, J. T.; GRATZ, J.; GEORGE, A. T.; HARIRAJU, D.; HAVT, A.; KARUNAKARAN, P.; LAZARUS, R. P.; LIMA, I. F.; MONDAL, D.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; NSHAMA, R.; QUETZ, J.; QURESHI, S.; RAJU, S.; RAMACHANDRAN, A.; RAMADAS, R.; CATHARINE ROSS, A.; SALAS, M. S.; SAMIE, A.; SCHULZE, K.; SHANMUGA SUNDARAM, E.; SWEMA, B. M.; TRIGOSO, D. R. Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. **EBioMedicine**, v. 18, p. 109–117, 1 abr. 2017. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S235239641730083X/fulltext>. Acesso em: 27 jul. 2023.

KOTLOFF, K. L. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 799–814, 1 ago. 2017. Acesso em: 23 jul. 2023.



KOWALSKI, A. J.; MAYEN, V. A.; DE PONCE, S.; LAMBDEN, K. B.; TILTON, N.; VILLANUEVA, L. M.; PALACIOS, A. M.; REINHART, G. A.; HURLEY, K. M.; BLACK, M. M. The Effects of Multiple Micronutrient Fortified Beverage and Responsive Caregiving Interventions on Early Childhood Development, Hemoglobin, and Ferritin among Infants in Rural Guatemala. **Nutrients**, v. 15, n. 9, 25 abr. 2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37432191>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

KREBS, H. A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochemical Journal**, v. 29, n. 8, p. 1951, 1 ago. 1935. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1266709/>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

KRUG, S. M.; BOJARSKI, C.; FROMM, A.; LEE, I. M.; DAMES, P.; RICHTER, J. F.; TURNER, J. R.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Tricellulin is regulated via interleukin 13 receptor  $\alpha 2$ , affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis. **Mucosal immunology**, v. 11, n. 2, p. 345, 1 mar. 2018. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5730503/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5730503/)>. Acesso em: 30 jul. 2023.

KUBICA, P.; KOT-WASIK, A.; WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J.; LANDOWSKI, P. Modern approach for determination of lactulose, mannitol and sucrose in human urine using HPLC–MS/MS for the studies of intestinal and upper digestive tract permeability. **Journal of Chromatography B**, v. 907, p. 34–40, 15 out. 2012. Acesso em: 27 jul. 2023.

KURASHIMA, Y.; YAMAMOTO, D.; NELSON, S.; UEMATSU, S.; ERNST, P. B.; NAKAYAMA, T.; KIYONO, H. Mucosal Mesenchymal Cells: Secondary Barrier and Peripheral Educator for the Gut Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, p. 1787, 13 dez. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5733542/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733542/)>. Acesso em: 31 jul. 2023.

LACEY, J. M.; WILMORE, D. W. Is Glutamine a Conditionally Essential Amino Acid? **Nutrition Reviews**, v. 48, n. 8, p. 297–309, 1 ago. 1990. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.1990.tb02967.x>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

LE BIVIC, A.; REAL, F. X.; RODRIGUEZ-BOULAN, E. Vectorial targeting of apical and basolateral plasma membrane proteins in a human adenocarcinoma epithelial cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 23, p. 9313, 1989. Disponível em: <[pmc/articles/PMC298485/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC298485/?report=abstract)>. Acesso em: 31 jul. 2023.

LECOUTRE, S.; MAQDASY, S.; PETRUS, P.; LUDZKI, A.; COUCHET, M.; MEJHERT, N.; RYDÉN, M. Glutamine metabolism in adipocytes: a bona fide epigenetic modulator of inflammation. **Adipocyte**, v. 9, n. 1, p. 620, 1 jan. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7553504/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7553504/)>. Acesso em: 26 jul. 2023.

LI, H.; SHEPPARD, D. N.; HUG, M. J. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 3, n. SUPPL. 2, p. 123–126, 1 ago. 2004. Disponível em:

<<http://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569199304000803/fulltext>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

LIMA, A. Â. M. **Glutamina e alanil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal, eletrólitos e permeabilidade intestinal**. 1998. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998. Disponível em: <<https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/74197>>.

LIMA, A. A. M.; ANSTEAD, G. M.; ZHANG, Q.; FIGUEIREDO, Í. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; LIMA, N. L.; GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B. Effects of glutamine alone or in combination with zinc and vitamin A on growth, intestinal barrier function, stress and satiety-related hormones in Brazilian shantytown children. **Clinics**, v. 69, n. 4, p. 225–233, 2014. Acesso em: 3 jul. 2023.

LIMA, A. A. M.; BRITO, L. F. B.; RIBEIRO, H. B.; MARTINS, M. C. V.; LUSTOSA, A. P.; ROCHA, E. M.; LIMA, N. L.; MONTE, C. M. G.; GUERRANT, R. L. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 40, n. 1, p. 28–35, jan. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15625423/>>. Acesso em: 3 jul. 2023.

LIMA, N. L. **Suplementação de alanil-glutamina em crianças de uma comunidade carente de Fortaleza-CE: impacto sobre a barreira intestinal e o estado nutricional infantil**. 2006. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/3735>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; MONTEIRO, H. S. A.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral formula. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 365–374, mar. 2007. Disponível em: <[https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2007/03000/Wasting\\_and\\_Intestinal\\_Barrier\\_Function\\_in.13.aspx](https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2007/03000/Wasting_and_Intestinal_Barrier_Function_in.13.aspx)>. Acesso em: 16 jul. 2023.

LINDEMANN, B. Hans Ussing, experiments and models. **Journal of Membrane Biology**, v. 184, n. 3, p. 203–210, 1 dez. 2001. Acesso em: 28 ago. 2022.

LIU, E.; PIMPIN, L.; SHULKIN, M.; KRANZ, S.; DUGGAN, C. P.; MOZAFFARIAN, D.; FAWZI, W. W. Effect of zinc supplementation on growth outcomes in children under 5 years of age. **Nutrients**, v. 10, n. 3, 20 mar. 2018. Acesso em: 4 jul. 2023.

LOSTIA, A. M.; LIONETTO, L.; PRINCIPESSA, L.; EVANGELISTI, M.; GAMBA, A.; VILLA, M. P.; SIMMACO, M. A liquid chromatography/mass spectrometry method for the evaluation of intestinal permeability. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 887–892, 1 jul. 2008. Acesso em: 27 jul. 2023.

LU, S.; SINGH, K.; MANGRAY, S.; TAVARES, R.; NOBLE, L.; RESNICK, M. B.; YAKIREVICH, E. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. **Modern Pathology**, v. 26, n. 4, p. 485–495, 1 abr. 2013. Disponível em:

<<http://www.modernpathology.org/article/S0893395222020749/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

LUISE, D.; CHALVON-DEMERSAY, T.; CORREA, F.; BOSI, P.; TREVISI, P. Review: A systematic review of the effects of functional amino acids on small intestine barrier function and immunity in piglets. **animal**, p. 100771, 11 mar. 2023. Acesso em: 26 jul. 2023.

LUNN, P. G. The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 1, p. 147–154, 2000. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/impact-of-infection-and-nutrition-on-gut-function-and-growth-in-childhood/FB6C9EA5375B8253C906EB9D2FB34F10>>. Acesso em: 8 out. 2023.

LUNN, P. G.; NORTHROP-CLEWES, C. A.; DOWNES, R. M. 2. Chronic diarrhoea and malnutrition in The Gambia: studies on intestinal permeability. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 8–11, 1 jan. 1991. Acesso em: 8 out. 2023.

MACIEL, B. L. L.; COSTA, P. N.; FILHO, J. Q.; RIBEIRO, S. A.; RODRIGUES, F. A. P.; SOARES, A. M.; JÚNIOR, F. S.; AMBIKAPATHI, R.; MCQUADE, E. T. R.; KOSEK, M.; AHMED, T.; BESSONG, P.; KANG, G.; SHRESTHRA, S.; MDUMA, E.; BAYO, E.; GUERRANT, R. L.; CAULFIELD, L. E.; LIMA, A. A. M. Higher Energy and Zinc Intakes from Complementary Feeding Are Associated with Decreased Risk of Undernutrition in Children from South America, Africa, and Asia. **The Journal of Nutrition**, v. 151, n. 1, p. 170–178, 1 jan. 2021. Acesso em: 4 jul. 2023.

MACIEL, B. L. L.; MORAES, M. L.; SOARES, A. M.; CRUZ, I. F. S.; DE ANDRADE, M. I. R.; FILHO, J. Q.; JUNIOR, F. S.; COSTA, P. N.; ABREU, C. B.; AMBIKAPATHI, R.; GUERRANT, R. L.; CAULFIELD, L. E.; LIMA, A. A. M. Infant feeding practices and determinant variables for early complementary feeding in the first 8 months of life: Results from the Brazilian MAL-ED cohort site. **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 13, p. 2462–2470, 1 set. 2018. Acesso em: 4 jul. 2023.

MADARA, J. L. Functional Morphology of Epithelium of the Small Intestine. **Comprehensive Physiology**, p. 83–120, dez. 1991. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cphy.cp060403>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

MADARA, J. L.; PAPPENHEIMER, J. R. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. **The Journal of membrane biology**, v. 100, n. 2, p. 149–164, dez. 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3430571/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MAES, M.; KUBERA, M.; LEUNIS, J.-C. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 29, n. 1, p. 117–124, 2008.

MAGALHÃES, L. M. V. C. **Validação do teste Lactulose:Manitol através de HPLC MS/ MS para análise de Barreira Morfofuncional Gastrointestinal**. 2021. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS. Childhood stunting in relation to the pre- and postnatal environment during the first 2 years of life: The MAL-ED longitudinal birth cohort study. **PLoS Medicine**, v. 14, n. 10, 1 out. 2017.

MARSHMAN, E.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. The intestinal epithelial stem cell. **BioEssays**, v. 24, n. 1, p. 91–98, 1 jan. 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.10028>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

MATSUYAMA, T.; YOSHINAGA, S. K.; SHIBUE, K.; MAK, T. W. Comorbidity-associated glutamine deficiency is a predisposition to severe COVID-19. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 12, p. 3199, 1 dez. 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8522258/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3522258/)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MAY, T.; KLATT, K. C.; SMITH, J.; CASTRO, E.; MANARY, M.; CAUDILL, M. A.; JAHOR, F.; FIOROTTO, M. L. Choline Supplementation Prevents a Hallmark Disturbance of Kwashiorkor in Weanling Mice Fed a Maize Vegetable Diet: Hepatic Steatosis of Undernutrition. **Nutrients** 2018, Vol. 10, Page 653, v. 10, n. 5, p. 653, 22 maio 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/10/5/653/htm>>. Acesso em: 12 set. 2023.

MAYNERIS-PERXACHS, J.; BOLICK, D. T.; LENG, J.; MEDLOCK, G. L.; KOLLING, G. L.; PAPIN, J. A.; SWANN, J. R.; GUERRANT, R. L. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 1253, 1 nov. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5081716/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/271716/)>. Acesso em: 23 jul. 2023.

MCCLEAN, S.; PROSSER, E.; MEEHAN, E.; O'MALLEY, D.; CLARKE, N.; RAMTOOLA, Z.; BRAYDEN, D. Binding and uptake of biodegradable poly-dl-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 153–163, 1 abr. 1998. Acesso em: 30 jul. 2023.

MCCORMICK, B. J. J.; MURRAY-KOLB, L. E.; LEE, G. O.; SCHULZE, K. J.; ROSS, A. C.; BAUCK, A.; LIMA, A. A. M.; MACIEL, B. L. L.; KOSEK, M. N.; SEIDMAN, J. C.; AMBIKAPATHI, R.; BOSE, A.; JOHN, S.; KANG, G.; TURAB, A.; MDUMA, E.; BESSONG, P.; SHRESTHA, S. K.; AHMED, T.; MAHFUZ, M.; OLORTEGUI, M. P.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; ACOSTA, A. M.; BURGA, R. R. De; CHAVEZ, C. B.; FLORES, J. T.; OLOTEGUI, M. P.; PINEDO, S. R.; SALAS, M. S.; TRIGOSO, D. R.; VASQUEZ, A. O.; AHMED, I.; ALAM, D.; ALI, A.; QURESHI, S.; RASHEED, M.; SOOFI, S.; ZAIDI, A. K. M.; BODHIDATTA, L.;

MASON, C. J.; BABJI, S.; GEORGE, A. T.; HARIRAJU, D.; STEFFI JENNIFER, M.; KAKI, S.; KARUNAKARAN, P.; KOSHY, B.; LAZARUS, R. P.; MULIYIL, J.; RAGHAVA, M. V.; RAJU, S.; RAMACHANDRAN, A.; RAMADAS, R.; RAMANUJAM, K.; ROSHAN, R.; SHARMA, S. L.; SUNDARAM, S. E.; THOMAS, R. J.; PAN, W. K.; DANIEL CARREON, J.; CHARU, V.; DOAN, V.; GRAHAM, J.; HOEST, C.; KNOBLER, S.; LANG, D. R.; MCGRATH, M.; MILLER, M. A.; MOHALE, A.; NAYYAR, G.; PSAKI, S.; RASMUSSEN, Z.; RICHARD, S. A.; WANG, V.; BLANK, R.; GOTTLIEB, M.; TOUNTAS, K. H.; AMOUR, C.; BAYYO, E.; MDUMA, E. R.; MVUNGI, R.; NSHAMA, R.; PASCAL, J.; SWEMA, B. M.; YARROT, L.; SHAMSIR AHMED, A. M.; HAQUE, R.; HOSSAIN, I.; ISLAM, M.; MONDAL, D.; TOFAIL, F.; CHANDYO, R. K.; SHRESTHA, P. S.; SHRESTHA, R.; ULAK, M.; BLACK, R. E.; CHECKLEY, W.; YORI, P. P.; CATHARINE ROSS, A.; SCHAEFER, B.; SIMONS, S.; PENDERGAST, L.; ABREU, C. B.; COSTA, H.; MOURA, A. Di; FILHO, J. Q.; HAVT, A.; LEITE, Á. M.; LIMA, N. L.; LIMA, I. F.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; MORAES, M.; MOTA, F. S.; ORIÁ, R. B.; QUETZ, J.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; PATIL, C. L.; BESSONG, P.; MAHOPO, C.; MAPHULA, A.; NYATHI, E.; SAMIE, A.; BARRETT, L.; DILLINGHAM, R.; GRATZ, J.; GUERRANT, R. L.; HOUP, E.; PETRI, W. A.; PLATTS-MILLS, J.; SCHARF, R.; SHRESTHA, B.; SHRESTHA, S. K.; STRAND, T.; SVENSEN, E. Intestinal permeability and inflammation mediate the association between nutrient density of complementary foods and biochemical measures of micronutrient status in young children: results from the MAL-ED study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 1015–1025, 1 out. 2019. Acesso em: 30 jul. 2023.

MEDEIROS, P. H. Q. S.; LEDWABA, S. E.; BOLICK, D. T.; GIALLOUROU, N.; YUM, L. K.; COSTA, D. V. S.; ORIÁ, R. B.; BARRY, E. M.; SWANN, J. R.; LIMA, A. Á. M.; AGAISSE, H.; GUERRANT, R. L. A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency. **Gut Microbes**, v. 10, n. 5, p. 615–630, 3 set. 2019.

MILLER, M.; ACOSTA, A. M.; CHAVEZ, C. B.; FLORES, J. T.; OLOTEGUI, M. P.; PINEDO, S. R.; TRIGOSO, D. R.; VASQUEZ, A. O.; AHMED, I.; ALAM, D.; ALI, A.; BHUTTA, Z. A.; QURESHI, S.; SHAKOOR, S.; SOOFI, S.; TURAB, A.; YOUSAFZAI, A. K.; ZAIDI, A. K. M.; BODHIDATTA, L.; MASON, C. J.; BABJI, S.; BOSE, A.; JOHN, S.; KANG, G.; KURIEN, B.; MULIYIL, J.; RAGHAVA, M. V.; RAMACHANDRAN, A.; ROSE, A.; PAN, W.; AMBIKAPATHI, R.; CARREON, D.; CHARU, V.; DABO, L.; DOAN, V.; GRAHAM, J.; HOEST, C.; KNOBLER, S.; LANG, D.; MCCORMICK, B.; MCGRATH, M.; MILLER, M.; MOHALE, A.; NAYYAR, G.; PSAKI, S.; RASMUSSEN, Z.; RICHARD, S.; SEIDMAN, J.; WANG, V.; BLANK, R.; GOTTLIEB, M.; TOUNTAS, K.; AMOUR, C.; MDUMA, E.; AHMED, T.; AHMED, A. M. S.; DINESH, M.; TOFAIL, F.; HAQUE, R.; HOSSAIN, I.; ISLAM, M.; MAHFUZ, M.; CHANDYO, R. K.; SHRESTHA, P. S.; SHRESTHA, R.; ULAK, M.; BLACK, R.; CAULFIELD, L.; CHECKLEY, W.; CHEN, P.; KOSEK, M.; LEE, G.; YORI, P. P.; MURRAY-KOLB, L.; SCHAEFER, B.; PENDERGAST, L.; ABREU, C.; BINDÁ, A.; COSTA, H.; DI, M. A.; FILHO, J. Q.; LEITE, Á.; LIMA, A.; LIMA, N.; LIMA, I.; MACIEL, B.; MORAES, M.; MOTA, F.; ORIA, R.; QUETZ, J.; SOARES, A.; SVENSEN, E.; TOR, S.; PATIL, C.; BESSONG, P.; MAHOPO, C.; MAPULA, A.; NESAMVUNI, C.; NYATHI, E.; SAMIE, A.; BARRETT, L.; GRATZ,

J.; GUERRANT, R.; HOUPPT, E.; OLMSTED, L.; PETRI, W.; PLATTS-MILLS, J.; SCHARF, R.; SHRESTHA, B.; SHRESTHA, S. K. The MAL-ED Study: A Multinational and Multidisciplinary Approach to Understand the Relationship Between Enteric Pathogens, Malnutrition, Gut Physiology, Physical Growth, Cognitive Development, and Immune Responses in Infants and Children Up to 2 Years of Age in Resource-Poor Environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. suppl\_4, p. S193–S206, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu653>>. Acesso em: 17 mar. 2024.

MIYAMOTO, K.; HASE, K.; TAGAGI, T.; FUJI, T.; TAKETANI, Y.; MINAMI, H.; OKA, T.; NAKABOU, Y. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. **The Biochemical journal**, v. 295 (Pt 1), n. Pt 1, p. 211–215, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8216218/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

MOLMENTI, E. P.; PERLMUTTER, D. H.; RUBIN, D. C. Cell-specific expression of alpha 1-antitrypsin in human intestinal epithelium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 4, p. 2022, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1311111/>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

MOORE, S. R.; GUEDES, M. M.; COSTA, T. B.; VALLANCE, J.; MAIER, E. A.; BETZ, K. J.; AIHARA, E.; MAHE, M. M.; LIMA, A. A. M.; ORIÁ, R. B.; SHROYER, N. F. Glutamine and alanyl-glutamine promote crypt expansion and mTOR signaling in murine enteroids. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 308, n. 10, p. G831–G839, 15 maio 2015. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00422.2014>>. Acesso em: 8 out. 2023.

MOORE, S. R.; QUINN, L. A.; MAIER, E. A.; GUEDES, M. M.; QUETZ, J. S.; PERRY, M.; RAMPRASAD, C.; LANZARINI LOPES, G. M. L.; MAYNERIS-PERXACHS, J.; SWANN, J.; SOARES, A. M.; FILHO, J. Q.; JUNIOR, F. S.; HAVT, A.; LIMA, N. L.; GUERRANT, R. L.; LIMA, A. A. M. Intervention and Mechanisms of Alanyl-glutamine for Inflammation, Nutrition, and Enteropathy: A Randomized Controlled Trial. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 71, n. 3, p. 393–400, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32826717/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

MOSCHEN, A. R.; ADOLPH, T. E.; GERNER, R. R.; WIESER, V.; TILG, H. Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 388–397, 1 maio 2017. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1043276017300073/fulltext>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

MULGREW, A. T.; TAGGART, C. C.; MCELVANEY, N. G. Alpha-1-antitrypsin deficiency: Current concepts. **Lung**, v. 185, n. 4, p. 191–201, 12 ago. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00408-007-9009-y>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

MUNFORD, R. S. Endotoxemia—menace, marker, or mistake? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 4, p. 687, 1 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5014740/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

MUNIRUL ISLAM, M.; ARAFAT, Y.; CONNELL, N.; MOTHABBIR, G.; MCGRATH, M.; BERKLEY, J. A.; AHMED, T.; KERAC, M. Severe malnutrition in infants aged <6 months—Outcomes and risk factors in Bangladesh: A prospective cohort study. **Maternal & Child Nutrition**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6586027/>. Acesso em: 7 out. 2023.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9061, p. 1269–1276, 3 maio 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9142060/>. Acesso em: 8 out. 2023.

MUSTATA, R. C.; VASILE, G.; FERNANDEZ-VALLONE, V.; STROLLO, S.; LEFORT, A.; LIBERT, F.; MONTEYNE, D.; PÉREZ-MORGA, D.; VASSART, G.; GARCIA, M. I. Identification of Lgr5-Independent Spheroid-Generating Progenitors of the Mouse Fetal Intestinal Epithelium. **Cell Reports**, v. 5, n. 2, p. 421–432, 31 out. 2013. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S2211124713005135/fulltext/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

NAKAMURA, T. Recent progress in organoid culture to model intestinal epithelial barrier functions. **International Immunology**, v. 31, n. 1, p. 13–21, 6 fev. 2019. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxy065/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

NASCIMENTO, R. R. do. **Alterações inflamatórias, secretórias e morfofuncionais em jejuno de camundongos C57BL/6 inoculados com a espícula do coronavírus SARS-COV-2**. 2022. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/69888/>. Acesso em: 1 ago. 2023.

NAYDENOV, N. G.; BROWN, B.; HARRIS, G.; DOHN, M. R.; MORALES, V. M.; BARANWAL, S.; REYNOLDS, A. B.; IVANOV, A. I. A Membrane Fusion Protein  $\alpha$ SNAP Is a Novel Regulator of Epithelial Apical Junctions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 34320, 2 abr. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3317505/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

NGO, J.; ORTIZ-ANDRELLUCCHI, A.; SERRA-MAJEM, L. Malnutrition: Concept, Classification and Magnitude. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 610–630, 14 set. 2016. Disponível em: </p/255640/malnutrition-concept-classification-and-magnitude/>. Acesso em: 23 jul. 2023.

NIEWOLD, T. A.; MEINEN, M.; VAN DER MEULEN, J. Plasma intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) concentrations increase following intestinal ischemia in pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 89–91, 1 ago. 2004. Acesso em: 27 jul. 2023.

NOBEN, M.; VERSTOCKT, B.; DE BRUYN, M.; HENDRIKS, N.; VAN ASSCHE, G.; VERMEIRE, S.; VERFAILLIE, C.; FERRANTE, M. Epithelial organoid cultures from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a truly long-term model to study the molecular basis for inflammatory bowel disease? **Gut**, v. 66, n. 12, p. 2193–2195, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/content/66/12/2193>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

NUSRAT, A.; GIRY, M.; TURNER, J. R.; COLGAN, S. P.; PARKOS, C. A.; CARNES, D.; LEMICHEZ, E.; BOQUET, P.; MADARA, J. L. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10629–10633, 7 nov. 1995. Acesso em: 23 jul. 2023.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. Intestinal Permeability Defects: Is It Time to Treat? **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 1075–1083, 1 set. 2013. Disponível em: <<http://www.cghjournal.org/article/S1542356513009269/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ODENWALD, M. A.; TURNER, J. R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2016 14:1, v. 14, n. 1, p. 9–21, 16 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2016.169>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

OOTANI, A.; LI, X.; SANGIORGI, E.; HO, Q. T.; UENO, H.; TODA, S.; SUGIHARA, H.; FUJIMOTO, K.; WEISSMAN, I. L.; CAPECCHI, M. R.; KUO, C. J. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. **Nature medicine**, v. 15, n. 6, p. 701, 8 jun. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19216/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

OPAL, S. M. Endotoxins and Other Sepsis Triggers. **Contributions to Nephrology**, v. 167, p. 14–24, jun. 2010. Disponível em: <<https://karger.com/books/book/2704/chapter/5769299/Endotoxins-and-Other-Sepsis-Triggers>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

ORÍ, R. B.; BRITO, G. A. C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. 1. ed. Fortaleza: Editora Edgard Blucher Ltda., 2016. v. 11–837 p.

P. FERRARIS, R. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. **The Biochemical journal**, v. 360, n. Pt 2, p. 265, 1 dez. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11716754/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

PAN, F.; ZHANG, L.; LI, M.; HU, Y.; ZENG, B.; YUAN, H.; ZHAO, L.; ZHANG, C. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammation effects in calorie-restricted mice. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 54, 21 mar. 2018.



PARK, C. Y.; PARK, S.; KIM, M. S.; KIM, H. K.; HAN, S. N. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 3, p. 636–642, 26 ago. 2017. Acesso em: 23 jul. 2023.

PERNA, S.; ALALWAN, T. A.; ALAALI, Z.; ALNASHABA, T.; GASPARRI, C.; INFANTINO, V.; RIVA, A.; PETRANGOLINI, G.; ALLEGRINI, P.; RONDANELLI, M. The Role of Glutamine in the Complex Interaction between Gut Microbiota and Health: A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 1 out. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6834172/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

PERSIDSKY, Y.; HEILMAN, D.; HAORAH, J.; ZELIVYANSKAYA, M.; PERSIDSKY, R.; WEBER, G. A.; SHIMOKAWA, H.; KAIBUCHI, K.; IKEZU, T. Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4770, 6 jun. 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1895810/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology** 2014 14:3, v. 14, n. 3, p. 141–153, 25 fev. 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3608>. Acesso em: 9 jul. 2023.

PINHEIRO, D. F.; PACHECO, P. D. G.; ALVARENGA, P. V.; BURATINI, J.; CASTILHO, A. C. S.; LIMA, P. F.; SARTORI, D. R. S.; VICENTINI-PAULINO, M. L. M. Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 287, 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3854379/>. Acesso em: 23 jul. 2023.

PLATTS-MILLS, J. A.; TANIUCHI, M.; UDDIN, M. J.; SOBUZ, S. U.; MAHFUZ, M.; GAFFAR, S. M. A.; MONDAL, D.; HOSSAIN, M. I.; ISLAM, M. M.; AHMED, A. M. S.; PETRI, W. A.; HAQUE, R.; HOUP, E. R.; AHMED, T. Association between enteropathogens and malnutrition in children aged 6–23 mo in Bangladesh: a case-control study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 5, p. 1132–1138, 1 maio 2017. Acesso em: 23 jul. 2023.

PLOTNIKOV, A.; ZEHORAI, E.; PROCACCIA, S.; SEGER, R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 1 set. 2011. Acesso em: 26 jul. 2023.

PSAKI, S.; BHUTTA, Z. A.; AHMED, T.; AHMED, S.; BESSONG, P.; ISLAM, M.; JOHN, S.; KOSEK, M.; LIMA, A.; NESAMVUNI, C.; SHRESTHA, P.; SVENSEN, E.; MCGRATH, M.; RICHARD, S.; SEIDMAN, J.; CAULFIELD, L.; MILLER, M.; CHECKLEY, W. Household food access and child malnutrition: results from the eight-country MAL-ED study. **Population Health Metrics**, v. 10, p. 24, 13 dez. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3584951/>. Acesso em: 17 mar. 2024.

QUARESMA, M. V. L. D. S.; SOUZA, W. Y. G.; LEMOS, V. A.; CARIS, A. V.; THOMATIELI-SANTOS, R. V. The Possible Importance of Glutamine Supplementation to Mood and Cognition in Hypoxia from High Altitude. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 1–15, 1 dez. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7760805/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3760805/)>. Acesso em: 26 jul. 2023.

RAHNER, C.; MITIC, L. L.; ANDERSON, J. M. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 411–422, 1 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508501430198/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

RAYMOND, J.; AGABA, M.; MOLLAY, C.; ROSE, J. W.; KASSIM, N. Analysis of nutritional adequacy of local foods for meeting dietary requirements of children aged 6–23 months in rural central Tanzania. **Archives of Public Health**, v. 75, n. 1, 17 ago. 2017.

RHOADS, J. M.; ARGENZIO, R. A.; CHEN, W.; RIPPE, R. A.; WESTWICK, J. K.; COX, A. D.; BERSCHNEIDER, H. M.; BRENNER, D. A. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.5.G943>, v. 272, n. 5 35-5, 1997. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.1997.272.5.G943>>. Acesso em: 8 out. 2023.

RIBEIRO, S. A. **Desenvolvimento de modelo murino de desnutrição baseado na dieta de crianças desnutridas e impacto na barreira morfofuncional intestinal**. 2022. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2022.

RIBEIRO, S. A.; RODRIGUES, F. A. D. P.; CLEMENTINO, M. A. D. F.; VERAS, H. D. N.; SIQUEIRA, R. C. L.; DE MEDEIROS, P. H. Q. S.; PEREIRA, J. M.; GUANABARA JÚNIOR, M. F. A.; DE SOUSA, J. K.; SANTOS, A. K. S.; DOS SANTOS, A. A.; MACIEL, B. L. L.; HAVT, A.; LIMA, A. Â. M. Consumption of a multi-deficient diet causes dynamic changes in the intestinal morphofunctional barrier, body composition and impaired physical development in post-weaning mice. **British Journal of Nutrition**, v. 129, n. 5, p. 745–758, 14 mar. 2023.

RICHTER, J. F.; SCHMAUDER, R.; KRUG, S. M.; GEBERT, A.; SCHUMANN, M. A novel method for imaging sites of paracellular passage of macromolecules in epithelial sheets. **Journal of Controlled Release**, v. 229, p. 70–79, 10 maio 2016. . Acesso em: 30 jul. 2023.

ROCHA, R. A.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. In vitro evaluation of intestinal fluoride absorption using different cell models. **Toxicology Letters**, v. 210, n. 3, p. 311–317, 5 maio 2012. Acesso em: 31 jul. 2023.

ROTH, E. Nonnutritive Effects of Glutamine. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2025S-2031S, 1 out. 2008. Acesso em: 24 jul. 2023.

ROZEHNAL, V.; NAKAI, D.; HOEPNER, U.; FISCHER, T.; KAMIYAMA, E.; TAKAHASHI, M.; YASUDA, S.; MUELLER, J. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 367–373, 15 ago. 2012. Acesso em: 30 jul. 2023.

SACK, G. H. Serum Amyloid A (SAA) Proteins. **Subcellular Biochemistry**, v. 94, p. 421–436, 2020. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-41769-7\\_17](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-41769-7_17)>. Acesso em: 30 jul. 2023.

SAITOU, M.; FUJIMOTO, K.; DOI, Y.; ITOH, M.; FUJIMOTO, T.; FURUSE, M.; TAKANO, H.; NODA, T.; TSUKITA, S. Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 2, p. 397–408, 20 abr. 1998. Acesso em: 26 jul. 2023.

SAITOU, M.; FURUSE, M.; SASAKI, H.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M.; TAKANO, H.; NODA, T.; TSUKITA, S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 12, p. 4131–4142, 13 out. 2000. Disponível em: <<https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.11.12.4131>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SAKAKIBARA, R. Gastrointestinal dysfunction in neuroinflammatory diseases: Multiple sclerosis, neuromyelitis optica, acute autonomic ganglionopathy and related conditions. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 232, 1 maio 2021. Disponível em: <<http://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566070221000254/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SAMBUY, Y.; DE ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M. L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell biology and toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1–26, jan. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15868485/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SAMPAIO, I. C. Avaliação do transporte transmembrânico de glicose, glutamina e alanil-glutamina em íleo de camundongos nutridos e desnutridos infectados por *Escherichia coli* enteropatogênica. 29 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/17971>>. Acesso em: 4 jul. 2023.

SAMPAIO, I. C.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; RODRIGUES, F. A. P.; CAVALCANTE, P. A.; RIBEIRO, S. A.; OLIVEIRA, J. S.; PRATA, M. M. G.; COSTA, D. V. S.; FONSECA, S. G. C.; GUEDES, M. M.; SOARES, A. M.; BRITO, G. A. C.; HAVT, A.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A. M. Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 10, 2016. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5064774/](https://pmc/articles/PMC5064774/)>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SAMPURNA, M.; ANGELIKA, D.; UTOMO, M. T.; WIJAYA, N. A.; BUDIONO, B.; ALKAFF, F. F.; IRAWAN, R.; ETIKA, R. Effect of enteral glutamine supplementation for low-birth-weight infants on weight gain patterns and levels of fecal secretory immunoglobulin A. **Turk pediatri arsivi**, v. 53, n. 4, p. 231–237, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30872925/>>. Acesso em: 8 out. 2023.

SATO, T.; STANGE, D. E.; FERRANTE, M.; VRIES, R. G. J.; VAN ES, J. H.; VAN DEN BRINK, S.; VAN HOUDT, W. J.; PRONK, A.; VAN GORP, J.; SIERSEMA, P. D.; CLEVERS, H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1762–1772, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21889923/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SATO, T.; VRIES, R. G.; SNIPPERT, H. J.; VAN DE WETERING, M.; BARKER, N.; STANGE, D. E.; VAN ES, J. H.; ABO, A.; KUJALA, P.; PETERS, P. J.; CLEVERS, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature** **2009 459:7244**, v. 459, n. 7244, p. 262–265, 29 mar. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07935>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SCHAERER, E.; NEUTRA, M. R.; KRAEHENBUHL, J. P. Molecular and cellular mechanisms involved in transepithelial transport. **The Journal of membrane biology**, v. 123, n. 2, p. 93–103, ago. 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1956074/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. Malnutrition is Associated with Increased Diarrhoea Incidence and Duration among Children in an Urban Brazilian Slum. **International Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 728–735, 1 set. 1990. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/ije/19.3.728>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SCHOULTZ, I.; KEITA, Å. V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. **Cells**, v. 9, n. 8, 17 ago. 2020. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC7463717/>>. Acesso em: 28 ago. 2022.

SCHULZKE, J. D.; GITTER, A. H.; MANKERTZ, J.; SPIEGEL, S.; SEIDLER, U.; AMASHEH, S.; SAITOU, M.; TSUKITA, S.; FROMM, M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1669, n. 1, p. 34–42, 15 maio 2005. Acesso em: 26 jul. 2023.

SCHUTGENS, F.; CLEVERS, H. Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>, v. 15, p. 211–234, 24 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SCHWANK, G.; KOO, B. K.; SASSELLI, V.; DEKKERS, J. F.; HEO, I.; DEMIRCAN, T.; SASAKI, N.; BOYMANS, S.; CUPPEN, E.; VAN DER ENT, C. K.; NIEUWENHUIS, E. E. S.; BEEKMAN, J. M.; CLEVERS, H. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. **Cell stem cell**, v. 13, n. 6, p. 653–658, 5 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24315439/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SCHWARZER, M.; MAKKI, K.; STORELLI, G.; MACHUCA-GAYET, I.; SRUTKOVA, D.; HERMANOVA, P.; MARTINO, M. E.; BALMAND, S.; HUDCOVIC, T.; HEDDI, A.; RIEUSSET, J.; KOZAKOVA, H.; VIDAL, H.; LEULIER, F. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 854–857, 19 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad8588>>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SCHWIERTZ, A.; SPIEGEL, J.; DILLMANN, U.; GRUNDMANN, D.; BÜRMANN, J.; FASSBENDER, K.; SCHÄFER, K. H.; UNGER, M. M. Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 50, p. 104–107, 1 maio 2018. Acesso em: 23 jul. 2023.

SEIDLER, U.; BLUMENSTEIN, I.; KRETZ, A.; VIELLARD-BARON, D.; ROSSMANN, H.; COLLEDGE, W. H.; EVANS, M.; RATCLIFF, R.; GREGOR, M. A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca (2+)-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion. **The Journal of Physiology**, v. 505, n. Pt 2, p. 411, 12 dez. 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1160074/>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

SELI MOGLU, M. A.; KANSU, A.; AYDOGDU, S.; SARIOGLU, A. A.; ERDOGAN, S.; DALGIC, B.; YUCE, A.; CULLU COKUGRAS, F. Nutritional support in malnourished children with compromised gastrointestinal function: utility of peptide-based enteral therapy. **Frontiers in pediatrics**, v. 9, p. 610275, 7 jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34164352/>>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SEVERSON, E. A.; KWON, M.; HILGARTH, R. S.; PARKOS, C. A.; NUSRAT, A. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating Occludin, Claudin-1 and E-cadherin expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 3, p. 592, 7 jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2974955/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SHAH, A. M.; WANG, Z.; MA, J. Glutamine Metabolism and Its Role in Immunity, a Comprehensive Review. **Animals: an Open Access Journal from MDPI**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37070879/>>. Acesso em: 24 jul. 2023.

SHARIATPANAH, Z. V.; ESLAMIAN, G.; ARDEHALI, S. H.; BAGHESTANI, A.-R. Effects of Early Enteral Glutamine Supplementation on Intestinal Permeability in Critically Ill Patients. **Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 23, n. 8, p. 356–362, ago. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31485104>>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SILVA, E. A. T. da. **Estudo comparativo de parâmetros elétricos na absorção de substratos Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-dependentes em epitélio jejunal e ileal de coelho em câmaras de ussing**. 2002. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/2714>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

SKAU, J. K. H.; BUNTHANG, T.; CHAMNAN, C.; WIERINGA, F. T.; DIJKHUIZEN, M. A.; ROOS, N.; FERGUSON, E. L. The use of linear programming to determine whether a formulated complementary food product can ensure adequate nutrients for 6- to 11-month-old Cambodian infants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 130–138, 1 jan. 2014. Acesso em: 3 mar. 2024.

SMITH, P. L. Methods for evaluating intestinal permeability and metabolism in vitro. **Pharmaceutical biotechnology**, v. 8, p. 13–34, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8791802/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SMITH, R. J. Glutamine Metabolism and Its Physiologic Importance. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n. 4 suppl, p. 40S-44S, jul. 1990. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1177/014860719001400402>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

SOARES, A. M. **Secreção paracelular de sódio durante a absorção de substratos sódio dependente em mucosa ileal de coelho montada em câmara de Ussing**. 1996. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

S

OETERS, P.; BOZZETTI, F.; CYNOBER, L.; FORBES, A.; SHENKIN, A.; SOBOTKA, L. Defining malnutrition: A plea to rethink. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 896–901, 1 jun. 2017.

SONDHEIMER, J. M. Glutamine for childhood malnutrition: Probably not needed. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 24–25, jan. 2005. Acesso em: 3 jul. 2023.

SONG, J. C.; HANSON, C. M.; TSAI, V.; FAROKHZAD, O. C.; LOTZ, M.; MATTHEWS, J. B. Regulation of epithelial transport and barrier function by distinct protein kinase C isoforms. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 281, n. 2 50-2, 2001. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.2001.281.2.C649>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

STEHLE, P.; KUHN, K. S. Glutamine: An Obligatory Parenteral Nutrition Substrate in Critical Care Therapy. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4606408/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

STEVENSON, B. R.; ANDERSON, J. M.; BRAUN, I. D.; MOOSEKER, M. S. Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. **Biochemical Journal**, v. 263, n. 2, p. 597, 10 out. 1989. Disponível em: </pmc/articles/PMC1133468/?report=abstract>. Acesso em: 26 jul. 2023.

STRUGARI, A. F. G.; STAN, M. S.; GHARBIA, S.; HERMENEAN, A.; DINISCHIOTU, A. Characterization of Nanoparticle Intestinal Transport Using an In Vitro Co-Culture Model. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6358835/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

SUKHOTNIK, I.; LEVI, R.; MORAN-LEV, H. Impact of Dietary Protein on the Management of Pediatric Short Bowel Syndrome. **Nutrients**, v. 15, n. 13, p. 2826, 21 jun. 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10343398/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

SULLIVAN, P. B.; LUNN, P. G.; NORTHROP-CLEWES, C.; CROWE, P. T.; MARSH, M. N.; NEALE, G. Persistent diarrhea and malnutrition--the impact of treatment on small bowel structure and permeability. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 14, n. 2, p. 208–215, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1593377/>. Acesso em: 8 out. 2023.

SULLIVAN, P. B.; MARSH, M. N.; MIRAKIAN, R.; HILL, S. M.; MILLA, P. J.; NEALE, G. Chronic diarrhea and malnutrition-histology of the small intestinal lesion. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 12, n. 2, p. 195–203, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1904932/>. Acesso em: 8 out. 2023.

SUN, H.; CHOW, E. C. Y.; LIU, S.; DU, Y.; PANG, K. S. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. **http://dx.doi.org/10.1517/17425255.4.4.395**, v. 4, n. 4, p. 395–411, abr. 2008. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425255.4.4.395>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TANI, K.; YAMAZAKI, Y.; TAMURA, A.; ISHITANI, R.; DOHMAE, N.; TSUKITA, S.; NUREKI, O.; FUJIYOSHI, Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. **Science**, v. 344, n. 6181, p. 304–307, 18 abr. 2014. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1248571>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SUZUKI, H.; TANI, K.; TAMURA, A.; TSUKITA, S.; FUJIYOSHI, Y. Model for the Architecture of Claudin-Based Paracellular Ion Channels through Tight Junctions. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 2, p. 291–297, 30 jan. 2015. Acesso em: 26 jul. 2023.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences** 2012 70:4, v. 70, n. 4, p. 631–659, 11 jul. 2012.

Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-012-1070-x>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SUZUKI, T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13357, 1 jan. 2020. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.13357>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TAMURA, A.; HAYASHI, H.; IMASATO, M.; YAMAZAKI, Y.; HAGIWARA, A.; WADA, M.; NODA, T.; WATANABE, M.; SUZUKI, Y.; TSUKITA, S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 913–923, 2011a. Acesso em: 3 jul. 2023.

TAMURA, A.; HAYASHI, H.; IMASATO, M.; YAMAZAKI, Y.; HAGIWARA, A.; WADA, M.; NODA, T.; WATANABE, M.; SUZUKI, Y.; TSUKITA, S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 913–923, 1 mar. 2011b.

Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508510012242/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TANG, V. W.; GOODENOUGH, D. A. Paracellular Ion Channel at the Tight Junction. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 3, p. 1660, 1 mar. 2003. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1302736/>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

TEODÓSIO, N. R.; LAGO, E. S.; ROMANI, S. A.; GUEDES, R. C. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 40, n. 4, p. 533–547, 1 dez. 1990. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/2136514>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

THOMSON, A.; SMART, K.; SOMERVILLE, M. S.; LAUDER, S. N.; APPANNA, G.; HORWOOD, J.; SUNDER RAJ, L.; SRIVASTAVA, B.; DURAI, D.; SCURR, M. J.; KEITA, A. V.; GALLIMORE, A. M.; GODKIN, A. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. **BMC Gastroenterology**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 20 jun. 2019. Disponível em:

<<https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-019-1002-4>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

TICKELL, K. D.; ATLAS, H. E.; WALSON, J. L. Environmental enteric dysfunction: A review of potential mechanisms, consequences and management strategies. **BMC Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 25 nov. 2019. Disponível em:

<<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1417-3>>. Acesso em: 23 jul. 2023.



TOKUMASU, R.; TAMURA, A.; TSUKITA, S. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 3, 3 jul. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5571777/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clinical Science**, v. 82, n. 5, p. 471–488, 1 maio 1992. Disponível em: </clinsci/article/82/5/471/75723/Intestinal-permeability-functional-assessment-and>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TRIPATHI, A.; LAMMERS, K. M.; GOLDBLUM, S.; SHEA-DONOHUE, T.; NETZEL-ARNETT, S.; BUZZA, M. S.; ANTALIS, T. M.; VOGEL, S. N.; ZHAO, A.; YANG, S.; ARRIETTA, M. C.; MEDDINGS, J. B.; FASANO, A. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 39, p. 16799, 9 set. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2744629/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2001 2:4, v. 2, n. 4, p. 285–293, abr. 2001. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35067088>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TSUKITA, S.; YAMAZAKI, Y.; KATSUNO, T.; TAMURA, A.; TSUKITA, S. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. **Oncogene** 2008 27:55, v. 27, n. 55, p. 6930–6938, 24 nov. 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2008344>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology** 2009 9:11, v. 9, n. 11, p. 799–809, nov. 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2653>. Acesso em: 9 jul. 2023.

TURNER, J. R.; RILL, B. K.; CARLSON, S. L.; CARNES, D.; KERNER, R.; MRSNY, R. J.; MADARA, J. L. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 273, n. 4 42-4, 1997. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1378>. Acesso em: 26 jul. 2023.

UENO, P. M.; ORIÁ, R. B.; MAIER, E. A.; GUEDES, M.; DE AZEVEDO, O. G.; WU, D.; WILLSON, T.; HOGAN, S. P.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L.; BRENT POLK, D.; DENSON, L. A.; MOORE, S. R. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 4, out. 2011. Acesso em: 3 jul. 2023.

ULLUWISHEWA, D.; ANDERSON, R. C.; MCNABB, W. C.; MOUGHAN, P. J.; WELLS, J. M.; ROY, N. C. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components<sup>1,2</sup>. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 769–776, 1 maio 2011. Acesso em: 26 jul. 2023.

UMEDA, K.; MATSUI, T.; NAKAYAMA, M.; FURUSE, E.; SASAKI, H.; FURUSE, M.; TSUKITA, S. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44785–44794, 22 out. 2004. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925819709314/fulltext>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

UNICEF/WHO/WORLD BANK GROUP. **Levels and trends in child malnutrition: UNICEF/WHO/World Bank Group joint child malnutrition estimates: key findings of the 2023 edition**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240073791>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

USAID; FANTA; FHI. Development of Evidence-Based Dietary Recommendations for Children, Pregnant Women, and Lactating Women Living in the Western Highlands in Guatemala. 2014. Acesso em: 3 mar. 2024.

USSING, H. H.; ZERAHN, K. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 23, n. 2–3, p. 110–127, 1951. Acesso em: 31 jul. 2023.

VAN DE POLL, M. C. G.; LIGTHART-MELIS, G. C.; BOELEN, P. G.; DEUTZ, N. E. P.; VAN LEEUWEN, P. A. M.; DEJONG, C. H. C. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. **The Journal of Physiology**, v. 581, n. Pt 2, p. 819, 6 jun. 2007. Disponível em: <[pmc/articles/PMC2075174/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111114/)>. Acesso em: 27 jul. 2023.

VAN DEN BERG, A.; FETTER, W. P. F.; WESTERBEEK, E. A. M.; VAN DER VEGT, I. M.; VAN DER MOLEN, H. R. A.; VAN ELBURG, R. M. The effect of glutamine-enriched enteral nutrition on intestinal permeability in very-low-birth-weight infants: a randomized controlled trial. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 408–414, 2006. Acesso em: 3 jul. 2023.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Measuring Size-Dependent Permeability of the Tight Junction Using PEG Profiling. **Methods in Molecular Biology**, v. 762, p. 1–11, 2011. Disponível em: <[https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-185-7\\_1](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-185-7_1)>. Acesso em: 30 jul. 2023.

VAN WIJCK, K.; VAN EIJK, H. M. H.; BUURMAN, W. A.; DEJONG, C. H. C.; LENAERTS, K. Novel analytical approach to a multi-sugar whole gut permeability assay. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 26, p. 2794–2801, 15 set. 2011. Acesso em: 26 jul. 2023.

VAN WIJCK, K.; VERLINDEN, T. J. M.; VAN EIJK, H. M. H.; DEKKER, J.; BUURMAN, W. A.; DEJONG, C. H. C.; LENAERTS, K. Novel multi-sugar assay for site-specific gastrointestinal permeability analysis: A randomized controlled crossover trial. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 245–251, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261561412001379/fulltext>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

VANUYTSEL, T.; TACK, J.; FARRE, R. The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 717925, 26 ago. 2021. Acesso em: 27 jul. 2023.

VICTORA, C. G.; ADAIR, L.; FALL, C.; HALLAL, P. C.; MARTORELL, R.; RICHTER, L.; SACHDEV, H. S. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **The Lancet**, v. 371, n. 9609, p. 340–357, 26 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673607616924/fulltext>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

VIDYASAGAR, S.; MACGREGOR, G. Ussing chamber technique to measure intestinal epithelial. **Methods in Molecular Biology**, v. 1422, p. 49–61, 2016. Disponível em: <[https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3603-8\\_6](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3603-8_6)>. Acesso em: 1 ago. 2023.

VOJDANI, A. For the Assessment of Intestinal Permeability, Size Matters. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 19, n. 1, p. 12–24, 2013. Acesso em: 27 jul. 2023.

VON MOLTKE, J.; JI, M.; LIANG, H. E.; LOCKSLEY, R. M. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 221, 1 jan. 2016. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4830391](https://www.nature.com/articles/PMC4830391)>. Acesso em: 31 jul. 2023.

WADA, M.; TAMURA, A.; TAKAHASHI, N.; TSUKITA, S. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. **Gastroenterology**, v. 144, n. 2, p. 369–380, 2013. Acesso em: 3 jul. 2023.

WALKER, N. M.; FLAGELLA, M.; GAWENIS, L. R.; SHULL, G. E.; CLARKE, L. L. An alternate pathway of cAMP-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion across the NKCC1-null murine duodenum. **Gastroenterology**, v. 123, n. 2, p. 531–541, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508502001312/fulltext>>. Acesso em: 1 ago. 2023.

WALLON, C.; PERSBORN, M.; JÖNSSON, M.; WANG, A.; PHAN, V.; LAMPINEN, M.; VICARIO, M.; SANTOS, J.; SHERMAN, P. M.; CARLSON, M.; ERICSON, A.; MCKAY, D. M.; SDERHOLM, J. D. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 140, n. 5, p. 1597–1607, 1 maio 2011. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508511001259/fulltext>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

WALTER, E.; JANICH, S.; ROESSLER, B. J.; HILFINGER, J. M.; AMIDON, G. L. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an *in vitro* model for the intestinal epithelium: *In vitro-in vivo* correlation with permeability data from rats and humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 10, p. 1070–1076, 1 out. 1996. Disponível em: <<http://jpharmsci.org/article/S0022354915501500/fulltext>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

WAN, C. P.; PARK, C. S.; LAU, B. H. S. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 162, n. 1, p. 1–7, 4 jun. 1993. Acesso em: 30 jul. 2023.

WANG, L.; LLORENTE, C.; HARTMANN, P.; YANG, A. M.; CHEN, P.; SCHNABL, B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. **Journal of Immunological Methods**, v. 421, p. 44–53, 1 jun. 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4451427/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2571427/)>. Acesso em: 30 jul. 2023.

WANG, X.; LIU, G. J.; GAO, Q.; LI, N.; WANG, R. tao. C-type lectin-like receptor 2 and zonulin are associated with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 141, n. 3, p. 250–255, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31715011/>>. Acesso em: 18 jul. 2023.

WATSON, C. J.; ROWLAND, M.; WARHURST, G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 281, n. 2 50-2, 2001. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.2001.281.2.C388>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

WEINER, I. D.; VERLANDER, J. W. Renal Ammonia Metabolism and Transport. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 201, 2013. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4319187/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2571427/)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

WELLS, J. C.; SAWAYA, A. L.; WIBAEK, R.; MWANGOME, M.; POUILLAS, M. S.; YAJNIK, C. S.; DEMAIO, A. The double burden of malnutrition: aetiological pathways and consequences for health. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10217, p. 75, 1 jan. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7613491/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/324464/)>. Acesso em: 26 jul. 2023.

WERNERMAN, J. Clinical Use of Glutamine Supplementation. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 10, p. 2040S-2044S, 1 out. 2008. Acesso em: 24 jul. 2023.

WERNERMAN, J. Glutamine supplementation. **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 1, p. 25, dez. 2011. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3224464/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/224464/)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

WHO. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. **Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement**, v. 450, p. 76–85, abr. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16817681/>>. Acesso em: 23 jul. 2023.

WHO. **WHO - Complementary feeding**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/complementary-feeding#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/complementary-feeding#tab=tab_1)>. Acesso em: 23 jul. 2023.

WIKMAN, A.; KARLSSON, J.; CARLSTEDT, I.; ARTURSSON, P. A Drug Absorption Model Based on the Mucus Layer Producing Human Intestinal Goblet Cell Line HT29-H. **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 6, p. 843–852, 1993. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1018905109971>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

WONG, V. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 273, n. 6 42-6, 1997. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.1997.273.6.C1859>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

WOON, F. C.; CHIN, Y. S.; ISMAIL, I. H.; CHAN, Y. M.; BATTERHAM, M.; ABDUL LATIFF, A. H.; GAN, W. Y.; APPANNAH, G. Contribution of early nutrition on the development of malnutrition and allergic diseases in the first year of life: A study protocol for the Mother and Infant Cohort Study (MICOS). **BMC Pediatrics**, v. 18, n. 1, 18 jul. 2018.

WORLD FOOD PROGRAMME. HungerMap LIVE: Global insights and key trends By the World Food Programme (WFP) | GLOBAL FOOD INSECURITY AT A GLANCE 828. 2023. Acesso em: 23 jul. 2023.

XU, J.; KAUSALYA, P. J.; PHUA, D. C. Y.; ALI, S. M.; HOSSAIN, Z.; HUNZIKER, W. Early Embryonic Lethality of Mice Lacking ZO-2, but Not ZO-3, Reveals Critical and Nonredundant Roles for Individual Zonula Occludens Proteins in Mammalian Development. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 5, p. 1669, 1 mar. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16691669/>>. Acesso em: 26 jul. 2023.

YAKYMENKO, O.; SCHOULTZ, I.; GULLBERG, E.; STRÖM, M.; ALMER, S.; WALLON, C.; WANG, A.; KEITA, Å. V.; CAMPBELL, B. J.; MCKAY, D. M.; SÖDERHOLM, J. D. Infliximab restores colonic barrier to adherent-invasive *E. coli* in Crohn's disease via effects on epithelial lipid rafts. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 6, p. 677–684, 3 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00365521.2018.1458146>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

YARUR, A. J.; QUINTERO, M. A.; JAIN, A.; CZUL, F.; BARKIN, J. S.; ABREU, M. T. Serum Amyloid A as a Surrogate Marker for Mucosal and Histologic Inflammation in Patients with Crohn's Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 23, n. 1, p. 158–164, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1097/MIB.0000000000000991>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

YOO, B. K.; YANDA, M. K.; NO, Y. R.; CHRIS YUN, C. Human intestinal epithelial cell line SK-CO15 is a new model system to study Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 2, p. G180, 7 jul. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3404572/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

YOUNG, A.; LEVIN, R. J. Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 1. Jejunal hypersecretion induced by starvation. **Gut**, v. 31, n. 1, p. 43, 1990. Disponível em: </pmc/articles/PMC1378339/?report=abstract>. Acesso em: 26 jul. 2023.

YUI, S.; NAKAMURA, T.; SATO, T.; NEMOTO, Y.; MIZUTANI, T.; ZHENG, X.; ICHINOSE, S.; NAGAISHI, T.; OKAMOTO, R.; TSUCHIYA, K.; CLEVERS, H.; WATANABE, M. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5<sup>+</sup> stem cell. **Nature Medicine** 2012 18:4, v. 18, n. 4, p. 618–623, 11 mar. 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.2695>. Acesso em: 31 jul. 2023.

ZHANG, B.; GUO, Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 5, p. 687–693, set. 2009. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/supplemental-zinc-reduced-intestinal-permeability-by-enhancing-occludin-and-zonula-occludens-protein1-zo1-expression-in-weaning-piglets/D197C9C79F5BB1955DAD4A573A52FECC>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ZHANG, H.; LI, H. B.; LYU, J. R.; LEI, X. M.; LI, W.; WU, G.; LYU, J.; DAI, Z. M. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 96, p. 19–24, 1 jul. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32311451/>. Acesso em: 9 jul. 2023.

ZHANG, Y. G.; WU, S.; XIA, Y.; SUN, J. *Salmonella*-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host–bacterial interactions. **Physiological Reports**, v. 2, n. 9, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4270227/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

ZHAO, X.; SETCHELL, K. D. R.; HUANG, R.; MALLAWAARACHCHI, I.; EHSAN, L.; DOBRZYKOWSKI, E.; ZHAO, J.; SYED, S.; MA, J. Z.; IQBAL, N. T.; IQBAL, J.; SADIQ, K.; AHMED, S.; HABERMAN, Y.; DENSON, L. A.; ALI, S. A.; MOORE, S. R. Bile Acid Profiling Reveals Distinct Signatures in Undernourished Children with Environmental Enteric Dysfunction. **The Journal of Nutrition**, v. 151, n. 12, p. 3689, 1 dez. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8643614/>. Acesso em: 24 jul. 2023.

ZIHNI, C.; MILLS, C.; MATTER, K.; BALDA, M. S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2016 17:9, v. 17, n. 9, p. 564–580, 29 jun. 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm.2016.80>. Acesso em: 25 jul. 2023.

ZOLLNER, A.; SCHMIDERER, A.; REIDER, S. J.; OBERHUBER, G.; PFISTER, A.; TEXLER, B.; WATSCHINGER, C.; KOCH, R.; EFFENBERGER, M.; RAINE, T.; TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Faecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Diseases: Calprotectin Versus Lipocalin-2—a Comparative Study. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 15, n. 1, p. 43–54, 13 jan. 2021. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa124>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

ZWEIBAUM, A.; PINTO, M.; CHEVALIER, G.; DUSSAULX, E.; TRIADOU, N.; LACROIX, B.; HAFFEN, K.; BRUN, J. -L; ROUSSET, M. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. **Journal of Cellular Physiology**, v. 122, n. 1, p. 21–29, 1 jan. 1985. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.1041220105>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

ZWEIBAUM, A.; TRIADOU, N.; KEDINGER, M.; AUGERON, C.; ROBINE-LÉON, S.; PINTO, M.; ROUSSET, M.; HAFFEN, K. Sucrase-isomaltase: A marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. **International Journal of Cancer**, v. 32, n. 4, p. 407–412, 15 out. 1983. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.2910320403>>. Acesso em: 31 jul. 2023.

## ANEXO A – ARTIGO 1



British Journal of Nutrition (2023), 129, 745–758

© The Author(s), 2022. Published by Cambridge University Press on behalf of The Nutrition Society.

doi:10.1017/S0007114522001271

## Consumption of a multi-deficient diet causes dynamic changes in the intestinal morphofunctional barrier, body composition and impaired physical development in post-weaning mice

Samilly Albuquerque Ribeiro<sup>1\*</sup>, Francisco Adelvane de Paula Rodrigues<sup>1</sup>, Marco Antonio de Freitas Clementino<sup>1</sup>, Herlice do Nascimento Veras<sup>1</sup>, Rômulo Celly Lima Siqueira<sup>1</sup>, Pedro Henrique Quintela Soares de Medeiros<sup>1</sup>, Jeanine Moraes Pereira<sup>1</sup>, Márcio Flávio Araújo Guanabara Júnior<sup>1</sup>, José Kleybson de Sousa<sup>1</sup>, Ana Karolina Silva Santos<sup>1</sup>, Armênio Aguiar dos Santos<sup>1</sup>, Bruna Leal Lima Maciel<sup>2</sup>, Alexandre Havt<sup>1</sup> and Aldo Ângelo Moreira Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology Postgraduation Program, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>2</sup>Nutrition Postgraduation Program and Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

(Submitted 29 July 2021 – Final revision received 2 March 2022 – Accepted 11 April 2022 – First published online 29 April 2022)

### Abstract

Few studies have focused on nutrient-deficient diets and associated pathobiological dynamics of body composition and intestinal barrier function. This study evaluated the impact of a nutrient-deficient diet on physical development and intestinal morphofunctional barrier in mice. C57BL/6 (21 days of age) mice were fed a Northeastern Brazil regional basic diet (RBD) or a control diet for 21 d. The animals were subjected to bioimpedance analysis, lactulose test, morphometric analysis and quantitative reverse transcription-PCR to evaluate tight junctions and intestinal transporters. RBD feeding significantly reduced weight ( $P < 0.05$ ) from day 5, weight gain from day 3 and tail length from day 14. The intake of RBD reduced total body water, extracellular fluid, fat mass and fat-free mass from day 7 ( $P < 0.05$ ). RBD induced changes in the jejunum, with an increase in the villus:crypt ratio on day 7, followed by reduction on days 14 and 21 ( $P < 0.05$ ). Lactulose:mannitol ratio increased on day 14 ( $P < 0.05$ ). Changes in intestinal barrier function on day 14 were associated with reductions in claudin-1 and occludin, and on day 21, there was a reduction in the levels of claudin-2 and occludin. SGLT-1 levels decreased on day 21. RBD compromises body composition and physical development with dynamic changes in intestinal barrier morphofunctional. RBD is associated with damage to intestinal permeability, reduced levels of claudin-1 and occludin transcripts and return of bowel function in a chronic period.

**Key words:** Malnutrition: Northeastern Brazil regional basic diet: Intestinal barrier function: Body composition: Tight junction proteins

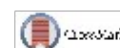
Malnutrition is a serious public health problem, especially in developing countries<sup>(1)</sup>. In 2020, approximately 149.2 million children under 5 years of age were affected by stunting, and approximately 45.4 million children under 5 years of age were affected by wasting<sup>(1)</sup>. The WHO has indicated a reduction in rates of both in recent years; however, it is estimated that the economic crisis caused by pandemic COVID-19 increased the number of children affected by wasting by 15% and is expected to increase the number of children affected by stunting in the coming years<sup>(2)</sup>. Nutritional deficiency, especially in the first years of life, is associated with impairment of the immune system<sup>(3)</sup>, increased susceptibility to infectious diseases<sup>(4)</sup>, growth

development<sup>(5)</sup>, cognitive deficit<sup>(6)</sup> and increased susceptibility to chronic diseases in adulthood<sup>(7)</sup>, such as type II diabetes, CVD, obesity, hypertension and dyslipidaemia.

Animal models provide a better understanding of the pathophysiology associated with malnutrition. Different types of diets with nutritional deficiency have been evaluated for malnutrition in animal models<sup>(7–10)</sup>, including the Northeastern Brazil regional basic diet (RBD). RBD is a diet deficient in nutrients that mimics the dietary deficiencies of populations with low socio-economic status in the Brazilian semi-arid region<sup>(11)</sup>. Since the first publication of the RBD, the diet has been explored to better understand the impact of acute or chronic malnutrition on the gastrointestinal

**Abbreviations:** RBD, regional basic diet.

\* Corresponding author: Samilly Albuquerque Ribeiro, email samilly.ribeiro@hotmail.com







746

S. A. Ribeiro *et al.*

tract<sup>(12,13)</sup>, the transmission of maternal-fetal malnutrition<sup>(12)</sup>, the development of environmental enteropathy<sup>(14)</sup> and the induction of the vicious cycle of enteric infection and malnutrition<sup>(15)</sup>, among others<sup>(16–18)</sup>.

The intestinal morphofunctional barrier is the largest surface area of the body and has vital life-maintaining functions, such as digestion, secretion, absorption of nutrients, electrolytes and water and defense function, recognition of microflora, food and toxin antigens<sup>(19)</sup>. Insufficient energy consumption leads the body to important physiological changes for maintaining the function of vital organs<sup>(20)</sup>. The intestinal mucosa has a high capacity for self-renewal and is quickly affected by malnutrition<sup>(21)</sup>. In this context, a better understanding of the intestinal morphofunctional dynamics in malnutrition is extremely important for the development of effective treatments. Thus, the present study aimed to assess the temporal impact of RBD consumption in the post-weaning period on body composition, morphology and intestinal barrier function.

## Methods

### Animals, diet and experimental design

C57BL/6 male mice (21 days old) were obtained from the Animal Industry Sector of the Department of Physiology and Pharmacology of the Federal University of Ceará. The mice (total of fifty-six) were maintained in boxes with wood shaving under the following conditions: temperature of 22 (±2°C), humidity of 60 (SEM 5)%, light/dark cycle of 12/12 h and free access to food and water. All procedures were conducted in accordance with the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Ceará (protocol 17/15).

Mice were randomly distributed in the nourished and malnourished groups (*n* 6 for group). Malnutrition was induced by the consumption of RBD (malnourished group), while healthy status was induced by the consumption of the control diet (nourished group). The RBD and control isoenergetic diets were purchased from the company Rhoster® (Araçoiaba da Serra), and the composition of the diets is shown in Table 1. The animals were evaluated on day 0 and every two subsequent days for body weight and food and water consumption. Tail length was measured on day 0 and every 7 d after. On days 7, 14 and 21, the mice were subjected to body evaluation using electrical bioimpedance (ImpediVET® device), and the small intestine samples were collected for morphometric analysis and of the genes of intestinal transporters and tight junctions. Jejunum and ileum samples were collected after intramuscular anaesthesia with 90 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine and stored at -80°C or 10% formaldehyde, and the animals were euthanised by exsanguination. The mice were also subjected to the lactulose and mannitol test protocols to analyse intestinal barrier function.

### Measurement of body development

Tail length measurement is a parameter used in preclinical studies to estimate animal development in a non-invasive manner<sup>(14)</sup>.

**Table 1.** Composition of the regional basic diet and the control diet (Percentages)

|                                 | Control diet |       | RBD   |       |
|---------------------------------|--------------|-------|-------|-------|
|                                 | %            | %kcal | %     | %kcal |
| Energy, kcal/g                  | 3.7          | –     | 3.7   | –     |
| <b>Macronutrients</b>           |              |       |       |       |
| Carbohydrates                   | 58.21        | 63.41 | 73.47 | 83.94 |
| Lipids                          | 6.08         | 14.90 | 2.42  | 6.22  |
| Protein                         | 19.91        | 21.69 | 8.61  | 9.84  |
| Fibre                           | 3.7          | –     | 2.94  | –     |
| <b>Micronutrients</b>           |              |       |       |       |
| Minerals                        | 3.8          | –     | 2.65  | –     |
| Total                           |              | 100   |       | 100   |
| <b>Ingredient</b>               | %            |       | %     |       |
| Maize starch                    | 27.829       |       | 49.91 |       |
| Casein                          | 23.151       |       | 6.36  |       |
| Dextrinized starch              | 4.202        |       | 6.27  |       |
| Dextrose or D-glucose anhydrous | 23.343       |       | 22.40 |       |
| Inulin                          | 2.334        |       | 2.24  |       |
| Sucrose                         | 0.00         |       | 0.49  |       |
| Soya oil                        | 6.536        |       | 2.09  |       |
| Cellulose MC-101                | 7.003        |       | 6.72  |       |
| Mineral mix Ca P K (RH9531UI)   | 0.934        |       | 0.45  |       |
| Bibasic calcium phosphate       | 1.214        |       | 0.99  |       |
| Calcium carbonate               | 0.514        |       | 0.00  |       |
| Potassium citrate               | 1.541        |       | 0.73  |       |
| Vitamin mix AIN-76 (RH9505UI)   | 0.934        |       | 0.90  |       |
| L-Cystine                       | 0.280        |       | 0.10  |       |
| Sodium chloride                 | 0            |       | 0.17  |       |
| Choline bitartrate              | 0.187        |       | 0.18  |       |
| Total                           | 100          |       | 100   |       |

The mice were positioned on a surface, the tail was extended distally and straight and the tail was measured from base to tip using a digital calliper (Mitutoyo® Precision Measuring Tools). The measurements were performed on days 0, 7, 14 and 21.

### Electrical bioimpedance

After anaesthesia, the animals were placed on a non-conductive surface with posterior and anterior limbs extended perpendicular to the body, and the tail was extended distally. Four needles (25 × 12 gauge) were used as electrodes, inserted in the sub-dermal region along the dorsal midline. The central electrodes were inserted in the medial region between the ears and at the base of the tail, intercepting the imaginary line of the thigh muscle with the midline of the body. Peripheral electrodes were inserted between the eyes, approximately 1.0 cm from the electrode between the ears, and in the tail, approximately 1.0 cm of the electrode at the base of the tail. The needles were then attached to the ImpediVET® device, a single-channel tetra polar bioimpedance spectroscopy device that scans 256 frequencies between 4 and 1000 kHz in less than a second. The species, sex, age, length between central electrodes and body weight information were input to the equipment. An electric current was activated, and the resistance and reactance bioimpedance parameters were obtained from a single spectrum from 4 to 1 MHz in a series of 256 points. The device uses a complex impedance plot to determine total body water, extracellular fluid and intracellular fluid. The fat-free mass, fat mass and BMI were calculated using software coupled to the device, which uses values predefined for mice by the manufacturer<sup>(22)</sup>.



### Intestinal morphometry

Samples of the jejunum and ileum were sectioned longitudinally and fixed in 10% formaldehyde buffer for 18 h. After the fixation period, the material was dehydrated, embedded in paraffin, cut to 5.0 µm sections using an impact microtome (Polycut 8) and stained with haematoxylin and eosin. Subsequently, with the aid of an optical microscope coupled to the image acquisition system (LEICA) and ImageJ software version 1.5a (National Institutes of Health), the heights of ten villi and the depths of ten crypts of each cut were measured to calculate the villus:crypt ratio.

### Lactulose/mannitol test for intestinal barrier function studies in vivo

For sample collection, animals from both groups were kept in metabolic cages for a period of 24 h with an isoenergetic low-carbohydrate diet (Rhostrer®) before days 7, 14 and 21, 16 h corresponding to the period of adaptation to the collection environment and 8 h of fasting. We conducted experimental groups only for this test, so that the 8-h fasting would not interfere with other analyses. After fasting, all animals received 250 µl of the test solution by gavage, containing 5.0 g of lactulose (Duphar Laboratories) and 1.0 g of mannitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA) dissolved in 20 ml of water. Urine samples preserved in 0.236 mg/ml chlorhexidine (Sigma Chemical®) were collected 24 h after the test solution was administered. The volumes of the samples were registered and centrifuged at 10 000 rpm for 3 min, and then 50 µl of a solution of the internal standard (3.6 mM of melibiose diluted in 2.9 ml of distilled water) was added to 50 µl of each sample. The solution was deionised and centrifuged (10 000 rpm for 3 min), and 50 µl was used to determine sugar by high-pressure liquid chromatography on an UltiMate 3000 instrument (Thermo Fisher Scientific®). Two standard carbohydrate solutions were used to calibrate the system at the beginning and between the testing of each group. The standards contained 60 µM of sugars: glucosamine, mannitol, melibiose and lactulose (group I) and inositol, sorbitol, glucose and lactose (group II). Groups I and II were applied at a concentration of 0.1 mM to determine the intra-experiment variation. The concentrations of lactulose and mannitol were measured for all experimental groups using high-pressure liquid chromatography with pulsed amperometric detection, as previously described<sup>(23)</sup>.

### Evaluation of gene transcription of tight junctions and intestinal transporter proteins

Gene transcription of the zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, claudin-1 (CLAU-1), claudin-2 (CLAU-2), peptide transport 1 (PEPT-1) and SGLT-1 was determined by quantitative reverse transcription-PCR. The reference gene for normalisation was 18S. RNA extraction from total jejunum samples on days 7, 14 and 21 was performed according to the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit protocol (Qiagen®). Then, 1 µg of the total isolated RNA was used for cDNA synthesis using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad®), according to the manufacturer's instructions. For the reaction, 10 µl of Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2.0 µl of each primer (0.2 µM) and

1.0 µl of cDNA from samples were used, and nuclease-free water was added to an end volume of 20 µl. The sequences and annealing conditions obtained from the National Center for Biotechnology Information website for each investigated gene are listed in Table 2. The data obtained were based on the values of the threshold cycle, in which the observed fluorescence was ten times greater than the baseline fluorescence for each qPCR assay. All amplifications were evaluated for the melting curve and performed to ensure the specificity of the amplification and to detect the formation of initiator dimers or any other non-specific product. From the values of the quantitative cycle (C<sub>q</sub>/C<sub>t</sub>), the relative levels of RNA were calculated according to the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method<sup>(24)</sup>.

### Evaluation of relative protein expression of tight junctions and intestinal transporter proteins

The investigation of protein expression of tight junctions and transporters involved in the regulation of the intestinal barrier was carried out using western blotting. The jejunum isolated from the animals were homogenised in RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific®) with protease inhibitor (1 ml inhibitor 100 ml RIPA) and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min. The total amount of protein in each sample was measured using the Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific®). Samples (120 µg of protein) were prepared by adding Laemmli buffer (Bio-Rad) with β-mercaptoethanol (Bio-Rad®), denatured at 99°C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (8–10% for SGLT-1, PEPT-1 and occludin; 15% for claudin-1 and -2), transferred to polyvinylidene difluoride membrane, blocked with 5% bovine serum albumin for 1 h and incubated with primary rabbit antibody: anti-GAPDH (1:1000), anti-SGLT-1 (1:500), anti-PEPT-1 (1:200), anti-occludin (1:1000), anti-claudin-1 (1:200) and anti-claudin-2 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology®). The membranes were also incubated for 1.5 h with the secondary antibody and then developed using the Clarity Western ECL Substrate kit (Bio-Rad®) and the ChemiDoc system (Bio-Rad). The densitometric quantification of the bands was analysed using ImageLab 6.0 software (Bio-Rad®).

### Statistical analysis

Parametric data were analysed by Student's *t* test or ANOVA followed by the Bonferroni post-test for paired data. Non-parametric data were analysed using the *Mann-Whitney* test. The parametric results are presented as mean values with their standard error of the mean, and the non-parametric results are presented as median and minimum to maximum. All tests were analysed using GraphPad Prism® software, and the results were considered significant at *P* < 0.05.

## Results

### Regional basic diet effect in body composition and development of weanling mice

The consumption of RBD caused a significant reduction (*P* < 0.001) in the weights of malnourished animals from day 5 to day 21 when compared with the nourished animals (Fig. 1(a)). Weight gain



748

S. A. Ribeiro *et al.***Table 2.** Genes, primers, accession number and conditions of quantitative reverse transcription -PCR

| Genes            | Primer sequence (5'-3')                      | NCBI no.       | Annealing conditions <sup>*</sup> |
|------------------|--|----------------|-----------------------------------|
| <i>Claudin-1</i> | TCTACGAGGGACTGTGGATG<br>TCAGATTACGAAGGAGTCG  | NM_016674.4    | 20', 58°C                         |
| <i>Claudin-2</i> | CCCACCACACACAGCTTAAT<br>GAAATGGCTCCAGGTCAGC  | NM_016675.4    | 20', 60°C                         |
| <i>Occludin</i>  | AAGAGCAGCCAAAGGCTTCC<br>CGTGGGGTTCACCTCCATTG | NM_008756.2    | 20', 60°C                         |
| <i>ZO-1</i>      | GACCATCGCCTACGGTTTGA<br>AGGTCTCGGGGATGCTGATT | NM_001163574.1 | 20', 60°C                         |
| <i>SGLT-1</i>    | CGGAAGAAGCGATCTGAGAA<br>AATCAGCAGGAGGATGAACA | NM_019810.4    | 20', 58°C                         |
| <i>PapT-1</i>    | AGGGGAGAACGGAATCAGGT<br>CTTTTCGCCAAGGGAAGA   | NM_053079.2    | 20', 60°C                         |
| <i>tBS</i>       | AATGCTGGACCAACACAAA<br>TTCACAATGTCATGCCTT    | NM_008907.1    | 20', 58°C                         |

<sup>\*</sup> Total of forty cycles, all cycles started with the denaturation stage (20 s at 95°C) and ended with an extension stage (45 s for 1 min at 72°C).

decreased significantly ( $P < 0.001$ ) in the malnourished group from day 3 when compared with the malnourished group (Fig. 1(b)). Malnourished animals increased their weight and significantly gained weight over time ( $P < 0.001$ ), in which weight increased from day 7 and weight gain increased from day 9 when compared with the values measured on day 0 (Fig. 1(a) and (b)). Tail length was significantly shorter ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group than in the nourished group on days 14 and 21 (Fig. 1(c)). Chronic consumption of the RBD diet compromised the animals' body development (Fig. 1(d)) regardless of feed consumption because there was a significant difference ( $P < 0.05$ ) in the consumption between the groups only on day 3 (Fig. 1(e)). The malnourished group consumed 18.55% less feed than the nourished group only on day 3 (nourished 3.45 (SEM 0.08) *v.* malnourished 2.81 (SEM 0.15) g), whereas water consumption was 31.19% higher in the malnourished group than in the control group only on day 21 (nourished 7.5 (SEM 0.5) *v.* malnourished 10.9 (SEM 0.6) ml,  $P < 0.05$ , Fig. 1(f)).

Considering the body composition of the animals, total body water significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group compared with the nourished group from day 7 (Fig. 2(a)). The extracellular fluid significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group compared with the nourished group on days 7, 14 and 21 (Fig. 2(b)). In contrast, intracellular fluid significantly reduced in the malnourished group when compared with the nourished group on days 7 (nourished 3.15 (SEM 0.22) *v.* malnourished 1.88 (SEM 0.25) ml,  $P < 0.01$ ) and 14 (nourished 3.85 (SEM 0.16) *v.* malnourished 2.81 (SEM 0.33) ml,  $P < 0.05$ , Fig. 2(c)). In addition, the RBD diet caused a significant reduction ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) in the fat-free mass (Fig. 2(d)) and fat mass (Fig. 2(e)) on days 7, 14 and 21 when compared with those of the nourished group. However, the BMI did not change at any of the analysed time points (Fig. 2(f)).

#### Temporal effect of regional basic diet consumption on intestinal morphology

RBD intake dynamically altered the morphometry of the portions of the jejunum (Fig. 3) and ileum (Fig. 4) over time. A significant reduction ( $P < 0.01$ ) in the crypt depth and a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the villus:crypt ratio in the jejunum of malnourished animals were observed on day 7. No significant changes were

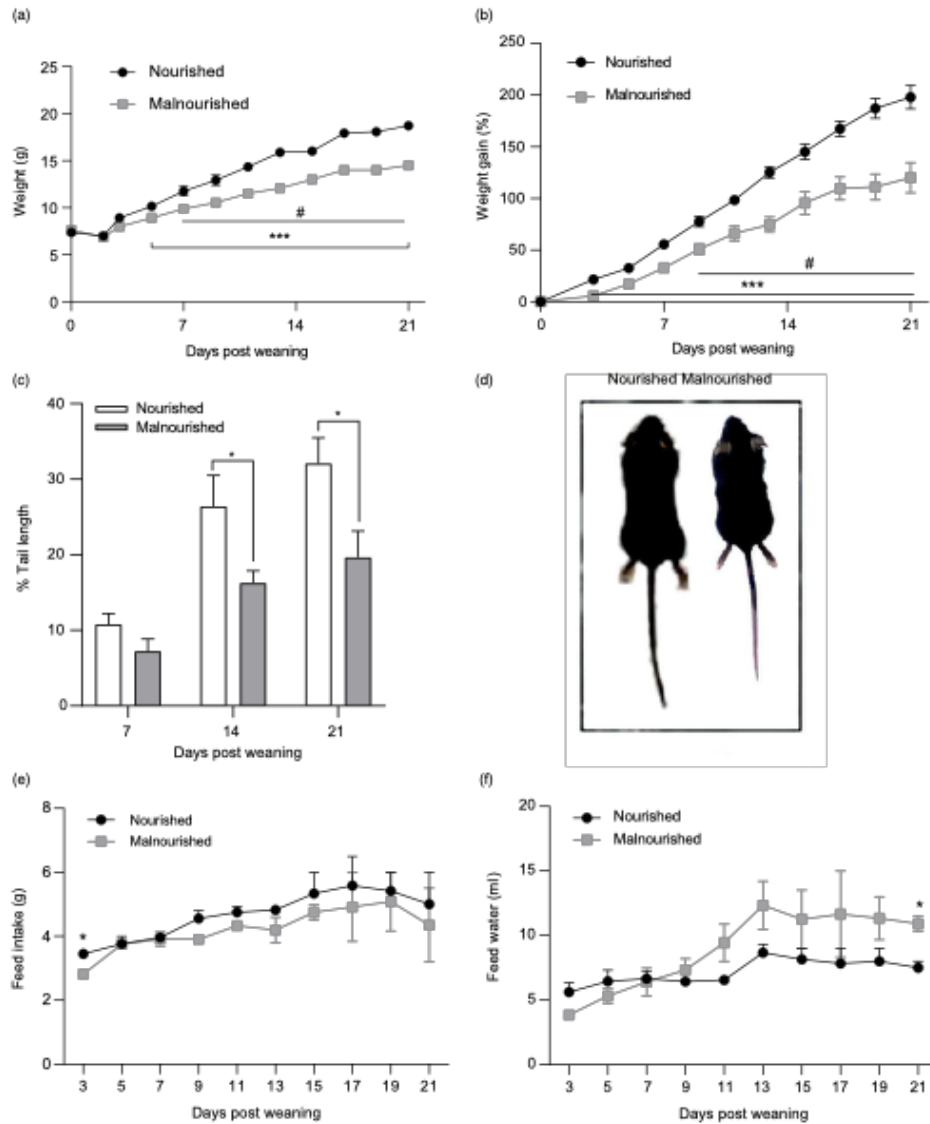
observed in the ileum on day 7. On the other hand, on the 14th day the villus:crypt ratio significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the jejunum of malnourished animals (Fig. 3(c)), without significant changes in villus height and crypt depths, while in the ileum a significant reduction was observed ( $P < 0.001$ ) at the height of the villi of the malnourished animals (Fig. 4(a)). On day 21, there was a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the height of the villi (Fig. 3(a)) and maintenance in the reduction of the villus:crypt ratio in the jejunum of malnourished animals (Fig. 3(c)), without significant changes in the ileal portion (Fig. 4(c)).

#### Temporal effect of regional basic diet consumption on intestinal barrier function

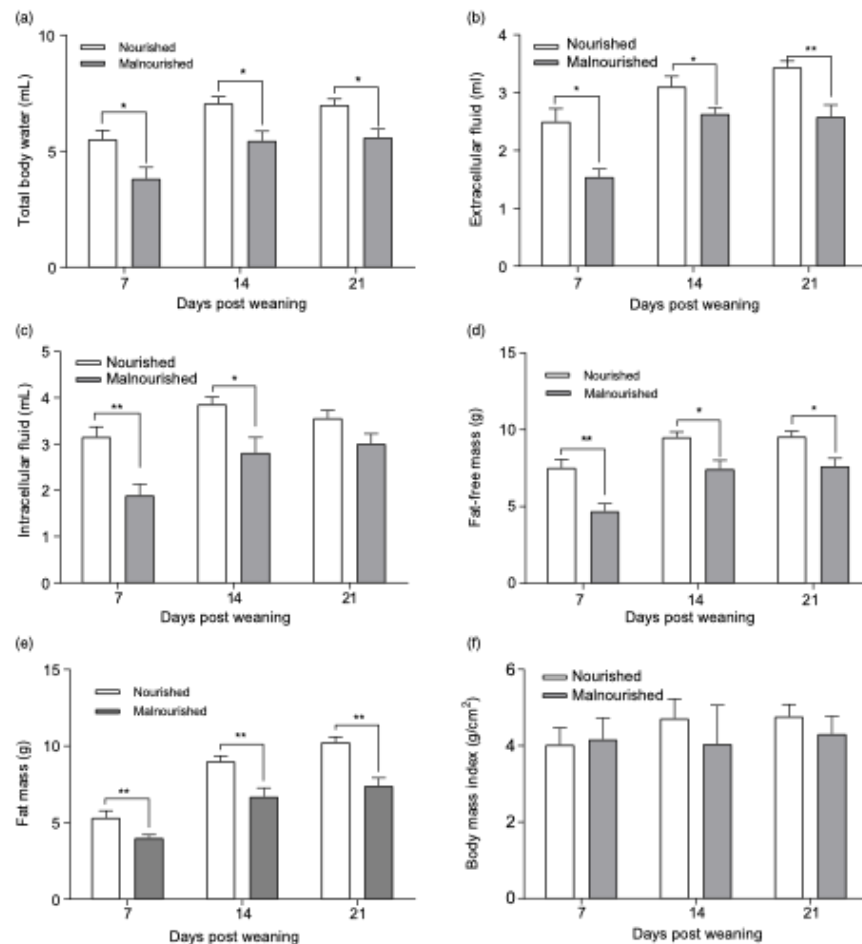
RBD also caused time-dependent changes in intestinal permeability. When assessing the percentage of lactulose excretion, it was possible to observe a significant reduction ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) in the malnourished group compared with the nourished group on days 7 and 14 (Fig. 5(a)). The percentage of mannitol excretion was also significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in malnourished animals when compared with that observed on days 7 and 14 (Fig. 5(b)). The lactulose:mannitol ratio increased significantly ( $P < 0.05$ ) in malnourished animals compared with that in animals fed on day 14 (Fig. 5(c)). No significant changes in intestinal barrier function were observed on day 21.

#### Temporal effect of regional basic diet consumption on the relative transcription of tight junctions and intestinal transporters

Analysis of the relative infrastructure of protein-forming proteins in the jejunum allowed us to assess the dynamics of changes in the molecular architecture of the intestinal barrier. The relative transcription of *clau-1* was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group compared with the nourished group on day 14 (Fig. 6(a)), whereas *Clau-2* was significantly reduced in the malnourished group compared with the nourished group on day 21 (Fig. 6(b)). The relative transcription of *occludin* was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group compared with that in the nourished group on



**Fig. 1.** Growth rate in weaning mice fed for regional basic diet or control diet. (a) Weight and (b) weight gain of C57BL/6 nourished and malnourished animals for a total of 21 d after weaning. The data are representative of three different experiments ( $n$  6–8 per group). Weight and weight gain were measured every 2 days and the data are presented as mean values with their standard error of the mean (\*\* $P$  < 0.001, Student's  $t$  test nourished v. malnourished per day and #  $P$  < 0.001 ANOVA of repeated measures comparing the days of the malnourished group with day 0). (c) Tail length variation of nourished (white bar) and malnourished (grey bar) animals on days 7, 14 and 21 ( $n$  6–8 per group). The data represent the percentage of tail length variation in mean values with their standard error of the mean (\* $P$  < 0.05, Student's  $t$  test nourished v. malnourished by time). (d) Representative image of the global effects of nourished and malnourished animals on day 21. (e) Feed and water (f) consumption during the 21 experimental days ( $n$  6–8 per group). The data represent the mean consumption of each group ( $n$  6–8 mice per group) in three different experiments. Data are presented as mean values with their standard error of the mean (\* $P$  < 0.05, Student's  $t$  test, nourished v. malnourished per day).



**Fig. 2.** Body composition of animals submitted to the consumption of regional basic diet (RBD) or control diet. After challenging the animals with RBD diet and control diet ( $n=8$ ), we analysed on days 7, 14 and 21 (a) total body water, (b) extracellular fluid, (c) intracellular fluid, (d) fat-free mass, (e) fat mass and (f) BMI. The data for each time represent different experimental lines and the data are presented by mean values with their standard error of the mean (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , nourished *v.* malnourished, Student's *t* test).

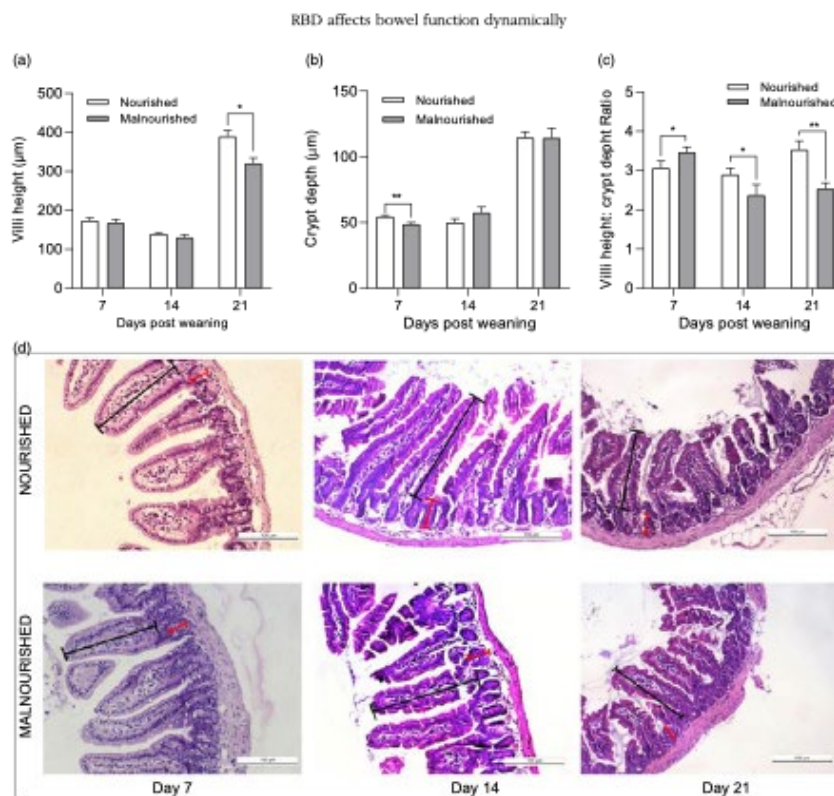
days 14 and 21 (Fig. 6(c)). In contrast, the relative transcription of ZO-1 was not altered at any time point analysed (Fig. 6(d)).

The consumption of RBD also altered the analysis of the relative transcription of intestinal transporters. The relative transcription of PEPT-1 increased significantly ( $P < 0.05$ ) in the malnourished group compared with the nourished group only on day 7 (Fig. 6(e)). The SGLT-1 levels increased significantly on days 7 and 14 in the malnourished group when compared with the nourished group; however, the GLUT decreased

significantly on day 21 in the malnourished group when compared with the nourished group (Fig. 6(f)).

#### *Temporal effect of regional basic diet consumption on the relative protein expression of tight junctions and intestinal transporters*

The evaluation of the relative protein expression of tight junctions and intestinal transporters allowed us to identify those



**Fig. 3.** Jejunum morphometry of nourished or malnourished animals. (a) Villus height (black line), (b) crypt depths (red line) and (c) villus height: crypt depth ratio were recorded for the nourished (white bar) and malnourished (grey bar) group on days 7, 14 and 21 ( $n=4$ ). Data are presented as mean values with their standard error of the mean (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann Whitney test on nutrient v. malnutrition for each day). (D) Sections of the nourished and malnourished mice stained with the haematoxylin and eosin standard for all times.

alterations found for relative transcription were not the same for protein expression. On day 7, we observed a trend towards increased protein expression of SGLT-1 and PepT-1 in malnourished animals compared with nourished ones, but with no significant difference ( $P > 0.05$ ) (Fig. 7(a)). On day 14, the relative protein expression of SGLT-1 and occludin showed a trend ( $P > 0.05$ ) to increase in malnourished animals when compared with nourished animals (Fig. 7(b)). Regarding day 21, we observed a certain trend ( $P > 0.05$ ) towards increased protein expression of SGLT-1, Clau-2 and occludin in the malnourished group when compared with the control group (Fig. 7(c)).

### Discussion

In this study, the ingestion of RBD triggered atrophy in body development; compromised body composition; and affected intestinal morphological histology, intestinal barrier function

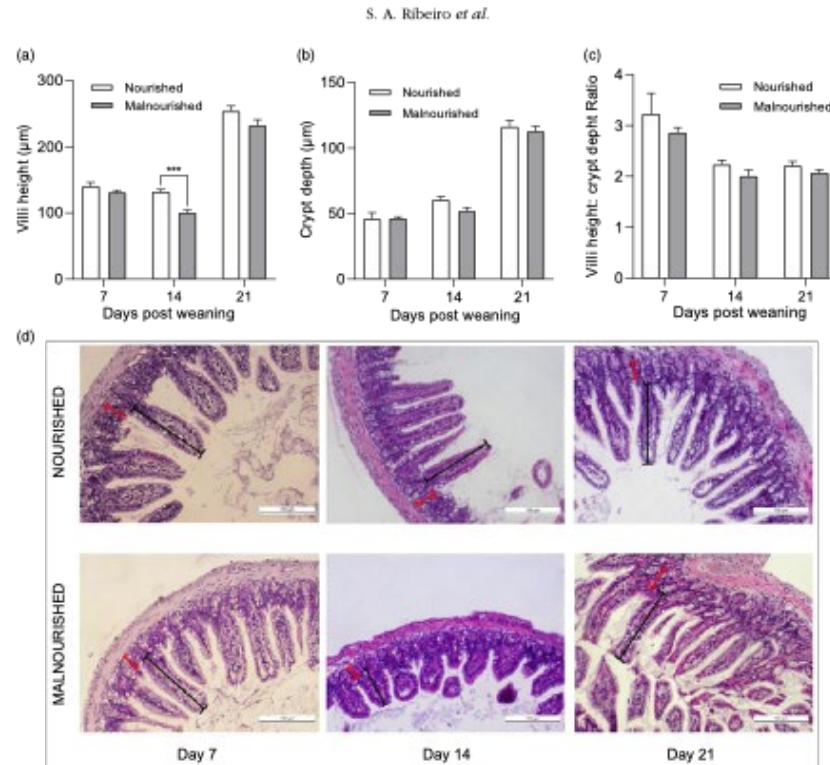
and mRNA levels of tight junctions and intestinal transporters, which are essential proteins for maintaining the morphofunctional barrier and adequate nutrient absorption, respectively.

Nutritional deficiency during early childhood is directly related to short- and long-term consequences resulting from adaptive epigenetic responses<sup>(25)</sup>. In this context, the development of weanling animal models has helped to better understand the pathophysiology associated with multi-deficient diets<sup>(9,25,26)</sup>. Our results, which differed from those of studies reported in the literature, allowed a temporal assessment of changes triggered by a diet exhibiting multiple nutrient deficiencies, based on food composition intake in the Northeastern Brazil, in the body composition, intestinal morphology and barrier function, and physical development of weanling rodents.

RBD is an experimental diet low in lipids, proteins and minerals and rich in carbohydrates, which is characteristic of diets accessible to low-income populations in Northeastern Brazil<sup>(11)</sup>.



752

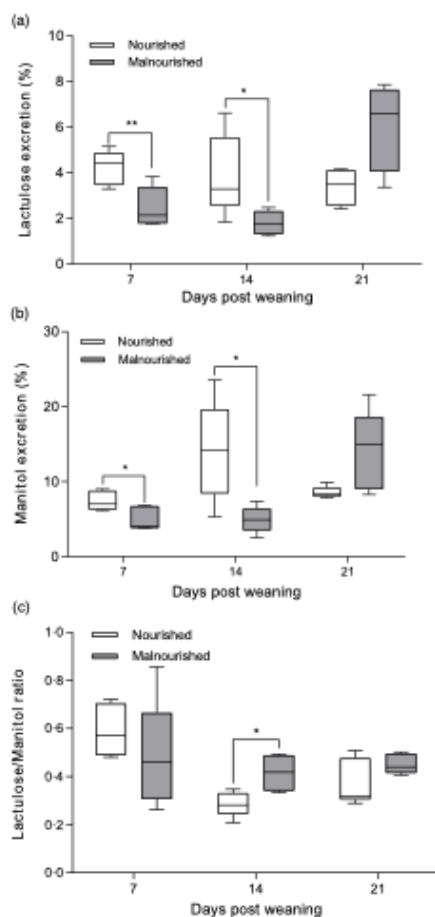


**Fig. 4.** Morphometry of the ileum of nourished or malnourished animals. (a) Villus height (black line), (b) crypt depths (red line) and (c) villus height/crypt depth ratio were recorded for the nourished (white bar) and malnourished (grey bar) group on days 7, 14 and 21 ( $n=4$ ). Data are presented as mean values with their standard error of the mean (\*\*\*)  $P < 0.001$ , Mann Whitney test on nutrient v. malnutrition for each day. (d) Sections of the nourished and malnourished mice stained with the haematoxylin and eosin standard for all times.

RBD-induced malnutrition in weanling mice is characterised by rapid weight reduction and weight gain<sup>(12–14)</sup> and a late reduction in tail length<sup>(14)</sup>. Our results show that RBD reduces weight gain early, followed by a reduction in weight in the first week and impaired growth from the second week of consumption of RBD, without changes in BMI due to both weight and length deficits. Our results were similar to the literature, even with our RBD lipid values being higher than in other studies<sup>(11,12,27)</sup>. In the literature, we have observed a variation of 0.8%<sup>(11,12,27)</sup> to 8.2%<sup>(13)</sup> of fat, in this sense our study maintained a percentage of 6.2% kcal of fat, thus within this percentage variation. In addition, changes in weight, weight gain and tail length occurred without changes in diet consumption, probably because diets were isoenergetic. Most studies with nutrient-deficient and isoenergetic diets do not report food consumption in the groups<sup>(12,14–16)</sup>, except for Sampaio *et al.*<sup>(13)</sup> who observed differences in feed intake on day 2.

The consumption of RBD in this study led to reduced total body water, extracellular fluid, fat mass and fat-free mass from day 7, while intracellular fluid decreased on days 7 and 14.

Bioelectrical impedance is rarely considered in animal studies, and to date, no study has analysed the body composition of animals in nutritional deficiency models. However, it is known that the metabolism of several organs in malnutrition is sustained by the mobilisation of fat and protein reserves when protein consumption is insufficient to maintain protein metabolism<sup>(28)</sup>. Therefore, our results show that the nutritional deficiency of the RBD diet is capable of compromising the animals' body energy reserves. In addition, the absence of oedema occurred even as increased water consumption in malnourished animals. In the clinic, severe acute malnutrition may present with the presence or absence of oedema<sup>(29)</sup>. Studies indicate that a low-protein diet decreases urine concentration capacity and free water reabsorption in the kidney due to synergistic or contributory changes, such as reduced corticomedullary osmotic gradient, reduced plasma amino acids, hydrosmotic effect of decreased ADH, among others<sup>(30)</sup>. Therefore, a possible change in water reabsorption in the kidney triggered by protein deficiency in RBD may explain the increase in water consumption and absence of oedema in the present study.



**Fig. 5.** Effects of RBD consumption on intestinal permeability on days 7, 14 and 21. The percentage excretion of (a) lactulose, (b) mannitol and (c) lactulose/mannitol ratio was recorded on days 7, 14 and 21 in the nourished and malnourished groups. The data correspond to an experiment ( $n$  6). Data are presented as median and minimum to maximum for all times (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann-Whitney test by time).

Differentiation of intracellular and extracellular fluids is important for nutritional assessment<sup>(31)</sup>. Chronic malnutrition is reported to compromise the growth of intracellular fluids and induce increases in extracellular fluids over time<sup>(32)</sup>. However, in this study, RBD caused atrophy of extracellular fluid from early to chronic, while intracellular fluid atrophied on days 7 and 14, with a return to baseline in a more chronic period. Intracellular fluid provides a baseline for measuring oxygen consumption, energetic requirements and BMR, while extracellular fluid

indicates most collagen-derived tissues, as well as interstitial fluid and plasma<sup>(33)</sup>. Cheek *et al.*<sup>(34)</sup> reported that the restoration of the cell phase or metabolically active protoplasm is of great importance for maintaining metabolism. Therefore, the return of intracellular fluid to the basal state indicates restoration of the metabolic rate on the 21st day.

The gastrointestinal tract is the first system directly affected by changes in nutrient intake, exhibiting rapid physiological and morphological changes<sup>(35)</sup>. In this study, RBD also triggered adaptive responses in intestinal barrier function. In a short time, RBD triggered atrophy of crypts and an increased in the villus: crypt ratio of the jejunum without altering the morphology of the ileum. Then, the RBD atrophied the absorptive area of the jejunum and reduced the height of villi in the ileum; and, in a chronic period, the RBD reduced the height of villi and the absorptive area in the jejunum. The morphological changes observed in this study are different from those reported in the literature; however, no work to date has evaluated the temporal effect of the RBD diet on the intestinal morphofunctional barrier. A study similar to ours showed that RBD-induced malnutrition reduces the height of the ileal crypt in a short period<sup>(15)</sup>. On the other hand, a model of RBD-induced malnutrition caused villus dullness, promoted crypt depth and decreased the villus: crypt ratio in the jejunum at 14 d<sup>(16)</sup>. However, another study showed that malnutrition in weanling mice due to a diet similar to RBD caused no morphological changes in any portion of the intestine analysed after 21 d<sup>(14)</sup>. The intestinal barrier is highly dynamic and changes easily<sup>(36)</sup>. Therefore, our results show an increase in the absorptive area in the initial phase that is not sustained in a later period, likely due to RBD protein deficiency.

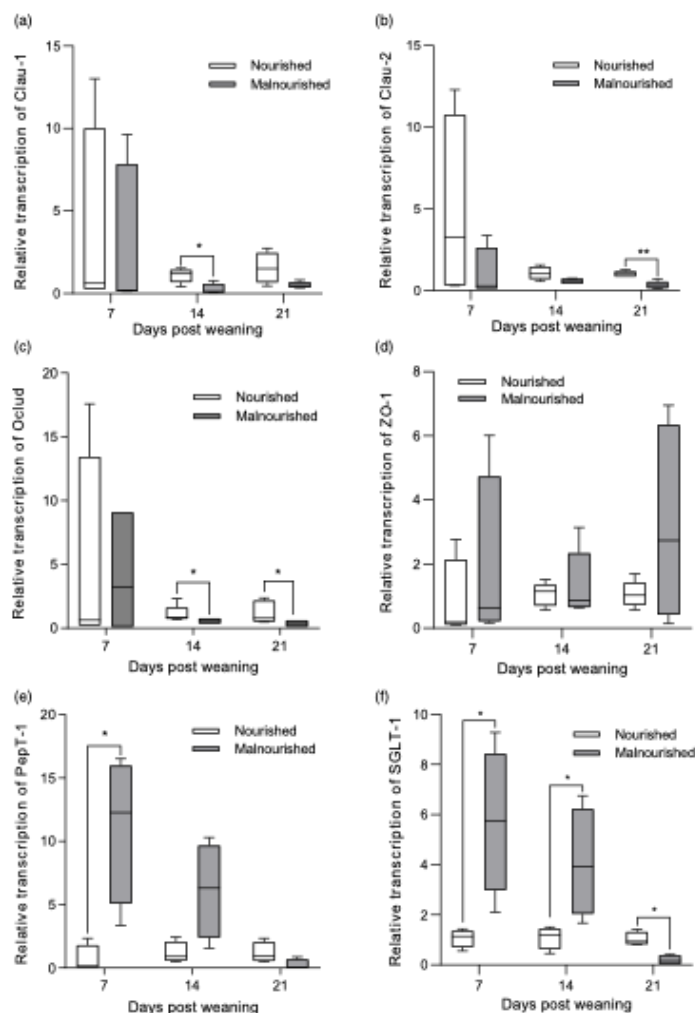
In clinical settings, malnourished children exhibit greater intestinal permeability<sup>(37,38)</sup>. Experimental models, mainly models of chronic malnutrition, also indicate damage to the intestinal cell barrier<sup>(32,14)</sup>. In this context, the lactulose and mannitol test (L/M) is a consistent, non-invasive and sensitive marker for intestinal barrier function<sup>(39,40)</sup>. In the present study, intestinal barrier function changed dynamically over time. RBD-induced malnutrition caused a reduction in the total absorptive area and paracellular permeability, with no indication of damage to the barrier on day 7. In contrast, day 14 showed a reduction in the absorptive area, increased paracellular permeability and consequent barrier damage that was reversed on day 21 in malnourished animals, consistent with restoration of the metabolic rate.

The L/M test is widely used in clinics to diagnose environmental enteropathy<sup>(41–43)</sup> and verify the effectiveness of treatments for malnutrition and diarrheal infections<sup>(21,37,38)</sup>. The moderate acute malnutrition-induced RBD did not alter transepithelial resistance during substrate absorption, indicating that in acute models, the diet does not affect paracellular permeability<sup>(15)</sup>, in contrast to the present study. A porcine model also identified that transepithelial resistance was not altered during acute malnutrition<sup>(44)</sup>. No RBD-induced malnutrition model showed changes in intestinal permeability on day 14, but a model similar to ours, with weanling mice challenged with an RBD-like diet showed barrier damage on day 21<sup>(14)</sup>. Changes in intestinal barrier function on day 14 were concomitant with a reduction in cell mass, muscle mass and adipose tissue, indicating a





754

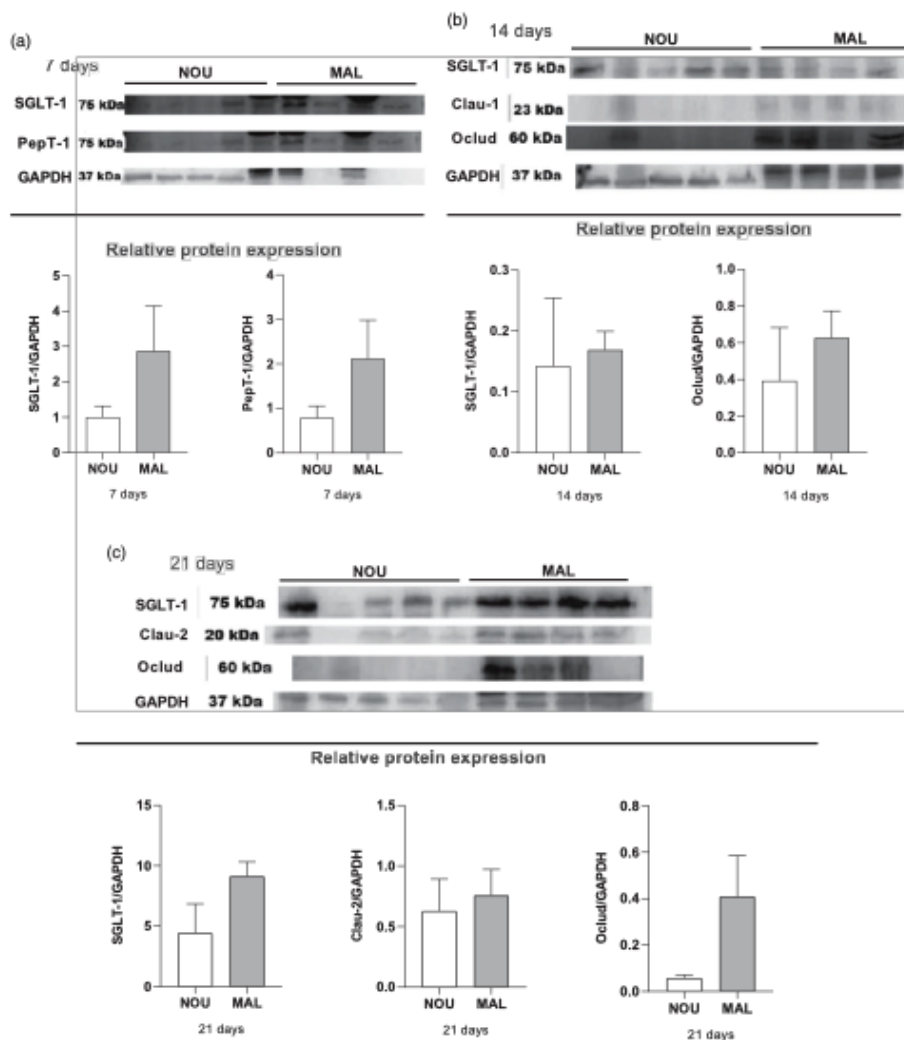
S. A. Ribeiro *et al.*

**Fig. 6.** Relative transcription of tight junctions and intestinal transporters in the jejunum of nourished and malnourished mice on days 7, 14 and 21. Analysis of the relative transcription of (a) claudin-1 (clau-1), (b) claudin-2 (Clau-2), (c) occludin (occlud), (d) ZO-1, (e) PepT-1 and (f) SGLT-1. Data are presented as median and minimum to maximum for all times ( $n$  6, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , Mann-Whitney test by time).

reduction in energy reserves necessary for repair response. The absence of changes in intestinal barrier function on day 21 may be due to the return of the metabolic rate, indicated by the absence of changes in intracellular fluids.

Several proteins constitute tight junctions and have complex distribution, regulation and functional characteristics<sup>(45–47)</sup>.

Overexpression of occludin in epithelial cells *in vitro* triggers an increase in transepithelial electrical resistance and an unexplained increase in the flow of uncharged solutes<sup>(48,49)</sup>. In contrast, claudin-1 plays a crucial role in barrier formation in several organs<sup>(47)</sup>. Unlike claudin-2, which plays a role in pore function, is indispensable for  $\text{Na}^+$  absorption in mice<sup>(45)</sup>. Our



**Fig. 7.** Relative protein expression of tight junctions and intestinal transporters of nourished and malnourished mice on days 7, 14 and 21. (a) Representative western blot analysis of SGLT-1, PepT-1 and GAPDH on day 7 followed by quantitative results of relative protein levels. (b) Representative western blot analysis of SGLT-1, Clau-1 and Occludin and GAPDH on day 14 followed by quantitative results of relative protein levels. (c) Representative western blot analysis of SGLT-1, Clau-2 and Occludin and GAPDH on day 21 followed by quantitative results of relative protein levels. Data are presented as mean values with their standard error of the mean for all times ( $n$  4–5, Mann–Whitney test by time).

results showed that RBD did not stimulate any change in the levels of transcripts of tight junctions on the 7th day, but on the 14th triggered reduction in the levels of claudin-1 and occludin, and on day 21st levels of claudin-2 and occludin were reduced, no

significant changes in protein levels. Claudins are a family of twenty-seven proteins that are considered the most important constituents for the maintenance of intestinal epithelial barrier homeostasis<sup>(50)</sup>. In the literature, different models of nutritional



deficiency consumption showed different modulations in transcript levels and the expression of firm junctions, but no work reported temporal changes in these proteins. For example, a model of moderate acute malnutrition with RBD in post-weaning mice showed increased levels of claudin-2 and occludin mRNA in the ileum, with no change in protein expression<sup>(13)</sup>. Post-weaning RBD-induced malnutrition results in a reduction in ZO-1 mRNA levels and an increase in claudin-2 levels during the chronic period<sup>(14)</sup>. RBD-induced malnutrition in neonates triggered an increase in the expression of claudin-3, but not claudin-1, occludin and ZO-1 expression<sup>(12)</sup>. In contrast, severe protein deprivation has been reported to decrease the protein expression of claudin-1, but with no change in the expression of occludin in the small intestines of neonatal rats<sup>(51)</sup>. Therefore, these data show that mRNA transcription and expression of tight junction proteins are highly dynamic, complex and dependent on various experimental and animal conditions.

Morphological and functional changes can promote beneficial or harmful effects on the transport of nutrients and ions, resulting from an adaptive mechanism to malnutrition<sup>(52)</sup>. In the present study, RBD-induced malnutrition in PEPT-1 mRNA levels increased only on day 7, while SGLT-1 mRNA levels increased on days 7 and 14 and decreased on day 21, no changes in protein levels. The regulation of gene expression of intestinal transporters is complex and can be altered under different conditions<sup>(53)</sup>. RBD induced an increase in the levels of SGLT-1 and PEPT-1 transcripts in the ileum on day 7, with no changes in protein expression<sup>(13)</sup>. The levels of SGLT-1 transporters are known to be highly correlated with the amount of food carbohydrates<sup>(54)</sup>. Studies indicate that a diet rich in carbohydrates increases the expression and levels of SGLT-1 transcripts and consequently the absorption of glucose within 1–3 d<sup>(54,55)</sup>. However, low protein diets stimulate an increase in the expression of essential amino acid transporters, aiming at cost benefits<sup>(55,56)</sup>. Our data show an increase in the levels of transporter mRNA initially to maintain adequate nutrient absorption; however, energy deprivation over time does not allow these changes to be observed in protein expression and promotes the reduction of these transporter mRNA levels later.

The present study was limited by the lack of quantification of protein expression and levels of claudin-15 and GLUT transcripts together with the application of tests such as oral glucose tolerance and measurement of the blood amino acid profile would allow identification of changes in the intestinal absorption of nutrients, thus reinforcing the changes identified for transporters. In addition, functional tests such as Ussing chambers associated with transmission electron microscopy could better explain the electrophysiological changes and distribution of proteins forming firm junctions at the paracellular level triggered by RBD in the intestinal epithelial barrier. Supplementation with alanyl-glutamine or Zn could also be added as a possible treatment for the effects of RBD. However, the present work shows that the intestinal morphofunctional barrier can adapt positively to nutrient deprivation, probably with the aim of maintaining intestinal function. Thus, this research makes an important contribution to better understand the impact over time that a multi-deficient

diet can have on important organs, such as the gastrointestinal tract.

In conclusion, RBD delays weight gain and physical development, changes body composition over a short period and induces long-term compositional alteration. In addition, a diet deficient in nutrients triggers a dynamic response in the intestinal function and morphology of the jejunum, which is associated with changes in the transcript levels of firm junctions and intestinal transporters. In a short period, RBD decreases the depth of crypts and increases the villi/crypt ratio of the jejunum, decreasing the total absorptive area and paracellular permeability, with increased levels of transcripts from the PEPT-1 and SGLT-1 transporters and without changing the transcript levels of tight junctions. The greatest damage to the morphofunctional barrier occurs in the intermediate period, with the reduction in the villi/crypt ratio of the jejunum, height of the villi in the ileum, paracellular permeability and total absorptive area with indicative barrier damage, which is associated with reduced transcript levels of claudin-1 and occludin and increased levels of the SGLT-1 transporter. In late periods, the villi/crypt ratio of the jejunum remains reduced in malnutrition, with a reduction in villus height, with no changes in intestinal barrier function, but a reduction in the levels of claudin-2, occludin and SGLT-1 transcripts. Thus, the present study provided monitoring of the main body and morphofunctional changes resulting from the introduction of a diet deficient in nutrients in a critical phase of physical development, enabling a dynamic understanding of the acute and chronic effects resulting from malnutrition and suggesting adaptive mechanisms in late periods, mainly in terms of intestinal barrier function.

#### Acknowledgements

We thank all researchers involved in development, financial support agencies and Gerly Brito (Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil).

There is no conflict of interest related to this manuscript.

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; #303650/2013–3). CNPq had no role in the design, analysis or writing of this article.

The responsibilities of the authors were as follows: S. A. R., F. A. P. R., P. H. Q. de M. and A. A. M. L.: designed the research; S. A. R., F. A. P. R., M. A. C., H. N. V., R. C. L. S., J. M. P., M. F. A. G. J. and A. H.: conducted the study; S. A. R., F. A. P. R., J. K. de S., A. K. S. dos S., A. A. dos S., B. L. L. M., A. H. and A. A. M. L.: analysed and interpreted data; S. A. R. and A. A. M. L.: wrote the paper and had final responsibility for the content; and all authors: read and approved the manuscript.

#### References

1. Das S, Hossain MZ & Nesa MK (2009) Levels and trends in child malnutrition in Bangladesh. *Asia-Pac Popul J* **24**, 51–78.
2. Headey D, Heidkamp R, Osendarp S, *et al.* (2020) Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *Lancet* **396**, 519–521.

3. Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, *et al.* (2016) Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational. *Am J Clin Nutr* **104**, 1441–1449.
4. Moore SR, Lima AA, Conway MR, *et al.* (2001) Early childhood diarrhoea and helminthiasis associate with long-term linear growth faltering. *Int J Epidemiol* **30**, 1457–1464.
5. Guerrant RL, Bolick DT & Swann JR (2021) Modeling enteropathy or diarrhea with the top bacterial and protozoal pathogens: differential determinants of outcomes. *ACS Infect Dis* **7**, 1020–1031.
6. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, *et al.* (2012) Infant malnutrition is associated with persisting attention deficits in middle adulthood. *J Nutr* **142**, 788–794.
7. Deboer MD, Lima AA, Oria RB, *et al.* (2013) Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev* **70**, 642–653.
8. Lykke M, Hother AL, Hansen CF, *et al.* (2013) Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition. *Am J Transl Res* **5**, 543–554.
9. Miyazaki A, Kandasamy S, Michael H, *et al.* (2018) Protein deficiency reduces efficacy of oral attenuated human rotavirus vaccine in a human infant fecal microbiota transplanted gnotobiotic pig model. *Vaccine* **36**, 6270–6281.
10. Núñez IN, Galdeano CM, Carmuega E, *et al.* (2013) Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in B6/c mice under non-severe protein-energy malnutrition. *Br J Nutr* **110**, 500–508.
11. Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, *et al.* (1990) A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* **40**, 533–547.
12. Ueno PM, Oria RB, Maier EA, *et al.* (2011) Alanine-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis *in vitro* and in a murine model of weaning undernutrition. *APJ Gastrointest Liver Physiol* **301**, G612–G622.
13. Sampaio IC, Medeiros PHQS, Rodrigues FAP, *et al.* (2016) Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Braz J Med Biol Res* **49**, 1–10.
14. Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, *et al.* (2015) Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nat Commun* **6**, 1–16.
15. Bolick DT, Roche JK, Hontecillas R, *et al.* (2013) Enterococcal *Escherichia coli* strain in a novel weaned mouse model: exacerbation by malnutrition, biofilm as a virulence factor and treatment by nitazoxanide. *J Med Microbiol* **62**, 896–905.
16. De Queiroz CA, Fonseca SGC, Prota PB, *et al.* (2014) Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. *BMC Gastroenterol* **14**, 1–14.
17. Paixão ADO, Aléssio MLM, Martins JPC, *et al.* (2006) Regional Brazilian diet-induced pre-natal malnutrition in rats is correlated with the proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **15**, 302–309.
18. Barros KMFT, Manhães-De-Castro R, Lopes-De-Souza S, *et al.* (2006) A regional model (Northeastern Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* **9**, 99–104.
19. Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799–809.
20. Cahill GP (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* **26**, 1–22.
21. Radtke F & Clevers H (2005) Self-Renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Sci* **307**, 1904–1909.
22. Carle MS (2010) Validation of Bioimpedance Spectroscopy by Assessing. PhD Thesis, University of Alabama. Validity of Bioimpedance Spectroscopy in the Assessment of Total Body Water and Body Composition in Wrestlers and Untrained Subjects - PubMed. nih.gov (accessed April 2021).
23. Barboza MS, Silva TMJ, Guerrant RL, *et al.* (1999) Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res* **32**, 1499–1504.
24. Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-ΔΔCT)</sup> Method. *Method* **25**, 402–408.
25. Agosti M, Tandoi F, Morlaichi L, *et al.* (2017) Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *La Pediatr Med e Chir* **39**, 57–61.
26. Weage K, Maier EA, Guedes MM, *et al.* (2013) Undernutrition by a regional basic diet increases serum interferon- $\gamma$  levels and enhances tolerance to oral lipopolysaccharide in weaning mice. *AGA* **1**, S316.
27. Almeida MFL, Yamasaki EN, Silveira ACD, *et al.* (2001) The GABAergic and cholinergic systems in the retina are differentially affected by postnatal malnutrition during the suckling period. *Nutr Neurosci* **4**, 223–238.
28. Soeters P, Bozzetti F, Cynober L, *et al.* (2016) Defining malnutrition: a plea to rethink. *Clin Nutr* **36**, 896–901.
29. Butsch WS & Heimbürger DC (2008) Malnutrition and disease outcomes. Gastroenterology, nutrition and gastrointestinal disease. In *Nutrition and Gastrointestinal Disease* [MH DeLEGE, editor]. Totowa, NJ: Human Press.
30. Benabe JE & Martínez-Maldonado M (1998) The impact of malnutrition on kidney function. *Miner Electrolyte Metab* **24**, 20–26.
31. Grover Z & Ee LC (2009) Protein energy malnutrition. *Pediatr Clin N Am* **56**, 1055–1068.
32. Gartner A, Berger J, Simondon KB, *et al.* (2003) Change in body water distribution index in infants who become stunted between 4 and 18 months of age. *Eur J Clin Nutr* **57**, 1097–1106.
33. Earthman WH, Matthie JR, Reid PM, *et al.* (2000) Body cell mass change in HIV infection A comparison of bioimpedance methods for detection of A comparison of bioimpedance methods for detection of body cell mass change in HIV infection. *J Appl Physiol* **88**, 944–956.
34. Cheek DB, Hill DE, Cordano A, *et al.* (1970) Malnutrition in infancy: changes in muscle and adipose tissue before and after rehabilitation. *Pediatr Res* **4**, 135–144.
35. Ferraris RP & Carey HV (2000) Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu Rev Nutr* **20**, 195–219.
36. Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, *et al.* (2005) Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 413–424.
37. Lima AAM, Brito LFB, Ribeiro HB, *et al.* (2005) Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **40**, 28–35.
38. Lima NL, Soares AM, Mota RMS, *et al.* (2007) Wasting and intestinal barrier function in children taking alanine-glutamine-supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **44**, 365–374.
39. Krugliak P, Hollander D, Schlaepfer CC, *et al.* (1994) Mechanisms and sites of mannitol permeability of small and large intestine in the rat. *Dig Dis Sci* **39**, 796–801.
40. Hossain MI, Haque R, Mondal D, *et al.* (2016) Undernutrition, vitamin A and iron deficiency are associated with impaired intestinal mucosal permeability in young Bangladeshi children assessed by lactulose/mannitol test. *PLoS ONE* **11**, 1–10.





41. Lee GO, Kosek P, Lima AAM, *et al.* (2014) Lactulose: mannitol diagnostic test by HPLC and LC-MSMS platforms: considerations for field studies of intestinal barrier function and environmental enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **59**, 544–550.
42. Lima AA, Leite Alvaro M, Di Moura A, *et al.* (2017) Determinant variables, enteric pathogen burden, gut function, and immune-related inflammatory biomarkers associated with childhood malnutrition. *Pediatr Infect Dis J* **36**, 1177–1185.
43. Lima AAM, Oria RB, Soares AM, *et al.* (2014) Geography, population, demography, socioeconomic, anthropometry, and environmental status in the MAL-ED cohort and case-control study sites in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Clin Infect Dis* **59**, S287–S294.
44. Jacobi SK, Moeser AJ, Blümslager AT, *et al.* (2015) Acute effects of rotavirus and malnutrition on intestinal barrier function in neonatal piglets. *World J Gastroenterol* **19**, 5094–5102.
45. Suzuki T (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* **70**, 631–659.
46. Tamura A, Hayashi H, Imasato M, *et al.* (2011) Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology* **140**, 913–923.
47. Wada M, Tamura A, Takahashi N, *et al.* (2013) Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology* **144**, 369–380.
48. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, *et al.* (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* **109**, 2287–2298.
49. Furuse M, Hirase T, Itoh M, *et al.* (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777–1788.
50. Furuse M, Hata M, Furuse K, *et al.* (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* **156**, 1099–1111.
51. Anderson JM & Itallie CMV (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, 1–16.
52. Li N, Lassman BJ, Liu Z, *et al.* (2004) Effects of protein deprivation on growth and small intestine morphology are not improved by glutamine or glutamate in gastrostomy-fed rat pups. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **39**, 28–33.
53. Boudry G, David ES, Douard V, *et al.* (2010) Role of intestinal transporters in neonatal nutrition: carbohydrates, proteins, lipids, minerals, and vitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **51**, 380–401.
54. Freeman TC, Wood IS, Sirinathsinghji DJS, *et al.* (1993) The expression of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) gene in lamb small intestine during postnatal development. *BBA* **1146**, 203–212.
55. Ferraris RP (2001) Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J* **360**, 265–276.
56. Gilbert ER, Wong EA & Webb KE (2008) Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *J Anim Sci* **86**, 2135–2155.

## ANEXO B – ARTIGO 2

The Journal of Nutrition  
 A NEW MURINE UNDERNUTRITION MODEL BASED ON COMPLEMENTARY  
 FEEDING OF UNDERNOURISHED CHILDREN CAUSES DAMAGE TO THE  
 MORPHOFUNCTIONAL INTESTINAL EPITHELIUM BARRIER  
 --Manuscript Draft--

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Manuscript Number:                  | JN-2023-1201  |
| Full Title:                         | A NEW MURINE UNDERNUTRITION MODEL BASED ON COMPLEMENTARY FEEDING OF UNDERNOURISHED CHILDREN CAUSES DAMAGE TO THE MORPHOFUNCTIONAL INTESTINAL EPITHELIUM BARRIER   |
| Short Title:                        | New murine model of malnutrition based on MAL-ED  |
| Article Type:                       | Original Research Article   |
| Section/Category:                   | Nutrition and Disease   |
| Keywords:                           | Child undernutrition; undernutrition experimental model; complementary feeding; functional barrier of the intestinal epithelium; body composition.  |
| Corresponding Author:               | Samilly Albuquerque Ribeiro, Ph.D<br>UFC: Universidade Federal do Ceara<br>Fortaleza, Ceara BRAZIL  |
| Corresponding Author's Institution: | UFC: Universidade Federal do Ceara  |
| First Author:                       | Samilly Albuquerque Ribeiro, Ph.D   |
| Order of Authors:                   | Samilly Albuquerque Ribeiro, Ph.D<br>Enock L.R. Braga<br>Marcus L. Queiroga<br>Marco A. Clementino<br>Xhaulla M.Q.C. Fonseca<br>Mônica O. Belém<br>Lyvia M.V.C. Magalhães<br>José K. de Sousa<br>Thiago M. de Freitas<br>Herlice N. Veras<br>Cristiane C. de Aquino<br>Alan D.C. Santos<br>Flávio R. M. de Moura<br>Armênio A. dos Santos<br>Alexandre Havt<br>Bruna L.L. Maciel<br>Aldo Ângelo Moreira Lima  |
| Abstract:                           | Background: Complementary feeding is a critical period for the establishment of undernutrition. However, the experimental undernutrition diets do not represent the amount of nutrients in the complementary diets of undernourished children.<br>Objective: To develop, validate and to evaluate the impact of new murine model of undernutrition based on the complementary diet of undernourished children from seven countries of low socioeconomic power belonging to the Malnutrition-Enteric Diseases (MAL-ED) cohort study on the intestinal epithelium.<br>Methods: We used the difference in the percentage of energy, macronutrients, fiber and zinc in the complementary diet of children without undernutrition vs. stunting |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>(height-for-age Z-score; HAZ &lt; -2) for the MAL-ED diet formulation. Subsequently, C57BL/6 mice were submitted to consumption of the control diet (AIN-93M diet) or MAL-ED diet for 28 days. Weight was measured every day; body composition were measured every seven days; lactulose:mannitol ratio (LM) and morphometry were evaluated on days 7 and 28; cotransport test, the analysis of intestinal transporters and tight junctions on day 7.</p> <p>Results: The MAL-ED diet presented -8.03% energy, -37.46% protein, -24.20% lipid, -10.83% zinc, +5.93% carbohydrate and +45.17% fiber than the control diet. This diet rapidly reduced weight gain, compromised body growth and energy reserves in the chronic period (<math>p &lt; 0.05</math>). In the intestinal epithelial barrier, this diet caused an increase in the LM (<math>p &lt; 0.001</math>), reduced (<math>p &lt; 0.001</math>) villous area associated with the increase of FATCD36 in the acute period and increased (<math>p &lt; 0.001</math>) mannitol excretion in the chronic period.</p> <p>Conclusions: The experimental diet MAL-ED induced undernutrition in animals, resulting in both acute damage to the integrity of the intestinal epithelial barrier and a subsequent increase in intestinal area during the chronic period. This study introduces the first murine model of undernutrition for the complementary feeding phase, based on data from undernourished children in seven different countries.</p> |
| Suggested Reviewers:                                     | <p>Robert HJ Bandsma<br/>robert.bandsma@sickkids.ca<br/>Specializes in malnutrition and intestinal function.</p> <p>Rachel Marion-Letellier<br/>Rachel.letellier@univ-rouen.fr<br/>The researcher has published with experimental models of malnutrition and environmental enteropathy.</p> <p>Sung Nim Han<br/>snhan@snu.ac.kr<br/>The researcher has experience with an experimental model of calorie restriction.</p>   |
| Opposed Reviewers:                                       |  |
| Additional Information:                                  |  |
| Question   | Response   |
| Has this manuscript been deposited on a preprint server? | No   |
| Has this manuscript previously been reviewed by JN?      | No   |
| Designated Alternate Author                              | Aldo AM Lima   |
| Author Comments:   | <p>Dear Editor,</p> <p>We are submitting the article entitled the paper entitled "A NEW MURINE MALNUTRITION MODEL BASED ON COMPLEMENTARY FEEDING OF UNDERNOURISHED CHILDREN CAUSES DAMAGE TO THE MORPHOFUNCTIONAL INTESTINAL EPITHELIUM BARRIER" and written by Samilly A. Ribeiro, Enock L.R. Braga, Marcus L. Queiroga, Marco A. Clementino, Xhaulla M.Q.C. Fonseca, Mônica O. Belém, Lyvia M.V.C. Magalhães, José K. de Sousa, Thiago M. de Freitas, Herlice N. Veras, Cristiane C. de Aquino, Alan D.C. Santos, Flávio R. M. de Moura, Armênio A. dos Santos, Alexandre Havt, Bruna L.L. Maciel, Aldo A.M. Lima. for consideration by the Editorial Board of the Journal of Nutrition.</p> <p>This manuscript is an original research work that was submitted only for publication in this magazine. This study had two primary objectives. First, it aimed to develop and validate a new experimental diet for a murine model based on the complementary diet of children from seven low socioeconomic countries belonging to the Malnutrition and Enteric Infections (MAL-ED) cohort study. Few experimental models are based on feeding populations, and to date, no work has focused on creating an experimental diet based on the complementary diet of malnourished children—a phase considered extremely important in understanding child malnutrition. This work represents an</p>   |

innovation in nutritional science, providing a valuable tool for studying nutritional deficiencies during a critical stage of healthy development. Secondly, this study aimed to evaluate the impact of this new experimental diet on the morphology and function of the intestinal epithelium. The findings reveal intriguing adaptations of the intestinal epithelium that allow it to maintain its function over extended periods of consumption. We declare that there is no potential competing interest. All authors have reviewed and approved the manuscript for submission.

Kind regards,

Ph.D Samilly Albuquerque Ribeiro  
Biomedicine Center, Infectious Diseases Laboratory, Federal University of Ceará  
Fortaleza, Ceará Coronel Nunes de Melo Street, 1315 (Zip code: 60430-270).  
Email: samilly.rib@gmail.com



Cover Letter



We are submitting the article entitled the paper entitled “

---

Biomedicine Center, Infectious Diseases  
Laboratory, Federal University of Ceará  
Fortaleza, Ceará Coronel Nunes de Melo Street,  
1315 (Zip code: 60430-270).  
Email: [samilly.rib@gmail.com](mailto:samilly.rib@gmail.com)

## Declaration of Interest Statement

**Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Aldo AM Lima reports financial support was provided by National Council for Scientific and Technological Development. Aldo AM Lima reports equipment, drugs, or supplies was provided by Bill & Melinda Gates Foundation.

Manuscript

[Click here to access/download;Manuscript;Ribeiro, SA et al \\_ MAL-ED diet.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

## A NEW MURINE UNDERNUTRITION MODEL BASED ON COMPLEMENTARY FEEDING OF UNDERNOURISHED CHILDREN CAUSES DAMAGE TO THE MORPHOFUNCTIONAL INTESTINAL EPITHELIUM BARRIER

Samilly A. Ribeiro,<sup>1</sup> Enock L.R. Braga,<sup>1</sup> Marcus L. Queiroga,<sup>1</sup> Marco A. Clementino,<sup>1</sup> Xhaulla M.Q.C. Fonseca,<sup>1</sup> Mônica O. Belém,<sup>1</sup> Lyvia M.V.C. Magalhães,<sup>1</sup> José K. de Sousa,<sup>1</sup> Thiago M. de Freitas,<sup>1</sup> Herlice N. Veras,<sup>1</sup> Cristiane C. de Aquino,<sup>1</sup> Alan D.C. Santos<sup>3</sup>, Flávio R. M. de Moura<sup>3</sup>, Armênio A. dos Santos,<sup>1</sup> Alexandre Havt,<sup>1</sup> Bruna L.L. Maciel,<sup>2</sup> Aldo A.M. Lima<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará

<sup>2</sup>Nutrition Postgraduation Program, Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

<sup>3</sup>Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia (NEQUIMA), Manaus-AM, Brazil

\*Correspondence: Samilly A Ribeiro, samilly.rib@gmail.com

### 1 ABSTRACT

2 *Background:* Complementary feeding is a critical period for the establishment of  
3 undernutrition. However, the experimental undernutrition diets do not represent  
4 the amount of nutrients in the complementary diets of undernourished children.

5 *Objective:* To develop, validate and to evaluate the impact of new murine model  
6 of undernutrition based on the complementary diet of undernourished children  
7 from seven countries of low socioeconomic power belonging to the Malnutrition-  
8 Enteric Diseases (MAL-ED) cohort study on the intestinal epithelium.

9 *Methods:* We used the difference in the percentage of energy, macronutrients,  
10 fiber and zinc in the complementary diet of children without undernutrition vs.  
11 stunting (height-for-age Z-score; HAZ < -2) for the MAL-ED diet formulation.  
12 Subsequently, C57BL/6 mice were submitted to consumption of the control diet  
13 (AIN-93M diet) or MAL-ED diet for 28 days. Weight was measured every day;  
14 body composition were measured every seven days; lactulose:mannitol ratio  
15 (LM) and morphometry were evaluated on days 7 and 28; cotransport test, the  
16 analysis of intestinal transporters and tight junctions on day 7.

17

18 **Results:** The MAL-ED diet presented -8.03% energy, -37.46% protein, -24.20%  
19 lipid, -10.83% zinc, +5.93% carbohydrate and +45.17% fiber than the control diet.  
20 This diet rapidly reduced weight gain, compromised body growth and energy  
21 reserves in the chronic period ( $p < 0.05$ ). In the intestinal epithelial barrier, this  
22 diet caused an increase in the LM ( $p < 0.001$ ), reduced ( $p < 0.001$ ) villous area  
23 associated with the increase of FATCD36 in the acute period and increased ( $p <$   
24  $0.001$ ) mannitol excretion in the chronic period.

25 **Conclusions:** The experimental diet MAL-ED induced undernutrition in animals,  
26 resulting in both acute damage to the integrity of the intestinal epithelial barrier  
27 and a subsequent increase in intestinal area during the chronic period. This study  
28 introduces the first murine model of undernutrition for the complementary feeding  
29 phase, based on data from undernourished children in seven different countries.

30 **Key words:** Child undernutrition; undernutrition experimental model;  
31 complementary feeding; functional barrier of the intestinal epithelium; body  
32 composition.

**Abbreviations:**

HAZ: height-for-age Z-score

LM: lactulose:mannitol ratio

MAL-ED: Malnutrition-Enteric Diseases

UNDERNOU: Undernourished

33 **INTRODUCTION**

34 Undernutrition in the first years of life is a serious health problem because it is  
35 associated with an increased risk of mortality (1), a vicious cycle of clinical and  
36 subclinical enteric infections, impairment of physical and cognitive development,  
37 as well as chronic diseases in adult life (2, 3, 4, 5). Despite efforts to reduce  
38 cases of child malnutrition, the latest estimates show that about 149.2 million  
39 children under 5 years of age were affected by chronic undernutrition and 45.4  
40 million by acute undernutrition in 2019 alone (6). Furthermore, it is estimated  
41 that the socioeconomic crisis caused by the COVID-19 pandemic will trigger a  
42 chronic impact on the number of children affected by stunting in the coming  
43 years (7).

44 Studies point out that the introduction of complementary feeding, necessary to  
45 meet the energy demand exceeding what is provided by breast milk, increases  
46 the risk of child malnutrition (8, 9). Evidence suggests that much of the  
47 malnutrition in low- and middle-income countries stems from nutritional  
48 deficiencies in complementary diets (10). However, the quantification of  
49 nutrients in children's complementary diets and their association with childhood  
50 malnutrition is quite scarce in the literature (11, 12, 13, 14, 15), directly  
51 reflecting on experimental undernutrition diets.

52 There are only three diets based on the dietary composition of specific  
53 populations: regional basic diet (RBD), which mimics the food composition of  
54 the Brazilian semi-arid region (16); the Vegetable Maize diet, which was based  
55 on the predominant foods of Malawian children with Kwashiorkor (17); and the  
56 M8, a diet based on the foods most consumed by the population of Malawi (18).  
57 These three experimental diets are based only on the most predominant foods  
58 in the diet of these populations, having as a limitation the lack of representation  
59 of the amount of energy, macronutrients and micronutrients consumed by the  
60 child population. Furthermore, none of these diets are representative of the  
61 complementary feeding phase, a critical moment for infant nutrition.

62 A showed that morphological, functional and inflammatory alterations in the  
63 intestine seem to be responsible for the establishment of morbidities related to  
64 long-term undernutrition (19). Thus, understanding the intestinal alterations  
65 triggered by undernutrition may be the key principle for implementing more  
66 effective treatments. In this context, animal models have contributed to the  
67 understanding of the pathophysiology associated with different nutritional  
68 deficiencies (18, 20, 21, 22, 23). However, it is worth noting that even with the  
69 advances in the understanding of damage at the intestinal level, the preference  
70 for using experimental diets with protein restriction to study the functional  
71 intestinal epithelium limits the findings and may not reflect child undernutrition  
72 (19).

73 Thus, this study aimed to formulate a new undernutrition diet, the MAL-ED diet,  
74 based on a recent study that quantified the energy, macronutrients and  
75 micronutrients of the complementary diet of undernourished children from seven

76 countries of low socioeconomic power belonging to the cohort study of  
77 malnutrition and enteric infection - MAL-ED (11). Furthermore, this work also  
78 aimed to evaluate the impact of this new experimental diet on the functional  
79 intestinal epithelium of C57BL/6 mice. We hypothesized that the new MAL-ED  
80 diet induces a clinical picture of undernutrition in newly weaned mice, negatively  
81 impacting the morphology and function of the intestinal epithelium. Thus, this is  
82 the first murine model of undernutrition aiming to mimic the common nutritional  
83 deficiencies in undernourished children during complementary feeding.

#### 84 **METHODS**

##### 85 **Animals and ethics committee**

86 Male C57BL/6 mice ( $n= 11/group$ ) were obtained from the Sectorial Animal  
87 Facility of the Department of Physiology and Pharmacology at the Federal  
88 University of Ceará (UFC). These mice were housed in a controlled  
89 environment with a 12/12-hour light/dark cycle, a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , and  
90 were provided with water "ad libitum." The quantity of their diet was controlled  
91 daily.

92 All procedures conducted on the mice were in accordance with the rules set  
93 forth by the National Council for the Control of Animal Experimentation  
94 (CONCEA) and were submitted for approval by the Ethics in Animal Use  
95 Committee (CEUA) at the Federal University of Ceará (protocol number  
96 3941290319).

##### 97 **Diets**

98 The formulation of the new malnutrition-inducing diet, MAL-ED, was based on  
99 the quantification of the complementary diet of children with and without  
100 undernutrition in the multicenter cohort study "Etiology, Risk Factors and  
101 Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for  
102 Child Health and Development (Malnutrition-Enteric Diseases; MAL-ED)," as  
103 described by Maciel et al. (11).

104 The quantification of the complementary diet involved collecting dietary records  
105 of the last 24 hours from 1,463 children living in urban, peri-urban, and rural  
106 areas of seven countries with low socioeconomic status. These countries

107 included Bhaktapur, Nepal ( $n = 229$ ); Dhaka, Bangladesh ( $n = 208$ ); Fortaleza,  
108 Brazil ( $n = 169$ ); Haydom, Tanzania ( $n = 210$ ); Loreto, Iquitos, Peru ( $n = 199$ );  
109 Venda, South Africa ( $n = 221$ ); and Vellore, India ( $n = 227$ ).

110 Maciel et al. (22) quantified the consumption of energy, macronutrients, fibers,  
111 six vitamins (niacin, riboflavin, thiamine, folate, and vitamins A and C), and six  
112 minerals (calcium, iron, magnesium, potassium, phosphorus, and zinc) in the  
113 children's complementary diet. To formulate the new undernutrition diet, we  
114 used the percentage difference in energy, macronutrients, fiber, and zinc  
115 consumption between children with undernutrition (HAZ < -2, stunting) and  
116 those without undernutrition at 24 months of age.

117 To ensure that the new undernutrition diet had the appropriate dietary pattern  
118 for rodents, we used the standard diet for rodents, AIN93-M control diet, as a  
119 basis. The formulation and production of both the MAL-ED and control (AIN-  
120 93M) diets were carried out by Rhoster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo,  
121 Brazil).

122 The centesimal composition of the new malnutrition diet was evaluated using  
123 various methods, including dumas, loss on drying, gravimetry, and atomic  
124 absorption, conducted by the company CBO® (Valinhos, São Paulo, Brazil).  
125 These methods collectively allowed for the quantification of moisture, volatiles,  
126 crude protein, ether extract by acid hydrolysis, crude fiber, calcium, phosphorus,  
127 zinc, and the estimation of carbohydrate content based on the difference in the  
128 percentages of macronutrients.

### 129 **Experimental Design**

130 The new murine model of undernutrition followed the protocol established by  
131 Brown et al. (24) with some adaptations. Male C57BL/6 mice, aged 21 days,  
132 underwent measurements of body weight and total length before being  
133 randomly assigned to either the Control group (AIN93-M diet) or the  
134 Undernourished group (MAL-ED diet). The diet consumption protocol extended  
135 for 28 days to observe the temporal effects of the diet on various body  
136 parameters and the intestinal epithelial barrier. Daily control was exercised over  
137 feed consumption to ensure that the undernourished group consumed the same  
138 amount as the control group. Body weight measurements were taken daily,



139 while water consumption was measured every two days. Additionally, every  
140 seven days, the animals underwent evaluations regarding their body  
141 development and body composition. On days 7 and 28, the animals received  
142 intramuscular anesthesia using ketamine hydrochloride (90 mg/kg) and xylazine  
143 hydrochloride (10 mg/kg). Blood and intestinal tissue were collected for further  
144 analysis, and finally, the animals were euthanized by *exsanguination*.

#### 145 **Assessment of body development**

146 The body length of the animals was measured on days 0, 7, 14, 21 and 28 to  
147 assess the body development. For this, the mice were briefly anesthetized with  
148 isoflurane (Cristália®, São Paulo, Itapira) (25), then they were positioned on a  
149 flat surface, aligned and body length was measured with the aid of a digital  
150 caliper (Mitutoyo® Precision Measuring Tools, Suzano, São Paulo, Brazil).

#### 151 **Body composition analysis**

152 Mice underwent body assessment by tetra polar bioimpedance (ImpediVET®,  
153 Carlsbad, California, USA) on days 0, 7, 14, 21 and 28. Mice were  
154 anesthetized, as mentioned, and placed under a non-conducting surface with  
155 the limbs arranged perpendicularly to the body and the tail extended distally.  
156 Four needles (25x12 gauge) were inserted into the subdermal region along the  
157 dorsal midline. The central electrodes were inserted between the ears and  
158 between the hind legs, while the peripheral electrodes were inserted between  
159 the eyes and on the tail, as specified by the manufacturer. The needles were  
160 connected to electrodes attached to the device. The length of the animal  
161 between the central electrodes was measured and recorded in the equipment,  
162 as well as the animal's body weight. Then, the electric current was activated  
163 and the bioimpedance parameters of resistance and reactance were obtained  
164 by a single spectrum of 4 to 1 MHz in a series of 256 points. Finally, the device  
165 uses a complex impedance graph to determine total body water, extracellular  
166 fluid, and intracellular fluid, while fat free mass, fat mass, and body mass index  
167 are calculated in the device's software (ImpediVET®, Carlsbad, California,  
168 USA) (26). Total body water was normalized by weight and expressed as a  
169 percentage.

#### 170 **Morphometric and histopathological analysis**

171 Samples from the duodenum, jejunum and ileum were transversely sectioned  
172 and fixed in 10% formaldehyde buffer for 18 h. After the fixation period, the  
173 material was dehydrated, embedded in paraffin, cut into 5.0  $\mu\text{m}$  sections using  
174 an impact microtome (Polycut S, Leica, Germany) and stained with hematoxylin  
175 and eosin. Subsequently, with the aid of an optical microscope coupled to the  
176 image acquisition system (LEICA) and ImageJ software version 1.5a (National  
177 Institutes of Health, USA) the areas of all the villi and corresponding crypts were  
178 measured for each slide of the group (minimum of 10 villi and 10 corresponding  
179 crypts per slide), in order to analyze the acute and chronic impact of the MAL-  
180 ED diet on intestinal morphometry.

181 For histopathological analysis, possible lesions were analyzed according to the  
182 inflammatory infiltrate severity score system suggested by Erben et al. (27) with  
183 some adaptations. Severity criteria were as follows: **score 0** indicated normal  
184 histological findings with less than 10% leukocytes in the mucosa; **score 1**  
185 indicated mild findings with 10 - 25% leukocytes in the mucosa and edema in  
186 villi; **score 2** indicated moderate findings with 26 – 50% leukocytes in the  
187 mucosa, submucosa, and edema; **score 3** indicated severe findings with > 51%  
188 transmural leukocytes and edema. The histopathological analysis was  
189 performed by a pathologist and conducted on all segments of the small intestine  
190 collected at days 7 and 28.

#### 191 **Assessment of the intestinal epithelial barrier**

192 An experimental group was exclusively conducted to assess the intestinal  
193 epithelial barrier using the lactulose and mannitol test, so that the conditions  
194 required for the test would not interfere with the other analyses. The animals  
195 underwent a period of adaptation to the collection environment, which consisted  
196 of remaining in metabolic cages 2h/day for 5 days before administration of the  
197 lactulose and mannitol solution. In the last 24 hours before the test, all animals  
198 remained full time in the metabolic cages. During these 24 hours, the animals  
199 were fed an isocaloric G diet for 16 hours (Rhooster®, São Paulo, Brazil), a low-  
200 carbohydrate diet, and fasted for 8 hours, to prevent dietary carbohydrates from  
201 interfering with the subsequent analysis. After fasting, all animals received 200  
202  $\mu\text{l}$  of the solution by gavage, containing 5.0 g of Lactulose (Duphar

203 Laboratories, Southampton, United Kingdom) and 1.0 g of Mannitol (Henrifarma  
204 Chemicals and Pharmaceuticals LTDA, São Paulo, Brazil) dissolved in 20 ml of  
205 water. Urine samples were collected for a period of 24 hours after test solution  
206 administration and preserved in 0.236 mg/ml chlorhexidine (Sigma Chemical, St  
207 Louis, MO). The animals remained consuming the isocaloric G diet during the  
208 collection period. Sample volumes were recorded and centrifuged at 10,000  
209 rpm for 3 min, then 50  $\mu$ l of each sample was added to 50  $\mu$ l of an internal  
210 standard solution (3.6 mM of melibiose diluted in 2.9 ml of water distilled). The  
211 solution was centrifuged (10,000 rpm for 3 min) again and 50  $\mu$ l was used for  
212 sugar determination. Two standard carbohydrate solutions were used to  
213 calibrate the system at baseline and between tests for each group. The  
214 standards contained 60  $\mu$ M of the following sugars: glucosamine, mannitol,  
215 melibiose and lactulose (group I) and inositol, sorbitol, glucose and lactose  
216 (group II). Sugar standard curves and samples were measured by high  
217 pressure liquid chromatography with pulsed amperometric detection in the  
218 UltiMate 3000 equipment (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, USA), as  
219 previously described (28).

#### 220 **Analysis of serum albumin levels**

221 Albumin levels were measured using the Labteste® dosage kit (Lagoa Santa,  
222 Minas Gerais, Brazil). We prepared the samples according to the  
223 manufacturer's instructions: sample (10  $\mu$ l of serum plus 1.0 ml of color  
224 reagent), blank (1.0 ml of color reagent) and standard (10  $\mu$ l of standard plus  
225 1.0 ml of color reagent). The solutions were lightly mixed, and after 2 min,  
226 readings were performed using the 630 nm wavelength spectrum in a  
227 Labquest® spectrophotometer (Oregon, USA).

#### 228 **Evaluation of baseline electrophysiological parameters and during** 229 **challenge with glutamine, alanyl-glutamine and glucose by Ussing** 230 **Chamber**

231 The Ussing chamber system provides a valuable, proven, and widely used  
232 method for measuring the transport of electrolytes, nutrients, and drugs across  
233 epithelial tissues. The entire experimental procedure followed as described by  
234 Soares (29). For this, the animals were anesthetized as described in the

235 experimental design topic, jejunal samples were collected and then dissected to  
236 remove the serosa. The mucosa was then attached to the hemichambers,  
237 which, in turn, were connected to the BIC automatic voltage clamp model #AVC  
238 – 300 (Buck & Co. Inc. Franklin, Massachusetts, United States) through salt  
239 bridges coupled to electrodes. The system keeps the tissue at 37.8°C, aerated  
240 with a carbogenic mixture (95% oxygen and 5% carbon dioxide) and filled with a  
241 Krebs-Mannitol solution on the mucosal side and Krebs-Glucose on the serous  
242 side. By fixing voltage and electrical current, we measured the basal Potential  
243 Difference (DP), Transepithelial Resistance (RT) and Short Circuit Current  
244 (CCC) for a period of 120 min without adding any substance (basal response)  
245 or during the challenge with increasing concentrations (7 mM, 20 mM, 70 mM  
246 and 200 mM) of glucose (Merck, Darmstadt, Germany), L-glutamine (Sigma-  
247 Aldrich, San Luis, Missouri, USA) and L-alanyl-glutamine (Rexim SA,  
248 Courbevoie, France). After the experimental protocol, a viability test was  
249 performed with 250 mM of theophylline (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri,  
250 USA) and then with glucose (5 mM/ml), to confirm tissue responsiveness at the  
251 end of the protocol.

#### 252 **Evaluation of gene transcription of tight junctions and intestinal** 253 **transporter proteins**

254 Gene transcription of the zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, claudin-1,  
255 claudin-2, claudin-15, peptide transport 1 (PEPT-1), SGLT-1 FATP4, and  
256 FATCD/36 was determined by quantitative reverse transcription-polymerase  
257 chain reaction (qRT-PCR). The reference gene for normalization was 18S. For  
258 this, total RNA was extracted by the Trizol method (Thermo Fisher Scientific,  
259 Waltham, Massachusetts, USA) from the jejunal mucosal scraping. Then, 1 µg  
260 of the total isolated RNA was used for cDNA synthesis using the GoScript™  
261 Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), according  
262 to the manufacturer's instructions. For the qRT-PCR reaction, 7.5 µL of GoTaq®  
263 qPCR Master (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 2.4 µL of each primer (0.8  
264 mM), and 1.0 µL of cDNA from samples were used, and nuclease-free water  
265 was added to an end volume of 20 µL. The sequences and annealing  
266 conditions obtained from the National Center for Biotechnology Information  
267 website for each investigated gene are listed in **Supplementary Table 1**. The

268 data obtained were based on the values of the threshold cycle, in which the  
269 observed fluorescence was 10 times greater than the baseline fluorescence for  
270 each qPCR assay. All amplifications were evaluated for the melting curve,  
271 performed to ensure the specificity of the amplification, and to detect the  
272 formation of initiator dimers or any other non-specific product. From the values  
273 of the quantitative cycle (Cq/Ct), the relative levels of RNA were calculated  
274 according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (30).

#### 275 **Evaluation of relative protein expression of tight junctions and intestinal** 276 **transporter proteins**

277 The investigation of protein expression of tight junctions and transporters  
278 involved in the regulation of the intestinal barrier was carried out using Western  
279 Blotting. Jejunal mucosal scraping from the animals were homogenized in RIPA  
280 buffer (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, USA) with protease inhibitor  
281 (1 mL inhibitor: 100 mL RIPA) and centrifuged at 10000 rpm for 10min. The total  
282 amount of protein in each sample was measured using the Pierce™ BCA  
283 protein assay kit (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, USA). Samples  
284 (50 µg of protein) were prepared by adding Laemmli buffer (Bio-Rad, California,  
285 USA) with β-mercaptoethanol (Bio-Rad®, California, USA), denatured at 99°C  
286 for 5 min. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
287 (8-10% for SGLT-1, PepT-1 and occludin; 15% for claudin-1 and -2), transferred  
288 to nitrocellulose membrane, blocked with 5% bovine serum albumin for 1 h and  
289 incubated with primary rabbit antibody: anti-actin (1:1000), anti-PEPT-1 (1:200),  
290 anti-occludin (1:1000), anti-claudin-2 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology®,  
291 Texas, USA) and anti-claudin-15 (1:200) (Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
292 Massachusetts, EUA). The membranes were then incubated for 1.5 hours with  
293 the secondary antibody and subsequently revealed using the Clarity Western  
294 ECL Substrate kit (Bio-Rad®, California, USA) and the ChemiDoc system (Bio-  
295 Rad, California, USA). Densitometric quantification of the bands was analyzed  
296 using ImageJ version 1.5a (National Institutes of Health, USA).

#### 297 **Metabolome**

298 *NMR experiments and identification of metabolites*

299 For the acquisition proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra, 150  
300  $\mu$ L urine was mixed with 400  $\mu$ L of D<sub>2</sub>O phosphate buffer (pH = 7.4) containing  
301 1 mM trimethylsilyl propionic acid (TSP-d<sub>4</sub>) and 3 mM NaN<sub>3</sub> (31). A 550  $\mu$ L  
302 portion of the resulting solution was transferred into 5 mm NMR tube. All NMR  
303 spectra were recorded at 293 K using an Avance III HD spectrometer operating  
304 at a <sup>1</sup>H frequency of 500.13 MHz, equipped with 5 mm probe. <sup>1</sup>H NMR spectra  
305 were acquired by using a water suppression pulse sequence, NOESYPR1D  
306 (Bruker library), using 64 K data points over a 20 ppm spectral width averaged  
307 over 32 transients. A recycle delay of 15 s and mixing delay of 100 ms were  
308 used, the later to help reduce the water signal through T<sub>1</sub> relaxation and  
309 chemical exchange. The saturation of water signal was achieved by irradiating  
310 during recycle and the NOE mixing delay at the H<sub>2</sub>O/HOD NMR frequency. The  
311 shimming, tuning, matching and pulse width were carefully adjusted for each  
312 sample. FIDs were Fourier transformed with line broadening (LB) = 0.3 Hz. The  
313 resulting spectra were manually phased and baseline corrected, and referenced  
314 to the TMS resonance (methyl groups) at 0.0 ppm. The assignment of <sup>1</sup>H and  
315 <sup>13</sup>C NMR spectra was obtained using two-dimensional experiments (HMBC  
316 <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H), the literature data (32, 33), the Chenomix NMR Suit software version  
317 8.4 (using pH = 7,4) and the Spectral Data Base for Organic Compounds –  
318 SDBS site from the National Institute of Advanced Industrial Science and  
319 Technology - AIST ([https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre\\_index.cgi](https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/cre_index.cgi)).

#### 320 *Multivariate Analysis*

321 Absolute areas of metabolites identified were normalized to creatinine and  
322 organized in a matrix with 32 samples (lines) and 7 variables (columns). PLS-  
323 DA analysis was done with Pareto scaling. To check the validity of the model a  
324 10-fold cross-validation method was applied and Q<sub>2</sub> and R<sub>2</sub> calculated (34).  
325 The model with three latent components offered Q<sub>2</sub>, R<sub>2</sub>, and accuracy values of  
326 0.761, 0.665 and 93.3%, respectively. A permutation test, and additional cross-  
327 validation tool, also was carried out for PLS-DA model with 2000 permutations.  
328 Permutation analysis showed Q<sub>2</sub> values of the original model higher than from  
329 permutation method, then the model had higher predictive ability.

#### 330 *Metabolites quantification*

331 The quantification of metabolites was performed on the original spectra data  
332 through internal method, using TSP-d (1mM) as the internal reference. The  
333 concentration of metabolites was normalized to each urine sample's  
334 corresponding creatinine value to compensate for variations in urine volume  
335 (results were expressed as M/M creatinine) (31, 35). For normalizing the data,  
336 the multi-integration tool-kit of AMIX-viewer (Bruker BioSpin, Rheinstetten,  
337 Germany) was employed. The results were evaluated using Welch's t and  
338 Mann-Whitney tests, according to normality of the data. Metabolite contents  
339 with p-values < 0.05 were considered significantly different. SPSS 21.0 software  
340 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used to perform univariate analysis.

#### 341 **Statistical analysis**

342 The collected data were entered into a Microsoft Excel® spreadsheet version  
343 15/Office 2013 (Remond, Washington, USA) and double-checked to validate  
344 data entry. Data were assessed for normality using the Kolmogorov-Smirnov  
345 test. The normalized parametric data were analyzed by the t test or analysis of  
346 variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test, when the data were  
347 paired. Non-parametric data, in turn, were analyzed using the Mann-Whitney  
348 test. All tests were applied using the GraphPad Prism® software (California,  
349 United States). Results were represented by mean ± standard error of mean  
350 (SEM) or median and interquartile range (Q1-Q3), when indicated. For the tests  
351 performed, p values lower than 0.05 were considered significant.

#### 352 **Results**

##### 353 **Composition of the MAL-ED diet**

354 Compositional analysis revealed that the new MAL-ED undernutrition diet  
355 presented -8.03% energy, -37.46% protein, -24.20% fat, -10.83% zinc, +5.93%  
356 carbohydrate and +45.17% fiber compared to the control diet (**Table 1**). The  
357 ingredients and their respective amounts for formulating the diets are also  
358 specified in **table 1**.

##### 359 **Induction of malnutrition by the new MAL-ED diet**

360 Consumption of the MAL-ED diet ad libitum for 28 days did not significantly  
361 change ( $p > 0.05$ ) the weight and weight gain of the animals in comparison to

362 the control diet. This lack of change occurred despite the fact that the  
363 consumption of feed on the MAL-ED diet was approximately 8 to 29 g greater  
364 than the consumption of the control feed, as illustrated in **Supplementary**  
365 **Figure 1A, 1B, and 1C**, respectively. However, when consumption of the MAL-  
366 ED diet was restricted to the same amount consumed as the control diet, a  
367 significant reduction ( $p < 0.05$ ) was observed in body parameters (**Figure 1**).

368 By controlling daily consumption of the MAL-ED experimental diet, we observed  
369 a significant reduction in the daily weight of animals in the undernourished  
370 group compared to the control group from the second experimental period  
371 onwards (Control  $19.12 \pm 0.56$  g vs. Undernourished  $17.11 \pm 0.56$ g) (**Figure**  
372 **1A**). Weight gain was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) from the first day of  
373 undernutrition (Control  $-6.63 \pm 0.28\%$  vs. Undernourished  $-8.55 \pm 0.56\%$ ),  
374 remaining reduced until the 28th day (Control  $27.47 \pm 2.27\%$  vs.  
375 Undernourished  $12.49 \pm 2.46\%$ ) (**Figure 1B**). Consumption of the MAL-ED diet  
376 also caused a significant difference ( $p < 0.05$ ) in body growth when compared to  
377 the control group on day 28 (**Figure 1C**).

378 Water consumption was slightly higher in undernourished animals in the first 6  
379 days, but it was significant ( $p < 0.05$ ) only on day 2 (**Figure 1D**). When analyzing  
380 serum albumin concentrations, we did not identify a significant difference ( $p >$   
381  $0.05$ ) between the control and undernourished groups on days 7 and 28 (**Figure**  
382 **1E**). A representative image of the global effects triggered by chronic  
383 consumption of the MAL-ED diet in animals can be seen in **Figure 1F**.

#### 384 **Impact of the MAL-ED diet on body composition**

385 Intake of the MAL-ED diet did not alter ( $p > 0.05$ ) the total body water of the  
386 animals at the evaluated times (**Figure 2A**). However, we identified a significant  
387 reduction ( $p < 0.05$ ) of extracellular fluid in the undernourished group compared  
388 to the control group on days 7, 14, 21 and 28 (**Figure 2B**), while the intracellular  
389 fluid reduced significantly ( $p < 0.05$ ) in the undernourished group compared to  
390 the control only on days 14 and 21 (**Figure 2C**).

391 Regarding body mass, consumption of the MAL-ED diet resulted in a significant  
392 reduction ( $p < 0.05$ ) of fat-free mass on days 7, 14, 21 and 28 (**Figure 2D**). On  
393 the other hand, the new diet compromised fat reserves only in a later period,



394 with a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of 16.36% and 25.37% in the  
395 undernourished group in relation to the control on days 21 and 28, respectively  
396 (Figure 2E). Body mass index was also significantly reduced ( $p < 0.05$ ) only on  
397 day 28 (Control  $4.94 \pm 0.13$  g/cm<sup>2</sup> vs. Undernourished  $4.5 \pm 0.09$  g/cm<sup>2</sup>)  
398 (Figure 2F).

399 **Acute to chronic impact of MAL-ED diet consumption on total small bowel**  
400 **size, morphometry and histopathology**

401 When analyzing the total length of the small intestine, we did not observe any  
402 significant change ( $p > 0.05$ ) in the total size of the intestine for the time of seven  
403 days (Figure 3A), however the total length of the intestine was about 7.26%  
404 greater ( $p = 0.013$ ) in undernourished animals when compared to the control on  
405 day 28 (Figure 3B).

406 The morphometric analysis in the acute period, in turn, revealed that the MAL-  
407 ED diet triggered a reduction in the area of villi in undernourished animals in the  
408 duodenum (-34.37%) and jejunum (-41.37%), while the area of the villi in the  
409 ileum were 23.72% larger ( $p < 0.0001$ ) when compared to controls (Figure 4A).  
410 On the 28th day of induction of undernutrition, on the other hand, we identified  
411 that the area of the villi was significantly ( $p < 0.0001$ ) larger in the duodenum  
412 (276.38%) and ileum (27.84%) of undernourished mice when compared to the  
413 control (Figure 4B). However, the area of villi in the jejunum of undernourished  
414 animals was 13.52% smaller ( $p < 0.001$ ) compared to controls at the same time  
415 evaluated (Figure 4B). Crypt area, on the other hand, was significantly smaller  
416 in the duodenum (24.31%) and larger in the ileum (12.42%) on day 7, without  
417 generating significant changes ( $p = 0.243$ ) in the jejunum (Figure 4C). On the  
418 28th day, the crypt areas were larger ( $p < 0.0001$ ) in all segments of the  
419 undernourished animals compared to the controls (Figure 4C).

420 The analysis of the histopathological scores did not show significant alterations  
421 ( $p > 0.05$ ) in any segment when comparing the undernourished animals with the  
422 controls (Table 2). The most important findings are the presence of edema in  
423 the villi, but we did not observe a significant difference ( $p > 0.05$ ) between the  
424 groups. Representative images of the duodenum, jejunum and ileum of  
425 undernourished and control animals on days 7 and 28 can be seen in figure 5.

**426 Assessment of intestinal epithelial barrier integrity**

427 Ingestion of the MAL-ED diet triggered a significant increase ( $p=0.011$ ) of  
428 103.9% in paracellular permeability compared to ingestion of the control diet in  
429 the acute period (Figure 6A). The increase in the lactulose excretion rate  
430 remained higher in the chronic period, being on average 348.1% higher ( $p=$   
431  $0.0007$ ) in undernourished animals compared to the control (Figure 6A).  
432 Regarding the total absorptive area, there were no significant changes ( $p>0.05$ )  
433 in the acute period, however, a significant increase ( $p=0.0012$ ) of 28.19% was  
434 registered in the undernourished animals in relation to the controls on day 28  
435 (Figure 6B). Consumption of the MAL-ED diet caused damage to the integrity  
436 of the intestinal barrier on day 7, with a significant increase ( $p=0.022$ ) in the  
437 lactulose:mannitol ratio in undernourished animals compared to the control  
438 (Figure 6C). However, no significant changes ( $p=1.014$ ) in the  
439 lactulose/mannitol ratio were observed between groups at day 28 (Control:  
440 0.279, 0.312-0.592 vs. Undernourished: 0.222, 0.474-0.697) (Figure 6C).

**441 Basal ion transport response and during absorption of glutamine, alanyl-  
442 glutamine and glucose after acute consumption of the MAL-ED diet**

443 When evaluating the baseline short-circuit current (CCC), potential difference  
444 (DP) and transepithelial electrical resistance (TR), we identified that the  
445 baseline CCC and RT of the undernourished group remained relatively higher  
446 ( $p>0.05$ ) to the control group throughout the experimental period (Figure 7A  
447 and 7B, respectively), with similar baseline RT ( $p>0.05$ ) between groups  
448 throughout the experimental period (Figure 7B). The PD, on the other hand,  
449 was higher ( $p>0.05$ ) than the control group in the initial times and very similar  
450 in the final time (Figure 7C). There was no significant difference ( $p>0.05$ ) for  
451 any evaluated parameter.

452 By adding increasing concentrations of glutamine, alanyl-glutamine and glucose  
453 in the jejunum, we identified that animals undernourished for seven days did not  
454 show different responses ( $p>0.05$ ) compared to controls in the values of  $\Delta$ CCC,  
455 PD and RT (Figure 8), with the exception of a lower resistance ( $p<0.05$ ) in the  
456 dose of 70mM of glucose in the undernourished animals (Figure 8C). The data  
457 were evaluated for the Hill coefficient, but we did not find coefficients close to

458 1.0 as expected. In this sense, EC50 and maximum response calculations were  
459 not evaluated.

460 **Levels of intestinal transporter transcripts and tight junctions after acute**  
461 **consumption of the MAL-ED diet**

462 Consumption of the MAL-ED diet for an acute period triggered changes in the  
463 levels of FATCD/36 transcripts (Figure 9D). There was a significant increase  
464 ( $p=0.022$ ) of 384% in the levels of FATCD/36 transcripts in the jejunum of  
465 undernourished animals compared to control animals on day 7 (Figure 9D).  
466 When evaluating the transcribed levels of SGLT-1, PEPT-1, FATP4 and CFTR,  
467 there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the control and  
468 undernourished groups (Figure 9A, 9B, 9C and 9E, respectively). The  
469 transcribed levels of claudin-1, -2, -15, occludin and ZO-1 also showed no  
470 significant difference ( $p > 0.05$ ) between the control and undernourished groups,  
471 as can be seen in figure 9F, 9G, 9H, 9I and 9J, respectively.

472 **Protein expression of intestinal transporters and tight junctions after**  
473 **acute consumption of the MAL-ED diet**

474 When we evaluated protein expression, we identified that claudin-2, -15 and  
475 occludin levels did not differ significantly ( $p > 0.05$ ) between groups (Figure 10A,  
476 10B, 10C, respectively). PEPT-1 levels were also unchanged ( $p > 0.05$ ) between  
477 groups (Figure 10D).

478 **Metabolite profile after consumption of the MAL-ED diet**

479 Samples from the seven-day experiment did not show differences in chemical  
480 profiles. So, multivariate analysis was performed only in the twenty-eight-day  
481 experiment. Seven metabolites were identified, as described in Table 3. PLS-  
482 DA score depicted in Figure 11 showed control samples grouping mostly on the  
483 negative side of components 1 and 2, while undernourished samples can be  
484 found spread all over the other quadrants. The loading plot revealed  
485 dimethylamine, lactate, succinate, betaine, and pyruvate as responsible for  
486 control samples grouping and undernourished samples characterized by taurine  
487 and formate. Only taurine and dimethylamine had VIP (variable importance in  
488 the projection) values higher than one, so they can be considered discriminant

489 variables. Average dimethylamine contents (mM/mM of creatinine) reached  
490  $0.16 \pm 0.04$  and  $228.39 \pm 58.54$  for control and undernourished samples,  
491 respectively, while the average taurine contents were  $4.40 \pm 0.63$  and  
492  $3.73 \pm 1.25$  for control and undernourished samples. Statistical analysis showed  
493 that, except for formate and betaine, the metabolite contents were statistically  
494 different between the groups studied (Table 3).

#### 495 DISCUSSION

496 The present study developed, in an innovative way, a new undernutrition-  
497 inducing diet for an *in vivo* model representative of the complementary feeding  
498 of undernourished children from seven countries of low socioeconomic status.  
499 This diet was able to rapidly reduce weight and weight gain, compromise body  
500 energy reserves, impacting late-term growth, without causing edema. At the  
501 intestinal level, the MAL-ED diet triggered blunting of the villi area in the  
502 duodenum and jejunum, increased paracellular permeability, with an indication  
503 of damage to the barrier function of the intestinal epithelium associated with  
504 increased levels of FATCD/36 transcripts in the jejunum in acute period. In a  
505 chronic period, consumption of the MAL-ED diet resulted in an increase in the  
506 total intestinal area, establishing an important adaptation of the intestinal  
507 epithelium.

508 Most *in vivo* models used diets with drastic changes in a given macronutrient,  
509 micronutrient or energy. For example, protein deficiency models used diets with  
510 0% (36), 0.7% (37), 2% (20), 4% (38, 39) and 7% protein (24) to induce  
511 undernutrition, while experimental models of zinc deficiency used diets with less  
512 than 2 ppm of zinc (21, 40) and models of energy deficiency used diets with -15  
513 to -50% energy compared to the control group (20, 41, 42).

514 Experimental diets based on foods most consumed by undernourished children  
515 or low-income populations in certain regions of the world, such as the vegetable  
516 corn diet (16), the M8 (17) and the DBR (15), also have a high protein  
517 deficiency (~ -65%), lipids (-50 to -90%), fibers (-56 to -53.6%) and are rich in  
518 carbohydrates (+35 to +37%). However, children with undernutrition, acute  
519 undernutrition, and chronic undernutrition have been shown to have less  
520 exorbitant macronutrient, micronutrient, and energy deficiencies in their diets  
521 than experimental diets (11).

522 The amount of protein in the complementary diet of undernourished children  
523 from seven different countries varied only from -2.0 to -6.6% in relation to the  
524 diet of healthy children (11). Zinc deficiency, on the other hand, ranged from -  
525 2.3 to -8.6% and energy intake ranged from 11.2 to -25.9% in the same  
526 population (11). Furthermore, both zinc deficiency and increased fiber have  
527 been linked to chronic undernutrition in children at 24 months of age (11). In this

528 sense, the new undernutrition-inducing MAL-ED diet with its moderate  
529 deficiency in energy, protein, lipids and zinc and moderate increase in  
530 carbohydrates and fiber better represent better the population of  
531 undernourished children undergoing complementary feeding.

532 Consumption of the MAL-ED diet caused clinical symptoms of undernutrition in  
533 newly weaned animals when the diet was controlled daily. There was an early  
534 weight loss and weight gain, triggering changes in body composition and  
535 impaired growth in the late period. Changes in body parameters are the first  
536 clinical signs of undernutrition. Weight reduction, weight gain, and impaired  
537 growth in the present study corroborate other models of nutritional deficiency,  
538 which report weight change and/or weight gain in the first week of induction (15,  
539 24, 43) and less growth in a chronic period (18, 24).

540 Body composition analysis also emerges as an important tool for assessing  
541 nutritional status, however it is little explored *in vivo* models. Ribeiro et al. (42)  
542 verified that RBD-induced undernutrition in newly weaned animals led to an  
543 early reduction in total body water, extracellular fluid and energy reserves, while  
544 intracellular fluid reduced only in an intermediate time and no changes in body  
545 mass index were identified. A similar response was observed in the present  
546 study, however, intake of the MAL-ED diet rapidly reduced protein reserves and  
547 only in a chronic period did it compromise fat reserves.

548 In general, the metabolism of several organs in undernutrition is sustained  
549 mainly by the mobilization of fat, with protein reserves being activated only  
550 when energy and protein consumption is insufficient to maintain protein  
551 metabolism (44). However, one study highlighted those pathological conditions  
552 such as infection and inflammation may require increased demand for amino  
553 acids, which in turn increase protein catabolism, reducing protein stores more  
554 rapidly (45). These factors may have first increased the catabolism of the  
555 protein reserves of the undernourished animals in this study, since  
556 undernutrition is associated with dysbiosis (24) and increased systemic  
557 inflammation (46, 47, 48, 49), however further studies are needed to confirm  
558 this hypothesis.

559 Changes in the function and morphology of the intestinal epithelium are  
560 common during undernutrition, more specifically villous atrophy and disruption  
561 of the barrier function of the intestinal epithelium (24, 43, 50, 51). Our results  
562 corroborate the literature, especially in the acute period, when we observe a  
563 reduction in the area of villi in the duodenum and jejunum, increase in intestinal  
564 permeability and damage to the integrity of the barrier function of the intestinal  
565 epithelium. However, contrary to expectations, we observed an increase in the  
566 total intestinal area in the chronic period.

567 The increase in intestinal area occurred together with the absence of changes  
568 in the L:M ratio, depletion of fat reserves and the reestablishment of intracellular

569 fluid in undernourished animals in the chronic period. A recent study suggested  
570 that intestinal function during longer periods of consumption of a multideficient  
571 diet is maintained even after identifying damage to the integrity of the intestinal  
572 epithelium in an intermediate period (42). Furthermore, an important review  
573 suggested that maintaining the function of organs that acquire energy and  
574 nutrients is essential for survival during undernutrition or famine (52). Knowing  
575 that intracellular fluid is related to oxygen consumption, caloric requirements,  
576 basal metabolic rate and work performance (53), fat reserve depletion may  
577 have helped in the reestablishment of intracellular fluid, maintenance of  
578 morphology and function of the intestinal epithelium in the present study.

579 Alterations in the intestinal immune system such as an increase in lymphocytes  
580 in the lamina propria (54), an increase in the activity of CD3+ T cells and  
581 macrophages (55) are also well reported in severe acute undernutrition in  
582 children. However, we did not observe changes in the inflammatory infiltrate in  
583 any intestinal segment evaluated either in the acute or chronic period. A recent  
584 review highlighted that the results in animal models are inconclusive regarding  
585 inflammatory cell infiltration in the intestinal submucosa (19), despite an in vivo  
586 model of severe protein undernutrition (2% protein) for 14 days have generated  
587 an increase in fecal inflammation biomarkers (21). Thus, inflammatory  
588 biomarkers seem to be more reliable to assess whether or not the immune  
589 system is activated in the **intestine**.

590 Regarding the intestinal electrophysiology, the MAL-ED diet did not change the  
591 CCC, RT, DP both basal and during cotransport of glucose and  
592 peptides/dipeptide. Studies show that undernutrition commonly causes an  
593 increase in basal CCC in the tissues of the jejunum and ileum (56, 57),  
594 indicating a secretory state (52), and increase in CCC when glucose is added to  
595 the mucosal side of the undernourished intestine (43, 56, 58), but these results  
596 are not observed in all experimental models of undernutrition.

597 Chronic caloric restriction (-70%) for 270 days was able to increase the  
598 intestinal transport of glucose, fructose and proline per mg of tissue, while  
599 caloric restriction for 24 days only increased fructose absorption (59). In  
600 addition, acute undernutrition by DBR decreased the basal CCC in the ileum of  
601 weanling mice (43) and when consumed for a chronic period, it did not change  
602 the basal short-circuit current in the jejunum (51). An experimental model of  
603 *Cryptosporidium parvum* showed that glutamine transport is compensated for  
604 by expression of the transporter in the crypts after villous blunting (60). In this  
605 sense, our results show maintenance of intestinal electrophysiology, even with  
606 the blunting of villi in the acute period in the jejunum.

607 In agreement with the electrophysiological results, we also did not observe  
608 alterations in the expression of PEPT-1 and SGLT-1 during acute  
609 undernutrition. Studies show that the expression of carbohydrate and protein  
610 transporters increases according to the amount of nutrients in the diet (59). For

611 example, high carbohydrate diets increase the levels of SGLT-1 transcripts,  
612 while PEPT-1 expression increases only when the diet is protein deficient (52).  
613 However, no work to date has identified changes in the expression of these  
614 transporters after consumption of a low-protein, high-carbohydrate diet (42, 43).  
615 This result suggests that even with the blunting of villi in the acute period, there  
616 is maintenance of glucose transporters and peptides, probably with the aim of  
617 maintaining adequate uptake of essential nutrients for survival, as suggested by  
618 Ferraris (59).

619 In addition, an important study showed that maternal-fetal protein restriction  
620 positively regulated cell proliferation in all intestinal segments and increased the  
621 abundance of SGLT-1, GLUT-2 and PEPT-1 transporters only in the duodenum  
622 of adult animals (61), suggesting a physiological adaptation to increase  
623 carbohydrate and peptide absorption in more proximal segments. Thus, the  
624 analysis of transporters in the other intestinal segments, mainly in the  
625 duodenum, are of great importance for a better understanding of the  
626 pathophysiology generated by the MAL-ED diet in the transport of nutrients.

627 In the gut, selective permeability is essential for physiological processes to be  
628 precisely regulated (62). Nutrient absorption, for example, depends on a  
629 complex system of tight-junction proteins. Claudin-2 and -15 demonstrated an  
630 important role in sodium feedback to the intestinal lumen, which ensures  
631 adequate absorption of carbohydrates, proteins and lipids (22). The role of tight  
632 junctions in undernutrition is complex and has shown variation in expression  
633 depending on the type of experimental model and intestinal segment evaluated  
634 (24, 43, 51). Our results show no changes in the expression of claudin-1, -2, -  
635 15, ZO-1 and occludin even with increased paracellular permeability in the  
636 acute period of consumption of the MAL-ED diet.

637 The paracellular flux of molecules larger than 0.6 nm, such as lactulose, occurs  
638 through the leak pathway, while molecules smaller than 0.6 nm are transported  
639 paracellularly through the pore pathway (62). The molecular structure of the  
640 leakage pathway is still poorly understood, but permeability appears to be  
641 regulated by occludin, tricellulin, ZO-1 and perijunctional actinomyosin (62). The  
642 increase in paracellular permeability in this study may be due to the response of  
643 other intestinal segments, as well as alterations in other proteins of tight  
644 junctions and adherent junctions that were not evaluated. For example, one  
645 study showed that lesions and disruption of the intestinal epithelial barrier of  
646 children with severe acute undernutrition were associated with reduced claudin-  
647 4 expression and lack of E-cadherin labeling, a protein of the adherent junction  
648 responsible for maintaining the integrity of the intestinal epithelium (63).

649 Another important finding in our work was the increase in the levels of  
650 transcripts of the FATCD/36 transporter, a transporter of long-chain fatty acids  
651 and cholesterol (64). Evidence shows that the metabolism of bile acids is  
652 altered in children with environmental enteropathy, a condition that generates

653 undernutrition (65). It is speculated that the transport of fatty acids may be  
654 altered in protein-energy undernutrition, but the expression of fatty acid  
655 transporters in undernutrition is little evaluated (66). The increase in FATCD/36  
656 mRNA levels in acute undernutrition by the MAL-ED diet may be indicative of a  
657 probable attempt to increase lipid uptake, with the aim of increasing energy  
658 uptake and maintaining homeostasis. More studies are needed to better  
659 understand the absorption of lipids in undernutrition.

660 Metabolomic analysis revealed that consumption of the MAL-ED diet in the  
661 chronic period was associated with increased dimethylamine and reduced  
662 taurine. Dimethylamine is one of the metabolites derived from choline  
663 degradation by the intestinal microbiota (67). In environmental enteropathy, the  
664 excretion of metabolites derived from the gut microbiota is usually reduced due  
665 to blunting of villi (68). In contrast, protein undernutrition in mice is reported to  
666 increase metabolites derived from the intestinal microbiota, including  
667 dimethylamine (21, 67). Recent work associated the increase in microbiota-  
668 derived metabolites with a concomitant reduction in choline, indicating that the  
669 intestinal microbiota increased choline metabolism after protein undernutrition  
670 (21). Furthermore, dimethylamine has been linked with inflammatory diseases  
671 (69), with systemic infection (70) and with non-survivors compared to survivors  
672 with septic shock (69). In this context, the exorbitant increase of dimethylamine  
673 in our model may be related to changes in the microbiota resulting from protein  
674 deficiency, which may indicate a systemic inflammatory state.

675 Taurine, on the other hand, is a nitrogenous compound that has several  
676 physiological functions in the body, including carbohydrate and lipid metabolism  
677 (71), anti-inflammatory action (72), antioxidant, increased muscle contraction,  
678 as well as playing an important role in the central nervous system, as a  
679 neurotransmitter (73). The low excretion of taurine in undernutrition animals  
680 may indicate metabolic dysfunction of the various body systems mentioned  
681 above, but measuring the systemic concentration in this case would be more  
682 indicated. The present study also observed a reduction in lactate, succinate and  
683 pyruvate after chronic consumption of the MAL-ED diet. These metabolites are  
684 part of energy and muscle metabolism (67), suggesting a possible reduction of  
685 these pathways in undernutrition animals.

686 Limitations of this study include the lack of analysis of undernutrition biomarkers  
687 such as anti-LPS IgA, zonulin, and intestinal fatty acid binding protein (I-FABP),  
688 which has been associated with childhood chronic undernutrition (46); as well  
689 as the absence of microbiota analysis to verify whether the new model  
690 generates dysbiosis, a condition associated with undernutrition (24). Analysis of  
691 baseline electrophysiological parameters in the portions of the duodenum, ileum  
692 and colon could also explain which segments contribute to the increase in  
693 paracellular permeability indicated by the LM test. In addition, evaluating the  
694 electrophysiological parameters in the co-transport, the expression of intestinal



695 transporters of peptides and carbohydrates and tight junctions in the duodenum  
696 and ileum portions in the acute period would contribute to a better  
697 understanding of the intestinal physiology during the consumption of a  
698 multideficiency diet. However, this study breaks new ground with the  
699 development of a new experimental diet for undernutrition that represents the  
700 clinic of undernourished children undergoing complementary feeding in seven  
701 low-income countries. This diet emerges as a valuable experimental tool that  
702 can be used to better understand the pathophysiology of undernutrition, as well  
703 as its association with enteric infections and environmental enteropathy, and in  
704 the search for more appropriate treatments for these pathologies (74).  
705 Furthermore, we also identified that moderate undernutrition causes a greater  
706 impact on the intestinal morphofunctional barrier in the acute period, with  
707 important morphological adaptations in the intestinal epithelium in the chronic  
708 period.

709 *In conclusion*, we developed an innovative diet for undernutrition based on the  
710 composition of the diet of undernourished children followed in a cohort study,  
711 with a moderate deficiency in energy, protein, lipids and zinc and a moderate  
712 increase in carbohydrates and fiber, capable of generating undernutrition in  
713 animals. The new MAL-ED diet reduced weight, compromised growth and  
714 energy reserves in a more chronic period, without causing edema and with  
715 normal serum albumin levels. This diet caused damage to the integrity of the  
716 intestinal epithelial barrier, reduced absorptive area associated with increased  
717 levels of FATCD/36 mRNA in the acute period, as well as increased total  
718 intestinal area and paracellular permeability in the chronic period. Thus, we  
719 propose a new clinically relevant murine model of undernutrition for the  
720 complementary feeding phase, which can be used as a tool to better  
721 understand the relationship between undernutrition and enteric infections.

#### 722 **Acknowledgments**

723 We thank all researchers involved in the development and financial  
724 support agencies. The authors also thank Fundação de Amparo à Pesquisa do  
725 Estado do Amazonas – FAPEAM (EDITAL N. 013/2022 – PRODUTIVIDADE –  
726 CT&I), the Postgraduate Program in Chemistry at the Federal University of  
727 Amazonas (PPGQ-UFAM), and Nuclear Magnetic Resonance Laboratory  
728 (NMRLab) of the Analytical Center of UFAM for the financial support, fellowships  
729 and infrastructure for metabolomic analysis. The authors' responsibilities were as  
730 follows: SAR, BLLM and AAML: designed the survey; SAR, ELRB, MLQ,  
731 XMQCF, LMVCM, JKS, TMF, HNV, CCA, ADCS, FRMM, AAS: conducted the  
732 study; AAS, MOB: provided and conducted electrical bioimpedance. SAR, MAC,  
733 AH and BLLM: data analysis and interpretation; SAR, BLLM and AAML: wrote

734

735

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.  The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Aldo AM Lima reports financial support was provided by National Council for Scientific and Technological Development. Aldo AM Lima reports equipment, drugs, or supplies was provided by Bill & Melinda Gates Foundation.

—

—

4. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Fitzmaurice G, Eaglesfield GD, Waber DP. Infant Malnutrition Is Associated with Persisting Attention Deficits in Middle Adulthood. *J Nutr*. 2012; 142(4): 788–794.
5. Deboer MD, Lima AAM, Oria RB, Scharf RJ, Moore SR, Luna MA et al. Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: Do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr Rev*. 2013; 70(11): 642–653.
6. UNICEF, WHO, World Bank Group. Levels and trends in child malnutrition. *Joint Child Malnutrition Estimates*, edition 2021.
7. Headey D, Heidkamp R, Osendarp S, Ruel M, Scott N, Black R, et al. Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *Lancet*. 2020; 396(10250): 519–521.
8. Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, et al. Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. 2008 Jan 26;371(9609):340-57. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61692-4. Erratum in: *Lancet*. 2008 Jan 26;371(9609):302.
9. Dewey KG, Huffman SL. Maternal, infant, and young child nutrition: combining efforts to maximize impacts on child growth and micronutrient status. *Food Nutr Bull*. 2009 Jun;30(2 Suppl):S187-9.
10. WHO/UNICEF. Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries: A Review of current scientific knowledge (1998). [www.enonline.net/compfeedingreview](http://www.enonline.net/compfeedingreview)
11. Maciel BLL, Costa PN, Filho JQ, Ribeiro SA, Rodrigues FAP, Soares AM, et al. Higher Energy and Zinc Intakes from Complementary Feeding Are Associated with Decreased Risk of Undernutrition in Children from South America, Africa, and Asia. *J Nutr*. 2021 Jan 4;151(1):170-178.
12. Campbell RK, Aguayo VM, Kang Y, Dzed L, Joshi V, Waid J, et al. Infant and young child feeding practices and nutritional status in Bhutan. *Matern Child Nutr*. 2018 Jul;14(3):e12580.
13. Ersino G, Henry CJ, Zello GA. Suboptimal Feeding Practices and High Levels of Undernutrition Among Infants and Young Children in the Rural Communities of Halaba and Zeway, Ethiopia. *Food Nutr Bull*. 2016 Sep;37(3):409-424.
14. Owais A, Schwartz B, Kleinbaum DG, Suchdev PS, Faruque AS, Das SK, et al. Minimum Acceptable Diet at 9 Months but Not Exclusive

**Breastfeeding at 3 Months or Timely Complementary Feeding Initiation Is Predictive of Infant Growth in Rural Bangladesh.** *PLoS One.* 2016 Oct 24;11(10):e0165128.

15. Raymond J, Agaba M, Mollay C, Rose JW, Kassim N. Analysis of nutritional adequacy of local foods for meeting dietary requirements of children aged 6-23 months in rural central Tanzania. *Arch Public Health.* 2017 Aug 17;75:60.

16. Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr.* 1990 Dec;40(4):533-47.

17. May T, Klatt KC, Smith J, Castro E, Manary M, Caudill MA et al. Choline Supplementation Prevents a Hallmark Disturbance of Kwashiorkor in Weanling Mice Fed a Maize Vegetable Diet: Hepatic Steatosis of Undernutrition. *Nutrients.* 2018 May 22;10(5):653.

18. Blanton LV, Charbonneau MR, Salih T, Barratt MJ, Venkatesh S, Ilkaveya O, et al. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science.* 2016 Feb 19;351(6275):10.1126/science.aad3311 aad3311.

19. Attia S, Feenstra M, Swain N, Cuesta M, Bandsma RHJ. Starved Guts: Morphologic and Functional Intestinal Changes in Malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Nov;65(5):491-495.

20. Park CY, Park S, Kim MS, Kim HK, Han SN. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Aug 26;490(3):636-642.

21. Mayneris-Perxachs J, Bolick DT, Leng J, Medlock GL, Kolling GL, Papin JA, et al. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. *Am J Clin Nutr.* 2016 Nov;104(5):1253-1262.

22. Wada M, Tamura A, Takahashi N, Tsukita S. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology.* 2013 Feb;144(2):369-380.

23. Chalvon-Demersay T, Even PC, Chaumontet C, Piedcoq J, Violette B, Gaudichon C, et al. Modifying the Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Alters the Postprandial Macronutrient Oxidation Pattern in Liver of AMPK-Deficient Mice. *J Nutr.* 2017 Sep;147(9):1669-1676.

24. Brown EM, Włodarska M, Willing BP, Vonaesch P, Han J, Reynolds LA, et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nat Commun*. 2015 Aug 4;6:7806.
25. Schwarzer M, Makki K, Storelli G, Machuca-Gayet I, Sruťkova D, Hermanova P, et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science*. 2016 Feb 19;351(6275):854-7.
26. Carle, M.S. Validation of bioimpedance spectroscopy by assessing. PhD Thesis, University of Alabama, 2010.
27. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Jul 15;7(8):4557-76.
28. Barboza Jr. MS, Silva TMJ, Guerrant RL, Lima AAM. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res [Internet]*. 1999Dec;32(12):1499–504.
29. SOARES, A. M. Secreção paracelular de sódio durante a absorção de substratos sódio dependente em mucosa ileal de coelho montada em câmara de Ussing. 1996. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
31. Rodrigues FAP, Santos ADDC, de Medeiros PHQS, Prata MMG, Santos TCS, da Silva JA, Brito GAC, Dos Santos AA, Silveira ER, Lima AÂM, Havt A. Gingerol suppresses sepsis-induced acute kidney injury by modulating methylsulfonylmethane and dimethylamine production. *Sci Rep*. 2018 Aug 14;8(1):12154.
32. Posada-Ayala M, Zubiri I, Martin-Lorenzo M, Sanz-Maroto A, Molero D, Gonzalez-Calero L, et al. Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2014 Jan;85(1):103-11.
33. Da Silva L, Godejohann M, Martin FP, Collino S, Bürkle A, Moreno-Villanueva M, et al. High-resolution quantitative metabolome analysis of urine by automated flow injection NMR. *Anal Chem*. 2013 Jun 18;85(12):5801-9.
34. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007 Feb;6(2):469-79.

35. Pelantová H, Bugáňová M, Anýž J, Železná B, Maletínská L, Novák D, et al. Strategy for NMR metabolomic analysis of urine in mouse models of obesity—from sample collection to interpretation of acquired data. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Nov 10;115:225-35.
36. Corware K, Yardley V, Mack C, Schuster S, Al-Hassi H, Herath S, et al. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. *Nutr Metab (Lond).* 2014 Oct 24;11(1):51.
37. Eyzaguirre-Velásquez J, Olavarria-Ramírez L, González-Arancibia C, Díaz-Merino C, Ariz R, López S, et al. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in Rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 May;64(5):707-712.
38. Bolick DT, Chen T, Alves LA, Tong Y, Wu D, Joyner LT 2nd, et al. Intestinal cell kinase is a novel participant in intestinal cell signaling responses to protein malnutrition. *PLoS One.* 2014 Sep 3;9(9):e106902.
39. Bolick DT, Kolling GL, Moore JH, de Oliveira LA, Tung K, Philipson C, et al. Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative escherichia coli -induced diarrhea. *Gut Microbes,* 2015; 5(5): 618–27.
40. Núñez IN, Galdeano CM, Carnuega E, Weill R, de Moreno de LeBlanc A, Perdígón G. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein-energy malnutrition. *Br J Nutr.* 2013 Aug 28;110(3):500-8.
41. Pan F, Zhang L, Li M, Hu Y, Zeng B, Yuan H, et al. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammation effects in calorie-restricted mice. *Microbiome.* 2018 Mar 21;6(1):54.
42. Ribeiro SA, Rodrigues FAP, Clementino MAF, Veras HDN, Siqueira RCL, de Medeiros PHQS, et al. Consumption of a multi-deficient diet causes dynamic changes in the intestinal morphofunctional barrier, body composition and impaired physical development in post-weaning mice. *Br J Nutr.* 2023 Mar 14;129(5):745-758.
43. Sampaio IC, Medeiros PH, Rodrigues FA, Cavalcante PA, Ribeiro SA, Oliveira JS, et al. Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model. *Braz J Med Biol Res.* 2016 Oct 10;49(10):e5340.
44. Briend A, Khara T, Dolan C. Wasting and stunting—similarities and differences: policy and programmatic implications. *Food Nutr Bull.* 2015 Mar;36(1 Suppl):S15-23.

45. Attia S, Versloot CJ, Voskuil W, van Vliet SJ, Di Giovanni V, Zhang L, et al. Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study. *Am J Clin Nutr*. 2016 Nov;104(5):1441-1449.
46. Guerrant RL, Leite AM, Pinkerton R, Medeiros PH, Cavalcante PA, DeBoer M, et al. Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil. *PLoS One*. 2016 Sep 30;11(9):e0158772.
47. Lima AA, Oriá RB, Soares AM, Filho JQ, de Sousa F Jr, Abreu CB, et al. Geography, population, demography, socioeconomic, anthropometry, and environmental status in the MAL-ED cohort and case-control study Sites in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Clin Infect Dis*. 2014 Nov 1;59 Suppl 4:S287-94.
48. de Queiroz CA, Fonseca SG, Frota PB, Figueiredo IL, Aragão KS, Magalhães CE, et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats. *BMC Gastroenterol*. 2014 Aug 5;14:136.
49. Coulthard MG. Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia. *Paediatr Int Child Health*. 2015 May;35(2):83-9.
50. Lima NL, Soares AM, Mota RM, Monteiro HS, Guerrant RL, Lima AA. Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Mar;44(3):365-74.
51. Ueno PM, Oriá RB, Maier EA, Guedes M, de Azevedo OG, Wu D, et al. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Oct;301(4):G612-22.
52. Ferraris RP, Carey HV. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:195-219.
53. Earthman CP, Matthie JR, Reid PM, Harper IT, Ravussin E, Howell WH. A comparison of bioimpedance methods for detection of body cell mass change in HIV infection. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Mar;88(3):944-56.
54. Burman D. The jejunal mucosa in kwashiorkor. *Arch Dis Child*. 1965 Oct;40(213):526-31.
55. Welsh FK, Farmery SM, MacLennan K, Sheridan MB, Barclay GR, Guillou PJ, Reynolds JV. Gut barrier function in malnourished patients. *Gut*. 1998 Mar;42(3):396-401.

56. Young A, Levin RJ. Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 1. Jejunal hypersecretion induced by starvation. *Gut*. 1990 Jan;31(1):43-53.
57. Darmon N, Heyman M, Candalh C, Blaton MA, Desjeux JF. Anaphylactic intestinal response to milk proteins during malnutrition in guinea pigs. *Am J Physiol*. 1996 Mar;270(3 Pt 1):G442-8.
58. Darmon N, Pélissier MA, Heyman M, Albrecht R, Desjeux JF. Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. *J Nutr*. 1993 Jun;123(6):1068-75.
59. Ferraris RP. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J*. 2001 Dec 1;360(Pt 2):265-76.
60. Blikslager A, Hunt E, Guerrant R, Rhoads M, Argenzio R. Glutamine transporter in crypts compensates for loss of villus absorption in bovine cryptosporidiosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Sep;281(3):G645-53.
61. Pinheiro DF, Pacheco PD, Alvarenga PV, Buratini J Jr, Castilho AC, Lima PF, et al. Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Mar;46(3):287-92.
62. Horowitz A, Chanez-Paredes SD, Haest X, Tumer JR. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023 Jul;20(7):417-432.
63. Amadi B, Besa E, Zyambo K, Kaonga P, Louis-Auguste J, Chandwe K, et al. Impaired Barrier Function and Autoantibody Generation in Malnutrition Enteropathy in Zambia. *EBioMedicine*. 2017 Aug;22:191-199.
64. Hui DY, Labonté ED, Howles PN. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Apr;294(4):G839-43.
65. Zhao X, Setchell KDR, Huang R, Mallawaarachchi I, Ehsan L, Dobrzykowski Iii E, Zhao J, Syed S, Ma JZ, Iqbal NT, Iqbal J, Sadiq K, et al. Bile Acid Profiling Reveals Distinct Signatures in Undernourished Children with Environmental Enteric Dysfunction. *J Nutr*. 2021 Dec 3;151(12):3689-3700.
66. Smit EN, Muskiet FA, Boersma ER. The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004 Oct;71(4):241-50.



67. Mayneris-Perxachs J, Swann JR. Metabolic phenotyping of malnutrition during the first 1000 days of life. *Eur J Nutr.* 2019 Apr;58(3):909-930.
68. Farràs M, Chandwe K, Mayneris-Perxachs J, Amadi B, Louis-Auguste J, Besa E, et al. Characterizing the metabolic phenotype of intestinal villus blunting in Zambian children with severe acute malnutrition and persistent diarrhea. *PLoS One.* 2018 Mar 2;13(3):e0192092.
69. Mickiewicz B, Tam P, Jenne CN, Leger C, Wong J, Winston BW, Doig C, Kubes P, Vogel HJ; Alberta Sepsis Network. Integration of metabolic and inflammatory mediator profiles as a potential prognostic approach for septic shock in the intensive care unit. *Crit Care.* 2015 Jan 15;19(1):11.
70. De Buck J, Shaykhtudinov R, Barkema HW, Vogel HJ. Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One.* 2014 Nov 5;9(11):e111872.
71. Murakami S. Role of taurine in the pathogenesis of obesity. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Jul;59(7):1353-63.
72. Kato T, Okita S, Wang S, Tsunekawa M, Ma N. The effects of taurine administration against inflammation in heavily exercised skeletal muscle of rats. *Adv Exp Med Biol.* 2015;803:773-84.
73. Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, et al. Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids.* 2004 Mar;26(2):203-7.
74. Guerrant RL, Bolick DT, Swann JR. Modeling Enteropathy or Diarrhea with the Top Bacterial and Protozoal Pathogens: Differential Determinants of Outcomes. *ACS Infect Dis.* 2021 May 14;7(5):1020-1031.

**Table 1-** Nutritional composition of the MAL-ED and control diets.

|                                   | <b>Control Diet</b> | <b>MAL-ED Diet</b> | <b>Difference (%)</b> |
|-----------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Energy (Kcal)                     | 391.69              | 360.22             | -8.03                 |
| <b>Macronutrients</b>             |                     |                    |                       |
| Carbohydrate (g)                  | 61.89               | 65.66              | 5.93                  |
| <b>Protein (g)</b>                | <b>21.25</b>        | <b>13.29</b>       | <b>-37.46</b>         |
| Lipid (g)                         | 6.57                | 4.98               | -24.20                |
| <b>Fibers</b>                     | <b>2.9</b>          | <b>4.21</b>        | <b>45.17</b>          |
| <b>Micronutrients</b>             |                     |                    |                       |
| <b>Zinc (mg)</b>                  | <b>35.0</b>         | <b>31.21</b>       | <b>-10.83</b>         |
| <b>Ingredients</b>                |                     |                    |                       |
| <b>Semola grits (g)</b>           | <b>-</b>            | <b>54.90</b>       |                       |
| Casein (81% protein)/14% (g)      | 16.40               | 9.60               |                       |
| <b>Dextrinized starch (g)</b>     | <b>15.50</b>        | <b>0.00</b>        |                       |
| Sucrose (g)                       | 10.00               | 0.00               |                       |
| <b>Soy oil (g)</b>                | <b>4.00</b>         | <b>5.10</b>        |                       |
| Cellulose MC-101 (g)              | 5.00                | 26.00              |                       |
| <b>Mineral mix (g)</b>            | <b>3.50</b>         | <b>3.50</b>        |                       |
| Vitamin mix (g)                   | 1.00                | 1.00               |                       |
| <b>L-cysteine (g)</b>             | <b>0.18</b>         | <b>0.30</b>        |                       |
| Choline Bitartrate (g)            | 0.25                | 0.25               |                       |
| <b>Tert-butylhydroquinone (g)</b> | <b>0.0008</b>       | <b>0.0014</b>      |                       |

Values referring to the analysis of the centesimal composition of the MAL-ED diet and control diet (AIN-93M), as well as the amount of ingredients used to formulate each diet.

**Table 2 – Histopathological scores triggered by acute and chronic consumption of the MAL-ED diet.**

| <b>Time</b>   | <b>Group</b>   | <b>Intestinal segment</b> | <b>Scores</b> |
|---------------|----------------|---------------------------|---------------|
| <b>Day 7</b>  | Control        | Duodenum                  | 1 (0 - 1)     |
|               |                | Jejunum                   | 1 (0 -1)      |
|               |                | Ileum                     | 0 (0 -1)      |
|               | Undernourished | Duodenum                  | 0 (0 - 1)     |
|               |                | Jejunum                   | 0 (0 -1)      |
|               |                | Ileum                     | 1 (0 -1)      |
| <b>Day 28</b> | Control        | Duodenum                  | 0 (0 - 0)     |
|               |                | Jejunum                   | 0 (0 -1)      |
|               |                | Ileum                     | 0 (0 -0)      |
|               | Undernourished | Duodenum                  | 0 (0 -1)      |
|               |                | Jejunum                   | 1 (0 -1)      |
|               |                | Ileum                     | 0,5 (0 -1)    |

Scores were analyzed using the Mann-Whitney test, Undernourished vs. Control for each intestine segment at times 7 and 28 days. Values are expressed as median, minimum, and maximum.

**Table 3** -  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments for metabolites in urine samples at 500 MHz. Comparison of metabolites contents with p-values of statistical tests and VIP score from PLS-DA.

| Compound               | $^1\text{H}$ ;<br>Multiplicity<br>: J (Hz) | HMBC<br>( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ )<br>(ppm) | Control<br>Median<br>[Q1;Q3]*    | Undernourished<br>Median [Q1;Q3]* | VIP<br>score | P value |
|------------------------|--|---|----------------------------------|-----------------------------------|--------------|---------|
| <b>Lactate**</b>       | 1.33(d: 6.9)                               | 63.23   | 0.616<br>[0.496;0.695]           | 0.277<br>[0.262;0.396]            | 0.7          | 0.002   |
|                        | 4.12(q:6.9)                                |   |                                  |                                   |              |         |
| <b>Succinate**</b>     | 2.41 (s)                                   | 181.04  | 0.153<br>[0.129;0.180]           | 0.098<br>[0.075;0.135]            | 0.5          | 0.014   |
|                        | 2.72(s)                                    |   |                                  |                                   |              |         |
| <b>Dimethylamine**</b> | 2.72(s)                                    | 37.55   | 229.407<br>[175.737;<br>272.969] | 0.163<br>[0.147;0.205]            | 1.3          | 0.000   |
| <b>Creatinine</b>      | 4.05(s)                                    | 188.9;<br>169.9;<br>56.08                           | -                                | -                                 | -            | -       |
| <b>Taurine**</b>       | 3.28(t: 6.7)                               | 50.11   | 4.285<br>[3.862;4.848]           | 3.736<br>[2.775;5.078]            | 1.9          | 0.008   |
|                        | 3.42(t: 6.7)                               |   |                                  |                                   |              |         |
| <b>Betaine</b>         | 3.26 (s)                                   | 56.12;<br>69.05                                     | 0.247<br>[0.217;0.270]           | 0.218<br>[0.167;0.292]            | 0.6          | 0.065   |
|                        | 3.90(s)                                    |   |                                  |                                   |              |         |
| <b>Pyruvate**</b>      | 2.35(s)                                    | n.d   | 0.210<br>[0.190;0.243]           | 0.174<br>[0.113;0.223]            | 0.3          | 0.008   |

Abbreviations: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), not detected (n.d.).

\* Median and interquartile range - median [Q1; Q3]; Creatinine M/M - were obtained from 12 control samples and 20 malnourished samples from day 28.

\*\*Significant differences by Welch's - t and Mann-Whitney tests ( $p < 0.05$ )

## Figures and captions

**Figure 1-** Comparison of physical development in mice fed undernutrition MAL-ED or control diet. (A) Weight (g) and (B) Weight gain (%) of the control (black line) and undernourished animals (gray line) for a total period of 28 days (n = 10-11). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) (\* Undernourished vs. Control,  $p < 0.05$ , Student's t test; #  $p < 0.05$ , one way ANOVA followed by the Bonferroni post-test in the malnourished group comparing day 1 with the other times). C) Variation in body growth on days 7, 14, 21 and 28 (n = 10-11). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  one way ANOVA followed by the Bonferroni post-test in the undernourished group comparing day 1 with the other times). D) Water intake of control (black line) and undernourished (gray line) animals for a period of 28 days (\*  $p < 0.05$ , Student's t test for Undernourished vs. Control for each day). Data are representative of the mean water consumption of control and undernourished animals from four different experimental lines (n=11). E) Serum levels of plasma albumin (g/dL) on days 7 and 28 of ingestion of the control diet (white bar) or MAL-ED (grey bar). Data correspond to two experimental lines (n=7). Values are represented as mean  $\pm$  SEM (n.s.=  $p > 0.05$ , Student's t-test for Undernourished vs. Control). F) Illustrative image of the control and undernourished animal on the 28th day.

**Figure 2 -** Body composition in animals fed an undernourished MAL-ED or control diet. A) Total body water (%), B) Extracellular fluid (ml), C) Intracellular fluid (ml), D) Fat-free mass (g), E) Fat mass (g) and F) Body mass index (g/ cm<sup>2</sup>) of control (black line) and undernourished (gray line) animals at times (days) 0, 7, 14, 21, 28. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , Student's t test for Undernourished vs. Control for each time. The values in the figure are representative of an experimental line and are represented by means  $\pm$  SEM of the control and undernourished groups (n=10). Total body water values were normalized by the weight of each evaluated animal and presented as a percentage.

**Figure 3-** Total length of the small intestine after acute and chronic consumption of the MAL-ED diet. A) Gut length (cm) on day 7 and B) Gut length (cm) on day 28 of control (white bar) and undernourished (grey bar) animals. Results are representative of one experimental line for each period (n= 6–8). Values are represented by mean  $\pm$  SEM (n.s. =  $p > 0.05$  and  $p$ -value for significant data is specified in the plot, Undernourished vs. Control, *Man Whitney* test).

**Figure 4 -** Area of villi and crypts of the duodenum, jejunum and ileum after days 7 and 28 of consumption of the MAL-ED diet. A) villus area on day 7 ( $\mu\text{m}^2$ ) and B) villus area on day 28 ( $\mu\text{m}^2$ ), C) crypt area ( $\mu\text{m}^2$ ) on day 7 and D) crypt area ( $\mu\text{m}^2$ ) on day 28 of the duodenum (DUO), jejunum (JEJ) and ileum (ILE) of the control and undernourished groups. Values are presented as mean  $\pm$  SEM (*Man Whitney* test, Undernourished vs. Control for each segment of the intestine at times 7 and 28.  $\alpha$ :  $p < 0.0001$ , comparison Undernourished duodenum vs. Control duodenum;  $\beta$ :  $p < 0.0001$ , Undernourished jejunum vs. Control jejunum;  $\delta$ :  $p < 0.0001$ , Undernourished ileum vs. Control ileum).

**Figure 5 –** Representative images of the duodenum, jejunum and ileum after days 7 and 28 of MAL-ED diet consumption. A) Representative images on day 7 and B) Representative images on day 28 of the duodenum (DUO), jejunum (JEJ) and ileum (ILE) of the control and undernourished (UNDERNOU) groups. The images of the groups are at 200x magnification and the image at 400x magnification refers to the UNDERNOU group in all segments. The scale bar (black line) is 500  $\mu\text{m}$ .

**Figure 6-** Intestinal permeability in animals that consumed control diet and MAL-ED diet in acute and chronic periods. A) Lactulose excretion (%), B) mannitol excretion (%) and C) lactulose/mannitol ratio in control (white box) and undernourished (gray box) animals on day 7 and 28. Data correspond to one experiment (n=7-8) and values are represented as median, Q1-Q3 ( $p$  value specified in significant data, Undernourished vs. Control, *Man Whitney* test).

**Figure 7-** Basal electrophysiology of jejunal segments after acute consumption of the control diet and MAL-ED. A) Short-circuit current ( $I_{sc}$ ,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), B) Potential difference (mV/cm<sup>2</sup>) and C) Basal transepithelial electrical resistance ( $\Omega\text{cm}^2$ ) of the control group (black line) and undernourished group (gray line) in seven days' time. Values are represented by mean  $\pm$  SEM

(n.s. =  $p > 0.05$ , Undemourished vs. Control, groups were compared point by point by Student's test).

**Figure 8** – Electrophysiology of the dose-response curve of glucose, glutamine and alanyl-glutamine after acute consumption of the control diet and MAL-ED. Response of A) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), B) Potential difference (mV/cm<sup>2</sup>) and C) Transepithelial electrical resistance ( $\Omega.\text{cm}^2$ ) to increasing glucose concentrations; response of D) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), E) Potential difference (mV/cm<sup>2</sup>) and F) Transepithelial electrical resistance ( $\Omega.\text{cm}^2$ ) to increasing concentrations of glutamine; and response of G) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), H) Potential difference (mV/cm<sup>2</sup>) and I) Transepithelial electrical resistance ( $\Omega.\text{cm}^2$ ) to increasing concentrations of alanyl-glutamine in the jejunum of the group control (black line) and undemourished (gray line) within seven days. Values are represented by mean  $\pm$  SEM (n.s. =  $p > 0.05$ , Undemourished vs. Control, groups were compared point by point by Student's test).

**Figure 9**– Transcript levels of intestinal transporters, ion channel and tight junction forming proteins after acute consumption of the MAL-ED diet and control diet. Relative transcript of levels of A) SGLT-1, B) PEPT-1, C) FATP4, D) FATCD/36, E) CFTR, F) Cladin-1, G) Cladin-2, H) Claudin-15, I) Occludin and J) ZO-1 from jejunal mucosal scrapings from control (white box) and undemourished (gray box) animals on day 7. Data are representative of an experimental line (n=8) and are represented by median, Q1-Q3 (\* $p < 0.05$ , Mann Whitney test, Undemourished vs. Control).

**Figure 10** - Protein expression of tight junction proteins and peptide transporter after acute consumption of the MAL-ED and control diet. Graphical representation of the protein expression of A) claudin-2, B) claudin-15, C) occludin and D) PEPT-1 in jejunal mucosa scrapings from control (white box) and undemourished (gray box) animals on day 7. Values are represented as median, Q1-Q3 (n.s. =  $p > 0.05$ , Man Whitney test, Undemourished vs. Control).

**Figure 11** - Metabolic profile determined by nuclear magnetic resonance of animals submitted to consumption of the MAL-Ed or control diet. A) PLS-DA score and (B) Loading of graphs based on Urine Display metabolic profiles after 28 days of consumption of the control (AIN-93M) and MAL-ED (malnourished) diets. Data are representative of an experimental line (n=4-8).

Figure 1

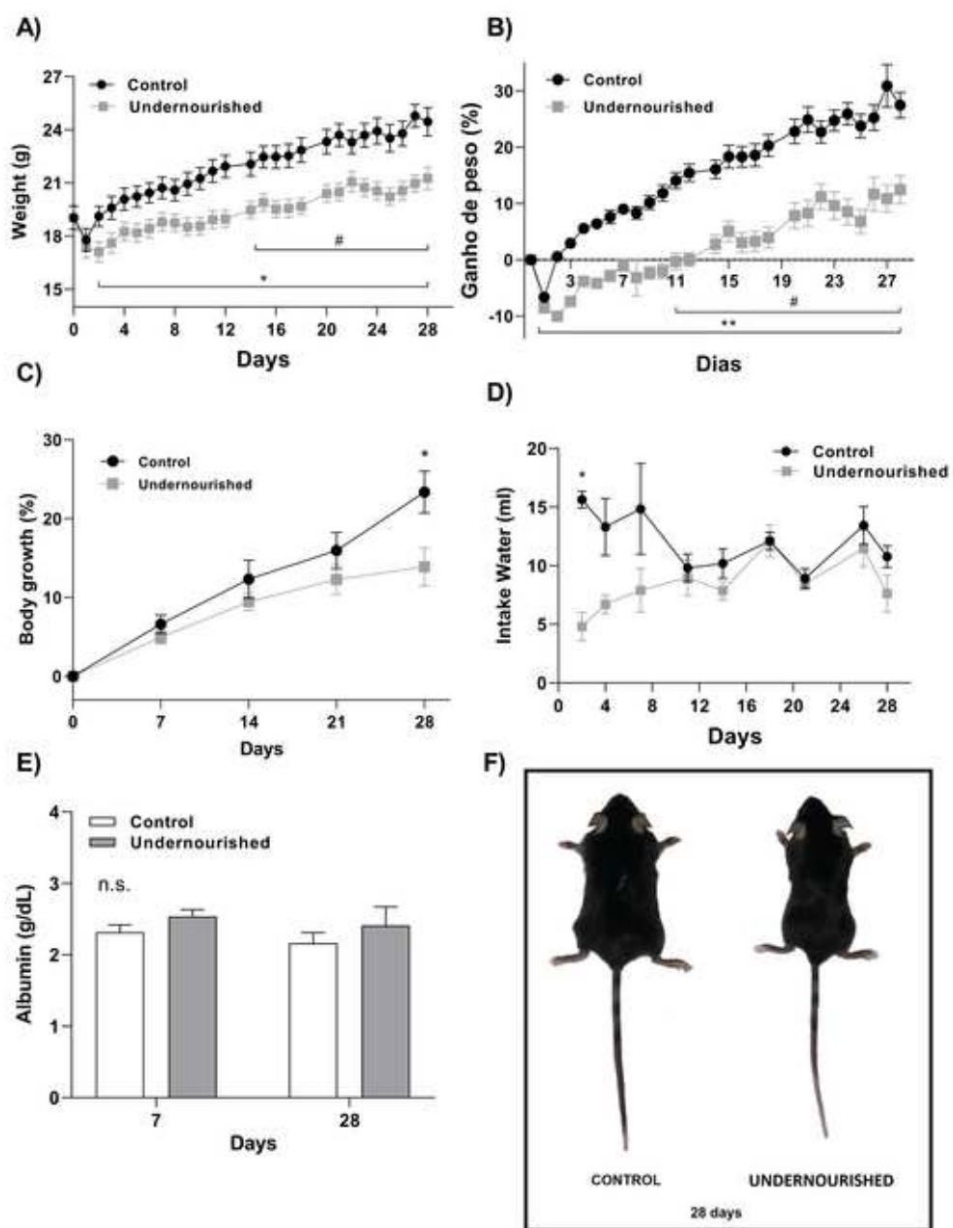
[Click here to access/download;Figure;Figure 1.tif](#)

Figure 2

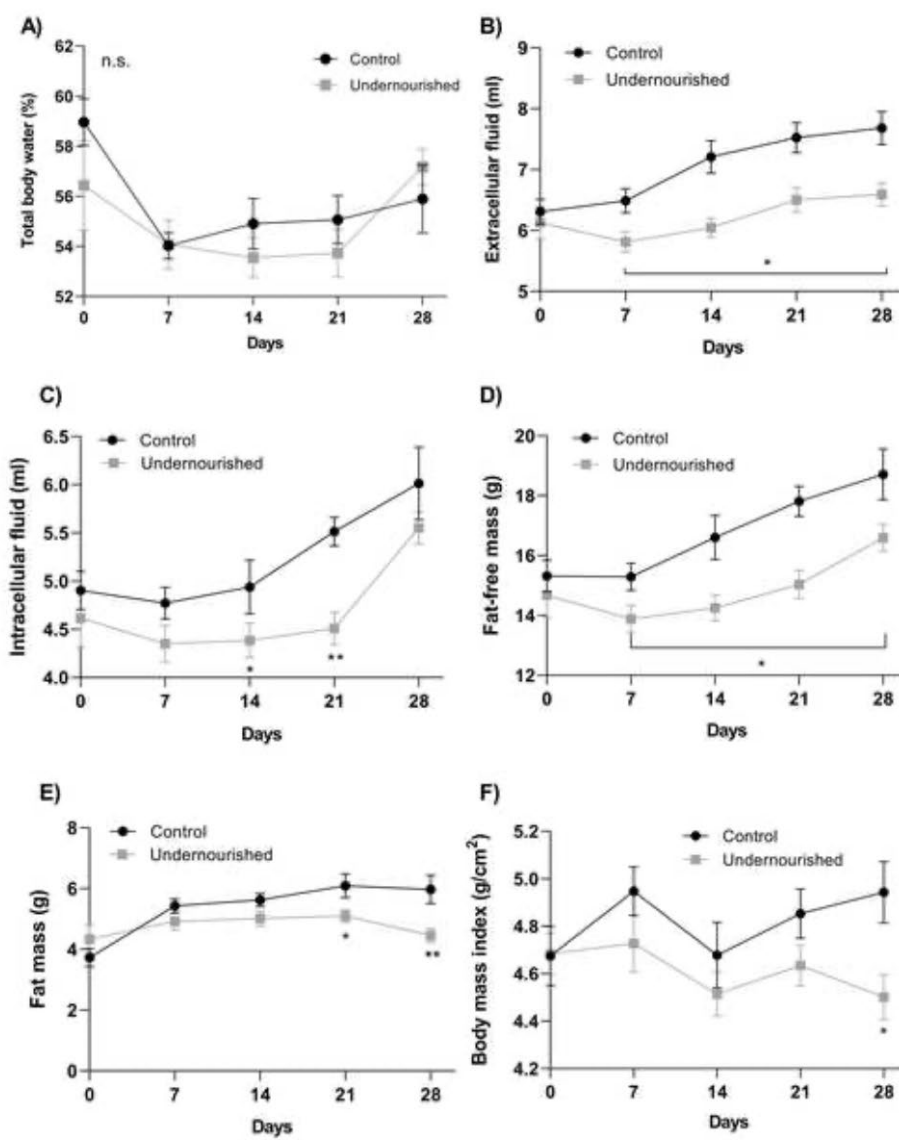
[Click here to access/download;Figure;Figure 2.tif](#)




Figure 3

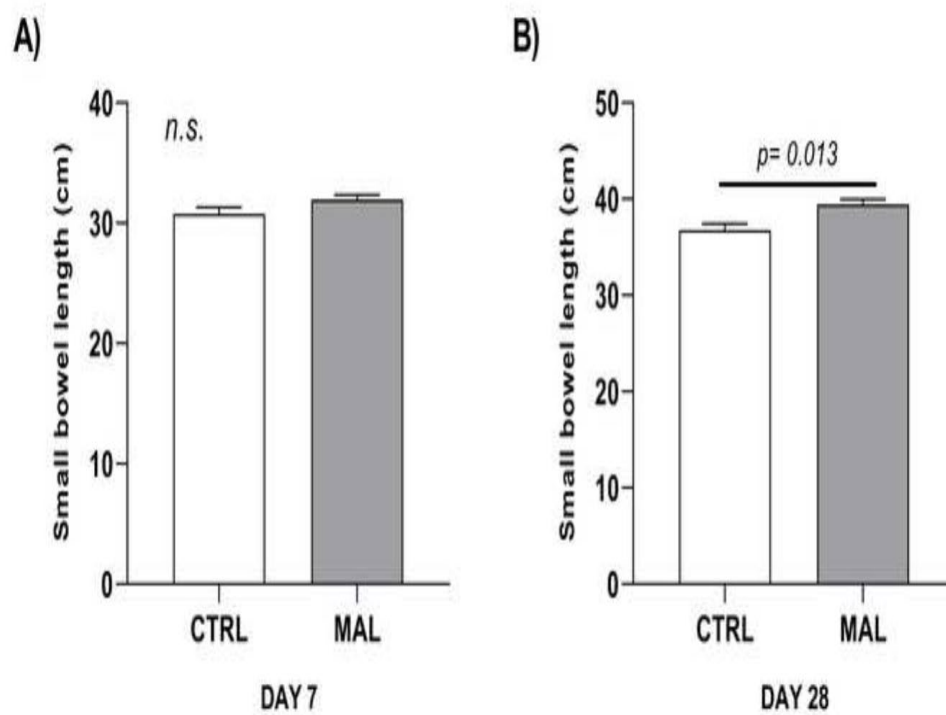
[Click here to access/download;Figure;Figure 3.tif](#)

Figure 4

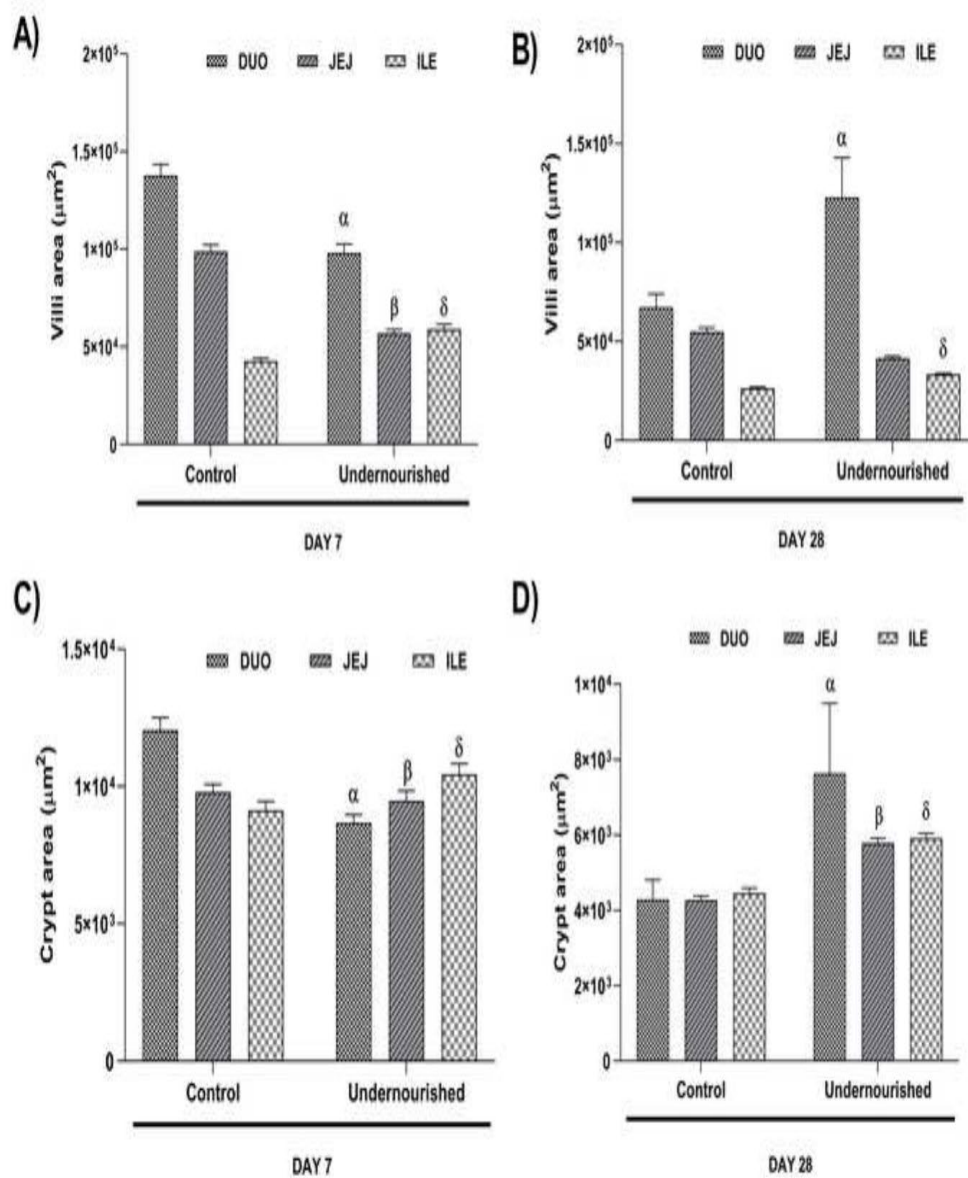
[Click here to access/download;Figure;Figure 4.tif](#)


Figure 5

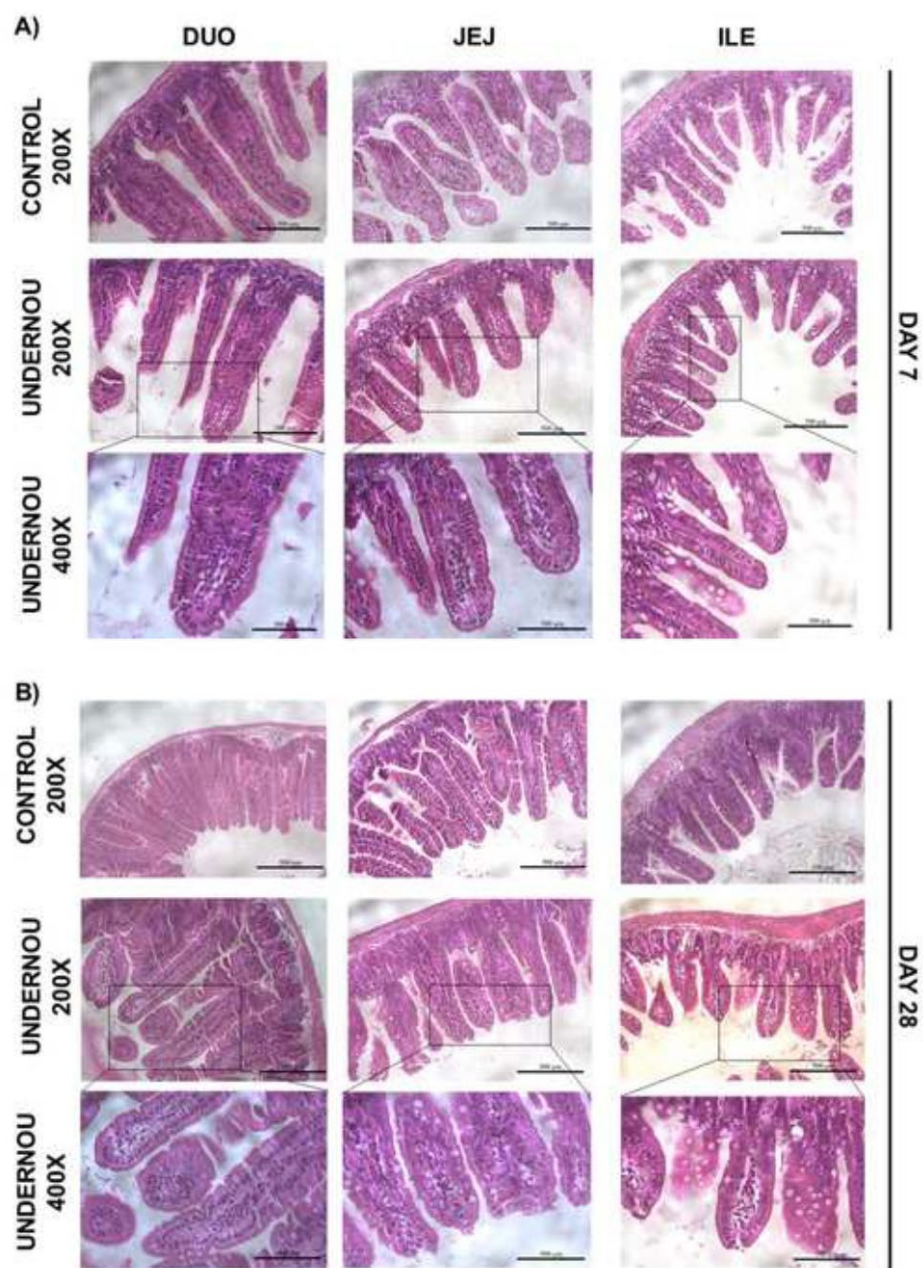
[Click here to access/download;Figure;Figure 5.tif](#)

Figure 6

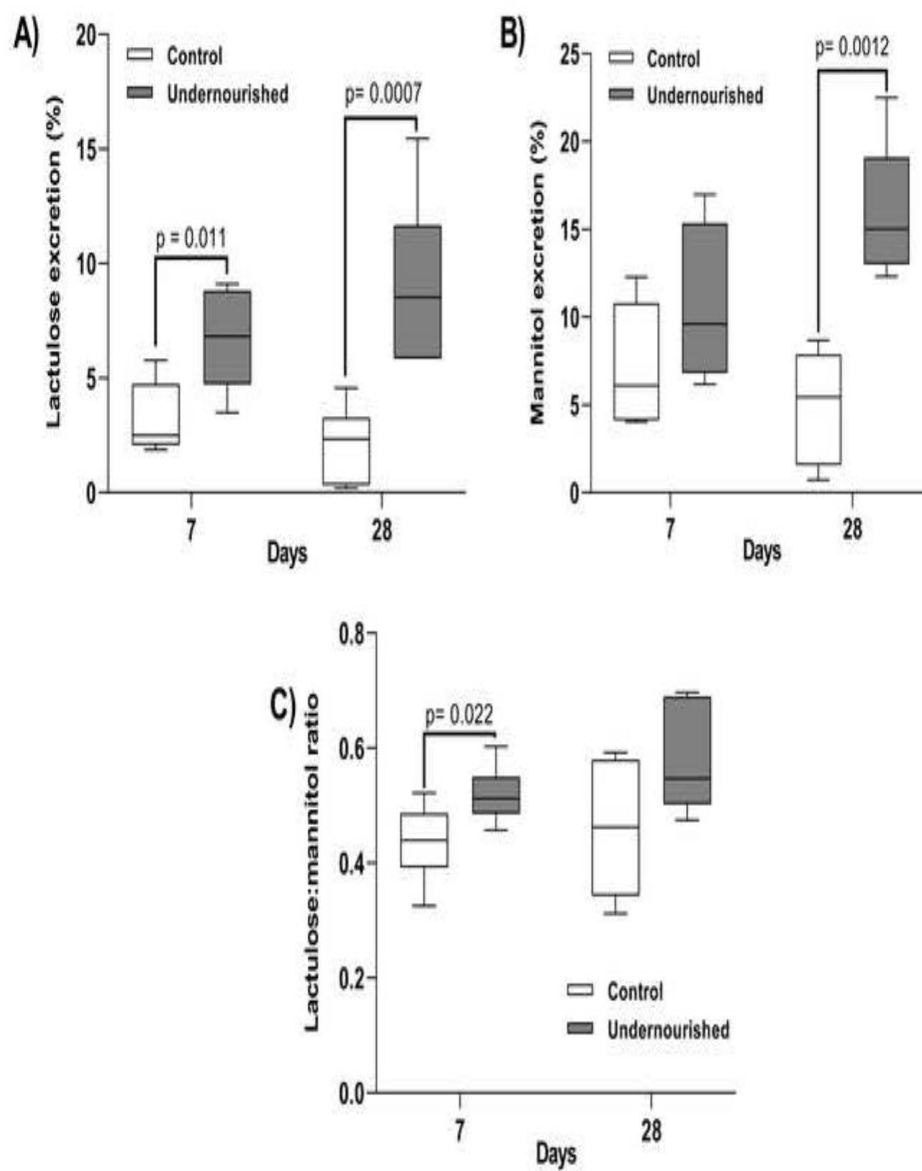
[Click here to access/download;Figure;Figure 6.tif](#)

Figure 7

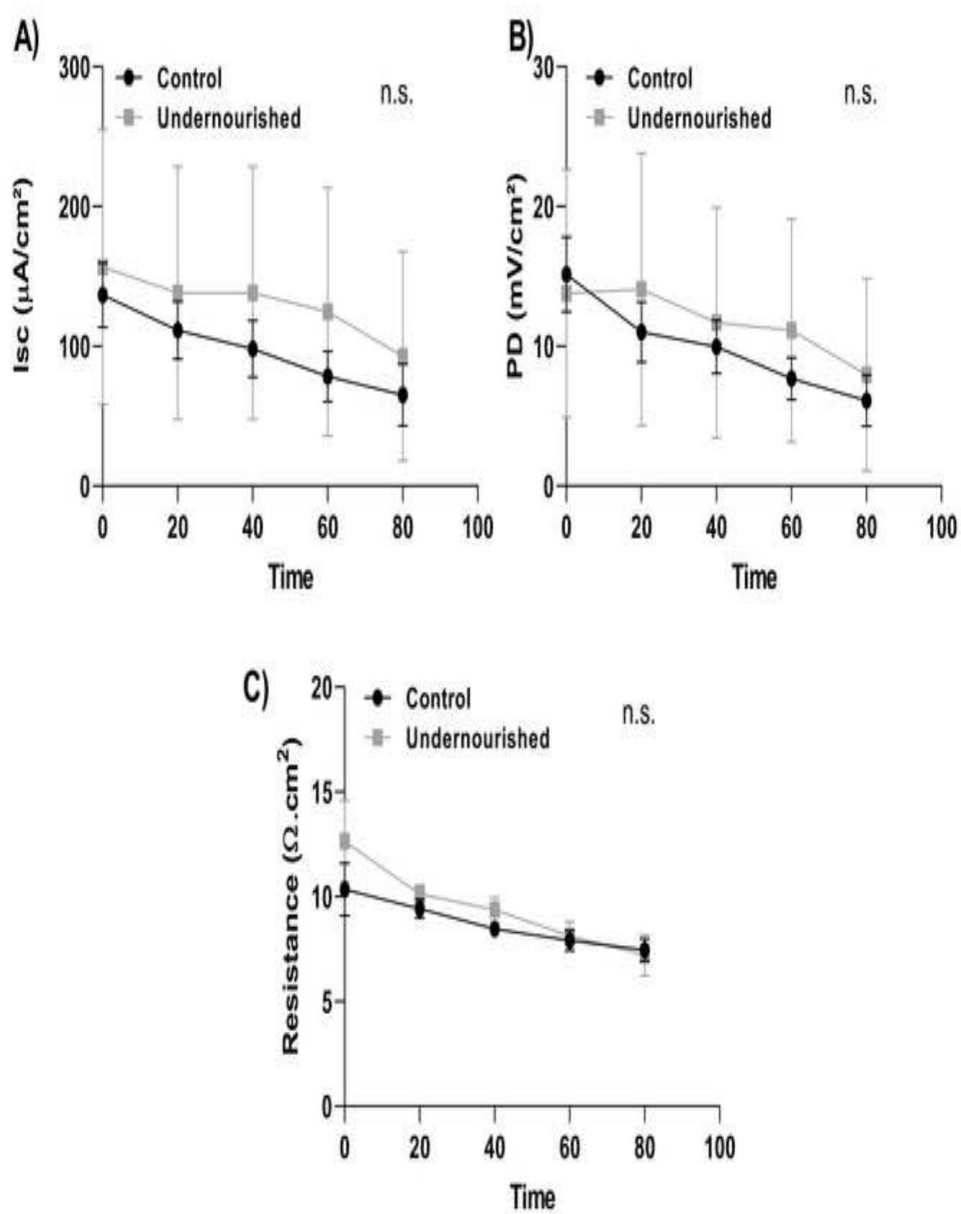
[Click here to access/download;Figure;Figure 7.tif](#)

Figure 8

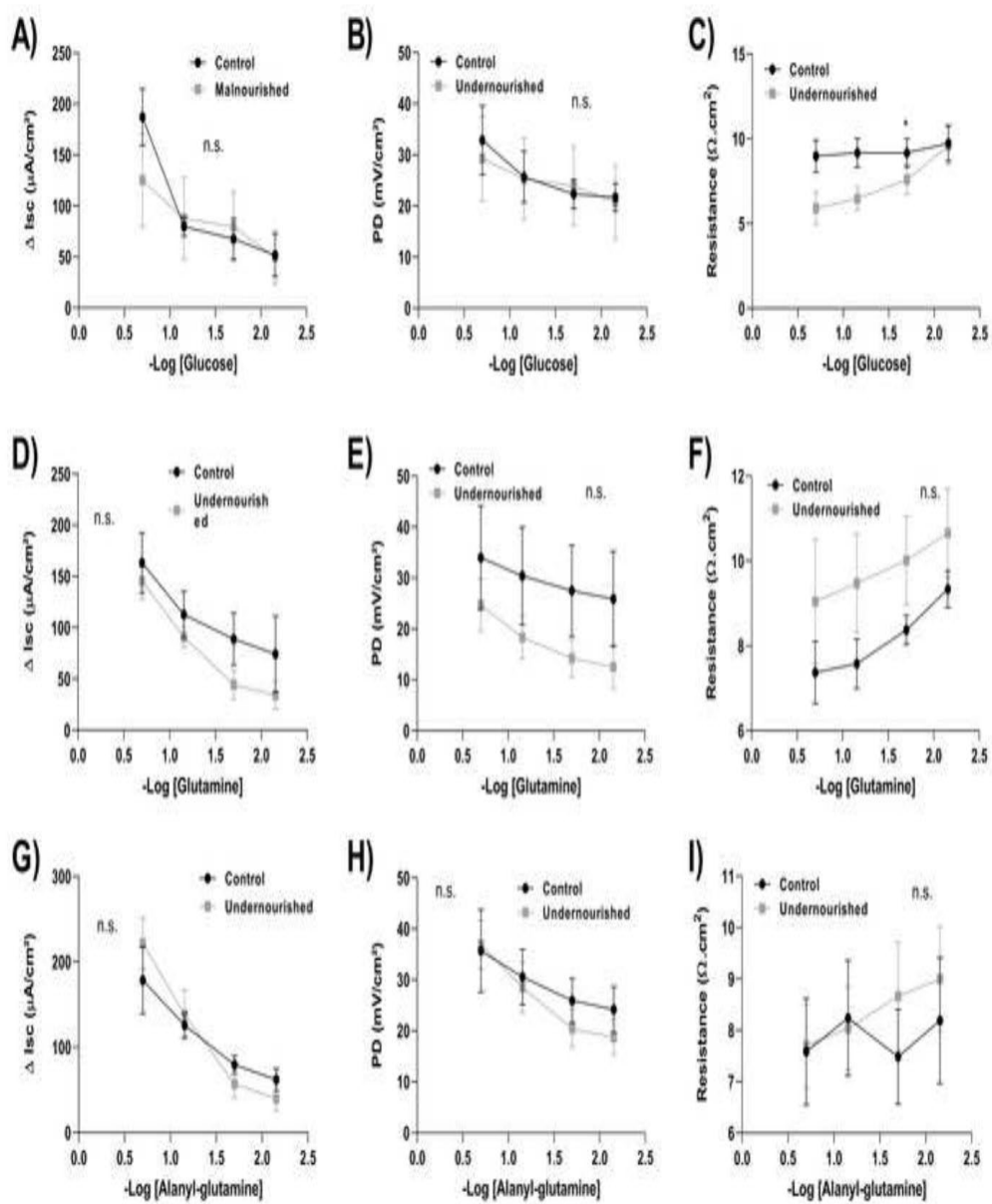
[Click here to access/download;Figure;Figure 8.tif](#)


Figure 9

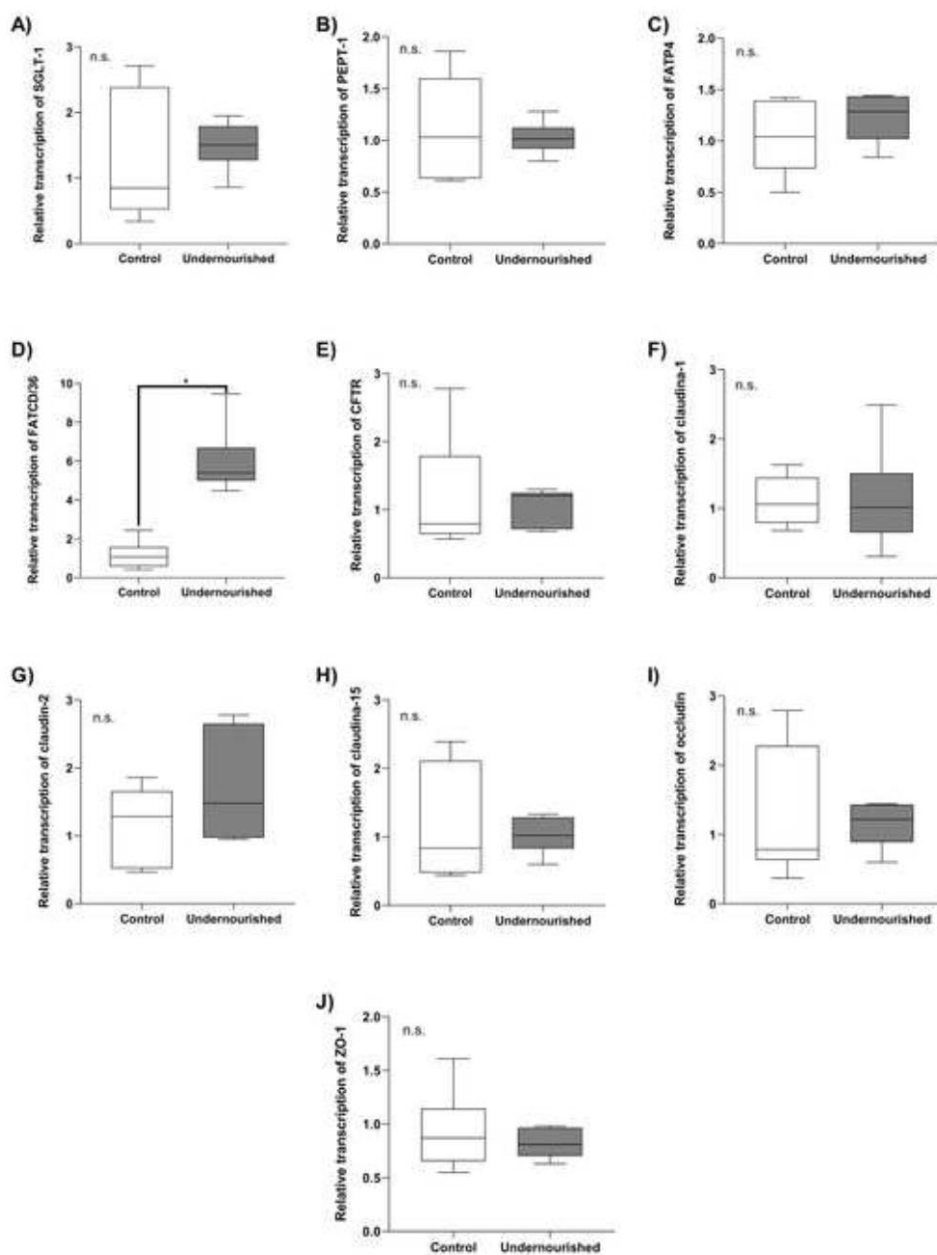
[Click here to access/download;Figure;Figure 9.tif](#)

Figure 10

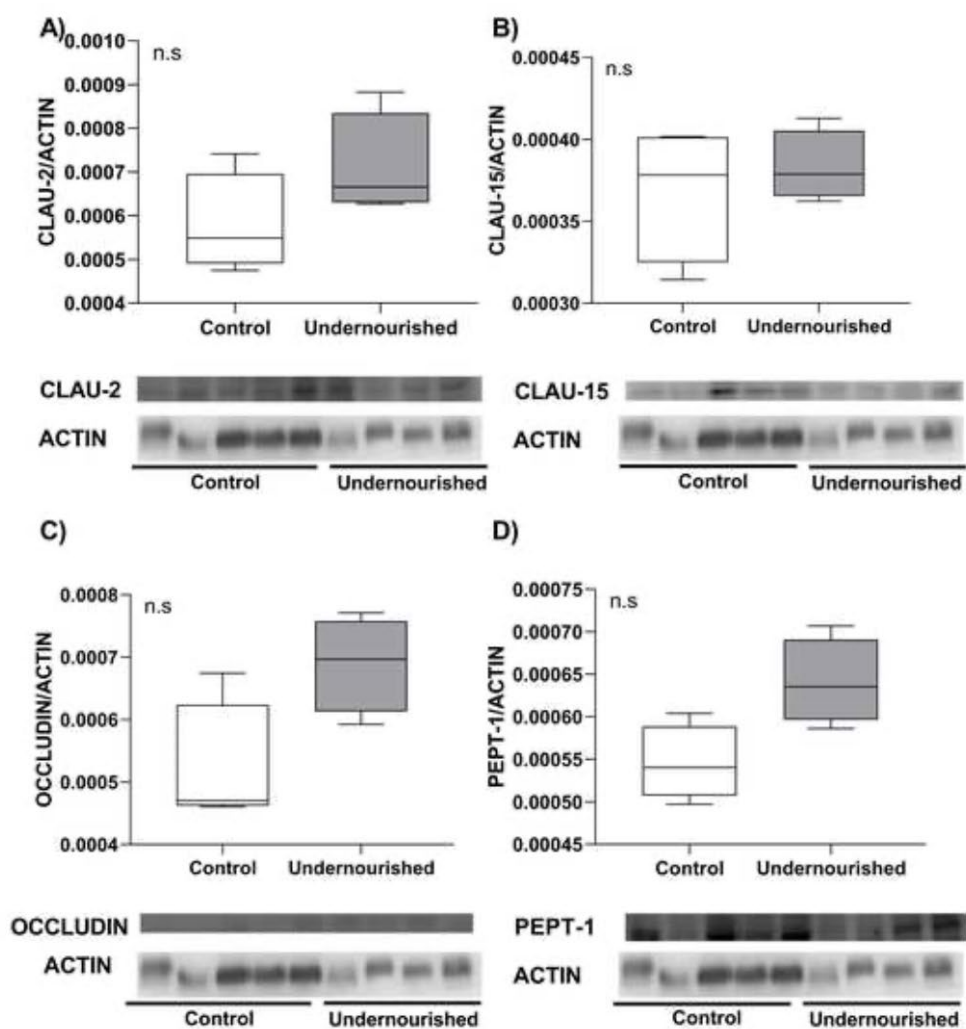
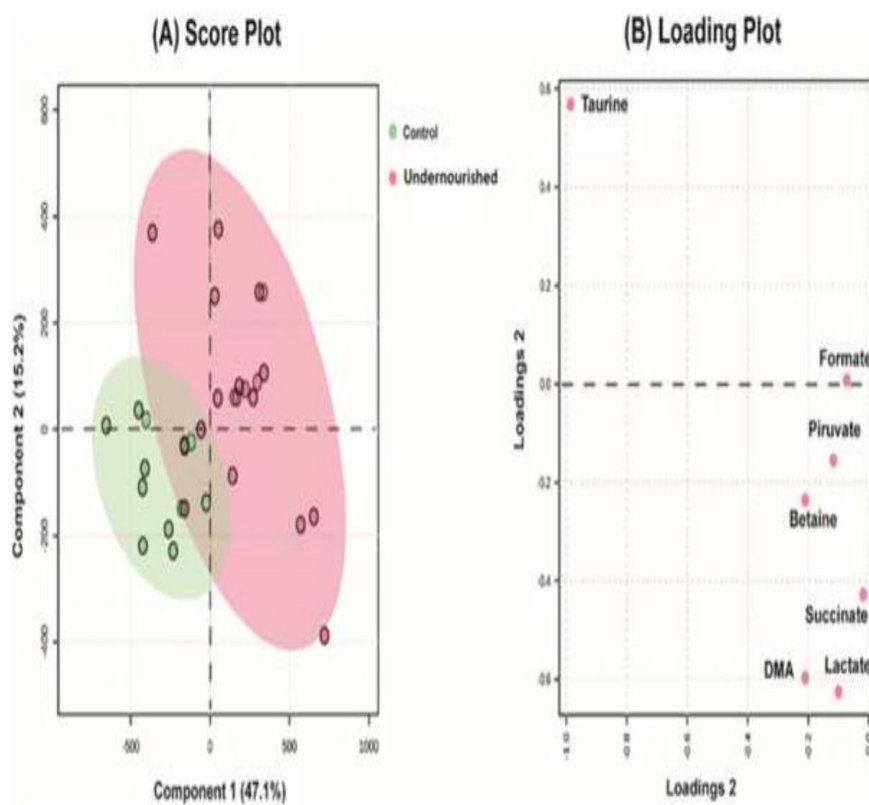
[Click here to access/download;Figure;Figure 10.tif](#)



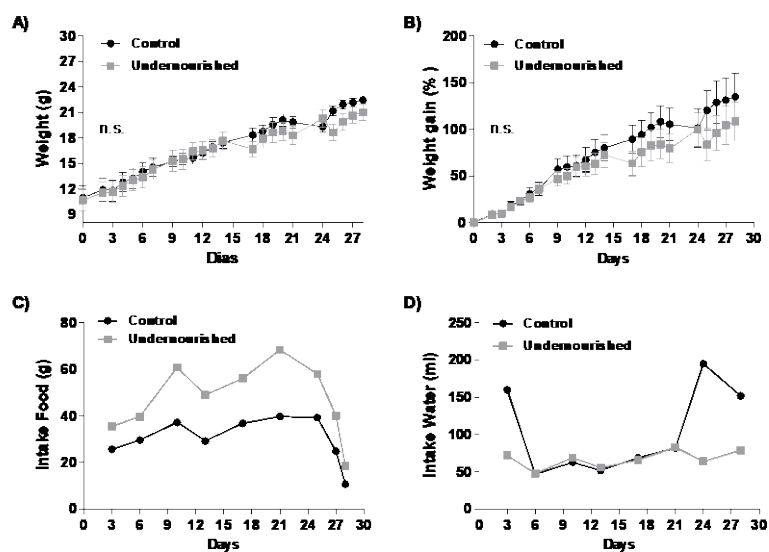
Figure 11

[Click here to access/download;Figure;Figure 11.tif](#)

**Material Supplementary****Supplementary Table 1- Sequences of oligonucleotide primers for tight junctions and intestinal transporters and protocol conditions.**

| <b>Genes</b>       | <b>Primer sequence</b>         | <b>Annealing conditions</b> |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>SGLT-1</i>      | S - CGGAAGAAGGCATCTGAGAA       | 20'' - 60 °C                |
|                    | AS - AATCAGCACGAGGATGAACA      |                             |
| <i>PEPT-1</i>      | S - AGGGGAGAACGGAATCAGGT       | 20'' - 61 °C                |
|                    | AS - CTTTTGCCAGAAGGGAAGA       |                             |
| <i>FATP4</i>       | S - GTTCCAGAAGACAGAGTTGC       | 20'' - 63 °C                |
|                    | AS - CTGAATCCAGCATCTTCTGG      |                             |
| <i>FATCD/36</i>    | S - GATGTGGAACCCATAACTGGATTCAC | 20'' - 63 °C                |
|                    | AS - GGTCCCAGTCTCATTAGCCCAGT   |                             |
| <i>CFTR</i>        | S - GGATGCTGAGGAAGCAACTC       | 20'' - 60 °C                |
|                    | AS - CCAGCCTGGAACTCTCTTTG      |                             |
| <i>Claudina-1</i>  | S - TCTACGAGGGACTGTGGATG       | 20'' - 63 °C                |
|                    | AS - TCAGATTCAGCAAGGAGTCG      |                             |
| <i>Claudina-2</i>  | S - CCCACCACCACCAGCTTAAT       | 20'' - 60 °C                |
|                    | AS - GAAATGGCTTCCAGGTCAGC      |                             |
| <i>Claudina-15</i> | S - GCAGGGACCCTCCACATACTTG     | 20'' - 60 °C                |
|                    | AS -                           |                             |
| <i>Ocludina</i>    | AGTTCATACTTGGTTCAGCATAACAGTG   | 20'' - 60 °C                |
|                    | S - AAGAGCAGCCAAAGGCTTCC       |                             |
| <i>ZO-1</i>        | AS - GCTCGGTTCACTCCCATTA       | 20'' - 60 °C                |
|                    | S - GACCATCGCCTACGGTTTGA       |                             |
| <i>18S</i>         | AS - AGGTCTCGGGATGCTGATT       | 20'' - 58 °C                |
|                    | S- CGGACAGGATTGACAGATTG        |                             |
|                    | AS- CAAATCGCTCCACCAACTAA       |                             |

Note: S – sense primer (5'-3') and AS – antisense primer (3'-5'). Reference gene: 18S.



**Supplementary Figure 1- Weight, weight gain and body growth after ad libitum consumption of the MAL-ED diet or control diet. (A) Weight (g), (B) weight gain (%), (C) feed intake (g) and (d) water intake (mL) of control (black line) and undernourished (gray line) animals under *ad libitum* protocol for a total period of 28 days. *n.s.*= no significance, Student's t-test for Undernourished vs. Control for each day. All data are representative of an experimental line ( $n=10-12/group$ ) and values are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) for weight and weight gain and single values per experimental box for water consumption and feed.**



ISSN 2993-5407

## Research Article

## Translational Medicine : Open Access

## Pre-Clinical and Randomized Clinical Trial with Bromhexine and N-Acetylcysteine for COVID-19

Roberto J. Pires-Neto<sup>1\*</sup>, Marco Clementino<sup>2\*</sup>, Rafael F. Mesquita<sup>1,2\*</sup>, Mariana S. Lima<sup>2,4\*</sup>, Mariana S. Lima<sup>2,6</sup>, Ronaldo B. Martins<sup>3</sup>, Iasmin Ferreira<sup>3</sup>, José Quirino-Filho<sup>3</sup>, Rafaela N. D. G. Gondim<sup>3</sup>, Lyvia M. V. C. Magalhães<sup>3</sup>, Karene F. Cavalcante<sup>4</sup>, Vânia A. F. Viana<sup>4</sup>, Liana P. Mello<sup>4</sup>, José K. Souza<sup>5</sup>, Xhaulla M.Q.C. Fonseca<sup>2</sup>, Armênio A. Santos<sup>2</sup>, Pedro J. C. Magalhães<sup>2</sup>, Alexandre Havt<sup>2</sup>, Érico A. G. Arruda<sup>1</sup>, Juliano P. Souza<sup>1</sup>, Marjorie Pontelli<sup>1</sup>, Italo A. Castro<sup>3</sup>, Thais M. Lima<sup>1</sup>, Rosa M. M. Viana<sup>1</sup>, Daniel M. Jorge<sup>1</sup>, Priscyla D. Marcato<sup>3</sup>, Hugo P. Monteiro<sup>5</sup>, Eurico Arruda<sup>3,6</sup>, Aldo A. M. Lima<sup>2,6\*</sup> and Study Group Members - AVANTI

\*These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ), Secretaria de Saúde do Ceará (SESA), Brazil.

<sup>2</sup>INCT-Biomedicina no Semiárido Brasileiro (INCT-Biomedicina), Núcleo de Biomedicina (NUBIMED), Faculdade de Medicina, UFC, Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina, USP-RP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e Laboratórios Central de Saúde Pública (LACEN), Brazil.

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>6</sup>Rede Virus, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), Brasília-DF, Brazil.

## Corresponding Author

Aldo AM Lima - Núcleo de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, no. 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE, Brazil.

Submitted: 2023, July 25; Accepted: 2023, Aug 26; Published: 2023, Oct 10

**Citation:** Neto, R. J. P., Clementino, M., Mesquita, R. F., Lima, M. S., Lima, A. A. M., et al. (2023). Pre-Clinical and Randomized Clinical Trial with Bromhexine and N-Acetylcysteine for COVID-19. *Transl Med OA*, 1(2), 56-75.

## Abstract

Treatment options for mild to moderate COVID-19 is limited. N-acetylcysteine and bromhexine have antiviral activity and show potential as treatment options against SARS-CoV-2 infections. This study evaluates the in vitro antiviral effect of bromhexine (BMX) for SARS-CoV-2 and determines the efficacy of treatment with BMX in combination with N-acetylcysteine (NAC) to reduce clinical scores in patients with mild to moderate COVID-19. Upon evidence from pre-clinical studies, a single center randomized trial of BMX + NAC (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04928495) with 420 participants in total took place in Fortaleza, CE, Brazil. Out of the 420 participants 140 received placebo, 140 received NAC alone, and 140 received NAC + BMX. Patients were monitored for 10-14 days, where physicians recorded all signs and symptoms reported. Nasopharyngeal swabs and blood samples were collected for SARS-CoV-2 RNA testing during the first visit, as well as 3 and 10 days after. Blood samples were collected at first visit and 10 days after for immuno-inflammatory biomarkers measurements. Treatment with NAC+BMX reduced clinical scores and symptoms when compared to placebo group (2/26; 8% vs 7/18; 39%;  $p < 0.05$ ). Fever ( $\geq 37.8^{\circ}\text{C}$ ) was reduced by NAC + BMX treatment when compared to treatment with NAC alone and placebo. This study was limited by a largely vaccinated population. Our analysis showed that BMX reduces SARS-CoV-2 infection in vitro. Clinical trial results suggested that combinatory treatment with NAC + BMX is beneficial in mild to moderate COVID-19.

## 1. Introduction

There is an urgent need for antiviral drugs to treat or ameliorate mild and severe cases of COVID-19. Among several studies that have been published on the repurposing of drugs to treat

COVID-19 [1,2], the most promising report was the use of remdesivir, originally developed to treat hepatitis C and Ebola fever [3]. Remdesivir was superior to placebo in reducing recovery time in adults hospitalized with COVID -19 and lower

respiratory tract infection. RNA viruses such as SARS-CoV-2 use the NF- $\kappa$ B pathway within host cells in their viral replication process. In experiments with human coronaviruses (HCoV-229E), suppression of the NF- $\kappa$ B pathway was associated with reduction in the rate of virus replication in vitro [4,5]. NAC inhibits the NF- $\kappa$ B pathway and replication of human influenza virus (H5N1, Vietnam / strain VN1203) in human lung epithelial cells [5]. Considering the lower cost of NAC we investigated its potential as an inhibitor of SARS-CoV-2 replication, due to its ability to downregulate the NF- $\kappa$ B pathway. NAC also reduces the production of pro-inflammatory cytokines (IL-8, CXCL10, CCL5, and IL-6), and the chemotaxis of monocyte migration [6]. NAC has been shown to inhibit the replication of other viruses such as human immunodeficiency virus (HIV) [7] and respiratory syncytial virus (RSV) [8]. In SARS-CoV-2, the Mpro protease is required for virus replication [9].

NAC can bind to Cys-145, an active site of Mpro, which can inhibit its protease activity and consequently inhibit viral replication. The canonical entry into cells of the SARS-CoV-2 virus depends on the binding of the viral spike protein (S) to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) cell receptor, a fact preceded by the initiation of the S protein through the action of the host cell membrane-associated type II transmembrane serine protease (TMPRSS2) [9]. Several research groups have proposed reusing drugs capable of interfering with the action of TMPRSS2, such as bromhexine hydrochloride, for the treatment of patients with COVID-19 [10-12]. Bromhexine selectively inhibits TMPRSS2 activity [13] and, consequently, could suppress protein cleavage SARS-CoV-2 S, thus limiting the reproduction of the new coronavirus. This study evaluated in vitro BMX inhibition of SARS-CoV-2 replication, as well as the effectiveness of NAC alone or combined with BMX in reducing the clinical score of COVID-19 through a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Our results showed that BMX treatment efficiently disrupts SARS-CoV-2 infection in vitro and benefit of NAC + BMX treatment by reducing ordinal clinical scores, specifically by its reduction of fever in patients with mild and moderate respiratory syndrome with SARS-CoV-2 infection.

## 2. Methods

### 2.1 Molecular Docking

The transmembrane serine protease TMPRSS2 (accession number: O15393) was obtained from the Uniprot database (Nucleic Acids Res, 2019). The TMPRSS2 extracellular domain was used to build a homology model using the SWISS-MODEL web server. Bromhexine hydrochloride (CID 5702220) was obtained from the PubChem Database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) in sdf format and then converted to mol2 format. The molecular docking of the protein TMPRSS2 and the bromhexine hydrochloride molecule was performed using the Achilles blind docking server (<https://bio-hpc.ucam.edu/achilles/>).

### 2.2 Antiviral Activity of Bromhexine in Vitro

All in vitro protocols were placed in a BSL-3 laboratory following all biosafety regulations of the University of São

Paulo. Cell lineages Caco-2 (human colon, ATCC TB-37) HUH7 (human liver, JCRB0403) and Vero (monkey kidney, ATCC CCL-81) were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> as recommend by ATCC. Bromhexine hydrochloride (BMX) (Shanghai Shengxin Medicine Chemical Co., Ltd.) was kindly donated by Ourofino. Camostat mesylate were purchased from Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, USA). Antiviral properties of BMX in Caco-2 cells (Human, colon - ATCC HTB-37) was determined by the neutral red (NR) and Deoxyribonucleic Acid (DNA) Content assays. Briefly, 24-well plates treated with the compounds were infected in triplicate with SARS-CoV-2 (MOI=1) and incubated for adsorption for 2 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The inoculum was then removed, cultures were washed with PBS, and then treated with medium containing 750 nM BMX or vehicle (0.004% DMSO). The positive control consisted of 100 mM camostat mesylate (Sigma Aldrich, Inc., Missouri, USA), a known TMPRSS2 inhibitor. After 48 h, 250  $\mu$ L of supernatant was collected for RNA extraction and viral load quantification by real-time RT-PCR using a standard curve. Next an in vitro dose-response experiment was done with Caco-2 cells pretreated with BMX ranging from 250 to 1500 nM for 2 hours, followed by inoculation with SARS-CoV-2 (MOI=1) for 2 h. The monolayers were then washed with PBS and replenished with fresh medium containing BMX at the same concentrations used in the pretreatment. Supernatants were collected for viral genome quantification 48 hours postinfection. The virucidal activity of bromhexine on SARS-CoV-2 was tested using 5x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> inoculum and incubated with the drug diluted in serum free DMEM at a final concentration of 1500 nM. Two hours later, virus titers were measured by endpoint titration by TCID<sub>50</sub> in 96-wel plates.

### 2.3 Single Centre Clinical Trial

#### 2.3.1 Study Design, Site, and Population

A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was performed to test the efficacy of NAC+BMX treatment for mild or moderate COVID-19. This trial was approved by the Brazilian National Research Ethics Commission (no. 47715321.9.0000.5054), and carried out in the city of Fortaleza, Northeastern Brazil. Patients with mild to moderate respiratory infection and clinical suspicion of COVID-19 were invited to participate in the study after signing a consent form.

#### 2.3.2 Selection, Inclusion, and Exclusion Criteria

Adult patients of both sexes were invited to participate in the study. Inclusion criteria were: (a) patients with clinical signs and symptoms of mild or moderate respiratory infection defined by the absence of dyspnea, respiratory distress and an O<sub>2</sub> saturation <95%; and (b) patients between  $\geq 18$  and  $\leq 60$  years of age. Exclusion criteria were: (a) patients participating in another clinical intervention study; (b) patients having an illness or other medical condition that precludes the use of the drugs in this intervention; (c) patients unable to ingest, retain, and absorb intervention medications; and (d) mentally incapacitated patients. The study team recruited the patients from November 29, 2021, to October 24, 2022. A total of 486 patients were selected to enter the study protocol and 66 of them were excluded based on before mentioned exclusion criteria. Therefore, 420 patients

were randomly distributed into the three treatment groups. We used a computer random list in blocks of three sequentially permuted numbers to assign the treatment groups. Thus, 140 patients received placebo control (Vitamin C – 500 mg/day for 10 days), 140 patients received N-acetylcysteine (NAC; 1800 mg/day for 10 days), and 140 patients received NAC (1800 mg/day, for 10 days) + Bromhexine Hydrochloride (BMX; 32 mg/day, for 10 days). Treatments were prepared with similar formulation vehicle to keep treatments blind.

### 2.3.3 Protocol Study Duration and Treatments Evaluation

Patients enrolled were evaluated by the study medical staff and health professionals during three visits: day 1, day 3 (+2 days) and day 10 (+3 days), at an outpatient primary care clinic. On day 1 of recruitment, demographic, epidemiologic and clinical data, and nasopharyngeal swab, and blood samples were collected, as well as started registration of adverse events (AEs) and serious adverse events (SAEs) was collected. On day 3, clinical sign and symptoms information and AEs and SAEs, and nasopharyngeal swab were collected. On day 10, we collected clinical information, nasopharyngeal swab, and blood samples.

### 2.3.4 Diagnosis of SARS-CoV-2

Molecular diagnostic analyzes was performed by Real Time PCR (qPCR) according to official guidelines determined by the American CDC (CDC-006-00019, Revision 03). Samples of nasopharyngeal swabs followed nucleic acid isolation (AcNu). All qPCR reactions were by uniplex diagnostics as described before [14].

### 2.3.5 Immune-Inflammatory Biomarkers

Immune-inflammatory biomarkers were evaluated by Luminex XMAP Technology, as described before [14]. This technique performs a simultaneous analysis, in the same plasma sample (25  $\mu$ L volume), of a panel of protein markers of pro and anti-inflammatory activity (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-3, IL-10, G-CSF, TNF- $\alpha$ ). Glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured in plasma sample using a standard kit and performed as recommended (ThermoFisher, Frederick, MD, EUA).

### 2.3.6 Adverse Events and Serious Adverse Events Data

Adverse events (AEs) and serious adverse events (SAEs) were collected using a specific form and reported within 14 days do Data Safety Managing Board (DSMB). All SAEs recorded were reviewed and reported according to good clinical practice procedures (Code of Federal Regulations & ICH Guidelines, 2019).

### 2.3.7 Sample Size and Statistical Analysis

For the samples size calculation, we used the post-hoc power

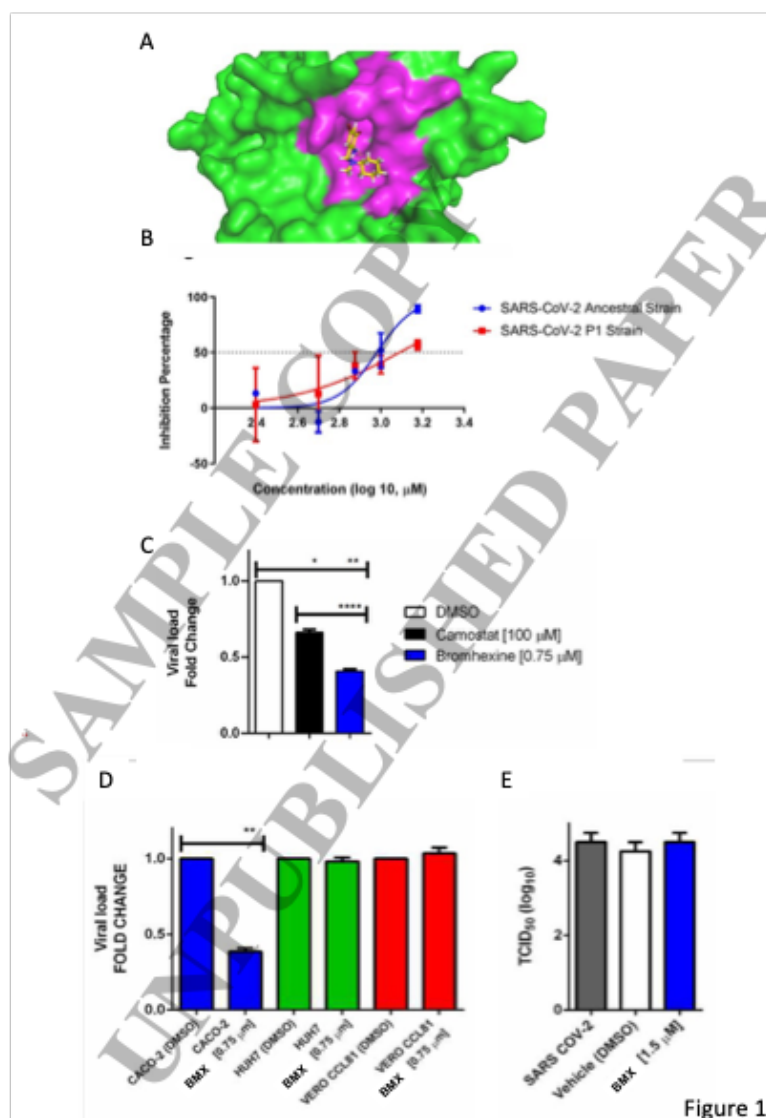
calculator for two independent treatment groups (<https://clincalc.com/Stats/SampleSize.aspx>). We used the percentages of the clinical score's incidence of the NAC + BMX group of 8% compared with 38% incidence clinical score of the control group (Vit. C). Considering an alpha value of 0.05 (type-I error), we obtained a post-hoc power value of 70% (1 – Beta; type-II errors). The randomized trial data were entered twice into spreadsheets and verified by one independent researcher to ensure accuracy. Data were de-identified and statistical analysis was performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v.20.0; IBM Corporation, <https://www.ibm.com/>).

We used descriptive analysis and checked the variables for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. Mann-Whitney U test and Kruskal–Walli's test were used for independent nonparametric samples or Wilcoxon signed rank test was used for paired samples and for parametric variables. The chi-square test or Fisher's exact test was used for assessing qualitative variables. All statistical tests were two-sided with a significant level of  $p < 0.05$ . For the pre-clinical study in vitro data, we used ordinary one-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analyses and graph plots were carried out using the GraphPad<sup>®</sup> Prism 8.4.2 software.

## 3. Results

### 3.1 Bromhexine Inhibits SARS-CoV-2 Proliferation In Vitro

Molecular docking showed that bromhexine binds to TMPRSS2. A blind docking server generated a three-dimensional structure representing the interaction between TMPRSS2 and BMX, with 15 possible clusters of binding poses. The selected bromhexine pose in the active site of TMPRSS2 exhibited a -5.7 kcal/mole binding energy, with hydrogen bonds with Ser460 (Figure 1A). A dose-response effect of bromhexine on SARS-CoV-2 replication in vitro was observed in the Caco-2 cells infected with both parental and P1 variant strains. The estimated inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of bromhexine was around 1  $\mu$ M (Figure 1B). When we tested the antiviral activity of bromhexine using a non-cytotoxic concentration (0.75  $\mu$ M), we verified that the drug strongly inhibited SARS-CoV-2 infection in Caco-2 cells ( $p < 0.001$ ) (Figure 1C). Remarkably, bromhexine was more effective in reducing the SARS-CoV-2 replication than the positive control camostat mesylate ( $p < 0.0001$ ), with 1.5-fold-higher inhibition efficiency than camostat mesylate (Figure 1C). Moreover, antiviral effects of bromhexine over SARS-CoV-2 infection was not reproduced when we use HUH7 and Vero CCL81 cells lines (Figure 1D). Infectious virus titration experiments determined by TCID<sub>50</sub> revealed that the drug did not exhibit direct virucidal activity at 1500 nM after 2 hours of incubation at room temperature (Figure 1E).

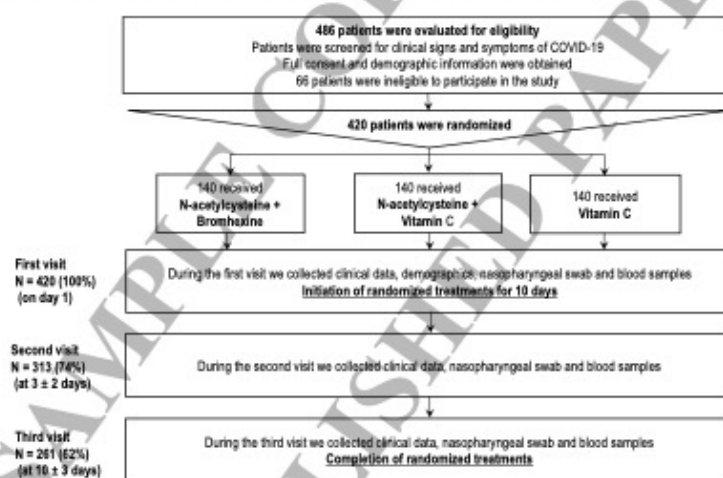


**Figure 1.** Bromhexing (BMX) shows potential to inhibit SARS-CoV-2 proliferation in vitro. A. Docking model of the 3D structures TMPRSS2 protein and BMX using the Achilles blind docking server. Green and pink colors indicate the TMPRSS2 protein and its active site residue, respectively. The chemical structure represents the BMX. B. Dose-response effect of BMX concentrations in the SARS-CoV-2 progeny RNA production in parental lineage (blue line) and P.1 lineage (red line). C. Absolute quantitation of viral load of SARS-CoV-2 in Caco-2 cells treated for 48h with BMX at 0.75 μM, Camostat and mock (DMSO 0.004%). D. BMX inhibition of SARS-CoV2 replication in Caco-2, HUH7, and Vero cell lineages. E. Virucidal activity of BMX treatment represented by SARS-CoV-2 titers with TCID<sub>50</sub> assay. (\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\*\* P < 0.001)

### 3.2 A randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial Tested the Efficacy of NAC+BMX Treatment for Mild or Moderate COVID-19

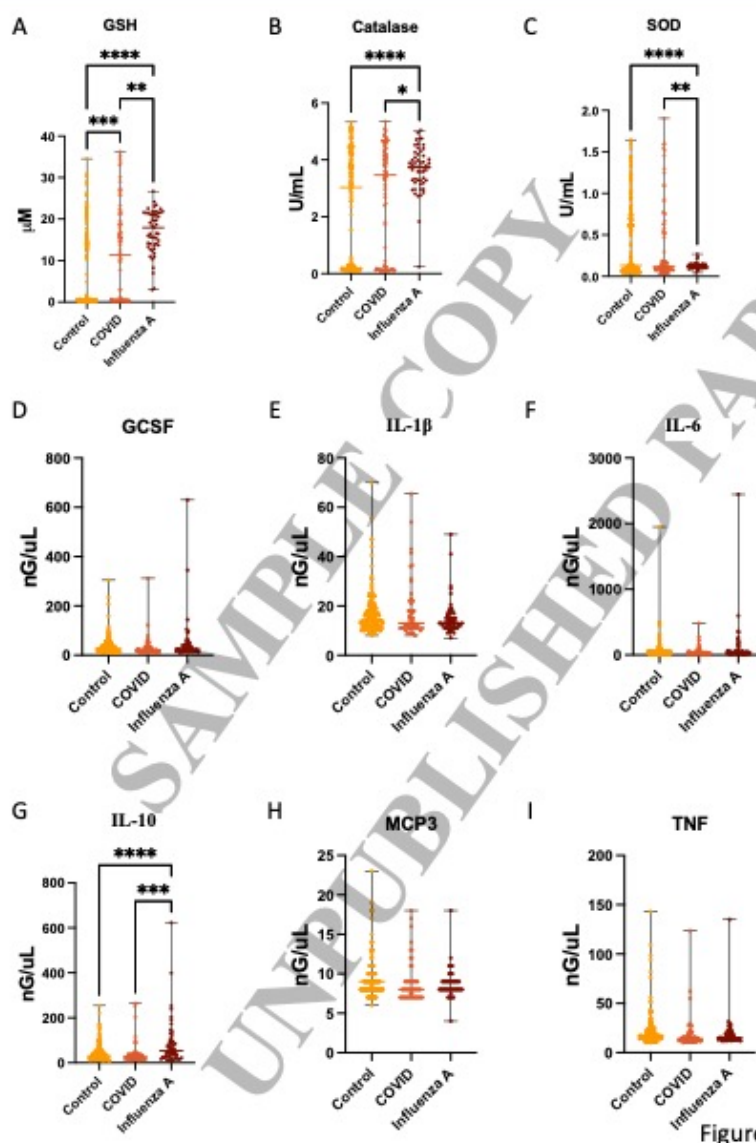
Considering the *in vitro* results, we proposed a clinical trial to test the efficacy of treating mild respiratory infections caused by SARS-CoV-2 with N-acetyl cysteine (NAC) and NAC combined with bromhexine (NAC + BMX). Figure 2 shows a flowchart of selection, randomization, and follow-up of patients in the study protocol. After signing the consent form, a total of 486 patients with mild and moderate respiratory syndrome were evaluated for eligibility for entry into the study. Of these, 420 (86%) were enrolled and randomized to treatment with placebo (Control), N-acetyl cysteine alone (NAC), and NAC combined

with Bromhexine (NAC + BMX). During the first visit, 420 (100%) patients with mild and moderate respiratory syndrome were evaluated and allocated to one of the experimental groups. During the second visit (3 + 2 days) we evaluated 313 (74%) patients. During the third and final visit (10 + 3 days) of the study, we evaluated 261 (62%) patients. Supplementary figure 1 shows a heat map showing the dispersion of confirmed COVID-19 cases (2,406 georeferenced cases) at the peak of the third wave of COVID-19 in Fortaleza, between January and February 2022. According to the Municipal Health department (February 21, 2022), this period coincides with the period of greatest recruitment in the clinical trial, under the predominance of the Omicron variant of SARS-CoV-2.

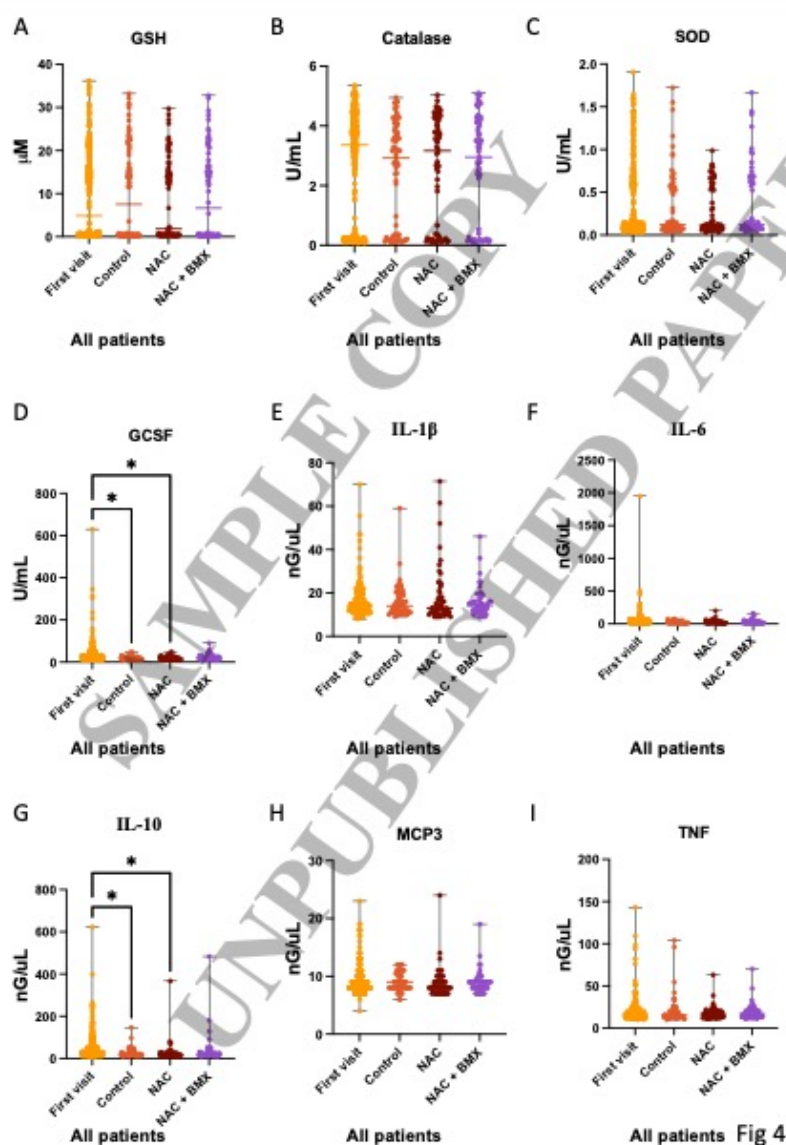


**Figure 2.** Flowchart representing the selection, randomization, and follow-up of patients during the single center clinical trial to test the efficacy of treating mild respiratory infections caused by SARS-CoV-2 with N-acetyl cysteine (NAC) and NAC combined with bromhexine (NAC + BMX).





**Figure 3.** Serum Antioxidant activity and cytokine levels of patients with acute respiratory syndrome without diagnosis (Control), with SARS-CoV-2 infection (COVID), and with Influenza A virus infection (Influenza A). A. Concentration of Glutathione (GSH) in serum of patients with acute respiratory syndrome. B. Activity of Catalase in serum of patients with acute respiratory syndrome. C. Activity of superoxide dismutase (SOD) in serum of patients with acute respiratory syndrome. Concentration of GCSF (D), Interleukin 1 beta (IL-1β) (E), Interleukin 6 (IL-6) (F), Interleukin 10 (IL-10) (G), Monocyte-chemotactic protein 3 (MCP3) (H), and Tumor necrose factor (TNF) (I) in serum level of patients with acute respiratory syndrome. (\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\*\* P < 0.001)



**Figure 4.** Serum Antioxidant activity and cytokine levels of patients with acute respiratory syndrome treated with placebo (Control), N-Acetyl cysteine (NAC), or N-acetyl cysteine combined with bromhexine (NAC+BMX) for 3-5 days was compared to serum collected during the first visit (First visit). A. Concentration of Glutathione (GSH) in serum of patients with acute respiratory syndrome. B. Activity of Catalase in serum of patients with acute respiratory syndrome. C. Activity of superoxide dismutase (SOD) in serum of patients with acute respiratory syndrome. Concentration of GCSF (D), Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ )(E), Interleukin 6 (IL-6) (F), Interleukin 10 (IL-10) (G), Monocyte-chemotactic protein 3 (MCP3) (H), and Tumor necrose factor (TNF) (I) in serum level of patients with acute respiratory syndrome. (\*  $P < 0.05$ )

Supplementary table 1 shows demographic and clinical characteristics of patients with mild and moderate respiratory syndrome collected during the first visit of the study protocol. During the first visit was observed a median of six signs and symptoms and an IQR of 5-7. Most patients had one or more comorbidities (241/383; 63%), the highest to lowest frequency were listed as obesity, former smoker, smoking, hypertension, asthma, diabetes, and other diseases with frequencies  $\leq 1\%$ . Twenty percent of the patients enrolled in the study were positive for SARS-CoV-2 (83/419), 13% (55/420) were positive for influenza A, 0.2% (1/420) were positive for influenza B and 1%

were positive for respiratory syncytial virus. In Supplementary table 2 we show the general clinical characteristics among patients with mild and moderate respiratory syndrome at their first visit. In general, patients with mild and moderate respiratory syndrome had headache (366/417; 88%), cough (368/419; 88%), rhinorrhea (356/416; 86%), weakness (367/419; 88%), 88%), sore throat (365/419; 87%), fever ( $\geq 37.8^\circ\text{C}$ ) (310/420; 74%), muscle pain/arthralgia (309/419; 74%), and with a frequency  $< 30\%$  for shortness of breath, ageusia or dysgeusia, anosmia or dysosmia and skin irritation.

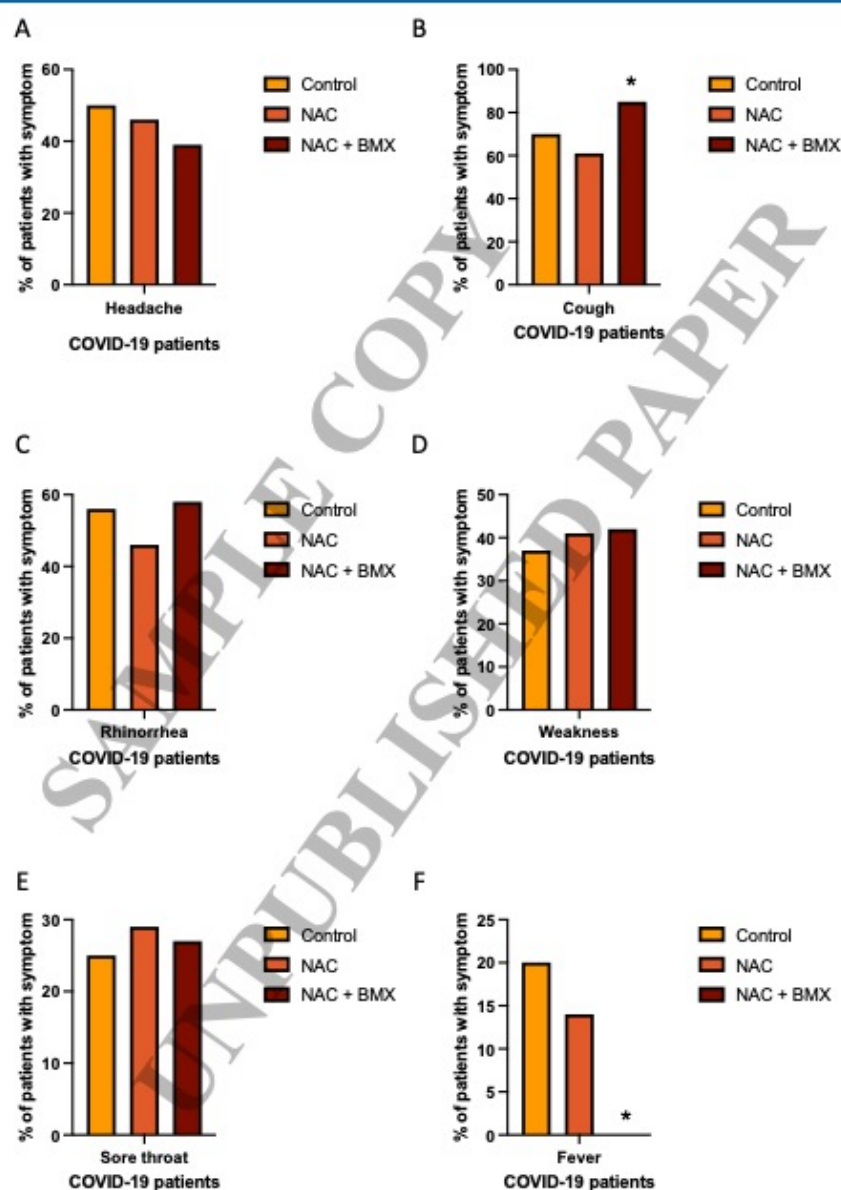
The results of clinical score in the treated population positive for COVID-19 (SARS-CoV-2) are shown in Table 1. Note that the overall clinical score in the ordinal score of a symptoms or signs was reduced in the group treated with NAC + BMX compared to control group with Vit. C (2/26; 8% vs 7/18; 39%;  $p < 0.05$ ). Analyzing the details of which specific signs and symptoms were relevant in reducing the score, we observed that fever ( $\geq 37.8^\circ\text{C}$ ) was reduced by NAC + BMX treatment when compared to control treatments (Figure 5F). Treatment with NAC+BMX also increased cough in patients with COVID-19 (Figure 5B).

Treatment with NAC alone decreased muscle pain / arthralgia in COVID-19 patients (Figure 6A), furthermore NAC treatment alone also increased ageusia / dysgeusia in COVID-19 patients (Figure 6C). Adverse events are shown in Supplementary table 3. Overall adverse events occurred with a frequency of less than 3% (12/420) and comparison between experimental treatment groups did not show significant differences. There was a serious adverse event related to the hospitalization of a patient due to worsening of the patient's health, this patient was allocated in the control group of Vit. C.

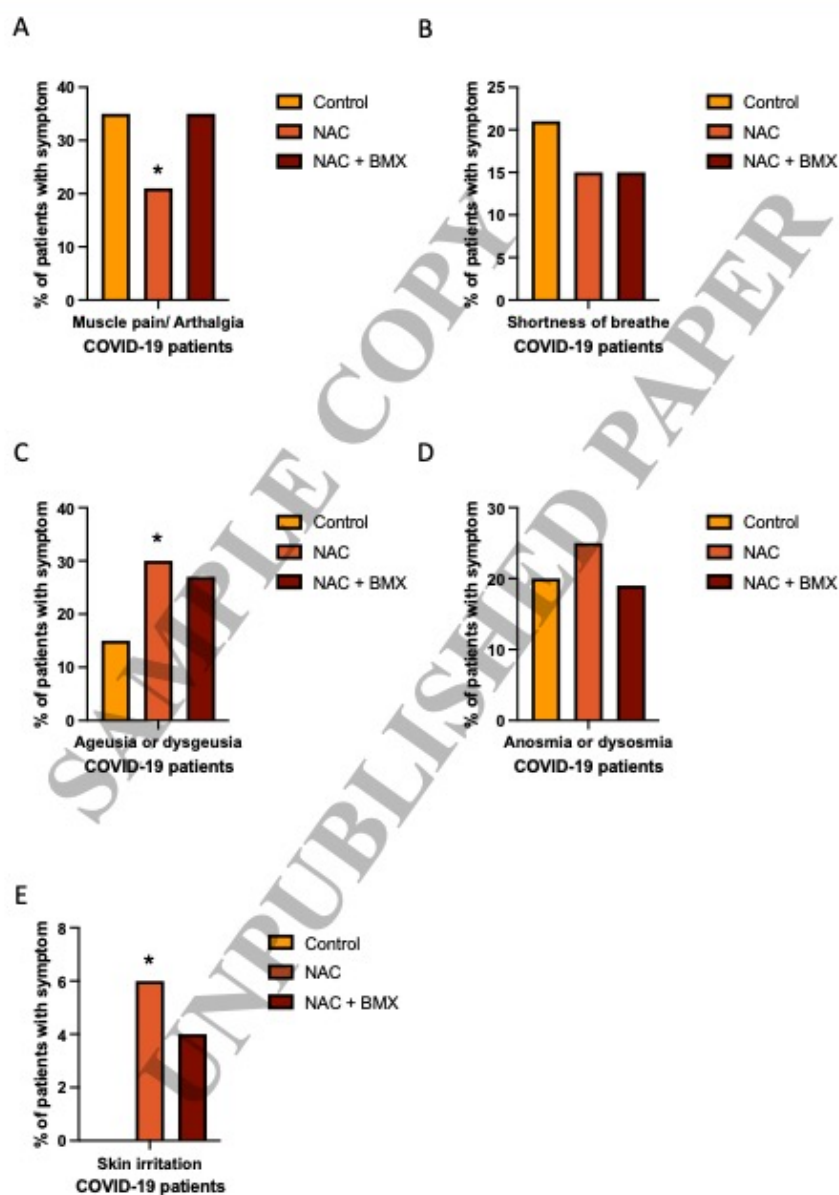
| Clinical scores at the second visit in the study protocol                              | Total*<br>N (%) | N-acetylcysteine +<br>bromhexine <sup>a</sup><br>N (%) | N-acetylcysteine +<br>vitamin C<br>N (%) | Vitamin C<br>N (%)        |
|--|-----------------|--|--|---------------------------|
| <b>Score on the ordinal scale – no. (%) RT-PCR positive for SARS-CoV-2<sup>b</sup></b> |                 |  |  |                           |
| 1. No symptoms or signs  | 7 / 69 (10)     | 3 / 26 (12) <sup>a</sup>                               | 3 / 25 (12) <sup>a</sup>                 | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>   |
| 2. A symptom or sign   | 13 / 69 (19)    | 2 / 26 (8) <sup>a</sup>                                | 4 / 25 (16) <sup>a,b</sup>               | 7 / 18 (39) <sup>b</sup>  |
| 3. Two symptoms or signs   | 10 / 69 (15)    | 5 / 26 (19) <sup>a</sup>                               | 3 / 25 (12) <sup>a</sup>                 | 2 / 18 (11) <sup>a</sup>  |
| 4. Three or more symptoms or signs   | 39 / 69 (57)    | 16 / 26 (62) <sup>a</sup>                              | 15 / 25 (60) <sup>a</sup>                | 8 / 18 (44) <sup>a</sup>  |
| <b>Clinical signs and symptoms</b>   |                 |  |  |                           |
| Headache   | 33 / 74 (45)    | 10 / 26 (39) <sup>a</sup>                              | 13 / 28 (46) <sup>a</sup>                | 10 / 20 (50) <sup>a</sup> |
| Cough  | 53 / 74 (72)    | 22 / 26 (85) <sup>a</sup>                              | 17 / 28 (61) <sup>a</sup>                | 14 / 20 (70) <sup>a</sup> |
| Rhinorrhea   | 36 / 74 (49)    | 15 / 26 (58) <sup>a</sup>                              | 13 / 28 (46) <sup>a</sup>                | 8 / 20 (56) <sup>a</sup>  |
| Weakness   | 29 / 72 (40)    | 11 / 26 (42) <sup>a</sup>                              | 11 / 27 (41) <sup>a</sup>                | 7 / 19 (37) <sup>a</sup>  |
| Sore throat  | 20 / 74 (27)    | 7 / 26 (27) <sup>a</sup>                               | 8 / 28 (29) <sup>a</sup>                 | 5 / 20 (25) <sup>a</sup>  |
| <b>Fever (<math>\geq 37.8^\circ\text{C}</math>)</b>                                    | 8 / 74 (11)     | 0 / 26 (0) <sup>a</sup>                                | 4 / 28 (14) <sup>b</sup>                 | 4 / 20 (20) <sup>b</sup>  |
| Muscle pain/arthralgia   | 22 / 74 (30)    | 9 / 26 (35) <sup>a</sup>                               | 6 / 28 (21) <sup>a</sup>                 | 7 / 20 (35) <sup>a</sup>  |
| Shortness of breathe   | 12 / 72 (17)    | 4 / 26 (15) <sup>a</sup>                               | 4 / 27 (15) <sup>a</sup>                 | 4 / 19 (21) <sup>a</sup>  |
| Ageusia or dysgeusia   | 18 / 73 (25)    | 7 / 26 (27) <sup>a</sup>                               | 8 / 27 (30) <sup>a</sup>                 | 3 / 20 (15) <sup>a</sup>  |
| Anosmia or dysosmia  | 16 / 74 (22)    | 5 / 26 (19) <sup>a</sup>                               | 7 / 28 (25) <sup>a</sup>                 | 4 / 20 (20) <sup>a</sup>  |
| Skin irritation  | 3 / 74 (4)      | 1 / 26 (4) <sup>a</sup>                                | 2 / 28 (6) <sup>a</sup>                  | 0 / 20 (0) <sup>a</sup>   |

\* The percentage may not add up to 100 due to rounding. <sup>b</sup> RT-PCR positive by CT  $< 37$ . <sup>a</sup> Treatment dosage by experimental group: N-acetylcysteine 1,800 mg/day for 10 days + bromhexine 32 mg/day PO; N-acetylcysteine 1800 mg/day PO for 10 days; Control placebo (Vitamin C 500 mg/Day PO for 10 days) + juice vehicle. + Statistical tests used: Chi-Square Likelihood Ratio Test. Each subscript letter denotes a subset of treatment categories whose column proportions do not significantly differ from each other at the 0.05 level.

**Table 1. Results according to clinical scores in the treated population and positive RT-PCR test for SARS-CoV-2.**



**Figure 5.** Prevalence of reported symptoms of patients with acute respiratory syndrome diagnoses with COVID-19 treated with placebo (Control), N-Acetyl cysteine (NAC), or N-acetyl cysteine combined with bromhexine (NAC+BMX) for 3-5 days. A. Prevalence of Headache in each treatment group. B. Prevalence of cough in each treatment group. C. Prevalence of Rhinorrhea in each treatment group. D. Prevalence of weakness in each treatment group. E. Prevalence of sore throat in each treatment group. F. Prevalence of fever in each treatment group. (\* P < 0.05)



**Figure 6:** Prevalence of reported symptoms of patients with acute respiratory syndrome diagnoses with COVID-19 treated with placebo (Control), N-Acetyl cysteine (NAC), or Nacetyl cysteine combined with bromhexine (NAC+BMX) for 3-5 days. A. Prevalence of muscle pain / arthralgia in each treatment group. B. Prevalence of shortness of breathe in each treatment group. C. Prevalence of Ageusia or dysgeusia in each treatment group. D. Prevalence of Anosmia or dysosmia in each treatment group. E. Prevalence of skin irritation in each treatment group. (\* P < 0.05)

#### 4. Discussion

Antiviral drugs for the treatment of mild to moderate COVID-19 is extremely limited. The CDC, USA indicates only two drugs for the treatment of COVID-19, nirmatrelvir combined with ritonavir (Paxlovid) and Remdesivir, both approved by Food and Drug Administration (FDA). There is strong evidence that patients at risk for severe COVID-19 have a reduced risk for hospitalization and death when taking these drugs [15, 16]. However, these medications are not easily available in the pharmaceutical market, especially in developing countries. This unavailability is mostly due to the high economic cost of making these drugs, turning this treatment unavailable for the population. This randomized clinical trial evaluated the activity of drugs available at lower costs, such as N-acetylcysteine and bromhexine. Pre-clinical experiments revealed that BMX significantly inhibits SARS-CoV-2 infection and replication in vitro. Molecular docking showed that bromhexine binds to the extracellular domain of TMPRSS2 (-5.7 kcal/mole binding energy). Bromhexine significantly reduces the production of SARS-CoV-2 progeny in Caco-2 cells in a dose-dependent manner. The outcome observed in Caco-2, which are known to express TMPRSS2 (mRNA and protein) [17], were not reproduced with HUH7 and Vero CCL-81 cells. This difference could be explained by a relatively low level of expression of ACE2 in hepatocytes (e.g., HUH7) and by differences in the nonhuman primate TMPRSS2 on Vero CCL-81 cells [18]. Furthermore, bromhexine showed a higher inhibitory effect than camostat, a widely known TMPRSS2 inhibitor. These results strongly indicate that the anti-SARS-CoV-2 action of bromhexine is mediated by TMPRSS2 inhibition.

Corroborating with our pre-clinical results, the randomized clinical trial showed that the combination N-acetylcysteine plus bromhexine significantly reduced the clinical score of COVID-19 patients, associated specifically with the reduction of fever ( $\geq 37.8$  °C) in patients. These results suggest a beneficial action upon bromhexine treatment in the SARS-CoV-2 infection. Clinical improvement in treatment groups was mainly due to abolition of fever. The results also emphasize the absence of adverse events and serious adverse and the high tolerability of patients taking these medications. As we did not observe an isolated benefit of N-acetylcysteine on the clinical score, we believe that the beneficial effect on the observed clinical improvement was more associated with the use of bromhexine. These medications are already widely used in children and older people, showing the broad potential benefit in the treatment of COVID-19 in these populations considering their risk for developing severe COVID-19. Bromhexine is a mucolytic compound approved by FDA and derived from the alkaloid vasicine, which has been identified as a potential inhibitor of TMPRSS2 [11,19]. We observed an increase in cough in patients treated with bromhexine, this increase may be due to its mucolytic activity stimulating the expectorant response aiding in the removal of virus and debris from the airways.

Two others related bromhexine randomized clinical trial reports were found [20,21]. Ansarin et al. (2020) was using bromhexine (24mg p.o./day, 14 days) to reduced patient transfer to the

intensive care unit, intubation, and mortality rate in patients with COVID-19. In the study by Méndez et al. (2022), they were also using open-label randomized design, where bromhexine was used at a dose of 48 mg p.o./day for 7 days. This 2022 study showed no reduction in viral load for SARS-CoV-2 measured at 4, 7 and 14 days compared to the control standard of care. In our study, we observed a drastic reduction in viral load as early as the third day of evolution in all treatment groups, thus making it difficult to assess this secondary endpoint. Our study seems to be the only one so far with a randomized, double-blind clinical trial design with placebo control and having a clinical score of signs and symptoms for COVID-19 as the primary outcome parameter.

SARS-CoV-2 blocks the activity of the ACE2 receptor leading to an increased activity of angiotensin II (ANGII). ANGII binds to AT1R activating NADPH oxidases which generates several reactive oxygen species [22]. ROS mediated oxidative stress leads to activation of NF- $\kappa$ B in a signaling cascade to create a cytokine storm associated with tissue damage and poor prognosis [23]. GSH is an antioxidant enzyme known as a master regulator of oxidative stress in all tissues. In COVID-19 GSH seems to inhibit NF- $\kappa$ B activation by reducing ROS production, consequently GSH antioxidant activity helps to control cytokine storms [24]. Serum level of patients diagnosed with COVID-19 or Influenza A infection showed higher levels of GSH in comparison to a group of patients without either of those viruses (Control). Furthermore, Influenza A patients also showed higher levels of catalase and SOD activity in their plasma when compared to the control groups and COVID-19 patients. The damage that is occasioned by oxidative stress is not peculiar to SARS infection, it is shared by all inflammatory lung diseases. This study shows that Influenza A patients can count on the activity of 3 different antioxidant enzymes while SARS-CoV-2 infected patients rely only on GSH. However, it is important to mention that GSH deficiency has been observed in severe COVID-19 disease [25,26], which lead us to hypothesize that those patients presented a mild case of this disease due to their high levels of GSH activity.

Out of the cytokines analyzed, only IL-10 was increased in plasma of Influenza A patients when compared to control or COVID-19 patients. IL-10 works as an anti-inflammatory cytokine mediating the activity of Th1 cells, NK cells, and macrophages. This anti-inflammatory response is important to prevent tissue damage. Thus, proper activation of this cytokine is important for optimal removal of pathogens and prevention of tissue damage. Influenza A patients are actively producing and releasing IL-10 in their plasma, suggesting the inflammatory response to the virus, while COVID-19 patients do not show the same response. However, higher level of IL-10 has been found in severe COVID-19 patients, these studies hypothesize that IL-10 has an inflammatory role in these cases [27, 28].

In conclusion, our results demonstrate that BMX effectively inhibits SARS-CoV-2 infection in vitro and the randomized trial data suggest that NAC + BMX treatment is beneficial in reducing ordinal clinical score, specifically by the reduction of

fever in patients with mild and moderate respiratory syndrome and with COVID-19.

**Data Availability Statement:** Study protocol is available on request to the corresponding author and researchers support team.

**Funding Statement:** This study received support from the Cearense Foundation for Supporting Scientific and Technological Development - Funcap grant number 03041300/2021, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 403201/20209), and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant number 2019/26119-0).

**Conflict of Interest Disclosure:** There are no conflicts of interest to disclose.

#### Author Contributions:

R. B. Martins, I. Ferreira, J. P. Souza, M. Pontelli, I. A. Castro, T. M. Lima, R. M. M. Viana, D. M. Jorge, P. D. Marcato and E. Arruda participated in the conceptualization of the pre-clinical experiments.

A.A. Santos, P.J.C. Magalhães, A. Havt, H. P. Monteiro, E. Arruda-Neto, A.A.M. Lima participated in the conceptualization of the randomized trial.

R. B. Martins, I. Ferreira, J. P. Souza, M. Pontelli, I. A. Castro, T. M. Lima, R. M. M. Viana, D. M.

Jorge, P. D. Marcato and E. Arruda participated in the methodology of the pre-clinical experiments;

M. Clementino, E.A.G. Arruda, R.J. Pires-Neto, M.S. Medeiros, J. Quirino-Filho, R.N.D.G. Gondim, José K. Souza, Xhaulla M.Q.C. Fonseca, L.M.V.C. Magalhães, K.F. Cavalcante, V.A.F. Viana, Liana Perdigão Mello, A. Havt, and A.A.M. Lima participated in the methodology of the randomized trial.

M. Clementino, E. Arruda, J. Quirino-Filho, R.N.D.G. Gondim, A. Havt, and A.A.M. Lima. Data curation: R. B. Martins, E. Arruda, J. Quirino-Filho, M. Clementino, R.N.D.G. Gondim, L.M.V.C. Magalhães, K.F. Cavalcante, V.A.F. Viana, L. P. Mello, A. Havt, A.A.M. Lima participated in data analysis.

M. Clementino, R. B. Martins, I. Ferreira, J. P. Souza, M. Pontelli, I. A. Castro, T. M. Lima, R. M. M.

Viana, D. M. Jorge, P. D. Marcato and E. Arruda, A.A. Santos, P.J.C. Magalhães, A. Havt, H. P. Monteiro, E. Arruda-Neto, A.A.M. Lima participated in the writing and submission of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### Ethics Approval Statement:

This trial was approved by the Brazilian National Research Ethics Commission (no. 47715321.9.0000.5054)

#### Patient Consent Statement:

Patients with mild to moderate respiratory infection and clinical suspicion of COVID-19 were invited to participate in the study after signing a consent form.

#### Permission to Reproduce Material from Other Sources:

Not applicable.

#### Clinical trial Registration:

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04928495

#### Acknowledgements

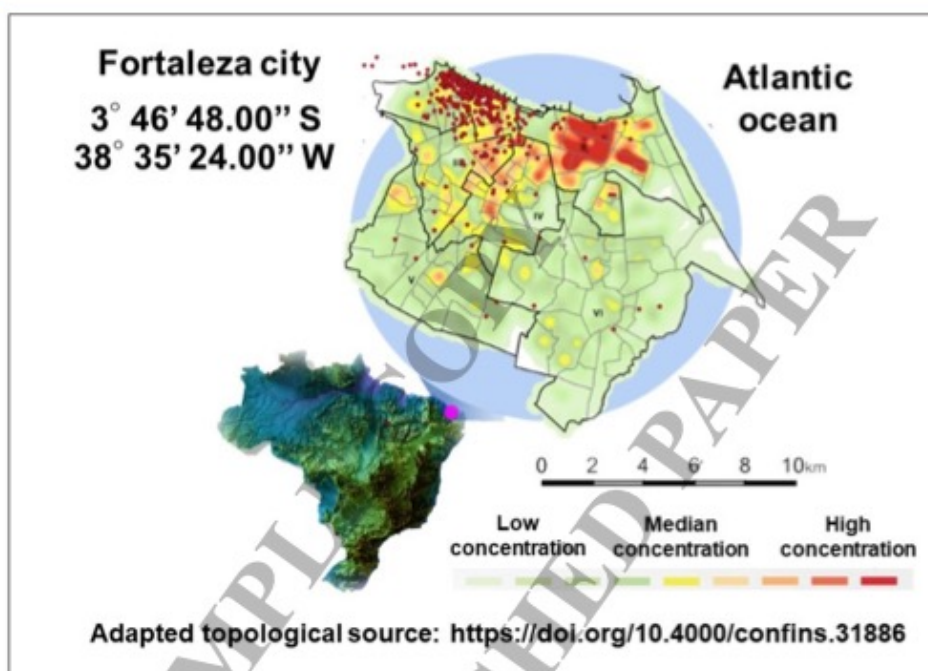
We thank the patients for their availability to participate in this study. We also thank all staff participating in the randomized trial including administrators, coordinators at various levels of research, health workers and laboratory technical assistants. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### References

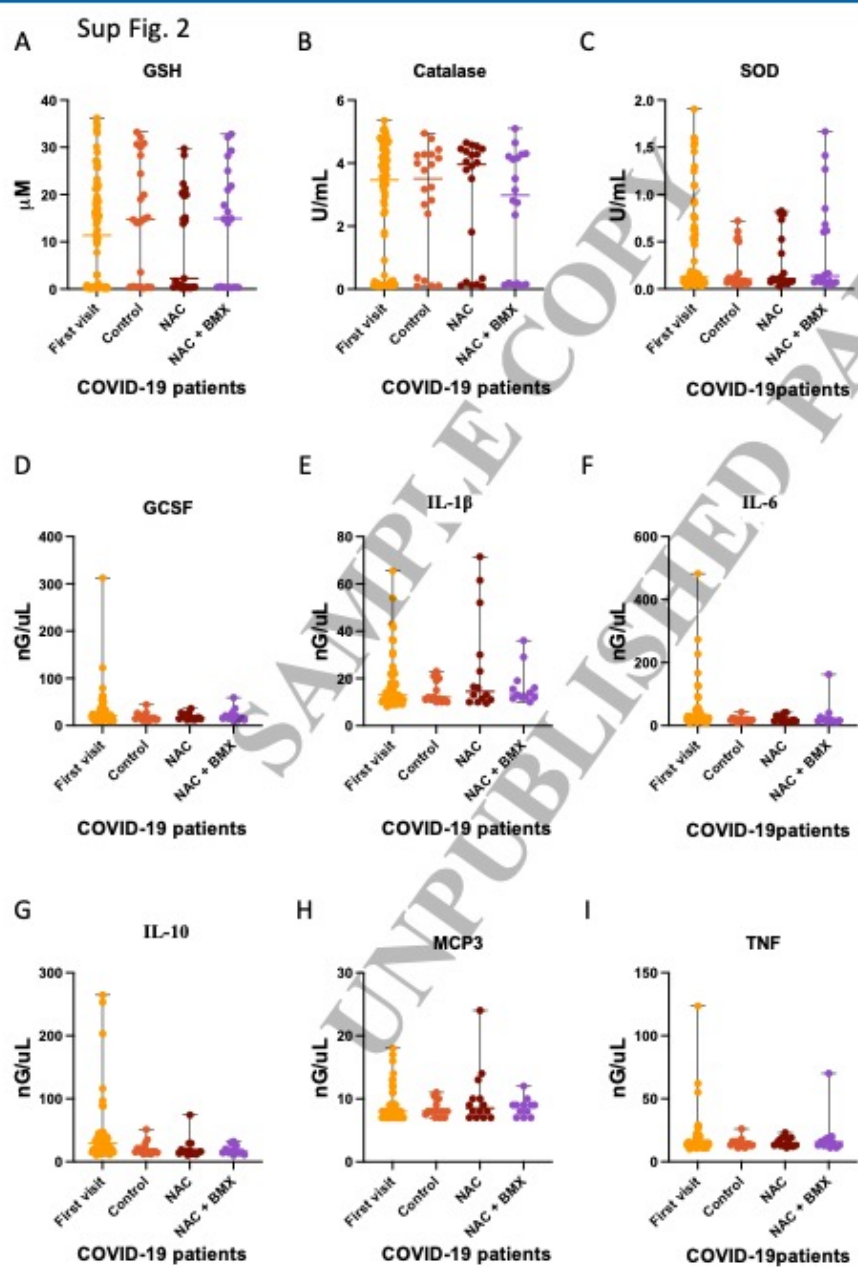
- Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., ... & Wang, C. (2020). A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *New England journal of medicine*, 382(19), 1787-1799.
- Borba, M. G. S., Val, F. F. A., Sampaio, V. S., Alexandre, M. A. A., Melo, G. C., Brito, M., ... & Lacerda, M. V. G. (2020). Effect of high vs low doses of chloroquine diphosphate as adjunctive therapy for patients hospitalized with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection: a randomized clinical trial. *JAMA network open*, 3(4), e208857-e208857.
- Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., ... & Lane, H. C. (2020). Remdesivir for the treatment of Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 383(19), 1813-1826.
- Shi, Z., & Puyo, C. A. (2020). N-acetylcysteine to combat COVID-19: an evidence review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 1047-1055.
- Poppe, M., Wittig, S., Jurida, L., Bartkuhn, M., Wilhelm, J., Müller, H., ... & Kracht, M. (2017). The NF- $\kappa$ B-dependent and-independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells. *PLoS pathogens*, 13(3), e1006286.
- Geiler, J., Michaelis, M., Naczek, P., Leutz, A., Langer, K., Doerr, H. W., & Cinatl Jr, J. (2010). N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochemical pharmacology*, 79(3), 413-420.
- HO, W. Z., & DOUGLAS, S. D. (1992). Glutathione and N-acetylcysteine suppression of human immunodeficiency virus replication in human monocyte/macrophages in vitro. *AIDS research and human retroviruses*, 8(7), 1249-1253.
- Mata, M., Sarrion, I., Armengot, M., Carda, C., Martinez, I., Melero, J. A., & Cortijo, J. (2012). Respiratory syncytial virus inhibits ciliogenesis in differentiated normal human bronchial epithelial cells: effectiveness of N-acetylcysteine. *PLoS one*, 7(10), e48037.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., ... & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2), 271-280.
- Maggio, R., & Corsini, G. U. (2020). Repurposing the mucolytic cough suppressant and TMPRSS2 protease

- inhibitor bromhexine for the prevention and management of SARS-CoV-2 infection. *Pharmacological research*, 157, 104837.
11. Fu, Q., Zheng, X., Zhou, Y., Tang, L., Chen, Z., & Ni, S. (2021). Re-recognizing bromhexine hydrochloride: pharmaceutical properties and its possible role in treating pediatric COVID-19. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 77, 261-263.
  12. Habtemariam, S., Nabavi, S. F., Ghavami, S., Cismaru, C. A., Berindan-Neogoe, I., & Nabavi, S. M. (2020). Possible use of the mucolytic drug, bromhexine hydrochloride, as a prophylactic agent against SARS-CoV-2 infection based on its action on the Transmembrane Serine Protease 2. *Pharmacological Research*, 157, 104853.
  13. Lucas, J. M., Heinlein, C., Kim, T., Hernandez, S. A., Malik, M. S., True, L. D., ... & Nelson, P. S. (2014). The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis. *Cancer discovery*, 4(11), 1310-1325.
  14. Arruda, E. A., Pires-Neto, R. J., Medeiros, M. S., Quirino-Filho, J., Clementino, M., Gondim, R. N. D. G., ... & Magalhães, P. J. C. (2021). Clinical features, pathobiology, efficacy, and toxicity of tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine for mild to moderate SARS-CoV-2 infections. *Eur J Respir Med*, 3(3), 238-248.
  15. Hammond, J., Leister-Tebbe, H., Gardner, A., Abreu, P., Bao, W., Wisemandle, W., ... & Rysnak, J. M. (2022). Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 386(15), 1397-1408.
  16. Hashemian, S. M. R., Sheida, A., Taghizadieh, M., Memar, M. Y., Hamblin, M. R., Baghi, H. B., ... & Mirzaei, H. (2023). Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 162, 114367.
  17. Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., Danisch, S., ... & Pöhlmann, S. (2010). TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of virology*, 84(19), 10016-10025.
  18. Dong, M., Zhang, J., Ma, X., Tan, J., Chen, L., Liu, S., ... & Zhuang, L. (2020). ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110678.
  19. Shen, L. W., Mao, H. J., Wu, Y. L., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2017). TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. *Biochimie*, 142, 1-10.
  20. Ansarin, K., Tolouian, R., Ardalan, M., Taghizadieh, A., Varshochi, M., Teimouri, S., ... & Chapman, K. R. (2020). Effect of bromhexine on clinical outcomes and mortality in COVID-19 patients: A randomized clinical trial. *BioImpacts: BI*, 10(4), 209.
  21. Vila Méndez, M. L., Antón Sanz, C., Cárdenas García, A. D. R., Bravo Malo, A., Torres Martínez, F. J., Martín Moros, J. M., ... & Soler López, B. (2022). Efficacy of Bromhexine versus Standard of Care in Reducing Viral Load in Patients with Mild-to-Moderate COVID-19 Disease Attended in Primary Care: A Randomized Open-Label Trial. *Journal of Clinical Medicine*, 12(1), 142.
  22. Vajapey, R., Rini, D., Walston, J., & Abadir, P. (2014). The impact of age-related dysregulation of the angiotensin system on mitochondrial redox balance. *Frontiers in physiology*, 5, 439.
  23. Zhang, X., Wu, K., Wang, D., Yue, X., Song, D., Zhu, Y., & Wu, J. (2007). Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates interleukin-6 expression through cellular transcription factor NF- $\kappa$ B. *Virology*, 365(2), 324-335.
  24. Silvagno, F., Vernone, A., & Pescarmona, G. P. (2020). The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by COVID-19. *Antioxidants*, 9(7), 624.
  25. Kumar, P., Osahon, O., Vides, D. B., Hania, N., Minard, C. G., & Sekhar, R. V. (2021). Severe glutathione deficiency, oxidative stress and oxidant damage in adults hospitalized with COVID-19: Implications for GlyNAC (Glycine and N-Acetylcysteine) supplementation. *Antioxidants*, 11(1), 50.
  26. Labarrere, C. A., & Kassab, G. S. (2022). Glutathione deficiency in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection and its effects upon the host immune response in severe COVID-19 disease. *Frontiers in Microbiology*, 13, 979719.
  27. Dhar, S. K., Vishnupriyan, K., Damodar, S., Gujar, S., & Das, M. (2021). IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. *Heliyon*, 7(2).
  28. SALEH, M. A., TAMIM, H. H., MARAWAN, M., SAMEH, A., & SELIM, M. (2022). TNF- $\alpha$  and IL-10 Serum Levels in COVID-19 Patients and their Relation to Disease Severity. *The Medical Journal of Cairo University*, 90(9), 1459-1467.
  29. Neumann, J., Prezzemolo, T., Vanderbeke, L., Roca, C. P., Gerbaux, M., Janssens, S., ... & Yserbyt, J. (2020). Increased IL-10-producing regulatory T cells are characteristic of severe cases of COVID-19. *Clinical & translational immunology*, 9(11), e1204.





Supplementary figure 1



Supplementary figure 2

Supplementary table 1. Demographic and clinical characteristics of patients at baseline<sup>a, \*</sup>.

| Characteristics  | Total<br>N (%) | N-acetylcysteine<br>+ bromhexine <sup>§</sup><br>N (%) | N-acetylcysteine<br>+ vitamin C<br>N (%) | Vitamin C +<br>N (%) |
|--|----------------|--|--|----------------------|
| Age – year   | 34 (25-42)     | 34 (25-42)   | 33 (25-42)                               | 33 (25-40)           |
| Male – no. (%)   | 179 (43)       | 65 (47)  | 60 (43)                                  | 54 (40)              |
| Schooling score – no./total (%)  |                |  |  |                      |
| 1. First series completed  | 79 / 410 (19)  | 25 / 137 (18)  | 31 / 137 (23)                            | 23 / 136 (17)        |
| 2. Second series completed   | 271 / 410 (66) | 89 / 137 (65)  | 88 / 137 (64)                            | 94 / 136 (69)        |
| 3. Complete university degree  | 56 / 410 (14)  | 21 / 137 (53)  | 17 / 137 (12)                            | 18 / 136 (13)        |
| 4. Graduate degree completed   | 4 / 410 (1)    | 2 / 137 (2)  | 1 / 137 (1)                              | 1 / 136 (1)          |
| Median time (IQR)** from onset<br>of symptoms/signs to<br>randomization - days | 3 (2-4)        | 3 (2-4)  | 3 (2-4)                                  | 3 (2-4)              |
| Total number of symptoms and<br>signs – median (IQR)                           | 6 (5-7)        | 6 (5-7)  | 7 (5-7)                                  | 6 (5-7)              |
| Number of coexisting<br>conditions – no./total (%)                             |                |  |  |                      |
| None   | 142 / 383 (37) | 47 / 130 (36)  | 42 / 128 (33)                            | 53 / 125 (42)        |
| One  | 140 / 383 (37) | 50 / 130 (39)  | 47 / 128 (37)                            | 43 / 125 (34)        |
| two or more  | 101 / 383 (26) | 33 / 130 (25)  | 39 / 128 (31)                            | 29 / 125 (23)        |
| Coexisting conditions – no.<br>/total (%)                                      |                |  |  |                      |
| Obesity  | 73 / 420 (18)  | 22 / 137 (16)  | 25 / 139 (18)                            | 26 / 136 (19)        |
| Ex smoker  | 60 / 416 (14)  | 25 / 138 (18)  | 21 / 140 (15)                            | 14 / 138 (10)        |
| Smoke  | 48 / 420 (11)  | 16 / 140 (11)  | 18 / 140 (13)                            | 14 / 140 (10)        |
| Hypertension   | 45 / 420 (11)  | 11 / 140 (8)   | 16 / 140 (11)                            | 18 / 140 (13)        |
| Asthma   | 34 / 420 (8)   | 12 / 140 (9)   | 12 / 140 (9)                             | 10 / 140 (7)         |
| Type 1 or 2 diabetes   | 19 / 420 (5)   | 4 / 140 (3)  | 8 / 140 (6)                              | 7 / 140 (5)          |
| Heart disease  | 3 / 420 (1)    | 1 / 140 (1)  | 1 / 140 (1)                              | 1 / 139 (1)          |
| Liver disease  | 6 / 419 (1)    | 2 / 140 (1)  | 2 / 139 (1)                              | 2 / 140 (1)          |
| HIV / AIDS   | 5 / 411 (1)    | 2 / 137 (2)  | 2 / 138 (1)                              | 1 / 136 (1)          |
| Other respiratory diseases**   | 19 / 417 (5)   | 8 / 138 (6)  | 9 / 138 (7)                              | 2 / 138 (1)          |
| Other chronic diseases***  | 98 / 399 (25)  | 32 / 131 (24)  | 33 / 135 (24)                            | 33 / 133 (25)        |
| # of positive RT-PCR for SARS-<br>CoV-2 <sup>§</sup> - no./total (%)           | 83 / 419 (20)  | 29 / 140 (21)  | 32 / 139 (23)                            | 22 / 140 (16)        |
| Viral load: SARS-CoV-2 (RNA<br>copies/mL) – median (IQR)                       | 23 (0,60-472)  | 56 (0,46-398)  | 6 (0,52-299)                             | 59 (0,67-<br>580)    |
| Influenza A no./total (%)  | 55 / 420 (13)  | 17 / 140 (12)  | 16 / 140 (11)                            | 22 / 140 (16)        |
| Influenza B no./total (%)  | 1 / 420 (0,2)  | 1 / 140 (1)  | -  | -                    |
| Respiratory syncytial virus no.<br>/total (%)                                  | 4 / 420 (1)    | 2 / 140 (1)  | 2 / 140 (1)                              | -                    |

<sup>a</sup> Values are in median and IQR. \*\* IQR denotes interquartile range. The percentage may not add up to 100 due to rounding. <sup>§</sup> RT-PCR positive by CT < 37.

<sup>\*</sup> No statistical difference between all treatment groups. Statistical tests used: Kruskal-Wallis test or Chi-square Likelihood Ratio test. \*\* Other respiratory diseases included rhinitis 2% (9/420) and sinusitis 0.5% (2/420). \*\*\* Other chronic illnesses included: allergic rhinitis 8% (34/420), anxiety 2% (9/420), hypothyroidism 1%, and various others <1%; <sup>§</sup> Treatment dosage by experimental group: N-acetylcysteine 1,800 mg/day for 10 days + bromhexine 32 mg/day PO; N-acetylcysteine 1800 mg/day PO for 10 days; Control placebo (Vitamin C 500 mg/Day PO for 10 days) + juice vehicle.

Supplementary table 1

**Supplementary table 2. Clinical characteristics of mild to moderate acute respiratory infections with and without SARS-CoV-2 infection.**

| Clinical signs and symptoms           | Total<br>N (%) | Patients with<br>SARS-CoV-2<br>confirmed by<br>laboratory RT-PCR<br>N (%) | Patients who<br>tested negative<br>for SARS-CoV-2<br>N (%) | Values<br>of $p$ <sup>†</sup> |
|---------------------------------------|----------------|---|--|-------------------------------|
| Headache                              | 366 / 417 (88) | 74 / 82 (90)  | 291 / 334 (87)   | 0.287                         |
| Cough                                 | 368 / 419 (88) | 74 / 83 (89)  | 293 / 335 (88)   | 0.418                         |
| Rhinorrhea                            | 356 / 416 (86) | 72 / 82 (88)  | 283 / 333 (85)   | 0.325                         |
| Weakness                              | 367 / 419 (88) | 74 / 82 (90)  | 292 / 336 (87)   | 0.269                         |
| Sore throat                           | 365 / 419 (87) | 75 / 83 (90)  | 289 / 335 (86)   | 0.211                         |
| Fever ( $\geq 37.8^{\circ}\text{C}$ ) | 310 / 420 (74) | 64 / 83 (77)  | 245 / 336 (73)   | 0.264                         |
| Muscle pain/arthralgia                | 309 / 419 (74) | 67 / 83 (81)  | 241 / 335 (72)   | 0.066                         |
| Shortness of breathe                  | 85 / 405 (21)  | 18 / 80 (23)  | 67 / 324 (21)  | 0.412                         |
| Ageusia or dysgeusia                  | 67 / 415 (16)  | 15 / 83 (18)  | 52 / 331 (16)  | 0.354                         |
| Anosmia or dysosmia                   | 61 / 416 (15)  | 13 / 82 (16)  | 48 / 333 (14)  | 0.429                         |
| Skin irritation                       | 3 / 404 (1)    | 0 / 81 (0)  | 3 / 322 (1)  | 0.509                         |
| <b>Treatment</b>                      |                |   |  |                               |
| Analgesic and antipyretic             | 264 / 420 (63) | 52 / 83 (63)  | 211 / 336 (63)   | 0.538                         |
| Vitamins                              | 12 / 420 (3)   | 1 / 83 (1)  | 11 / 336 (3)   | 0.276                         |
| Antiemetic                            | 10 / 420 (2)   | 2 / 83 (2)  | 8 / 336 (2)  | 0.621                         |
| Antihistamine                         | 5 / 420 (1)    | 3 / 83 (4)  | 2 / 336 (1)  | 0.055                         |
| bronchodilator                        | 5 / 420 (1)    | 2 / 83 (2)  | 3 / 336 (1)  | 0.258                         |
| Anxiolytic                            | 3 / 420 (0.7)  | 1 / 83 (1)  | 2 / 336 (1)  | 0.485                         |
| antispasmodic                         | 3 / 420 (0.7)  | 3 / 83 (4)  | 0 / 336 (0)  | <b>0.008</b>                  |
| Antibiotic                            | 1 / 420 (0.2)  | 0 / 83 (0)  | 1 / 336 (0.3)  | 0.802                         |
| Anti-inflammatory                     | 1 / 420 (0.2)  | 0 / 83 (0)  | 1 / 336 (0.3)  | 0.802                         |
| Syrup                                 | 1 / 420 (0.2)  | 0 / 83 (0)  | 1 / 336 (0.3)  | 0.802                         |

<sup>†</sup> Statistical tests used: Chi-Square Test of Likelihood Ratio.

**Supplementary table 2**

Supplementary table 3. Number of adverse events and serious adverse events total and by study groups in patients with mild to moderate respiratory syndrome up to the 10<sup>th</sup> day visit.

| Parameters                    | Total*<br>N (%) | N-acetylcysteine<br>+ bromhexine <sup>a</sup><br>N (%) | N-acetylcysteine<br>+ vitamin C<br>N (%) | Vitamin C<br>N (%)       |
|-------------------------------|-----------------|--|--|--------------------------|
| <b>Adverse events</b>         |                 |  |  |                          |
| Nausea                        | 12 / 48 (25)    | 3 / 12 (25) <sup>a</sup>                               | 4 / 18 (22) <sup>a</sup>                 | 5 / 18 (28) <sup>a</sup> |
| Diarrhea                      | 10 / 48 (2)     | 4 / 12 (33) <sup>a</sup>                               | 3 / 18 (17) <sup>a</sup>                 | 3 / 18 (17) <sup>a</sup> |
| Abdominal pain                | 5 / 48 (10)     | 0 / 12 (0) <sup>a</sup>                                | 3 / 18 (17) <sup>a</sup>                 | 2 / 18 (11) <sup>a</sup> |
| Pharmacodermia                | 5 / 48 (10)     | 0 / 12 (0) <sup>a</sup>                                | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>                  | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>  |
| Dyspepsia                     | 3 / 48 (6)      | 0 / 12 (0) <sup>a</sup>                                | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>                  | 3 / 18 (17) <sup>a</sup> |
| Somnolence                    | 2 / 48 (4)      | 0 / 12 (0) <sup>a</sup>                                | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>                  | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>  |
| Cough                         | 2 / 48 (4)      | 1 / 12 (8) <sup>a</sup>                                | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>                  | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>  |
| Spots on the skin             | 1 / 48 (2)      | 3 / 12 (25) <sup>a</sup>                               | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>                  | 2 / 18 (11) <sup>a</sup> |
| Palpitation                   | 1 / 48 (2)      | 0 / 12 (0) <sup>a</sup>                                | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>                  | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>  |
| Sinusitis                     | 1 / 48 (2)      | 1 / 12 (8) <sup>a</sup>                                | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>                  | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>  |
| Sweating                      | 1 / 48 (2)      | 0 / 12 (0) <sup>a</sup>                                | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>                  | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>  |
| Gum ulcer                     | 1 / 48 (2)      | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>                                | 0 / 18 (0) <sup>a</sup>                  | 1 / 18 (6) <sup>a</sup>  |
| <b>Serious adverse events</b> |                 |  |  |                          |
| Hospitalization               | 1 / 420 (0.24)  | -  | -  | 1 / 140 (0.71)           |

\* The percentage may not add up to 100 due to rounding. <sup>a</sup> Treatment dosage by experimental group: N-acetylcysteine 1,800 mg/day for 10 days + bromhexine 32 mg/day PO; N-acetylcysteine 1800 mg/day PO for 10 days; Control placebo (Vitamin C 500 mg/Day PO for 10 days) + juice vehicle. <sup>b</sup> Statistical tests used: Chi-Square Likelihood Ratio Test. Each subscript letter denotes a subset of treatment categories whose column proportions do not significantly differ from each other at the 0.05 level.

Supplementary table 3

---

**Study Group Members - AVANTL**

| NAME                                 | E-mail                         | Function                               | IES          | Department and centers                              |
|--------------------------------------|--------------------------------|--|--------------|---|
| Aldo Ângelo Moreira Lima             | alima@ufc.br                   | Coordinator                            | UFC          | Fisiologia e Farmacologia, NUBIMED, UFC             |
| Alexandre Havt Bindá                 | ahavt@ufc.br                   | Collaborator                           | UFC          | Fisiologia e Farmacologia, NUBIMED, UFC             |
| Armênio Aguiar dos Santos            | meno@ufc.br                    | Collaborator                           | UFC          | Fisiologia e Farmacologia, NUBIMED, UFC             |
| Bruno Lins de Souza                  | bruno.lins.souza@gmail.com     | 2st Typing                             | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Charles Roberto Sousa de Melo        | filonego@ahoo.com.br           | Accounting Assistant                   | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Charlene Sousa de Melo               | charlienemelo@yahoo.com.br     | Laboratory technique                   | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Dayane Feitosa Guedes de Melo        | dayaneg.melo@hotmail.com       | Technique in nursing                   | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Djayne Rodrigues de Sousa            | djaynerodrigues@gmail.com      | Health Agent Coordinator               | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Érico Antônio Gomes de Arruda        | ericoarruda48@gmail.com        | Collaborator                           | HSJ          | Hospital São José, SESA, Fortaleza, CE, Brasil      |
| Eurico de Arruda Neto                | eaneto@fmfp.usp.br             | Collaborator                           | USP          | Biologia Celular, FMRP, USP, RB, São Paulo          |
| Fabiana Maria da Silva Nascimento    | etica-upc@ufc.br               | Study Coordinator and Ethics Committee | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Francisca Mônica da Silva Nascimento | monquinhasilva@gmail.com       | Health Agent Coordinator               | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Francisco de Sousa Junior            | fjunior@yahoo.com.br           | Programming Technician                 | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Hugo Pequeno Monteiro                | hugo.monteiro@unifesp.br       | Collaborator                           | EPM, UNIFESP | Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, SP |
| José Amadeus Sousa                   | apoio.ufc@gmail.com            | Laboratory Technical Maintenance       | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| José Quirino da Silva Filho          | jqf_ce@yahoo.com.br            | Programming Technician                 | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Kátia Maria Lima Nogueira            | katianog1@yahoo.com.br         | Project Administrator                  | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Lucia de Fátima Alves                | luciadefatimaalves60@gmail.com | Health Agent                           | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Luciana França da Silva              | lucianafds84@gmail.com         | Laboratory technique                   | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Lyvia M.V.C. Magalhães               | lyviacarneiro@hotmail.com      | Pharmacist                             | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Marco Clementino                     | Marco.Clementino22@gmail.com   | Collaborator                           | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Magina Maria Justa da Silva          | mary_justa@hotmail.com         | Nurse                                  | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Marenilda Justa da Silva             | mary_justa@hotmail.com         | Technique in nursing                   | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Maria Jacinilda Rodrigues Pereira    | maryjacy@outlook.com           | Nurse                                  | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Maria Luzia Sousa de Melo            | filonego@na il.com             | Health Agent                           | HSJ          | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC               |
| Mariana Silva Lima                   | limamarian@gmail.com           | Clinical researcher                    | UFC          | Nubimed, FAMED-UFC                                  |
| Melissa Soares Medeiros              | melmedeiros@hotmail.com        | Collaborator                           | HSJ          | Hospital São José, SESA, Fortaleza, CE, Brasil      |

|                              |                                |                      |     |   |
|------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----|---|
| Pedro Jorge Caldas Magalhães | pjcmagal@ufc.br                | Collaborator         | UFC | Fisiologia e Farmacologia, NUBIMED, UFC |
| Rafael Ferreira Mesquita     | rafael.f.mesquita@terra.com.br | Clinical researcher  | UFC | Nubimed, FAMED-UFC                      |
| Rafhaella N.D.G. Gondim      | rafhaellandgg@gmail.com        | Pharmacist           | UFC | Nubimed, FAMED-UFC                      |
| Renan Lobo Cavalcanti        | renanlobo@gmail.com            | Ind Typing           | UFC | Nubimed, FAMED-UFC                      |
| Roberto da Justa Pires Neto  | robertojusta@gmail.com         | Collaborator         | UFC | Saúde Comunitária, UFC                  |
| Rosania Maria de Paula Silva | paula.rosania@yahoo.com.br     | Health Agent         | HSJ | Hospital São José, Nubimed, FAMED-UFC   |
| Terezinha Freire França      | terezinhafrana45@yahoo.com.br  | Laboratory technique | UFC | Nubimed, FAMED-UFC                      |

IES: Instituições de Ensino Superior; UFC: Universidade Federal do Ceará; HSJ: Hospital São José; USP: Universidade de São Paulo; FAMED: Faculdade de Medicina; NUBIMED: Núcleo de Biomedicina; EPM, UNIFESP: Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, SP.

**Copyright:** ©2023 Aldo AM Lima, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ANEXO D – ARTIGO 4

## Mucosal Immunology

----SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost layers: From basic science to clinical relevance

--Manuscript Draft--

|   |   |
|---|---|
| Manuscript Number:                            | MUCIMM-D-23-00191   |
| Full Title:                                   | SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost layers: From basic science to clinical relevance  |
| Article Type:                                 | Article   |
| Keywords:                                     | Gastrointestinal; Spike; Mucosa; Barrier; Dysmotility.  |
| Corresponding Author:                         | Lucas Nicolau, Ph.D.<br>Federal University of the Parnaíba Delta<br>Parnaíba, Piauí BRAZIL  |
| Corresponding Author Secondary Information:   |   |
| Corresponding Author's Institution:           | Federal University of the Parnaíba Delta  |
| Corresponding Author's Secondary Institution: |   |
| First Author:                                 | Renata Rocha Nascimento, MsC  |
| First Author Secondary Information:           |   |
| Order of Authors:                             | Renata Rocha Nascimento, MsC<br>Cristhyane Costa Aquino<br>José Kleybson Sousa<br>Kalinne Gadelha, PhD<br>Aurilene Cajado, PhD<br>Carolina Schiebel, PhD<br>Sarah Dooley, PhD<br>Paulo Araújo Sousa, MsC<br>Jefferson Rocha, PhD<br>Jand Rolim Medeiros, PhD<br>Pedro Caldas Magalhães, PhD<br>Daniele Maria-Ferreira, PhD<br>Marcelo Biondaro Gois, PhD<br>Roberto Pereira Lima-Junior, PhD<br>Deysi Viana Wong, PhD<br>Aldo Lima, MD, PhD<br>Amy Engevik, PhD<br>Lucas Nicolau, Ph.D.<br>Mariana Lima Vale, PhD |
| Order of Authors Secondary Information:       |   |
| Manuscript Region of Origin:                  | BRAZIL  |
| Abstract:                                     | Studies have reported the occurrence of gastrointestinal (GI) symptoms, primarily diarrhea in COVID-19. However, the pathobiology regarding COVID-19 in the GI tract  |



|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
|                                     | <p>remains limited. Here, we present a novel experimental murine model with the inoculation of SARS-CoV-2 Spike protein in the jejunal lumen, in vitro approach with human enterocytes and in silico methodologies. Interaction of the Spike protein with the jejunal mucosa led to increased intestinal fluid accompanied by Cl<sup>-</sup> secretion, followed by intestinal edema, neutrophil infiltration, reduced glutathione levels, and increased cytokine levels (IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-10), indicating inflammation. Additionally, the viral epitope caused disruption in the mucosal histoarchitecture with impairment in Paneth and goblet cells, including decreased lysozyme and mucin, respectively. Upregulation of TLR2 and TLR4 gene expression suggested potential activation of local innate immunity. Moreover, this experimental model exhibited reduced contractile responses in jejunal smooth muscle. In barrier function, there was a decrease in transepithelial electrical resistance and alterations in the expression of tight junction proteins in the murine jejunal epithelium. Additionally, paracellular intestinal permeability increased in human enterocytes. Finally, in silico data revealed that the Spike protein interacts with CFTR and CaCC, highlighting the secretory effect promoted by the viral protein. Collectively, these data highlight the intricate sequence of events initiated by the interaction between the SARS-CoV-2 Spike protein and the GI system, including inflammation and phenomena tied to specialized innate immune cells within the gut.</p> |
| Suggested Reviewers:                | <p>Yasunari Kanda, PhD<br/>Kanagawa University<br/>kanda@nihs.go.jp</p> <p>Evgeny Knyazev, PhD<br/>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences<br/>knyazevvg@gmail.com</p>  |
| Additional Information:             |   |
| Question                            | Response  |
| Are any of the authors SMI members? | No  |

Cover Letter



Parnaíba Delta Federal University  
 Ministry of Education  
 Biodiversity and Biotechnology Research Center  
 Lab of Inflammation and Translational Gastroenterology

Subject: Manuscript Submission - "SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost layers: From basic science to clinical relevance"

Professor Benjamin Marsland

Editor-in-Chief

Mucosal Immunology

Dear Professor Benjamin Marsland,

I hope this letter finds you well. I am writing to submit a manuscript entitled "SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost layers: From basic science to clinical relevance", for consideration in Mucosal Immunology. I had the privilege of discussing with you earlier regarding the potential for an APC costs waiver, and I greatly appreciate your willingness to consider this matter.

The manuscript presents groundbreaking findings from our research project that delves into the complex relationship between the SARS-CoV-2 Spike protein and the gastrointestinal (GI) tract. Through meticulous experimentation involving both rodent and human samples, we have unraveled a series of intricate events that shed light on the multifaceted effects of the Spike protein on the GI system.

Our key findings are as follows:

- 1) Enhanced Chloride Secretion in Jejunal Segments: Exposure to the SARS-CoV-2 Spike protein triggers a remarkable surge in chloride (Cl<sup>-</sup>) secretion in rodent jejunal segments. This disruption of electrolyte balance has the potential to disturb the harmonious milieu of the small intestine, possibly leading to perturbed fluid equilibrium and ensuing diarrhea;
- 2) Disruption of Mucosal Integrity and Tight Junctions: Utilizing an innovative murine model, we demonstrate a profound impact on mucosal integrity caused by the presence of the SARS-CoV-2 Spike protein. This disruption leads to the disintegration of tight junctions among enterocytes, compromising the barrier function and potentially allowing the translocation of harmful agents across the intestinal lining;
- 3) Heightened Mucosal Permeability in Human Enterocytes: Human enterocytes exposed to the Spike protein exhibit escalated mucosal permeability. This compromised barrier function could enable the passage of molecules that are typically restricted, potentially fueling systemic inflammation and immune responses;
- 4) Diminished Mucus Blanket and MUC-2 Depletion: Examination of the jejunum reveals a noticeable reduction in the protective mucus layer covering the intestinal surface. Goblet cells responsible for mucus production exhibit reduced MUC-2 abundance, further compromising the protective function of the mucus layer;

---

Av. São Sebastião, 2819 – CEP 64.202.020 – Parnaíba/PI

E-mail: [lucasnicolau@ufpi.edu.br](mailto:lucasnicolau@ufpi.edu.br)



Parnaíba Delta Federal University  
 Ministry of Education  
 Biodiversity and Biotechnology Research Center  
 Lab of Inflammation and Translational Gastroenterology

Ligat

5) Paneth Cell Degranulation and Lysozyme Depletion: Exposure to the Spike protein induces the degranulation of Paneth cells, which release antimicrobial molecules such as lysozymes. However, the presence of the Spike protein results in a reduction of lysozyme levels, potentially disrupting the regulation of the gut's microbial population;

6) Heightened Cytokine Expression, Especially IL-6: Interaction with the Spike protein triggers an elevated production of pro-inflammatory cytokines, notably interleukin-6 (IL-6). This heightened cytokine expression can contribute to inflammation both locally and systemically, influencing various gut layers and the overall immune response;

7) Dampened Gut Motility: The cumulative effects of the Spike protein on the GI tract lead to reduced gut motility. This disturbance results from disrupted electrolyte balance, compromised mucosal integrity, and increased cytokine expression, particularly IL-6. Altered gut motility has the potential to disrupt digestion, absorption, and overall GI function.

These findings highlight the intricate sequence of events initiated by the interaction between the SARS-CoV-2 Spike protein and the GI system. The implications extend beyond respiratory effects, emphasizing the potential for significant disruptions in gut health and equilibrium. Comprehensive understanding of these phenomena underscores the need for targeted interventions to mitigate the broader repercussions of the virus.

Once again, I express my gratitude for your consideration of the APC costs waiver for this manuscript with mention of our most sincere acknowledgements to Mucosal Immunology support for the development of research in the Brazilian Northeast, the region with the lowest development rate in Brazil, but with scientists engaged in progress. I am confident that the dissemination of our findings in Mucosal Immunology will contribute significantly to the understanding of the virus's impact on the gastrointestinal tract. Thank you for your time and attention.

Sincerely,

Prof. Dr. Lucas Duarte Nicolau  
 Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC)  
 Lab of Inflammation and Translational  
 Gastroenterology (LIGAT)  
 Parnaíba Delta Federal University – Parnaíba, PI, Brazil

ORCID

Corresponding Author

Av. São Sebastião, 2819 – CEP 64.202.020 – Parnaíba/PI

E-mail: [lucasnicolau@ufpi.edu.br](mailto:lucasnicolau@ufpi.edu.br)

1 **SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost**  
2 **layers: From basic science to clinical relevance**

3  
4 Renata R. Nascimento<sup>1</sup>, Cristhyane C. Aquino<sup>2</sup>, José K. Sousa<sup>2,3</sup>, Kalinne L. Gadelha<sup>1</sup>, Aurilene  
5 G. Cajado<sup>1</sup>, Carolina S. Schiebel<sup>4</sup>, Sarah A Dooley<sup>7</sup>, Paulo A. Sousa<sup>5</sup>, Jefferson A. Rocha<sup>5</sup>, Jand  
6 R. Medeiros<sup>5</sup>, Pedro C. Magalhães<sup>1</sup>, Daniele Maria-Ferreira<sup>4</sup>, Marcelo B. Gois<sup>6</sup>, Roberto C. P.  
7 Lima-Junior<sup>1</sup>, Deysi V. T. Wong<sup>1</sup>, Aldo M. Lima<sup>2,3</sup>, Amy C. Engevik<sup>7</sup>, Lucas D. Nicolau<sup>2,5\*</sup>,  
8 Mariana L. Vale<sup>1</sup>  
9

10  
11  
12 <sup>1</sup>Post Graduation Program in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology,  
13 Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil  
14

15  
16 <sup>2</sup>Institute of Biomedicine for Brazilian Semi-Arid and Clinical Research Unit, Department of  
17 Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;  
18

19  
20 <sup>3</sup>Division of Infectious Diseases & International Health, University of Virginia School of  
21 Medicine, Charlottesville, VA, USA;  
22

23  
24 <sup>4</sup>Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Faculdades Pequeno Príncipe, Programa de Pós-  
25 graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdades  
26 Pequeno Príncipe, Curitiba, PR, Brazil.  
27

28  
29 <sup>5</sup>Biotechnology and Biodiversity Center Research, Lab of Inflammation and Translational  
30 Gastroenterology (LIGAT), Parnaíba Delta Federal University, Parnaíba, PI, Brazil;  
31

32  
33 <sup>6</sup>Faculty of Health Sciences, Federal University of Rondonópolis, MT, Brazil;  
34

35  
36 <sup>7</sup>Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, Medical University of South  
37 Carolina, Charleston, SC, USA.  
38

39  
40  
41 \*Corresponding author: LIGAT/UFDPar, Av. São Sebastião, 2819, CEP 64202-020, Parnaíba,  
42 PI, Brazil. Tel.: +55 86 99637-6170; E-mail address: lucasnicolau@ufpi.edu.br  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**ABSTRACT**

Studies have reported the occurrence of gastrointestinal (GI) symptoms, primarily diarrhea in COVID-19. However, the pathobiology regarding COVID-19 in the GI tract remains limited. Here, we present a novel experimental murine model with the inoculation of SARS-CoV-2 Spike protein in the jejunal lumen, in vitro approach with human enterocytes and in silico methodologies. Interaction of the Spike protein with the jejunal mucosa led to increased intestinal fluid accompanied by Cl<sup>-</sup> secretion, followed by intestinal edema, neutrophil infiltration, reduced glutathione levels, and increased cytokine levels (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10), indicating inflammation. Additionally, the viral epitope caused disruption in the mucosal histoarchitecture with impairment in Paneth and goblet cells, including decreased lysozyme and mucin, respectively. Upregulation of TLR2 and TLR4 gene expression suggested potential activation of local innate immunity. Moreover, this experimental model exhibited reduced contractile responses in jejunal smooth muscle. In barrier function, there was a decrease in transepithelial electrical resistance and alterations in the expression of tight junction proteins in the murine jejunal epithelium. Additionally, paracellular intestinal permeability increased in human enterocytes. Finally, in silico data revealed that the Spike protein interacts with CFTR and CaCC, highlighting the secretory effect promoted by the viral protein. Collectively, these data highlight the intricate sequence of events initiated by the interaction between the SARS-CoV-2 Spike protein and the GI system, including inflammation and phenomena tied to specialized innate immune cells within the gut.

**Keywords:** Gastrointestinal, Spike, Mucosa, Barrier, Dysmotility

## INTRODUCTION

COVID-19, a severe acute respiratory infection, originated from the SARS-CoV-2 coronavirus<sup>1</sup>. In addition to the pulmonary symptoms, the SARS-CoV-2 can affect other sites, including organs of the digestive system, leading to common symptoms of fever and respiratory complications. However, it is worth noting that some patients also report gastrointestinal (GI) symptoms such as nausea, vomiting, abdominal pain, and diarrhea, which are the most prevalent clinical signs and directly impact the patients' quality of life<sup>2,3</sup>.

Consequently, the literature suggests that damage to the GI tract caused by SARS-CoV-2 contributes to a poor prognosis for the disease. In particular, COVID-19 has been linked to alterations in the microbiome and dysfunction of the intestinal barrier in human studies, potentially resulting in the translocation of bacterial products and toxins into the circulatory system, thereby exacerbating the systemic inflammatory response<sup>4,5</sup>.

The crucial role of the intestine in regulating the immune system is well-established. However, the precise mechanisms underlying the pathophysiology of COVID-19-related gastrointestinal symptoms are not yet fully understood. Therefore, further studies are required to elucidate the underlying mechanisms of viral infection-induced diarrhea and to establish the correlation between respiratory and gastrointestinal symptoms. Given this scenario, we directed our efforts towards establishing an experimental model based on the interaction of SARS-CoV-2 Spike protein with the intestinal mucosa, which becomes a relevant alternative for studying the pathobiology in the GI tract. Thus, this innovative experimental model aimed to understand the effect of this recombinant protein on the secretory and contractile machinery, inflammatory response, and epithelial integrity of the intestinal mucosa in mice. In addition, the involvement of Paneth and goblet cells was also evaluated. Based on this, this research can serve as an experimental model for the study of the SARS-CoV-2 coronavirus, facilitating the search for preventive and therapeutic approaches for affected patients.

## RESULTS

### Spike protein inoculation in mouse small intestinal loops

The Spike inoculation model (Fig 1A) was standardized by performing tissue macroscopy, wet weight, intestinal fluid volume, and chloride concentration (Fig. 1). The highest Spike concentration (5 $\mu$ g/loop) was able to promote hyperemia, erythema, and tissue distension (Fig. 1B). This was followed by an increase in wet weight (Fig. 1C; Spike 5 $\mu$ g/loop: 109.20  $\pm$  8.62 vs. control 68.67  $\pm$  4.21 mg/cm) and intestinal fluid volume (Fig. 1D; Spike 5 $\mu$ g/loop: 288.60  $\pm$  60.45 vs. control: 11.25  $\pm$  2.26  $\mu$ l). Moreover, this same concentration of Spike has induced

1 increased chloride ions in the intestinal lumen (Fig. 1E; Spike 5µg/loop: 0.07541 ± 0.006 vs.  
2 Control: 0.04375 ± 0.001 mEq/L). While administration of Spike at a concentration of 3µg/loop  
3 resulted in an increase in only wet weight (Fig. 1C; 79.38 ± 13.52 mg/cm;  $p < 0.05$ ) and intestinal  
4 fluid volume (Fig. 1D; 120.00 ± 27.08 µL;  $p < 0.05$ ). Spike concentrations of 0.1, 0.3 and  
5 1µg/loop did not show effects on any of the analyzed parameters when compared to control  
6 groups.  
7  
8  
9  
10  
11

### 12 **Inflammatory changes triggered by SARS-CoV-2 Spike glycoprotein**

13 After the first experimental set, data showed that Spike (5µg/loop) had an important effect in  
14 all parameters, when compared to other concentrations. Thus, this concentration was chosen to  
15 perform all the following experimental procedures. Jejunum histological changes, the activity  
16 of MPO, the levels of GSH and MDA, cytokines (*Il6*, *Il10* and *Ifng*), pattern recognition  
17 receptors (*Tlr2*, *Tlr4*) and *Nfkb* gene expression were all assessed following administration of  
18 5µg/loop Spike. Additionally, pro-inflammatory cytokines protein expression (IL-1β, IL-6 and  
19 TNF-α; Fig. 2) was evaluated.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 Histopathological intestinal analysis showed that the Spike inoculation caused significant  
29 microscopic changes ( $p < 0.05$ ), including altered mucosal histoarchitecture (Fig. 2Aa; Spike  
30 1.97 ± 0.07 vs. control group 1.10 ± 0.07) through alterations of villi and crypt morphology,  
31 followed by epithelial cell disorganization (2Ab; Spike 2.06 ± 0.07 vs. control group 0.91 ±  
32 0.06). We also observed an inflammatory response characterized by the presence of  
33 inflammatory cell infiltrate (Fig. 2Ac; Spike 2.22 ± 0.06 vs. control group 1.35 ± 0.08).  
34 Correspondingly, the cumulative histopathological scores [Fig. 2Ad (mucosal histoarchitecture  
35 + epithelial changes + inflammatory cell infiltrate); Spike 6.25 ± 0.12 vs. control group 3.36 ±  
36 0.12] showed statistical differences ( $p < 0.05$ ) between murine gut inoculated with Spike  
37 compared to the control group.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 Moreover, micro-morphometry was performed to measure the thickness of intestinal tissue  
47 layers. Mild but significant ( $p < 0.05$ ) alterations in the jejunum of mice were observed  
48 particularly regarding the 1) muscular layer (Fig. 2Ba; Spike 57.88 ± 0.866 vs. control group  
49 89.24 ± 1.064 µm), 2) submucosa (Fig. 2Bb; Spike 37.98 ± 0.663 vs. control group 47.25 ±  
50 1.014 µm) and 3) mucosa (Fig. 2Bc; Spike 120, 9 ± 1.559 vs. control group 175.8 ± 2.258 µm).  
51 Spike inoculation into the intestinal lumen decreased the villi height (Fig. 2Bd; Spike 218 ±  
52 3.84 vs. control group 232.4 ± 3.29 µm) and increased the villi width (Fig. 2Bg; Spike 77.60 ±  
53 1.69 vs. control group 57.99 ± 0.90 µm). Furthermore, after intestinal Spike inoculation there  
54 was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in crypt depth (Fig. 2Be; Spike 65.60 ± 1.142 vs. control  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 group  $95.81 \pm 1.538 \mu\text{m}$ ) and crypt width (Fig. 2Bh; Spike  $38.21 \pm 0.45$  vs. control group  $42.54$   
2  $\pm 0.53 \mu\text{m}$ ). Additionally, the luminal presence of Spike on mucosal tissue decreased ( $p < 0.05$ )  
3 the height of enterocytes (Fig. 2Bf; Spike  $12.73 \pm 0.20$  vs. control group  $23.67 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ) and  
4 increased the width of these cells (Fig. 2Bj; Spike  $6.08 \pm 0.10$  vs. control group  $5.62 \pm 0.08$   
5  $\mu\text{m}$ ).

6  
7  
8  
9  
10 In addition to morphological data, the present study evaluated biochemical markers involved in  
11 the inflammatory response. Spike inoculation increased ( $p < 0.05$ ) the enzymatic activity of  
12 MPO (Fig. 2Af; Spike  $14.59 \pm 1.50$  vs. control group  $4.44 \pm 0.28$  UMPO/mg of tissue),  
13 decreased ( $p < 0.05$ ) GSH (2Ag; Spike  $130.70 \pm 5.42$  vs. control group  $165.70 \pm 8.69 \mu\text{g/g}$  of  
14 tissue). However, levels of MDA were not altered (2Ah; Spike  $93.79 \pm 11.99$  vs. control group  
15  $88.18 \pm 4.24$  nmol/g of tissue).

16  
17  
18  
19  
20  
21 Gene expression of inflammatory markers (cellular and humoral immunity) such as pattern  
22 recognition receptors, transcription factors and cytokines were evaluated by qRT-PCR. Spike  
23 inoculation increased ( $p < 0.05$ ) the gene expression of *Tlr2* (Fig. 2Ca; Spike four-fold increase  
24 compared to the control group) and *Tlr4* (Fig. 2Cb; Spike threefold increase compared to the  
25 control group). Moreover, Spike dramatically increased *Il6* (Fig. 2Ce; Spike two hundred and  
26 ninety-four fold increase compared to the control group) and *Il10* (Fig. 2Cf; Spike five fold  
27 increase compared to the control group) gene expression. However, no significant alteration  
28 was observed in the transcription factor gene *Nfkb* (Fig. 2Cc; Spike  $1.02 \pm 0.15$  vs. control  
29 group  $1.05 \pm 0.12$  times), and in the expression of *Ifnb* (Fig. 2Cd;  $1.33 \pm 0.30$  vs. control group  
30  $1.19 \pm 0.27$  times).

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40 Inflammatory effects of Spike inoculation extended beyond gene expression to the protein level.  
41 Western blotting analysis showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in IL-1 $\beta$  (Fig. 2Da; Spike  
42  $1.25 \pm 0.07$  vs. control group  $0.70 \pm 0.06$  kDa), IL-6 (Fig. 2Db; Spike  $2.10 \pm 0.11$  vs. control  
43 group  $1.63 \pm 0.07$  kDa) and TNF- $\alpha$  (Fig. 2Dc; Spike  $1.09 \pm 0.09$  vs. control group  $0.83 \pm 0.02$   
44 kDa).

#### 45 46 47 48 49 50 51 **SARS-CoV-2 Spike glycoprotein causes Paneth cell degranulation in intestinal mucosal** 52 **crypts**

53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65 In a detailed histological analysis, the Spike protein caused the degranulation of Paneth cells in  
the intestinal crypts of mice, resulting in a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in intestinal tissue of  
mice exposed to Spike (Fig. 3Ab and 3Af; Spike  $2.29 \pm 0.05$  - 20.3% vs. control group  $2.61 \pm$   
 $0.06$  - 30.8% Paneth cells/crypt). A reduction in Paneth cell area in intestinal crypts was also  
observed in Spike inoculated mice. (Fig. 3Ad and 3Af; Spike  $316.7 \pm 5.65$  - 79.4% vs. control



1 group  $479.1 \pm 8.99 - 69.2 \% \mu\text{m}^2$ ). Additionally, Paneth cells lysozyme was analyzed by  
 2 immunohistochemistry. The Spike protein group showed a decrease ( $p < 0.05$ ) in lysozyme  
 3 positive Paneth cells (Fig. 3B; Spike  $3.73 \pm 0.23$  vs. control group  $5.92 \pm 0.24$  Paneth  
 4 cells/crypts).  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9

#### 10 **SARS-CoV-2 Spike glycoprotein alters goblet cells by reducing Mucin-2 expression in the** 11 **intestinal mucosa**

12 Spike protein reduced ( $p < 0.001$ ) neutral mucins (stained with PAS; Fig. 4A, 4B, 4C; Spike  
 13  $12.15 \pm 0.49$  vs. control group  $14.68 \pm 0.45$  goblet cells/100 epithelial cells). Likewise, the  
 14 analysis of acidic mucins, including sulfomucins (Fig. 4D, 4E, 4F; Spike AB pH 1.0 –  $8.53 \pm$   
 15  $0.34$  vs. control group  $12.35 \pm 0.27$ ; goblet cells / 100 epithelial cells) and sialomucins (Fig.  
 16 4G, 4H, 4I; AB pH 2.5 –  $6.26 \pm 0.28$  vs. control group  $8.33 \pm 0.42$  goblet cells / 100 epithelial  
 17 cells), was reduced ( $p < 0.001$ ) in goblet cells after luminal contact with the Spike protein.  
 18 Moreover, Spike protein also reduced mucin 2 (MUC2<sup>+</sup>) immunohistochemical expression in  
 19 goblet cells (Fig. 4E and 4F; Spike  $0.041 \pm 0.002$  vs. control group  $0.059 \pm 0.004$  cell/area).  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30

#### 31 **SARS-CoV-2 Spike glycoprotein induces functional changes in intestinal tissues**

32 To determine the effect of Spike administration on functional parameters, contractility, barrier  
 33 function and tight junction integrity was analyzed. First, the contractile response of a  
 34 depolarizing stimulus function (KCl) showed a first contractile peak at the concentration of 40  
 35 mM, continuing with an increase in the force of contraction at the concentration of 60 mM of  
 36 KCl, followed by gradual relaxation with higher concentrations (80 to 140 mM) in both groups.  
 37 The Spike group evidently presented lower tension (g) in all concentrations (Spike:  $0.1236 \pm$   
 38  $0.0237$  vs. control group  $0.2135 \pm 0.4505$  g), showing significant results ( $p < 0.05$ ) at a  
 39 concentration of 60 mM (Fig. 5A) Intestinal loops were also subjected to cholinergic  
 40 stimulation (Fig. 5B), which showed the first contraction peak at concentrations of 1  $\mu\text{M}$   
 41 (control group) and 3  $\mu\text{M}$  of CCh (Spike group) with response saturation in the concentration  
 42 range of 10-100  $\mu\text{M}$  of CCh. In this analysis, the Spike group (Spike:  $0.1472 \pm 0.0405$  vs.  
 43 control group  $0.2275 \pm 0.0569$  g) showed no statistical difference from the control group.  
 44 Subsequently, the Spike protein decreased ( $p < 0.05$ ) transepithelial electrical resistance (Fig.  
 45 5C) at the following time points: 10 minutes (Spike  $11.62 \pm 1.02$  vs. control group  $15.93 \pm 0.86$   
 46  $\Omega/\text{cm}^2$ ), 30 minutes (Spike  $10.48 \pm 1.03$  vs. control group  $14.92 \pm 0.86 \Omega/\text{cm}^2$ ), 50 minutes  
 47 (Spike  $9.31 \pm 0.83$  vs. control group  $13.63 \pm 0.80 \Omega/\text{cm}^2$ ), 70 minutes (Spike  $8.79 \pm 0.86$  vs.  
 48 control group  $13.11 \pm 0.87 \Omega/\text{cm}^2$ ), and 80 minutes (Spike  $8.37 \pm 0.90$  vs. control group  $12.73$   
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

± 0.87 Ω/cm<sup>2</sup>), respectively. However, no significant difference was observed in the short-circuit current (Fig. 5D).

Interestingly, Spike increased ( $p < 0.05$ ) the gene expression of *claudin 2* (Fig. 5E; Spike five-fold increase), and decreased ( $p < 0.05$ ) the protein expression of claudin 5 (Fig. 5H; 1.06 ± 0.06 vs. control group 1.30 ± 0.06 kDa). Additionally, Spike decreased ( $p < 0.05$ ) the *Tjp1* gene expression (Fig. 5F; Spike 0.57 ± 0.10 vs. control group 1.05 ± 0.11), but did not alter ZO-1 protein expression (Fig. 5I; Spike 1.12 ± 0.05 vs. control group 1.01 ± 0.03 kDa). Meanwhile, Spike decreased ( $p < 0.05$ ) occludin gene expression (Fig. 5G; Spike 0.58 ± 0.12 vs. control group 0.13 ± 0.25) as well as occludin protein expression (Fig. 5I; Spike 12.08 ± 1.60 vs. control group 4.93 ± 0.32 kDa) in the intestinal mucosa.

#### **SARS-CoV-2 Spike glycoprotein reduces cellular metabolism and increases intestinal permeability**

In vitro analysis was performed to evaluate the effect of Spike on cellular metabolism and intestinal permeability in Caco-2 cells. It was observed that the highest Spike concentration (45 µg/ml) reduced cellular metabolism at 6 (Fig. 6A; 92%,  $p < 0.0094$ ), 12 (Fig. 6A; 87%,  $p < 0.0001$ ), and 24 (Fig. 6A and B; 80%,  $p < 0.0001$ ) hours, compared to the control group (DMEM/F12 - 100%). At 24 hours, Spike concentration of 15 µg/ml also induced a significant reduction in cellular metabolism (Fig. 6A and 6B; 85%,  $p < 0.0001$ ) compared to the control (DMEM/F12). However, no statistical differences were found between the control group and the lower Spike concentrations at 6 and 12 hours (Fig. 6A).

After 24 hours of Spike exposure, an increase ( $p < 0.0334$ ) in cellular permeability was observed at the concentration of 45 µg/ml (Fig. 6C; 0.58 ± 0.03 vs. control group 0.3296 ± 0.04 µg/h/cm<sup>2</sup>). However, the concentration of Spike at 15 µg/ml (Fig. 6C; 0.2438 ± 0.03 µg/h/cm<sup>2</sup>) did not show a significant difference compared to the control group.

#### **SARS-CoV-2 Spike glycoprotein interacts with calcium and chloride channel proteins in molecular docking study**

Molecular docking was performed to evaluate the binding interaction dynamics between the SARS-CoV-2 Spike and the chloride channels involved in secretory diarrhea (CaCC and CFTR). Based on the Spike (ligand) interaction in its open state with macromolecules NBD1, NBD2, CFTR and CaCC (targets), binding energies and hydrogen bonds were measured (Fig. 7). According to the active site of each target, molecular docking was performed, obtaining the results shown in Table 1. Molecular interaction Spike coupling with the NBD2 target (Fig. 7B)

1 demonstrated binding energy of -1325.5 kcal.mol<sup>-1</sup> and was able to interact with the following  
2 Spike amino acids: Gln913, Arg1019, Glu1144, Lys921, Glu1031, Phe898, Lys790, Tyr200,  
3  
4 Leu864, Gln895, Gly889, Gln755, Ser758, Asp796, Arg983, Asp985, Leu984, Gln1005,  
5  
6 Arg765, Tyr873, Ile788, Gln787, Lys786, Pro863, Phe43, Asn282, Asn978, Lys41, Asp737  
7  
8 and Asp745, forming hydrogen bonds.  
9

10 However, the Spike (6VYB) when forming the complex with the NBD1 target (Fig. 7C),  
11 showed a higher binding energy -1180.8 kcal.mol<sup>-1</sup> than the 6VYB/NBD2 complex and was  
12 able to interact with the Spike amino acids: Glu1031, Glu1144, Lys921, Ser758, Gln1005,  
13  
14 Gly889, Arg765, Gln895, Tyr873, Ile788, Leu864, Tyr200, Pro863, Lys790, Lys786, Asp796,  
15  
16 Phe898, Gln913, Arg983, Gln755, Leu984, Asp985, Gln787, Arg1019, Asp745, Asn282,  
17  
18 Asp737, Phe43, Asn978 and Lys41.  
19

20 Spike binding with CFTR (Fig. 7D) showed lower binding energy, -1658.2 kcal.mol<sup>-1</sup> when  
21 compared to its subunits (6VYB/NBD2 and 6VYB/NBD2), evidencing the lowest binding  
22 energy up to that time. This complex was able to interact with amino acids Glu1031, Gln913,  
23  
24 Glu1144, Ser758, Gln1005, Lys790, Phe898, Asp796, Tyr873, Leu864, Gln755, Pro863,  
25  
26 Tyr200, Lys786, Lys921, Arg983, Leu984, Asp985, Arg1019, Gly889, Gln895, Gln787,  
27  
28 Ile788, Asn978, Asn282, Arg765, Phe43, Lys41, Asp737 and Asp745 from de Spike.  
29

30 Another result obtained was the 6VYB/CaCC complex (Fig. 7E) which expressed a binding  
31 energy of -1593.3 kcal.mol<sup>-1</sup> and showed interactions through hydrogen bonds with Lys921,  
32  
33 Glu1144, Glu1031, Ser758, Phe898, Ile788, Gln787, Tyr873, Lys790, Leu864, Asp745,  
34  
35 Pro863, Arg765, Gln1005, Arg983, Gln755, Gln913, Leu984, Asp796, Gly889, Asp985,  
36  
37 Gln895, Lys786, Arg1019, Phe43, Asn282, Tyr200, Lys41, Asn978 and Asp737.  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 **DISCUSSION**

44 In this study, a biologically safe animal model of Spike inoculation of intestinal tissue was  
45 generated. This model of COVID infection in the gastrointestinal tract allowed for analysis of  
46 the pathophysiological changes evident in the small intestine and may provide a reference for  
47 alterations that are likely to occur in humans. By using a recombinant protein derived from the  
48 SARS-CoV-2 Spike as an immune stimulant, it was possible to simulate the effects of the  
49 SARS-CoV-2 on the GI tract. The findings revealed that the induced secretory effects,  
50 specifically involving chloride ions and increased cytokines in the jejunal tissue, closely  
51 resemble the clinical outcomes observed in patients. Additionally, the role of potential pattern  
52 recognition receptors in the innate immune response was investigated, particularly their  
53 interaction with the Spike protein, and alterations in the integrity of the jejunal mucosa was  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 elucidated. Thus, a prospective translational investigation was conducted to explore the  
2 relationship between the SARS-CoV-2 Spike protein and the intestinal mucosa. Consequently,  
3 this model exhibits secretory, inflammatory, and morphological as well as functional changes  
4 within the gastrointestinal tract.  
5  
6

7 Initially, it was observed that a higher concentration of Spike protein could induce edema, as  
8 indicated by increased wet weight, serving as an indirect marker of edema. This was followed  
9 by tissue dilation and elevated intestinal fluid with a significant release of chloride ions into the  
10 intestinal lumen. Considering these enteric effects triggered by the Spike protein, this mouse  
11 model of infection effectively replicates the impact of viral infection on tissues, making it a  
12 valuable tool for studying pathobiology in experimental animals.  
13  
14

15 Studies have shown that bacterium and bacterial enterotoxins, including *Clostridium difficile*,  
16 cholera, and *Escherichia coli* damage the intestinal mucosa, as observed through secretory and  
17 inflammatory effects<sup>6-10</sup>. In studies of viral diseases, Spike proteins have been used in models  
18 that mimic coronaviruses. The study by Kuba et al., (2005) demonstrated that intraperitoneal  
19 administration SARS-CoV Spike protein in mice triggered acute pulmonary failure by  
20 dysregulating the renin-angiotensin system, leading to a significant decrease in ACE2  
21 expression<sup>11</sup>. Subsequently, Gu et al., (2021) demonstrated that intraperitoneal administration  
22 SARS-CoV-2 Spike, in mice, triggered acute lung injury with neutrophilic inflammation and  
23 interstitial edema<sup>12</sup>. Furthermore, murine alveolar macrophages rapidly accumulate  
24 intranasally following administration of SARS-CoV-2 Spike protein in a murine model that  
25 mimics respiratory effects observed in COVID patients<sup>13</sup>. These findings provide evidence that  
26 viral Spikes contribute to the severity of pulmonary pathologies, consequently, it is believed  
27 that the SARS-CoV-2 Spike could be utilized to evaluate the effects of viral infection in the  
28 gastrointestinal tract.  
29  
30

31 Direct interaction between the Spike protein and the jejunal mucosa resulted in a predominantly  
32 acute inflammatory response, characterized by edema, neutrophil infiltration, tissue  
33 derangement and hyperplasia of intestinal crypts, disruption of tissue histoarchitecture, and  
34 changes in the epithelial layer. These observations are in line with the clinical findings reported  
35 by Xiao et al. (2020), who noted that the migration of leukocytes, particularly neutrophils, to  
36 the inflamed site is one of the early events in the infectious process of COVID-19<sup>14</sup>. This  
37 provides further evidence supporting the idea that a potential interaction between the Spike  
38 protein and the intestine could perpetuate the inflammatory response.  
39  
40

41 In a similar vein, it was observed that the Spike protein led to a decrease in endogenous  
42 protective parameters, reflected in the levels of glutathione, as well as inflammatory alterations  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 in the intestinal mucosa, as evidenced by increased levels of cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and  
2 IL-10. These changes are similar to what occurs in patients with complicated inflammatory  
3 pathogenesis in COVID-19 <sup>15</sup>. The intensity of the Spike protein's effect on the IL-6 gene  
4 expression is disproportionately remarkable compared to its effect on other cytokines. Indeed,  
5 patients affected by COVID-19, during the inflammatory phase, exhibit elevated levels of  
6 plasma IL-6, and dramatic changes in expression correlate with the severity of the disease <sup>16</sup>.

7  
8 It has been reported that the immunopathology of COVID-19 infection is caused by an elevated  
9 inflammatory response, characterized by abundant expression of pro-inflammatory cytokines,  
10 including IL-6 and TNF- $\alpha$  <sup>17</sup>. These cytokines are products of the TLR2 and TLR4 signaling  
11 pathway. Therefore, this work investigated the expression of these surface receptors following  
12 Spike protein contact <sup>18</sup>. High expression of TLR2 and TLR4 was observed in the jejunal  
13 mucosa after prior exposure to SARS-CoV-2 spike protein. However, despite the increased  
14 gene expression of TLR receptors, there was no observed increase in NF- $\kappa$ B gene expression.  
15 In fact, NF- $\kappa$ B activation does not necessarily involve an increase in its gene expression, but  
16 rather the phosphorylation and degradation of regulatory proteins called kappa B inhibitors  
17 (I $\kappa$ B). I $\kappa$ B phosphorylation is mediated by the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, and this process  
18 results in NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus and the transcriptional activation of pro-  
19 inflammatory genes. When not stimulated, the NF- $\kappa$ B factor is bound to cytoplasm I $\kappa$ B, and  
20 this complex prevents the NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus <sup>19</sup>. It has been demonstrated that  
21 the Spike protein is a potent viral PAMP that, when detected by TLR2, activates the NF- $\kappa$ B  
22 pathway, leading to the expression of inflammatory mediators in immune and innate epithelial  
23 cells <sup>20</sup>. To demonstrate activation of the TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway, experiments should  
24 be conducted with TLR2 and TLR4 knockout mice to analyze NF- $\kappa$ B protein expression and  
25 its downstream activation. This is a noted limitation of the current study. However, the  
26 increased gene expression of TLR2 and 4 suggests their importance in intestinal inflammation  
27 in response to the SARS-CoV-2 Spike protein.

28  
29 In a more specialized context within the intestinal epithelium, the Spike protein triggered Paneth  
30 cell degranulation and decreased lysozyme. Paneth cells are of paramount importance for  
31 intestinal health, as they contain antimicrobial molecules in their cytoplasmic granules,  
32 including defensins, phospholipase A2, and lysozymes <sup>21</sup>. In the presence of an inflammatory  
33 process, Brown et al. (2014) demonstrated a significant decrease in Paneth cells in the intestines  
34 of mice <sup>22</sup>. In agreement, the literature shows that acute inflammatory processes can induce  
35 degranulation of these cells, releasing the granules that store lysozymes, known for modulating  
36 immune response activity due to their antimicrobial capacity <sup>23</sup>. Thus, it is likely that the viral  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 epitope of SARS-CoV-2 initially activates Paneth cells, and as a defense mechanism, the  
2 degranulation of these cells occurs, accompanied by lysozyme secretion. Possibly, this  
3 secretory process stimulates the immune system activation to counterattack the Spike, leading  
4 to a robust response of pro-inflammatory cytokines. The loss or disruption of these cells can  
5 result in adverse consequences, including increased susceptibility to infectious conditions,  
6 bacterial pathogens reduced clearance, and even the development of inflammatory bowel  
7 diseases<sup>24-27</sup>. Based on these findings, the results presented in this study show the degranulation  
8 of Paneth cells which play a significant role in this immune response.  
9

10 In addition to the observed reduction in Paneth cells, altered goblet cells were observed  
11 following Spike inoculation. This change in goblet cell number led to a decrease in mucins  
12 within the jejunal mucosa, particularly mucin 2 (MUC2), a crucial surface glycoprotein  
13 involved in the pre-epithelial barrier. Goblet cells are the major unicellular intraepithelial  
14 mucin-secreting cell scattered within simple columnar epithelia of the gut. MUC2, produced by  
15 these cells, forms the protective mucus blanket overlying the intestinal epithelium<sup>28</sup>. Enteric  
16 viruses such as rotavirus and enterovirus 71 promote changes in goblet cells by reducing the  
17 expression of mucins, specifically MUC2<sup>29,30</sup>. Innate immune components act promptly upon  
18 invasion of microorganisms or harmful agents such as the viral Spike protein through the  
19 epithelial barrier, so alterations in mucus composition may impact the intestinal microbiota<sup>31</sup>.  
20 Consequently, the loss of the mucus layer can exacerbate the inflammatory process beyond the  
21 intestinal mucosa, thus compromising deeper layers, suggesting that goblet cells and mucins  
22 play a role in active defense against viral infection.  
23

24 Alterations in the surface of luminal organs can generate deeper damage that affects the  
25 muscular layer and ultimately leads to episodes of diarrhea, which can occur in the context of  
26 both inflammatory and infectious conditions. Inflammation can cause modifications in the  
27 expression of ion transporters or the mislocalization of these membrane gates<sup>32</sup>. We observed  
28 that the Spike protein disrupted intestinal integrity by dysregulating the expression of important  
29 tight junctions that maintain the integrity of the jejunal mucosa, followed by a reduction in basal  
30 transepithelial electrical resistance (TEER), as well as decreasing intestinal motility. The Spike  
31 protein altered intestinal function by reducing motility through an electro-mechanical  
32 mechanism. However, after a four-hour exposure, the Spike protein was unable to induce  
33 significant pharmacomechanical changes in gastrointestinal transit. It is possible that this  
34 difference in contractile response occurs at the beginning, and that a longer exposure time  
35 would be necessary. Alternatively, further studies involving direct inoculation of the Spike  
36 protein into the contractility chamber could investigate this motor behavior. Given the  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 information presented, we propose that the exacerbated increase in IL-6 observed in the study  
2 is directly related to intestinal dysmotility. The literature demonstrates that the upregulation of  
3 IL-6 is correlated with reduced gut motility and dysfunction of the gastrointestinal smooth  
4 musculature with systemic and local repercussions in terms of enterocyte and myenteric plexus  
5 <sup>33,34</sup>. Additionally, we have evidence that the expression of ACE2 in enteric glia could be a clue,  
6 as the contractility of the intestinal wall depends on the functioning of the myenteric plexus, or  
7 else, diarrhea primarily occurs due to changes in intestinal fluid and electrolyte transport, rather  
8 than smooth muscle function <sup>35</sup>. While one would expect to see increased contractions in the  
9 smooth muscle of the jejunum, low motility can also be observed during episodes of diarrhea<sup>36</sup>.  
10 We postulate that the changes in intestinal motility are directly related to the damage caused by  
11 the Spike protein to the structure and protein composition of junction proteins. Since the enteric  
12 nervous system could be one of the entry gates for enteric pathogens, we observed that the  
13 Spike protein itself caused a decrease in gene expression of the tight junction protein *Tjp1*.  
14 However, this expression was not sufficient to induce a change in the protein expression of ZO-  
15 1 within the four-hour exposure time. Possibly, a longer interaction time of the Spike protein in  
16 the jejunal loops would promote this alteration. On the other hand, the Spike protein increased  
17 the transcription of claudin 2, as well as decreased the protein expression of claudin 5. While  
18 one protein undergoes downregulation, we believe that messenger RNA increases its activity  
19 to compensate for the loss. Lastly, the Spike protein was also capable of reducing the protein  
20 expression of the tight junction protein occludin.

21 In general, pro-inflammatory cytokines have a substantial impact on the expression of natural  
22 intercellular adhesives found in epithelial cells, known as tight junctions, leading to a significant  
23 influence on the function and structure of the epithelial barrier. In line with their recognized  
24 pro-inflammatory effects, pro-inflammatory cytokines disrupt the integrity of the intestinal tight  
25 junction barrier, thereby facilitating enhanced penetration of luminal antigens into the adjacent  
26 tissue <sup>37,38</sup>. Experimental data in the literature indicate that the increase in IL-1 $\beta$  interferes with  
27 the barrier function of the intestinal epithelium without causing a significant effect on the  
28 expression of the ZO-1 protein, but it does decrease the protein expression of occludin <sup>39</sup>.

29 The barrier function of the epithelium is often quantified in terms of resistance and epithelial  
30 permeability. In this way, it is observed that the Spike decreased the basal transepithelial  
31 electrical resistance (TEER). In a way, we propose that the inflammatory process triggered by  
32 the Spike protein is directly related to damage to the integrity of the jejunal mucosa, involving  
33 a cascade of cytokines that characterize inflammation with localized damage to the epithelial  
34 barrier. In order to investigate the influence of the SARS-CoV-2 Spike protein on intestinal  
35

36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 permeability, we employed an in vitro approach using Caco-2 cells. This approach allowed us  
2 to assess the cytotoxic effects of viral protein by measuring metabolic activity, followed by  
3 evaluating paracellular permeability through Evans blue extravasation in the apical to  
4 basolateral direction. Our data are in agreement with Corpetti and colleagues (2021) which  
5 demonstrated that the interaction of the Spike with Caco-2 cells caused destruction of the  
6 epithelial barrier, leading to a decrease in basal TEER <sup>40</sup>.

7  
8  
9  
10  
11 In contrast, when evaluating Isc, an electrophysiological method to measure transepithelial ion  
12 transport, no alteration in basolateral secretion of anions on the luminal surface was observed  
13 in this study <sup>41</sup>. However, Poeta et al. (2022) observed that the Spike protein induced an increase  
14 in Isc when added to the mucosal side of Caco-2 cells, confirming ion secretion <sup>42</sup>. Initially, this  
15 study showed that Spike protein promoted exacerbated Cl<sup>-</sup> ions secretion, supposedly, the direct  
16 effects of Spike on enterocytes and/or indirect effects on the submucosal plexus accelerated the  
17 process of ion secretion, triggering a hydroelectrolytic imbalance. Thus, after four hours of  
18 exposure to Spike, it is likely that the ion channels become saturated, rendering them unable to  
19 promote a responsive ion effect in Isc. Furthermore, there was no secretory stimulation after  
20 the period of Spike action. These explanations demonstrate that our results are consistent with  
21 the existing literature.

22  
23 For a better understanding of diarrhea in COVID-19, we utilized molecular docking techniques  
24 to analyze the binding of the Spike protein in its open state with chloride channels. We observed  
25 a low binding Gibbs free energy of the Spike protein with CFTR and CaCC, which are capable  
26 of forming hydrogen bridges with various amino acids, ultimately suggesting good molecular  
27 interaction with these two targets. This spatial binding suggests a possible ligand/target  
28 molecular fit and likely activation of Cl<sup>-</sup> channels in the intestine, which aligns with initial  
29 experimental data where the Spike protein resulted in an increase in intestinal fluid, primarily  
30 composed of high concentrations of Cl<sup>-</sup> ions.

31  
32 Recently, Donowitz et al. (2021) reported that CaCC-dependent Cl<sup>-</sup> secretion induced by the  
33 Spike protein occurs in the presence of pre-existing inflammation (induced by IL-6 and IL-8  
34 pre-treatment) <sup>43</sup>. In this preliminary in vitro study using human enteroids from healthy  
35 individuals, it is suggested that an inflammatory response may be a prerequisite for secretion  
36 <sup>43</sup>. Subsequently, Poeta et al. (2022) also demonstrated that the SARS-CoV-2 Spike protein  
37 induced calcium (Ca<sup>2+</sup>)-dependent Cl<sup>-</sup> secretion in Caco-2 cells derived from human colon  
38 carcinoma, the effect was inhibited in the absence of Cl<sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup>, and by adding a mucosal  
39 Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel inhibitor, suggesting that the Spike protein induced Ca<sup>2+</sup>-dependent  
40 Cl<sup>-</sup> secretion <sup>42</sup>. Although using a different model of secretory diarrhea induced by rotavirus, a  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 representative of another viral family, oxidative stress resulted in an increase in cytoplasmic  
2  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, leading to  $\text{Cl}^-$  secretion<sup>44,45</sup>. Our findings support the hypothesis that  
3 SARS-CoV-2, likely through the Spike protein, exerts direct enterotoxic effects, leading to an  
4 increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and subsequent activation of CaCC. This  
5 dysregulated activation could be a precursor to the pathogenic mechanisms involved in SARS-  
6 CoV-2-induced diarrhea.  
7  
8  
9

10 In clinical gastroenterology, although cases of diarrhea associated with SARS-CoV-2 are often  
11 mild to moderate, they can be severe and require hospitalization with parenteral rehydration<sup>46</sup>.  
12 We suggest that there are two main physiological mechanisms for COVID-19-associated  
13 diarrhea. The first arises from osmotic diarrhea, resulting from cellular damage and a marked  
14 reduction in the digestive and absorptive surface. The second follows secretory diarrhea,  
15 induced by ion secretion primarily involving  $\text{Cl}^-$  secretion from intestinal epithelial cells into  
16 the lumen, leading to subsequent water flow through the paracellular spaces in response to  
17 enterotoxic effects. Based on the findings of our study, it is possible that these two mechanisms  
18 could be associated, in addition to a secretory process, an inflammatory response occurs  
19 following contact of the Spike protein with the intestinal mucosa.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 In conclusion, the inoculation of the SARS-CoV-2 Spike protein into isolated jejunal loops of  
31 mice proves to be a useful experimental model to assess alterations that lead to intestinal  
32 impairment, ranging from the mucosal barrier to the muscularis. This is evidenced by: 1)  
33 Increased secretory activity in the intestine, with accumulation of intestinal fluid predominantly  
34 composed of  $\text{Cl}^-$  ions; 2) Inflammation, characterized by histopathological changes, production  
35 of inflammatory cytokines, and activation of innate immunity; 3) Disruption of jejunal mucosal  
36 integrity and intestinal dysmotility; and 4) Impairment of intestinal epithelial barrier by  
37 increasing permeability in Caco-2 cells. Our data indicate that this model mimics the  
38 pathological changes of COVID-19 in the gastrointestinal tract, making it a robust and  
39 accessible animal model for studying the physiopathological characteristics of enteric SARS-  
40 CoV-2. Furthermore, this straightforward experimental model holds promise for exploring new  
41 therapeutic strategies targeting intestinal COVID-19 and future infectious diseases caused by  
42 coronaviruses.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

## 55 MATERIALS AND METHODS

### 56 **Obtaining, producing and purifying the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein (Spike)**

57 The Laboratory of Cellular Culture Engineering (LECC) at COPPE/UFRJ produced the  
58 recombinant SARS-CoV-2 Spike glycoprotein (Spike). The Spike sequence produced,  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 consisting of amino acids 1-1208 followed by the tail, is identical to the sequence published by  
2 Wrapp et al. (2020) and corresponds to the SARS-CoV-2 B.1.33 variant <sup>47</sup>. Genetically  
3 modified HEK293 cells were used to produce the recombinant Spike, which stably expresses  
4 the soluble Spike in the pre-fusion trimeric conformation. This includes both the S1 domains  
5 responsible for receptor binding and the S2 domains responsible for fusion to the cell membrane  
6 <sup>47</sup>. The cells were cultured in HEK-GM medium (Xcell AG, Germany) in either 300 mL  
7 Erlenmeyer flasks under orbital agitation (180 rpm, 5 cm stroke) or 1.5-L stirred tank  
8 bioreactors. The bioreactors were operated at a pH setpoint of 7.1 and a dissolved oxygen  
9 setpoint of 40% air saturation. Cell-free supernatant was obtained by microfiltration using 0.45  
10 µm PVDF membranes, followed by purification through 5 mL StrepTrap XT affinity  
11 chromatography (Cytiva) according to the manufacturer's instructions <sup>48</sup>. The protein  
12 concentration, purity, and identity in the eluted fractions were confirmed through NanoDrop  
13 (Thermo Fisher) for protein concentration, SDS-PAGE for purity analysis, and Western blotting  
14 for identity confirmation. Additionally, it was verified that there were no LPS contaminants.  
15 The Spike glycoprotein was stored in PBS buffer with 50 mM biotin.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

### 30 **Animals**

31 Male C57BL/6 mice weighing between 20-25g, from the Biotherium of the Nucleus for  
32 Research and Development of Medicines at the Federal University of Ceará were used. The  
33 animals were kept in microisolator cages containing shavings, 6 animals (maximum) per cage  
34 under controlled temperature conditions (22 to 25°C) and light/dark cycle (12h light/12h dark),  
35 with free access to autoclaved industrial feed and water. The animals were monitored  
36 throughout the experimental period. This study was approved by the local ethics committee  
37 (Protocol No. 070703220).  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

### 47 **SARS-CoV-2 glycoprotein inoculation model in isolated jejunal loops.**

48 The Spike inoculation model in isolated mice jejunal loops was carried out using a previously  
49 described method, with necessary modifications <sup>49</sup>. The animals had access to water but were  
50 deprived of food for 12 hours prior to the experiment. Thirty minutes before the surgical  
51 procedure, the animals received the analgesic morphine (5 mg/kg, sc.). The mice were  
52 anaesthetized with isoflurane (4% induction and 2% maintenance) via inhalation, and a median  
53 laparotomy was performed. An incision was made to expose the small intestine, and jejunal  
54 loops (2 cm) were isolated using sutures. During the surgery, the body temperature was  
55 maintained at 36-38 °C using a heating pad. The jejunal loops were inoculated with 200 µL of  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 a PBS solution for the control group and with the Spike protein dissolved in PBS for the Spike  
2 group. The abdominal incision was closed with sutures, and the animals were appropriately  
3 cared for during recovery from anesthesia. Postoperatively, they received a morphine injection  
4 (5 mg/kg, sc.) for postoperative analgesia. The mice were euthanized 4h after surgical the  
5 procedure, and the loops were promptly removed from the abdominal cavity for the evaluation  
6 of secretory, inflammatory, and morphofunctional parameters.  
7  
8  
9  
10  
11  
12

#### 13 **Jejunal loop macroscopy**

14 For macroscopic analysis, the intestinal loops were collected and photographed.  
15  
16  
17

#### 18 **Jejunal loop wet weight**

19 Wet weight is the ratio of weight to tissue size. The size of the intestinal loop was measured  
20 using a digital caliper and ruler, respectively. The obtained values were expressed as the wet  
21 weight/length ratio (mg/cm).  
22  
23  
24  
25  
26  
27

#### 28 **Intestinal fluid volume**

29 For secretion analysis, the volume of intestinal fluid (IVC) accumulated in each isolated loop  
30 was quantified separately. The values obtained were expressed in  $\mu\text{l}$ .  
31  
32  
33  
34

#### 35 **Chloride concentration**

36 The evaluation of chloride concentration was performed according to the manufacturer's  
37 instructions (Labtest, SP, Brazil). Briefly, the accumulated IVC in each loop was collected,  
38 centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes, the supernatants of each sample were collected  
39 separately and then homogenized with kit reagents for two minutes and the absorbance was  
40 measured at 450 nm in a spectrophotometer. The values obtained were expressed in mEq/L.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

#### 48 **Myeloperoxidase activity**

49 Myeloperoxidase enzyme activity was measured according to the technique described by  
50 Bradley et al. (1982)<sup>50</sup>. The intestinal portion was collected to determine the presence of MPO  
51 by colorimetric method and absorbance measured by spectrophotometry at 450nm. Results  
52 were expressed in MPO units/mg of tissue.  
53  
54  
55  
56  
57  
58

#### 59 **Histological analysis**

60  
61  
62  
63  
64  
65

Twenty-five microscopic fields from each mouse, from at least 6 mice per group, on H&E-stained sections, were examined blindly by a specialist using a light microscope (Olympus® BX43F) and a 20x objective (and 40x or 100x if necessary to confirm structures). Histopathological findings were evaluated according to previously established criteria<sup>51,52</sup>, which are described in Table 1.

**Table 1. Histopathological score. Scoring scheme for small intestine inflammation mediated by luminal antigens.**

| Category   | Inflammatory cell infiltrate               |       | Epithelial changes                                 |       | Mucosal histoarchitecture                 |       |
|------------|--|-------|--|-------|---|-------|
|            | Severity/ Extent                           | Score | Severity/ Extent                                   | Score | Severity/ Extent                          | Score |
| Definition | -  | 0     | intact epithelium                                  | 0     | mild villous blunting                     | 0     |
|            | mucosa and sometimes submucosal            | 1     | mild hyperplasia                                   | 1     | mild/moderate villous blunting            | 1     |
|            | mucosa and sometimes submucosal            | 2     | moderate hyperplasia and goblet cell loss          | 2     | and broadening, sometimes villous atrophy | 2     |
|            | mucosa and submucosa, sometimes transmural | 3     | marked hyperplasia, goblet cell loss, and erosions | 3     | villous atrophy, ulcerations              | 3     |

### **Histomorphometric analysis**

Images taken with a digital camera connected to an optical microscope (Olympus® BX43F-Minato-Ku, Japan) were used for measurements. The muscular tunic thickness ( $\mu\text{m}$ ), submucosa, mucosa, height and width of villi, and width and depth of crypts were assessed under 100 $\times$  magnification. The villi width was determined from the average of three measurements at the base, middle third, and apex. A total of 384 measurements of each parameter were made, 16 measurements per quadrant, from the small intestine of six mice per group (16 $\times$ 4 $\times$ 6). Images acquired under 1000 $\times$  magnification were used to measure the height and width (at three points) of 64 enterocytes in the small intestine of each mouse (n=6 per group). Measurements were performed using Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, USA)<sup>53,54</sup>.

### **Goblet cells count**

Goblet cells among the 2560 epithelial cells of each mouse were counted in four sections, which were then divided into four quadrants. The counting was performed under a light microscope with a 40 $\times$  objective. The percentage of goblet cells/100 epithelial cells from slides stained with the techniques PAS<sup>+</sup>, AB pH 1.0<sup>+</sup>, and AB pH 2.5<sup>+</sup> was then calculated<sup>55,56</sup>.

### **Paneth cells quantitative analysis**

H&E-stained sections were used to count and measure Paneth cells' area. These cells in 64 intestinal crypts of each mouse were counted and the area ( $\mu\text{m}^2$ ) occupied by Paneth cells in intestinal crypts was measured in images acquired with the 100 $\times$  objective and Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, USA). In addition, the area (relative percentage) of intestinal crypts occupied by Paneth cells was calculated<sup>54,57</sup>.

### **Intestinal contractile response**

1 For the analysis of intestinal contractile function, segments of isolated jejunal loops (2 cm) were  
2 collected and mounted in a 5 mL organ bath containing Tyrode's solution at 37 °C aerated with  
3 95% oxygen (O<sub>2</sub>) and 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), under basal tension of 1 g. To record the  
4 tension in isometric conditions, the segments were attached to a fixed rod in the bath and a force  
5 transducer connected to a data acquisition system (PowerLab®; AD Instruments, Australia).  
6 The contractile responses of cumulative concentrations of carbachol (CCh; 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30  
7 and 100 μM) and KCl (10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 and 140 mM) were recorded at intervals  
8 of 3 minutes in tissue samples of control and Spike groups. The results were expressed as force  
9 of contraction in grams (g).  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

#### 18 **Transepithelial Electrical Resistance (TEER) and Short-Circuit Current (Isc)**

19 The Ussing chamber protocol, described by Soares (1992) with adaptations, was followed <sup>58</sup>.  
20 Mouse intestines were sectioned and the serous muscle layers were promptly dissected and  
21 placed in the hemi-chamber with the mucosal side facing upwards. Transepithelial Electrical  
22 Resistance (TEER) and Short-Circuit Current (Isc) data were collected. TEER was calculated  
23 using Ohm's Law:  $TEER = \Delta PD/i$ , corrected by the area of exposed tissue in cm, where  $\Delta PD$   
24 represents the voltage measured immediately after applying a current of 50 μA (PD2) minus  
25 the voltage indicated in the Difference of Basal Potential (PD1), and  $i$  represents the applied  
26 current (50 μA). Electrical TEER measurements were recorded every 10 minutes during the  
27 100-minute experimental period. To measure the Isc, tissue tension was initially clamped at 5  
28 mV. The Set Clamp  $i/V$  potentiometer was used to apply the current.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

#### 41 **Western blot analysis**

42 Western blot was performed according to the technique described by Aquino et al. (2019) for  
43 analysis of protein expression of inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, and TNF-α) and  
44 junctional proteins (claudin, ZO-1, and occludin) <sup>59</sup>. Samples were incubated with primary  
45 antibodies (mouse anti-occludin, 1:100, Santa Cruz Biotechnology; mouse anti-ZO-1, 1:100,  
46 Santa Cruz Biotechnology; rabbit anti-IL-6, 1:200, Santa Cruz Biotechnology; goat anti-TNF-  
47 α, 1:500, Millipore; rabbit anti-IL-1β, 1:200, Santa Cruz Biotechnology; mouse anti-claudin-5,  
48 1:100, Invitrogen), overnight at 4 °C, followed by incubation with alkaline phosphatase-  
49 conjugated secondary antibodies (anti-goat IgG, 1:10,000, GE Healthcare; anti-rabbit IgG,  
50 1:20,000, GE Healthcare; anti-mouse IgG, 1:10,000, GE Healthcare) for 1 hour. The internal  
51 control for protein content in each sample was evaluated using mouse anti-GAPDH (1:10,000,  
52 Sigma-Aldrich) or anti-β-actin (1:500, Santa Cruz Biotechnology). The target protein bands  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 were visualized after membrane incubation with enhanced chemifluorescence (ECF,  
2 Amersham) using a Typhoon FLA 9000 scanner (GE-Healthcare Biosciences) and quantified  
3 using Image Studio software (version 5.2, Licor).  
4  
5  
6  
7  
8

#### 9 **Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)**

10 Intestine samples were homogenized in 1 mL of Trizol using steel beads (4.5 mm) that were  
11 agitated in the TissueLyser LT (Qiagen) for 2 minutes at 50 pulses/second and then placed on  
12 ice for 2 minutes. RNA extraction followed the Trizol method according to the manufacturer's  
13 specifications. Then, the samples were measured on a Take3™ Microvolume Plate, using an  
14 Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek), samples with a purity factor where the  
15 absorbance A260/280 ranged from 1.5 to 2,0 were considered adequate for the study.  
16 Transcription of RNA into complementary DNA was performed using the High Capacity  
17 cDNA Reverse Transcription Kit in Veriti 96 Thermocycler both from Applied Biosystems.  
18 Finally, qRT-PCR was performed using the PowerUp SyBr Green Master Mix in  
19 QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific).  
20 Amplification was performed using the fast cycling mode following the manufacturer's  
21 specifications. One microgram of cDNA was used to analyze the expression of genes *Tlr2*, *Tlr4*,  
22 *Nfkb*, *Ifng*, *Il6*, *Il10*, *Cldn* and *Tjp1* for intestine samples. The samples were normalized using  
23 the *Ppia* gene, described in the table below. Relative gene expression was determined using the  
24  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method <sup>60</sup>.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

| Gene        | Forward                        | Reverse                         |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Tlr2</i> | 5'-CAAACGCTGTTCTGCTCAGG-3'     | 5'-CACCATGGCCAATGTAGGTG-3'      |
| <i>Tlr4</i> | 5'-TAGCCATTGCTGCCAACATC-3'     | 5'-CTGCCTCAGCAGGGACTTCT-3'      |
| <i>Nfkb</i> | 5'-GACAGCACTGGCAGCTTCAC-3'     | 5'-CCGTCACACATCCTGCTGTT-3'      |
| <i>Ifng</i> | 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' | 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'     |
| <i>Il6</i>  | 5'-GAGGATAACCACTCCCAACAGAC-3'  | 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3' |

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

|                     |                                |                                   |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Il10</i>         | 5'-<br>AGAGAAGCATGGCCCAGAAA-3' | 5'-GGGGAGAAATCGATGACAGC-3'        |
| <i>Oclud<br/>in</i> | 5'-AACAGCAGCCAAAGGCTTCC<br>-3' | 5'-CGTCGGGTTCACTCCCATTA-3'        |
| <i>Cldn2</i>        | 5'-GGGCTGTTAGGCACATCCAT'       | 5'-TGATGCCTGTGCTGTGTGTC-3'        |
| <i>Tjp1</i>         | 5'-GACCATCGCCTACGGTTTGA-'      | 5'-AGGTCTCGGGGATGCTGATT-3'        |
| <i>Ppia</i>         | 5'-CAGACGCCACTGTGGCTTT-3'      | 5'-TGTCTTTGGAACCTTGTCTGGAA-<br>3' |

### Immunostaining for lysozyme and mucin-2

Paraffin embedded sections (5-micron) on glass slides were heated to 60 °C. Intestinal tissue sections were deparaffinized, re-hydrated and transferred to citrate buffer antigen retrieval solution. Antigen retrieval was performed in a pressure cooker set to high for 30 minutes. Tissue sections were then cooled and washed. Serum free protein block (Dako; Agilent, #X0909) was applied to slides and incubated at room temperature for 1.5 hours. Primary antibodies lysozyme (Abcam, #ab108508 diluted 1:1000) and Muc2 (Genetex, #GTX100664 diluted 1:200) were diluted in antibody diluent with background reducing components (Dako; Agilent, #S3022) and incubated at 4 °C overnight. Secondary antibodies were diluted 1:200 in antibody diluent (Dako; Agilent, #S0809) and incubated in the dark. Hoechst was diluted 1:1000 in PBS and added to the slides. Slides were washed and coverslipped using Prolong gold antifade (Invitrogen, #P36934). A Leica SP8 confocal microscope was used to acquire images of immunostained slides. Lysozyme positive Paneth cells were counted in well oriented crypts. Muc2 positive goblet cells in villi were measured to determine the area of individual goblet cells using the measure tool in Image J software.

### Cell line and culture

Caco-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells) were cultured in 75 cm<sup>2</sup> plastic flasks (Corning®) supplemented with Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (DMEM/F-12), 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin and streptomycin. Cells were incubated in a humidifier at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 5-7 days to achieve 80% confluency. Every 3-4 days, the cells were washed with phosphate-saline buffer (PBS) and the culture medium was replaced. Cells were subcultured every 5-7 days with 0.05% trypsin-EDTA (37 °C, 10 min), suspended in sterile PBS, and carefully aspirated from the plastic container for use



1 in subsequent experiments. The cell line was purchased from Banco de Células do Rio de  
2 Janeiro, Brazil (BCRJ code 0059) <sup>61</sup>.  
3  
4  
5

#### 6 **Treatment protocol**

7 The following treatments were used to study the toxicity and permeability of spike in Caco-2  
8 cells: 1) Control group: treated with vehicle only (DMEM/F-12) and 2) Spike group: treated  
9 with different concentrations of Spike (300 ng/ml to 45 µg/ml).  
10  
11  
12  
13  
14

#### 15 **Cellular toxicity/metabolism**

16 Presto Blue reagent was used to study cellular metabolic reduction. Briefly, cells were cultured  
17 in 96-well plates (2 x 10<sup>4</sup> cells/well). After reaching confluence, cells were incubated with  
18 vehicle (DMEM/F12) or with different concentrations of spike diluted in DMEM/F-12 medium  
19 (300 ng/ml – 45 µg/ml) for 6, 12 and 24 hours. After the incubation period, cells were washed  
20 with PBS and treated with Presto Blue reagent. Absorbance was measured using a  
21 spectrophotometer (570 and 600 nm). The absorbance data were used to calculate the rate of  
22 cellular metabolic reduction according to the manufacturer's instructions.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

#### 32 **Intestinal Permeability**

33 To investigate the effect of spike on epithelial barrier integrity, cells were cultured in 12-well  
34 transwell plates with 12-mm filters and 0.4 µm polyester membrane (Corning®) at a density of  
35 2 x 10<sup>4</sup> cells/well. After differentiation (approximately 19 days), cells (apical well) were  
36 incubated with vehicle (DMEM/F12) or spike (15 and 45 µg/ml) for 24 hours. The wells were  
37 then washed twice with PBS and incubated with PBS for 1 hour. After this time, a solution  
38 containing Evans Blue prepared with 1% BSA was added to the apical well, and samples from  
39 the basolateral compartment were collected after 0-, 30-, 60-, and 120-min. Evans blue  
40 permeability was read in a spectrophotometer (630 nm), and the results were interpolated with  
41 a standard Evans blue curve. Cellular permeability results were expressed in µg Evans  
42 blue/hour/cm<sup>2</sup> <sup>62</sup>.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

#### 53 **Molecular docking**

54 Molecular docking assays involved Spike in the open state (6VYB) against Cystic Fibrosis  
55 Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), nucleotide-binding domain one of CFTR  
56 (NBD1), nucleotide-binding domain 2 of CFTR (NBD2) and Calcium-activated chloride  
57 channel (CaCC). All molecular docking experiments were performed using the ClusPro 2.0  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 server (<https://cluspro.org>), which is the best performing server currently available for the  
2 CAPRI challenge. It is also used for the study of inhibitor-enzyme, peptide-protein, and  
3 inhibitor-protein complexes, additionally allowing the analysis and choice of the most  
4 appropriate scoring scheme for the complex in this study. The choice of models was  
5 standardized and followed the criteria use of the same scoring scheme (Balanced) and balance  
6 between the number of members and lowest binding energy. The balanced scoring scheme has  
7 the best weight coefficients for the energy used in the structures. The best complexes generated  
8 by molecular docking studies were analyzed in terms of interface energy and interaction  
9 between surface residues, and for models with a high number of members. The first 10 models  
10 of the balanced energy parameter were used for the analysis of waste and interface energy.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

#### 21 **Statistical Analysis**

22 Statistical analyses were performed using the Graphpad Prism software (version 5.0) and were  
23 defined according to data distribution, using the D'Agostino-Pearson test. Statistical  
24 significance of differences between groups was determined by Student's t test for analysis of  
25 data with a maximum of two groups and by Unidirectional Analysis of Variance (ANOVA)  
26 followed by Bonferroni's post-test for analyses of three or more groups. Results are presented  
27 as the mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM). Freely distributed data are presented as  
28 median and interquartile range. The significance level was set at 5% for all tests, with 95%  
29 confidence, with 5 to 10 animals per group. In all cases, Spike groups results were compared to  
30 control groups. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

R.R.N, L.D.N and M.L.V. provided substantial contributions to the conception of the work and writing the manuscript. R.R.N, L.D.N and M.L.V. designed experiments. All authors contributed to the acquisition, analysis, or interpretation of data for manuscript and drafting, revising, and critically reviewing the manuscript for important intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript to be published.

**FUNDING**

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES) – Brazil.

**DECLARATION OF COMPETING INTEREST**

The authors declare that there is no conflict of interests.

**ACKNOWLEDGMENT**

The authors gratefully acknowledge the donation of trimeric spike protein of SARS-CoV-2 by the Cell Culture Engineering Laboratory of COPPE/UFRJ - Federal University of Rio de Janeiro. Besides, acknowledgements are addressed to Professor Leonardo P. Souza, Elias V. Alves and Felipe L. Carneiro from Scientific Illustration Centre (NIC) for the schematic diagram editing.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## REFERENCES

1. Galanopoulos, M. *et al.* COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology* vol. 26 Preprint at <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I31.4579> (2020).
2. Megyeri, K., Dernovics, Á., Al-Luhaibi, Z. I. I. & Rosztóczy, A. COVID-19-associated diarrhea. *World Journal of Gastroenterology* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i23.3208> (2021).
3. Wong, S. H., Lui, R. N. S. & Sung, J. J. Y. Covid-19 and the digestive system. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* vol. 35 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jgh.15047> (2020).
4. Sun, Z. *et al.* Gut microbiome alterations and gut barrier dysfunction are associated with host immune homeostasis in COVID-19 patients. *BMC Med* **20**, (2022).
5. Vatanen, T. *et al.* Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* **165**, (2016).
6. Hammitt, M. C. *et al.* A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Vet Microbiol* **127**, (2008).
7. Patanayindee, J., Muanprasat, C., Soodvilai, S. & Chatsudhipong, V. Antidiarrheal efficacy of a quinazolin CFTR inhibitor on human intestinal epithelial cell and in mouse model of cholera. *Indian J Pharmacol* **44**, (2012).
8. Cil, O. *et al.* Benzopyrimido-pyrrolo-oxazine-dione CFTR inhibitor (R)-BPO-27 for antisecretory therapy of diarrheas caused by bacterial enterotoxins. *FASEB Journal* **31**, (2017).
9. Sousa, F. B. M. *et al.* H2S is a key antisecretory molecule against cholera toxin-induced diarrhoea in mice: Evidence for non-involvement of the AC/cAMP/PKA pathway and AMPK. *Nitric Oxide* **76**, 152–163 (2018).
10. Oak, A. A., Chhetri, P. D., Rivera, A. A., Verkman, A. S. & Cil, O. Repurposing calcium-sensing receptor agonist cinacalcet for treatment of CFTR-mediated secretory diarrheas. *JCI Insight* **6**, (2021).
11. Kuba, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* **11**, (2005).
12. Gu, T. *et al.* Cytokine Signature Induced by SARS-CoV-2 Spike Protein in a Mouse Model. *Front Immunol* **11**, (2021).
13. Park, C. *et al.* Murine Alveolar Macrophages Rapidly Accumulate Intranasally Administered SARS-CoV-2 Spike Protein leading to Neutrophil Recruitment and Damage. *bioRxiv* (2023) doi:10.1101/2023.03.13.532446.
14. Xiao, F. *et al.* Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* **158**, (2020).
15. Ye, Q., Wang, B. & Mao, J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19’. *Journal of Infection* vol. 80 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037> (2020).
16. Sayah, W. *et al.* Interleukin-6, procalcitonin and neutrophil-to-lymphocyte ratio: Potential immune-inflammatory parameters to identify severe and fatal forms of COVID-19. *Cytokine* **141**, (2021).

- 1 17. Raoult, D., Zumla, A., Locatelli, F., Ippolito, G. & Kroemer, G. Coronavirus infections:  
2 Epidemiological, clinical and immunological features and hypotheses. *Cell Stress* vol. 4  
3 Preprint at <https://doi.org/10.15698/cst2020.04.216> (2020).  
4
- 5 18. Mukherjee, S., Karmakar, S. & Babu, S. P. S. TLR2 and TLR4 mediated host immune  
6 responses in major infectious diseases: A review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* vol.  
7 20 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011> (2016).  
8
- 9 19. Tak, P. P. & Firestein, G. S. NF- $\kappa$ B: A key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical*  
10 *Investigation* vol. 107 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI11830> (2001).  
11
- 12 20. Khan, S. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent  
13 activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *Elife* **10**, (2021).  
14
- 15 21. Lueschow, S. R. & McElroy, S. J. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature  
16 Small Intestine. *Frontiers in Immunology* vol. 11 Preprint at  
17 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587> (2020).  
18
- 19 22. Brown, K. S. *et al.* Tumor Necrosis Factor Induces Developmental Stage-Dependent Structural  
20 Changes in the Immature Small Intestine. *Mediators Inflamm* **2014**, (2014).  
21
- 22 23. Holly, M. K. & Smith, J. G. Paneth cells during viral infection and pathogenesis. *Viruses* vol.  
23 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/v10050225> (2018).  
24
- 25 24. Sherman, M. P., Bennett, S. H., Hwang, F. F. Y., Sherman, J. & Bevins, C. L. Paneth cells and  
26 antibacterial host defense in neonatal small intestine. *Infect Immun* **73**, (2005).  
27
- 28 25. Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L. & Hooper, L. V. Paneth cells  
29 directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial  
30 interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, (2008).  
31
- 32 26. Bel, S. *et al.* Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection  
33 of the intestine. *Science* **357**, 1047–1052 (2017).  
34
- 35 27. Delorme-Axford, E. & Klionsky, D. J. Secretory autophagy holds the key to lysozyme  
36 secretion during bacterial infection of the intestine. *Autophagy* vol. 14 Preprint at  
37 <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1401425> (2018).  
38
- 39 28. Pelaseyed, T. *et al.* The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first  
40 defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological*  
41 *Reviews* vol. 260 Preprint at <https://doi.org/10.1111/imr.12182> (2014).  
42
- 43 29. Boshuizen, J. A. *et al.* Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in  
44 mice. *Virology* **337**, (2005).  
45
- 46 30. Good, C., Wells, A. I. & Coyne, C. B. Type III interferon signaling restricts enterovirus 71  
47 infection of goblet cells. *Sci Adv* **5**, (2019).  
48
- 49 31. Yang, S. & Yu, M. Role of goblet cells in intestinal barrier and mucosal immunity. *Journal of*  
50 *Inflammation Research* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.2147/JIR.S318327> (2021).  
51
- 52 32. Gareau, M. G. & Barrett, K. E. Fluid and electrolyte secretion in the inflamed gut: Novel  
53 targets for treatment of inflammation-induced diarrhea. *Current Opinion in Pharmacology* vol.  
54 13 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.014> (2013).  
55
- 56 33. Guo, Y. *et al.* Biological characteristics of IL-6 and related intestinal diseases. *Int J Biol Sci* **17**,  
57 204–219 (2021).  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 34. Li, A., Xiong, J. & Chen, Z. IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS is associated with decreased colonic  
2 contraction in rats with multiple organ dysfunction syndrome. *Journal of Surgical Research*  
3 **178**, e51–e57 (2012).  
4
- 5 35. Deffner, F. *et al.* Histological Evidence for the Enteric Nervous System and the Choroid Plexus  
6 as Alternative Routes of Neuroinvasion by SARS-CoV2. *Front Neuroanat* **14**, (2020).  
7
- 8 36. Semrad, C. E. Approach to the Patient with Diarrhea and Malabsorption. in *Goldman's Cecil*  
9 *Medicine: Twenty Fourth Edition* vol. 1 (2012).  
10
- 11 37. Yamada, S. *et al.* SARS-CoV-2 induces barrier damage and inflammatory responses in the  
12 human iPSC-derived intestinal epithelium. *Journal of Pharmacological Sciences* vol. 149  
13 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jpsh.2022.04.010> (2022).  
14
- 15 38. Al-Sadi, R., Boivin, M. & Ma, T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight  
16 junction barrier. *Frontiers in Bioscience* **14**, (2009).  
17
- 18 39. Al-Sadi, R. M. & Ma, T. Y. IL-1 $\beta$  Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction  
19 Permeability. *The Journal of Immunology* **178**, 4641–4649 (2007).  
20
- 21 40. Corpetti, C. *et al.* Cannabidiol inhibits SARS-Cov-2 spike (S) protein-induced cytotoxicity and  
22 inflammation through a PPAR $\gamma$ -dependent TLR4/NLRP3/Caspase-1 signaling suppression in  
23 Caco-2 cell line. *Phytotherapy Research* **35**, 6893–6903 (2021).  
24
- 25 41. KARAKI, S.-I. A Technique of Measurement of Gastrointestinal Luminal Nutrient Sensing  
26 and These Absorptions: Ussing Chamber (Short-Circuit Current) Technique. *J Nutr Sci*  
27 *Vitaminol (Tokyo)* **69**, 164–175 (2023).  
28
- 29 42. Poeta, M. *et al.* SARS-CoV-2 causes secretory diarrhea with an enterotoxin-like mechanism,  
30 which is reduced by diosmectite. *Heliyon* **8**, (2022).  
31
- 32 43. Donowitz, M. *et al.* SARS-COV-2 induced Diarrhea is inflammatory, Ca (2+) Dependent and  
33 involves activation of calcium activated Cl channels. *bioRxiv* (2021).  
34
- 35 44. Buccigrossi, V. *et al.* Chloride secretion induced by rotavirus is oxidative stress-dependent and  
36 inhibited by *Saccharomyces boulardii* in human enterocytes. *PLoS One* **9**, (2014).  
37
- 38 45. Ermak, G. & Davies, K. J. A. Calcium and oxidative stress: From cell signaling to cell death.  
39 *Molecular Immunology* vol. 38 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00108-0)  
40 (2002).  
41
- 42 46. Fang, L. G. & Zhou, Q. Remarkable gastrointestinal and liver manifestations of COVID-19: A  
43 clinical and radiologic overview. *World J Clin Cases* **9**, (2021).  
44
- 45 47. Wrapp, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.  
46 *Science (1979)* **367**, (2020).  
47
- 48 48. Alvim, R. G. F. *et al.* An Affordable Anti-SARS-COV-2 Spike Protein Elisa Test for Early  
49 Detection of IgG Seroconversion Suited for Large-Scale Surveillance Studies in Low-Income  
50 Countries. *SSRN Electronic Journal* (2020) doi:10.2139/ssrn.3668433.  
51
- 52 49. Tradtrantip, L., Ko, E. A. & Verkman, A. S. Antidiarrheal Efficacy and Cellular Mechanisms  
53 of a Thai Herbal Remedy. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2674 (2014).  
54
- 55 50. Bradley, P. P., Christensen, R. D. & Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase  
56 in pyogenic inflammation. *Blood* **60**, (1982).  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 51. Erben, U. *et al.* A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse  
2 models. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, (2014).
- 3
- 4 52. Bueno, L. R. *et al.* Protective Effect of Dietary Polysaccharides from Yellow Passion Fruit Peel  
5 on DSS-Induced Colitis in Mice. *Oxid Med Cell Longev* **2022**, (2022).
- 6
- 7 53. Trevizan, A. R. *et al.* Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological  
8 changes in the duodenum of rats. *Exp Parasitol* **165**, (2016).
- 9
- 10 54. Cordeiro, G. S. *et al.* Perinatal and post-weaning exposure to a high-fat diet causes  
11 histomorphometric, neuroplastic, and histopathological changes in the rat ileum. *J Dev Orig*  
12 *Health Dis* **14**, (2023).
- 13
- 14 55. Santos, A. G. A. dos *et al.* Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden  
15 hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **106**, (2018).
- 16
- 17 56. Sant'Ana, D. M. G. *et al.* Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal  
18 neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Int J Exp Pathol* **93**, (2012).
- 19
- 20 57. Casagrande, L. *et al.* Moderate intestinal immunopathology after acute oral infection with  
21 *Toxoplasma gondii* oocysts is associated with expressive levels of serotonin. *Life Sci* **309**,  
22 (2022).
- 23
- 24 58. Soares, A. M., Freire, J. E. & Lima, A. A. M. Mathematical dose-response model for sodium  
25 cotransport with glucose and glutamine in the rabbit ileal mucosa. *Braz J Med Biol Res* **25**,  
26 1141–1144 (1992).
- 27
- 28 59. de Aquino, C. C. *et al.* Effect of hypoproteic and high-fat diets on hippocampal blood-brain  
29 barrier permeability and oxidative stress. *Front Nutr* **5**, (2019).
- 30
- 31 60. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time  
32 quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- 33
- 34 61. Maria-Ferreira, D. *et al.* Rhamnogalacturonan, a chemically-defined polysaccharide, improves  
35 intestinal barrier function in DSS-induced colitis in mice and human Caco-2 cells. *Sci Rep* **8**,  
36 (2018).
- 37
- 38 62. Toutounji, M. *et al.* Dextran sodium sulfate-induced impairment of protein trafficking and  
39 alterations in membrane composition in intestinal Caco-2 cell line. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

### FIGURES

**Figure 1. Inoculation of increasing concentrations of SARS-CoV-2 Spike glycoprotein in isolated jejunal loops.** (A) Experimental model in C57BL/6 mice with schematic of 2019-nCoV S primary structure colored in grayscale by domain. Domains that were excluded from the ectodomain expression construct or could not be visualized in the final map are colored white. SS, signal sequence; S2', S2' protease cleavage site; FP, fusion peptide; HR1, heptad repeat 1; CH, central helix; CD, connector domain; HR2, heptad repeat 2; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail. Arrows denote protease cleavage sites. (B) macroscopic view of representative jejunal loops after 4 hours of PBS (Control; B-a) or Spike inoculation in the concentration of 0.1 – 5.0µg/loop (B b-f). Bars in B are 1 cm length. (C) Wet Weight. (D) Accumulation of secretion of intestinal fluid and (E) Chloride ion concentration. The results are expressed as mean ± standard error of the mean, n= 5-10 animals per group. \* $p < 0.05$  vs. control group. \*\*\* $p < 0.001$  vs. control group. # $p < 0.01$  vs. group with the Spike concentration 5.0 µg/loop. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's test.

30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

**Figure 2. The SARS-CoV-2 Spike glycoprotein triggers an intestinal inflammatory response in a novel murine model.** (A) inflammatory/oxidative stress panel showing histopathological scores (Aa-d), representative photomicrographs of H&E (Ae) show blunting of villi, loss of goblet cells, and erosions on the epithelial surface leading to loss of mucosal histoarchitecture (arrows), note the strong presence of focal and diffuse inflammatory infiltrates in the distorted intestinal wall and hyperplasia in the intestinal crypts (#), infiltration of inflammatory cells into the submucosa (##) and lamina propria (###); Myeloperoxidase activity (Af); glutathione levels and malondialdehyde levels (Ag-h) (B) histomorphometry panel; (C) RT-qPCR panel and (D) Western blotting. Results are expressed as median and interquartile range or mean ± standard error of the mean, n= 6 to 8 animals per group. \* $p < 0.05$  vs. control group. \*\* $p < 0.01$  vs. control group. \*\*\* $p < 0.001$  vs. control group. Statistical analysis was performed by Student's t test.

54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Figure 3. The SARS-CoV-2 Spike glycoprotein inoculation promotes lysozyme release by Paneth cells in the gut wall.** (A-a) Representative photomicrographs of HE stained sections showing typical eosinophilic granules of Paneth cells at the base of the crypts (arrows); crypt area (external) and area occupied by Paneth cells (internal) of control group. (A-c) and Spike 5µg/loop group (A-e). Objective lens 40x. (A-b) Number of Paneth cells per intestinal crypt;



1 (A-d) Area occupied by Paneth cells in the intestinal crypt. (A-f) Percentage (%) relative to the  
 2 area occupied by Paneth cells in intestinal crypt. (B-a) Representative photomicrographs of  
 3 lysozyme immunohistochemistry; (B-b) Immunohistochemistry Paneth cell/crypt. Data are  
 4 presented in box-and-whisker plots with minimum and maximum values, median and  
 5 interquartile range or mean  $\pm$  standard error of the mean, n= 5 to 8 animals per group. \*\*  $p < 0.01$   
 6 vs. control group.  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13

14 **Figure 4. The SARS-CoV-2 Spike glycoprotein destroys goblet cells and impairs mucin**  
 15 **production.** Representative photomicrographs (H&E) show goblet cells stained with Periodic  
 16 Acid-Schiff (PAS<sup>+</sup>; A and B), Alcian blue (AB) pH 1.0 (D and E) and AB pH 2.5 (G and H).  
 17 Objective lens 40x. Representative photomicrographs of Muc2<sup>+</sup> immunohistochemistry (J);  
 18 objective lens 100x. Immunohistochemistry Muc2<sup>+</sup> cell area in pixels (K). Data are presented  
 19 in box-and-whisker plots with minimum and maximum values, median and interquartile range  
 20 or mean  $\pm$  standard error of the mean, n= 5 to 8 animals per group. \*\*  $p < 0.01$  vs. control group;  
 21 \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control group. Statistical analysis was performed by Student's t test.  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29

30 **Figure 5. SARS-CoV-2 Spike glycoprotein alters jejunal barrier function.** (A)  
 31 Concentration-effect curve to KCl (1 – 140 mM). (B) Concentration-effect curve to CCh (0.01  
 32 – 100  $\mu$ M). (C) Ussing chamber transepithelial electric resistance and (D) short-circuit current.  
 33 RT-qPCR (E) *Cldn2*, (F) *Tjp1* and (G) Occludin; Western blot analysis (H) claudin 5, (I) ZO-  
 34 1, (J) Occludin. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean, n= 5-9 animals per  
 35 group. \* $p < 0.05$  vs. control group; \*\* $p < 0.01$  vs. control group. # $p < 0.05$ , indicates the lowest  
 36 concentration with a significant contracting effect. For the contractile analyses, two-way  
 37 analysis of variance was performed, followed by Bonferroni's test, while for RT-qPCR and  
 38 western blotting analysis, Student's t test was performed.  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49

50 **Figure 6. Spike inoculation promotes reduction of cellular metabolism and increases the**  
 51 **intestinal permeability of Caco-2 cells.** (A) Metabolic reduction at 6, 12, and 24 hours; (B)  
 52 Percentage of metabolic reduction at 24 hours; (C) Cellular permeability. Results are expressed  
 53 as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $p < 0.05$  vs. control group; \*\* $p < 0.01$  vs. control group;  
 54 \*\*\* $p < 0.001$  vs. control group. Statistical analysis was performed using one-way analysis of  
 55 variance and two-way analysis of variance, followed by Bonferroni's test.  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65

**Figure 7. Molecular interaction docking between SARS-CoV-2 Spike protein in the open state (6VYB) and synthetic peptides.** (A) The protein-protein 3D molecular docking complex with Spike (Sub A: deep blue, Sub B: green and Sub C: light blue) and NBD2 ligand (Sub D: red, Sub C: yellow, Sub A: green and, Sub B: light green) illustrating the binding site; (B) The protein-protein 3D molecular docking complex with Spike (Sub A: deep blue, Sub B: green and Sub C: light blue) and NBD1 ligand (Sub D: red, Sub C: yellow, Sub A: green and, Sub B: light green) illustrating the binding site; (C) The protein-protein 3D molecular docking complex with Spike (Sub A: deep blue, Sub B: green and Sub C: yellow-green) and CFTR ligand (Sub A: red) illustrating the binding site; (D) The protein-protein 3D molecular docking complex with Spike (Sub A: deep blue, Sub B: deep blue and Sub C: light blue) and CACC ligand (Sub A: light blue, Sub B: green-blue, Sub C: green, Sub D: green light, Sub E: green, Sub N and O: red, Sub L and M: orange, Sub K and J: yellow, Sub H and I: light green , Sub F and G: green) illustrating the binding site.

**Figure 8. The Effects of SARS-CoV-2 Spike Protein on Gastrointestinal Health.** The schematic figure illustrates the complex interactions between the SARS-CoV-2 Spike protein and the gastrointestinal (GI) tract, highlighting the observed effects in both rodent and human samples. 1) Augmented Chloride Secretion in Jejunal Segments: In rodent jejunal segments, exposure to the SARS-CoV-2 Spike protein triggers a remarkable increase in chloride (Cl<sup>-</sup>) secretion. This electrolyte imbalance disrupts the homeostatic environment of the small intestine, potentially leading to altered fluid balance and diarrhea. 2) Impairment of Mucosal Integrity and Tight Junction Disruption: A novel murine model of enteritis induced by the SARS-CoV-2 Spike protein demonstrates a profound impact on mucosal integrity. The protein's presence leads to the disruption of tight junctions (TJs) between enterocytes, resulting in reduced transepithelial electrical resistance. This breach in barrier function may facilitate the translocation of harmful substances across the intestinal lining. 3) Increased Mucosal Permeability in Human Enterocytes: In human enterocytes, exposure to the SARS-CoV-2 Spike protein leads to an increase in mucosal permeability. This compromised barrier function allows the passage of molecules that would normally be restricted, potentially contributing to systemic inflammation and immune responses. 4) Reduced Mucus Blanket and MUC-2 Depletion: Examination of the jejunum reveals a marked reduction in the mucus blanket that typically coats the intestinal surface. Goblet cells, responsible for mucus production, show decreased bulk in MUC-2, a key component of mucus. This reduction may compromise the protective barrier provided by mucus, leaving the intestinal epithelium vulnerable to pathogenic insults. 5) Paneth

1 Cell Degranulation and Lysozyme Depletion: SARS-CoV-2 inoculation in the luminal gut  
2 environment triggers Paneth cell degranulation. These specialized cells release antimicrobial  
3 molecules such as lysozymes, which play a crucial role in maintaining gut microbial balance.  
4  
5 However, the presence of the Spike protein results in a notable reduction in lysozyme levels,  
6  
7 potentially affecting the gut's ability to control microbial populations. 6) Increased Expression  
8 of Cytokines, Especially IL-6: The exposure to the SARS-CoV-2 Spike protein induces  
9  
10 heightened expression of cytokines, notably interleukin-6 (IL-6). This pro-inflammatory  
11  
12 cytokine may contribute to local and systemic inflammation, exacerbating gut tissue damage,  
13  
14 including innermost layers such as smooth muscle, and influencing the overall immune  
15  
16 response. 7) Reduced Gut Motility: The cumulative effects of the SARS-CoV-2 Spike protein  
17  
18 on the GI tract culminate in reduced gut motility. This disruption may stem from the combined  
19  
20 impact of disrupted electrolyte balance, compromised mucosal integrity, and heightened  
21  
22 cytokine, mainly IL-6, expression. Altered gut motility can have cascading effects on digestion,  
23  
24 absorption, and overall GI function. The legend underscores the intricate cascade of events  
25  
26 triggered by the SARS-CoV-2 Spike protein's interaction with the gastrointestinal system,  
27  
28 highlighting the potential for significant disruptions in gut health and homeostasis. These  
29  
30 findings shed light on the broader impact of the virus beyond the respiratory system,  
31  
32 emphasizing the need for comprehensive understanding and targeted interventions. The lower  
33  
34 frame shows the legend of the illustration elements.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 1

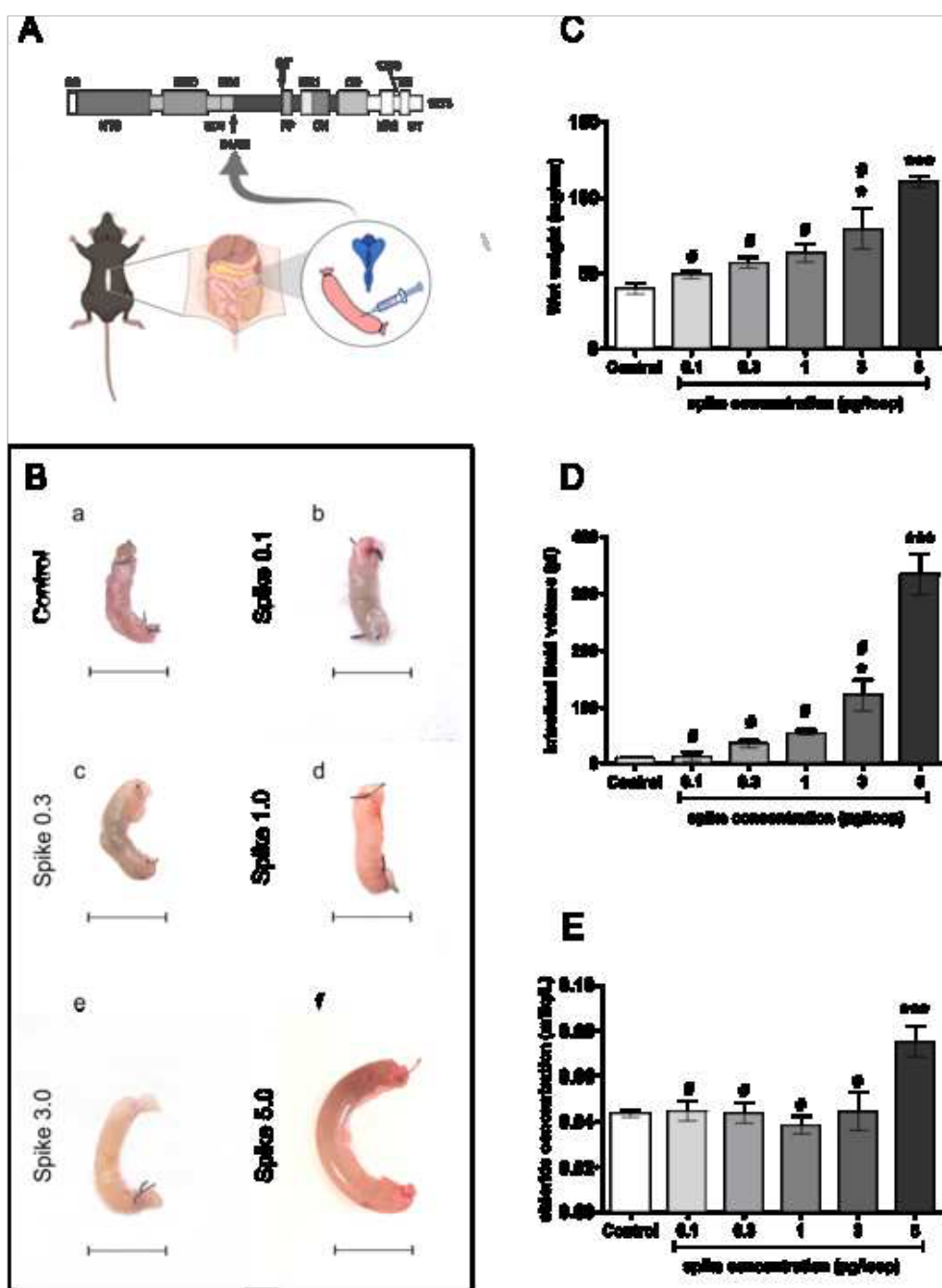
[Click here to access/download;Figure;Figure 1.tif](#)


Figure 2

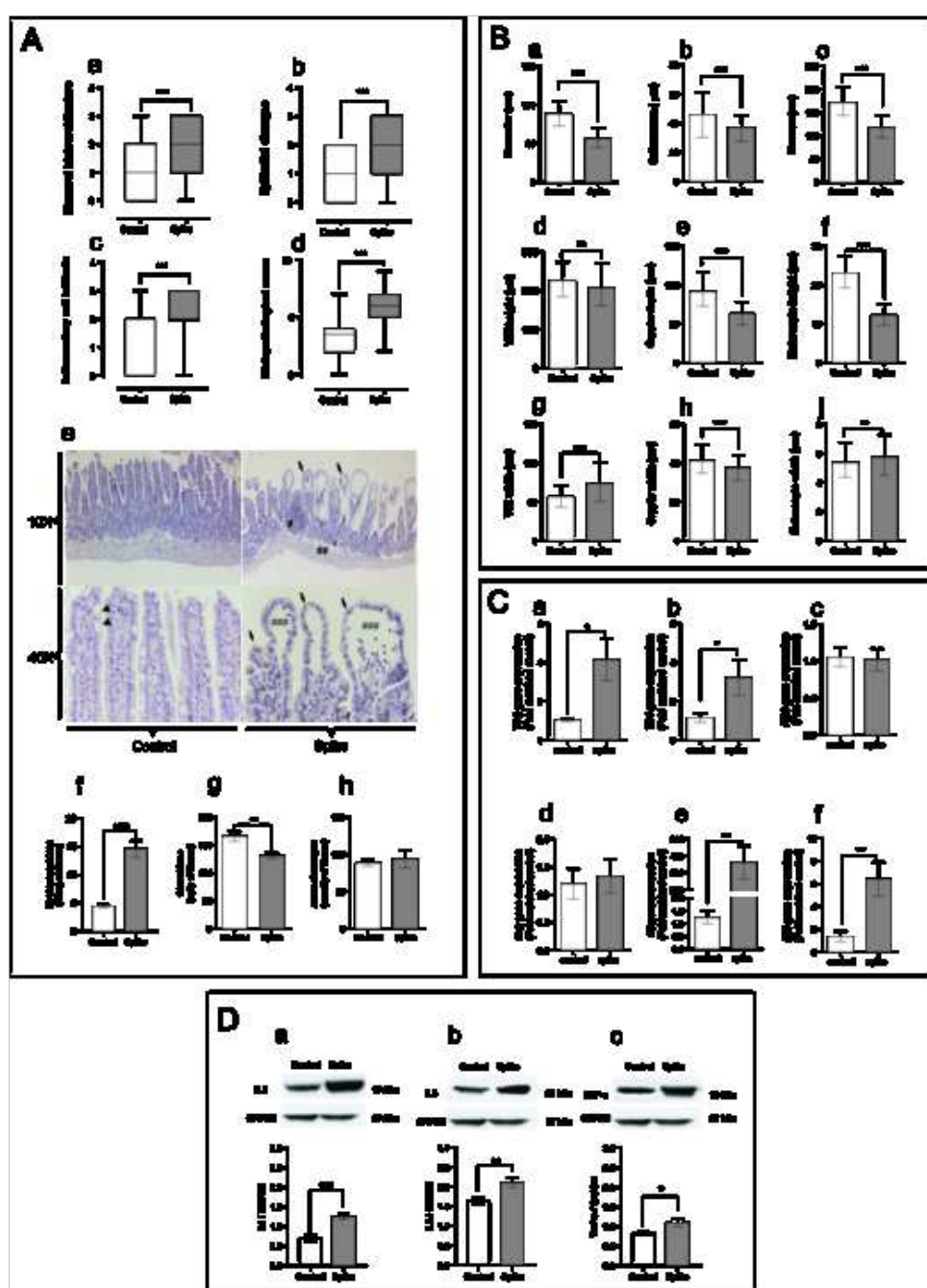
[Click here to access/download;Figure;Figure 2.tif](#)

Figure 3

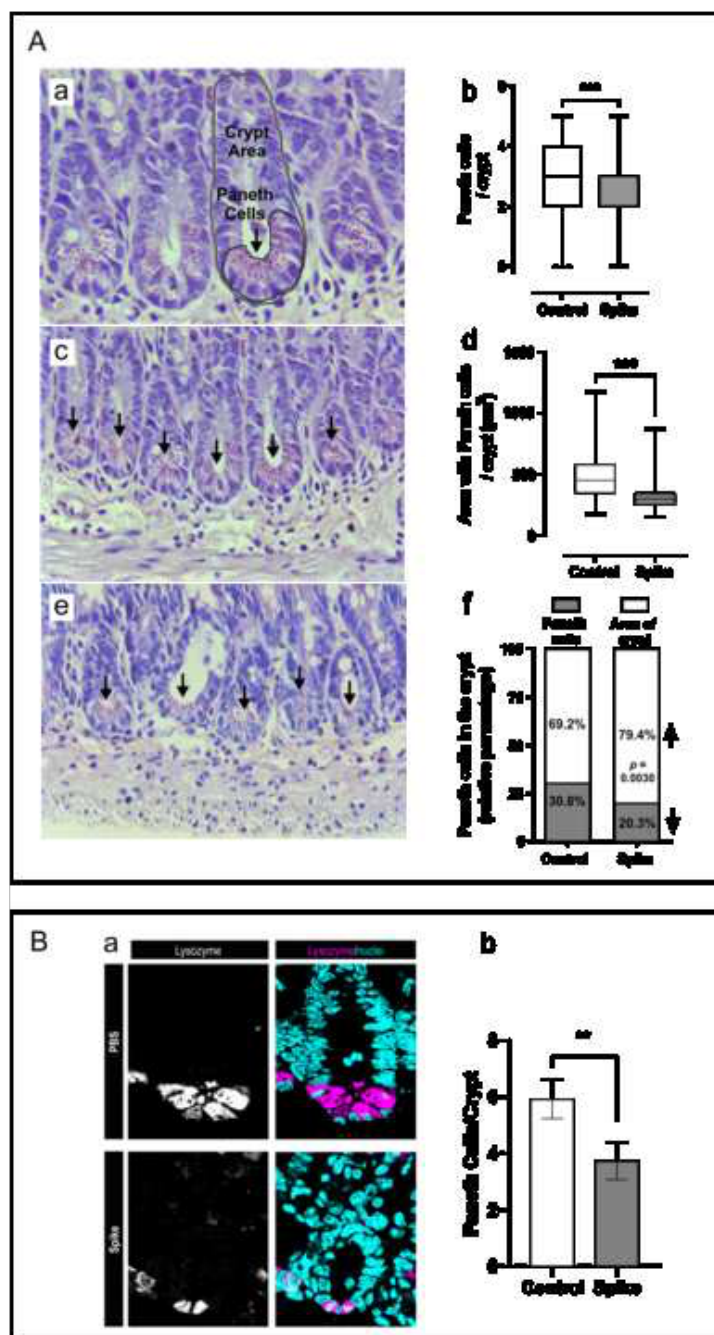
[Click here to access/download;Figure;Figure 3.tif](#)


Figure 4

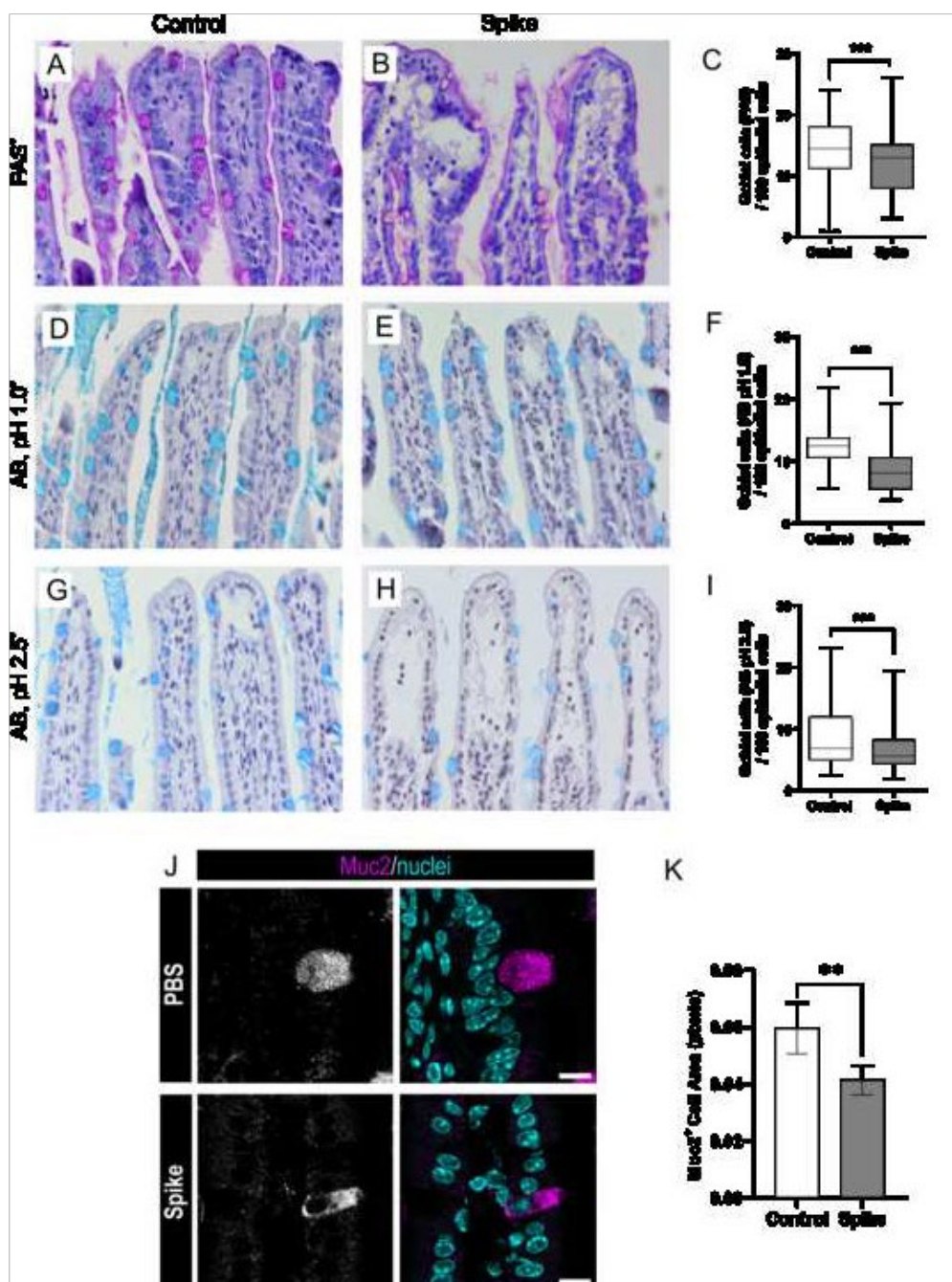
[Click here to access/download;Figure;Figure 4.tif](#)


Figure 5

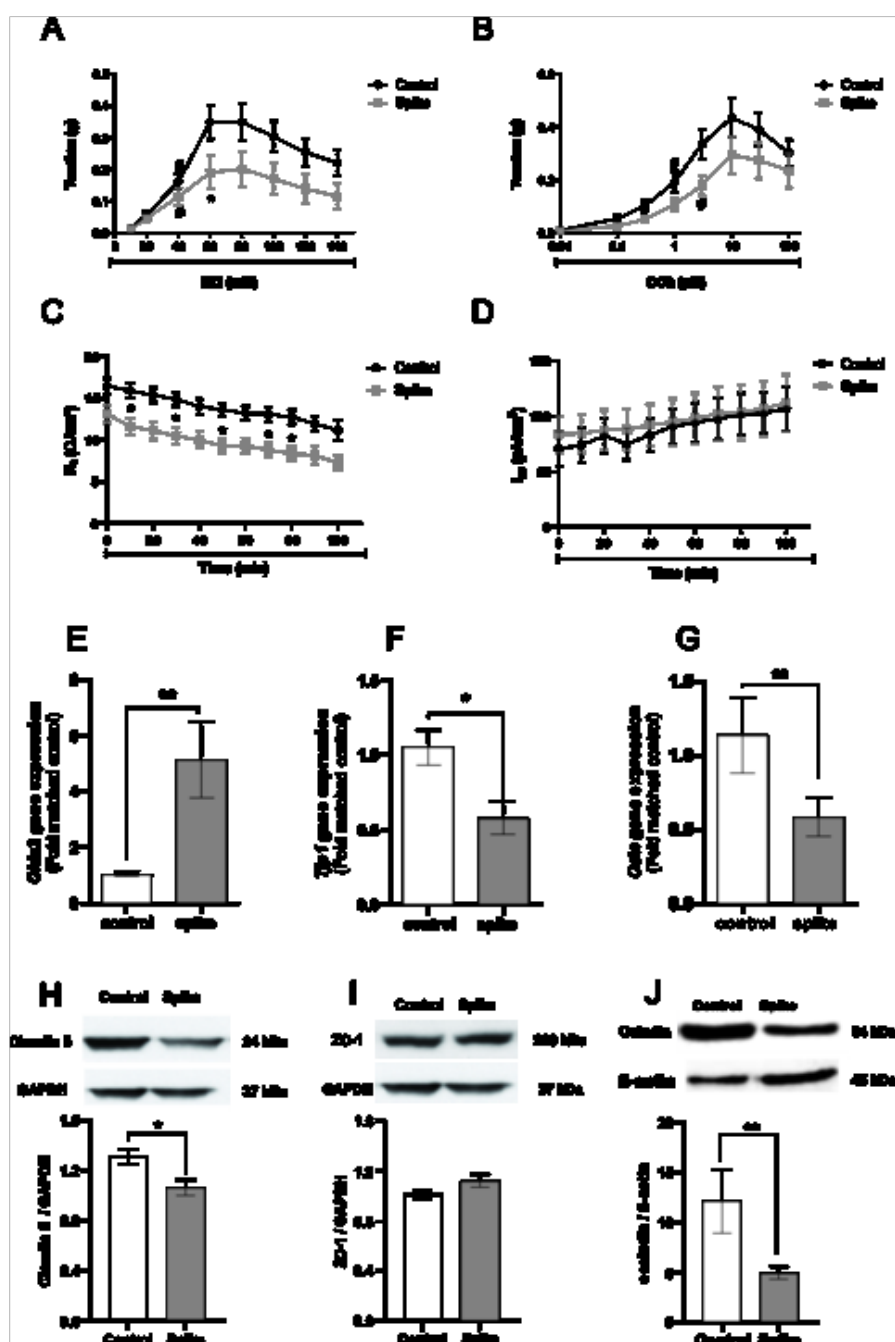
[Click here to access/download;Figure;Figure 5.tif](#)



Figure 6

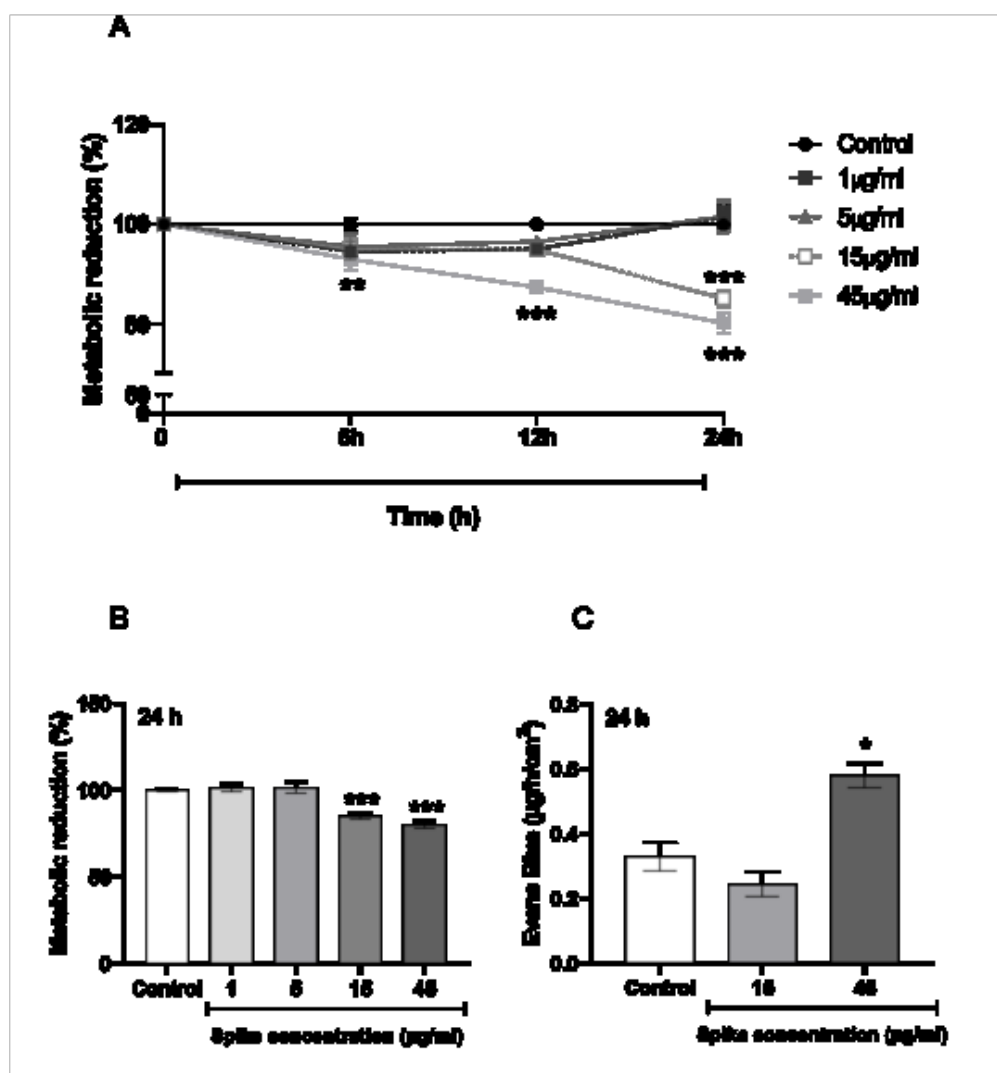
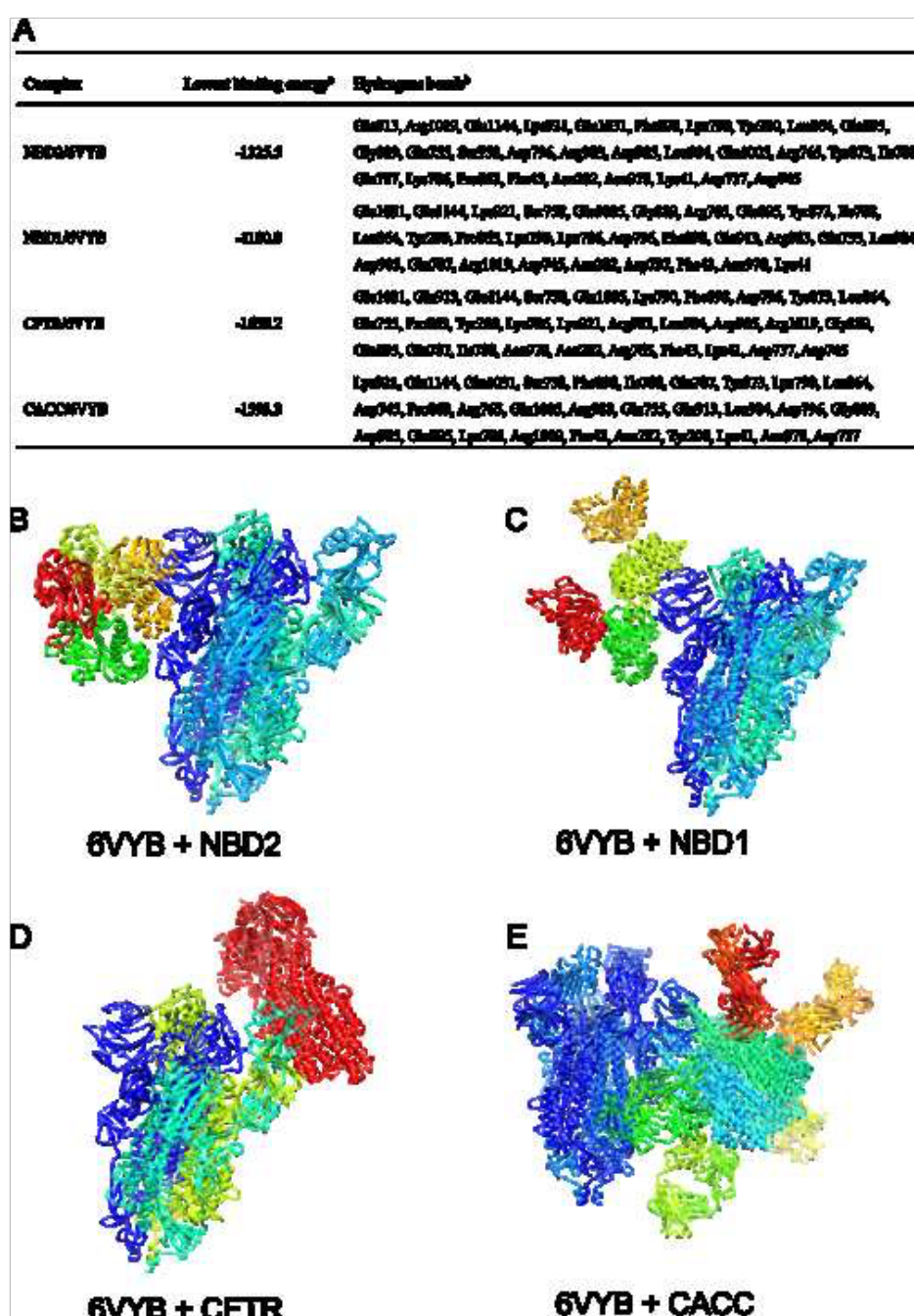
[Click here to access/download;Figure;Figure 6.tif](#)

Figure 7

[Click here to access/download;Figure;Figure 7.tif](#)

## ANEXO E – PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CAMARAS DE USSING



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMEDICINA

### Procedimento Operacional Padrão – POP

|  |
|--|
| <b>1. TÍTULO:</b> Preparo de soluções para Câmaras de Ussing                               |
| <b>2. NOME DA INSTITUIÇÃO:</b> Instituto de Biomedicina                                    |
| <b>3. DEPARTAMENTO:</b> Patologia e Medicina Legal   |
| <b>4. OBJETIVO:</b> Preparo de soluções para Câmaras de Ussing                             |
| <b>5. ALCANCE:</b><br>Setor de Câmaras de Ussing.  |
| <b>6. RESPONSABILIDADE:</b><br><b>Professor orientador:</b> Dr. Aldo A. M. Lima            |
| <b>7. MATERIAIS NECESSÁRIOS:</b>   |
| <b>7.1. Vidraria:</b>  |
| 1. Becker de 1000mL  |
| 2. Bastão de vidro   |
| 3. Balão volumétrico de 1000mL   |
| 4. Vidro âmbar de 1000 mL  |
| 5. Erlemeyer de 500mL  |
| 6. Tubos falcon de 15mL  |
| <b>7.2. Reagentes e suas concentrações para solução de manutenção de eletrodos:</b>        |
| 1. Cloreto de sódio (NaCl 150 mM)  |
| 2. Cloreto de potássio (KCl 150 mM);   |
| <b>7.3. Reagentes/concentrações para solução de KRB (<i>Krebs-ringer Bicarbonate</i>):</b> |
| 1. Cloreto de sódio (NaCl 115 mM)  |
| 2. Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> 25 mM);  |
| 3. Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 mM);                  |
| 4. Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> 1,2 mM);   |
| 5. Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> 1,2 mM);   |
| 6. Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4mM)                  |
| <b>7.4. Reagentes e suas concentrações para solução de manutenção das membranas:</b>       |
| 1. Manitol (10 mM)   |
| 2. Glicose (10 mM)   |

|  |                         |                           |
|--|-------------------------|---------------------------|
| <b>7.5. Reagentes e suas concentrações para solução de teste funcional das membranas:</b>  |                         |                           |
| 1. Teofilina (300 mM)  |                         |                           |
| 2. Glicose (300 mM)  |                         |                           |
| <b>8. PROCEDIMENTO:</b>  |                         |                           |
| 1. Efetuar pesagem dos seguintes reagentes para solução de manutenção dos eletrodos (1000 mL)  |                         |                           |
| a. NaCl  |                         | 8,8g                      |
| b. KCl   |                         | 11,19g                    |
| Preparar 1000mL de solução e ajustar o pH para 7,4.  |                         |                           |
| 2. Efetuar pesagem dos seguintes reagentes para solução de KRB (1000 mL)   |                         |                           |
| a. NaCl  |                         | 6,7206g                   |
| b. NaHCO <sub>3</sub>  |                         | 2,1003g                   |
| c. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   |                         | 0,4181g                   |
| d. CaCl <sub>2</sub>   |                         | 0,1764g                   |
| e. MgCl <sub>2</sub>   |                         | 0,2439g                   |
| f. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   |                         | 0,0544g                   |
| Preparar 1000mL de solução e ajustar o pH para 7,4.  |                         |                           |
| 3. Efetuar pesagem dos seguintes reagentes para solução de manutenção das membranas (300 mL em solução de KRB para cada um dos reagentes)    |                         |                           |
| a. Manitol   |                         | 0,5466g                   |
| b. Glicose   |                         | 0,5406g                   |
| Com solução de KRB, adicionar os reagentes. Preparar uma solução de manitol (300mL) e uma solução de glicose (300mL).                        |                         |                           |
| 4. Efetuar pesagem dos seguintes reagentes para solução de teste funcional das membranas (2 mL em solução de KRB para cada um dos reagentes) |                         |                           |
| a. Teofilina   |                         | 0,1081g                   |
| b. Glicose   |                         | 0,1080g                   |
| Com solução de KRB, adicionar os reagentes. Preparar uma solução de Teofilina (2mL) e uma solução de glicose (2mL).                          |                         |                           |
| <b>9. VERIFICAÇÃO DOS DADOS:</b>   |                         |                           |
| Os dados deverão ser verificados periodicamente pelo responsável pela técnica praticada e por seu orientador.                                |                         |                           |
| <b>12. NOTAS:</b>  |                         |                           |
| Caso necessário qualquer alteração, os dados poderão ser atualizados ou modificados com prévia aprovação do orientador responsável.          |                         |                           |
| Se necessária a preparação de soluções com volumes diferentes dos aqui apresentados, refazer os caçulos da pesagem dos reagentes             |                         |                           |
| <b>REDIGIDO POR:</b>   | <b>REVISADO POR:</b>    | <b>APROVADO POR:</b>      |
| <b>DATA DA REDAÇÃO:</b>  | <b>DATA DA REVISÃO:</b> | <b>DATA DA APROVAÇÃO:</b> |

## ANEXO F – PREPARO DO SISTEMA DAS CAMARAS DE USSING



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMEDICINA

### Procedimento Operacional Padrão – POP

|   |
|---|
| <b>1. TÍTULO:</b> Preparo do sistema das Câmaras de Ussing  |
| <b>2. NOME DA INSTITUIÇÃO:</b> Instituto de Biomedicina   |
| <b>3. DEPARTAMENTO:</b> Patologia e Medicina Legal  |
| <b>4. OBJETIVO:</b> Preparo do sistema das Câmaras de Ussing  |
| <b>5. ALCANCE:</b><br>Setor de Câmaras de Ussing.   |
| <b>6. RESPONSABILIDADE:</b><br><b>Professor orientador:</b> Dr. Aldo A. M. Lima   |
| <b>7. MATERIAIS NECESSÁRIOS:</b><br><br><b>7.1. Câmaras de Ussing:</b><br><br><b>7.2. Bomba propulsora de água</b><br><br><b>7.3. Soluções</b><br>1. <i>Krebs-Ringer Bicarbonate</i> (KRB)<br>2. Manutenção de membranas<br>3. Teste funcional<br><br><b>7.4. Outros materiais</b><br>1. Eletrodos de voltagem<br>2. Eletrodos de corrente<br>3. Pipetador automático<br><br><b>7.5. Vidraria</b><br>1. Pipetas de 20mL<br>2. Becker de 300mL |
| <b>8. PROCEDIMENTO:</b><br><br>1. Verificar o volume de água na bomba propulsora de água, se necessário, completar com água destilada para manter o volume acima 80% da capacidade total do reservatório.   |

2. Preparar as pontes de ágar para conectar os eletrodos as câmaras. Para preparação das pontes de ágar, é pesado 2,4 g de Ágar na balança analítica e adicionado a 50 ml de KRB dentro de um Becker de 100 ml. Em seguida, o Becker contendo a solução de KRB-ágar é colocada em banho-maria dentro de um outro Becker de 1 L contendo 150 ml de água fervendo em temperatura de 80 a 100 °C e homogeneizada com uma bala magnética pequena em agitação na velocidade 3 por um período de 30 minutos, utilizando para isto um agitador magnético com placa aquecedora. Após o tempo de aquecimento, é observação se o ágar está homogêneo e totalmente diluído, bem como se já começou a enrijecer, sinalizando que está pronto para ser distribuído nos cartuchos dos eletrodos, evitando a formação de bolhas, que podem interferir na captação do sinal elétrico pelos eletrodos. São utilizados 16 cartuchos para os eletrodos de voltagem e mesma quantidade para eletrodos de corrente, mas, devido a necessidade de trocas de cartuchos durante a calibração do sistema, sendo preparados em cada experimento 20 cartuchos para os eletrodos de corrente, que dão menos problema, e 34 cartuchos para os eletrodos de voltagem.

2. Conectar os eletrodos no pré-amplificador e as pontes nas câmaras contendo solução de KRB. Ordem dos eletrodos no pré-amplificador:

Eletrodos azuis (Voltagem): conectados na parte da frente da câmara – V1 = direita  
V2 = esquerda

Eletrodos vermelhos (Corrente): conectados na parte de atrás da câmara – I1 = direita  
I2 = esquerda

3. Ligar EVC-4000.

4. No pré-amplificador: virar o botão para “Operate”.

4.1. Checar a voltagem. Voltagem deve estar perto de zero. Caso muito acima de zero, seguir os seguintes passos:

a) Verificar se as pontes de ágar dos eletrodos apresentam bolhas, se sim, trocá-las imediatamente, e ver se as conexões estão devidamente conectadas ao pré-amplificador.

b) Se ainda assim a Voltagem estiver muito acima de zero, trocar os eletrodos das Câmaras que estão mostrando uma voltagem muito alterada. Fazer essas trocas de eletrodos até conseguir que os valores de voltagem se encontrem abaixo de 1 mV. Caso necessário colocar eletrodos novos em funcionamento.

4.2. Ajustar a voltagem para zero usando os botões “Coarse” e “Fine” no pré-amplificador.

4.3. Colocar o pré-amplificador em “Standby”.

4.4. Verificar se a água circulante dentro das colunas está aquecendo. A solução de KRB dentro das câmaras deve estar entre 37 e 38,5°C.

4.5. Conectar as colunas às câmaras. Adicionar 5 ml de KRB em cada coluna.

4.6. Liberar o Gás verificando se a válvula verde está frouxa.

a) Abra a válvula cinza em sentido anti-horário

b) Aperte a válvula verde no sentido horário até que comece a ver o gás sendo liberado nas colunas.

4.7. Colocar pré-amplificador em “Operate”.

4.8. Zerar a resistência do fluido:

a) Apertar o botão “Fluid Res.” no EVC-4000. Verificar se a resistência está próxima de 100. Se estiver muito diferente há algo de errado. Verificar se todos os eletrodos estão devidamente conectados ao pré-amplificador e se as pontes também estão devidamente conectadas a câmara. Caso, esses não sejam o problema, tomar nota de que a resistência estava muito abaixo ou muito acima e seguir com o procedimento.

b) Enquanto aperta “Fluid Res.”, usar o botão “Compensation” para zerar a resistência do fluido até que a mesma chegue a zero ou muito próximo.

c) Prender as conexões que levam o KRB das colunas para as Câmaras com as pinças, previamente colocadas uma de cada lado do suporte.

4.9. Colocar o pré-amplificador em “Standby”

4.10. Carregar “Set clamp” em 50  $\mu$ A.

4.10. Esvaziar as câmaras e colunas, prender os tubos que saem das colunas com as pinças que devem estar presas ao suporte das câmaras.

4.11. Retirar as câmaras, adicione 5ml de Manitol à coluna da direita que correspondente ao lado mucoso da membrana, e, em seguida, adicione 5ml de Glicose à coluna da esquerda que e correspondente ao lado seroso da membrana.

## **9. VERIFICAÇÃO DOS DADOS:**

|  |                         |                           |
|--|-------------------------|---------------------------|
| Os dados deverão ser verificados periodicamente pelo responsável pela técnica praticada e por seu orientador.  |                         |                           |
| <b>10. NOTAS:</b><br>Caso necessário qualquer alteração, os dados poderão ser atualizados ou modificados com prévia aprovação do orientador responsável. |                         |                           |
| <b>REDIGIDO POR:</b>   | <b>REVISADO POR:</b>    | <b>APROVADO POR:</b>      |
| <b>DATA DA REDAÇÃO:</b>  | <b>DATA DA REVISÃO:</b> | <b>DATA DA APROVAÇÃO:</b> |



## ANEXO G – PREPARO DE PONTES DE AGAR PARA CAMARAS DE USSING



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMEDICINA

### Procedimento Operacional Padrão – POP

|  |
|--|
| <b>1. TÍTULO:</b> Preparo de pontes de Agar para Câmaras de Ussing   |
| <b>2. NOME DA INSTITUIÇÃO:</b> Instituto de Biomedicina  |
| <b>3. DEPARTAMENTO:</b> Patologia e Medicina Legal   |
| <b>4. OBJETIVO:</b> Preparo de pontes de Agar para Câmaras de Ussing   |
| <b>5. ALCANCE:</b><br>Setor de Câmaras de Ussing.  |
| <b>6. RESPONSABILIDADE:</b><br><b>Professor orientador:</b> Dr. Aldo A. M. Lima  |
| <b>7. MATERIAIS NECESSÁRIOS:</b><br><br><b>7.1. Vidraria:</b><br>1. Becker de 1000 mL<br>2. Becker de 100 mL<br><br><b>7.2. Bomba propulsora de água</b><br><br><b>7.3. Cilindro de ar com mistura cabogênica</b><br><br><b>7.4. Outros materiais</b><br>1. Cartucho (pequeno) para os eletrodos de voltagem (30 unidades)<br>2. Cartucho (grande) para eletrodos de corrente (20 unidades)<br>3. Seringa de 20 mL com ponta plástica adaptada para o preenchimento das pontes<br>4. Eletrodos de voltagem (azul)<br>5. Eletrodos de corrente (vermelho)<br>6. Agitador magnético com placa aquecedora |
| <b>8. NOTA:</b><br>Antes de começar o preparo das pontes, checar os seguintes pontos:<br>1) Verificar se tem água na bomba propulsora. Baixe a válvula manualmente. Se a mesma estiver maleável, não é necessário adicionar água. Caso não haja maleabilidade, adiciona água suficiente para a circulação nas câmaras.<br>2) No pré-amplificador, verificar se o mesmo se encontra em: <b>stand-by</b> , <b>coarse</b> e <b>fine</b> devem estar zerados em suas marcações, botão marcando <b>out</b> .  |

3) EVC 4000 deve encontrar-se em: botão meter deve estar voltado para mV, botão zero deve estar voltado para (+), e, *compensation* e set *clamp* devem estar marcando zero.

4) No cilindro de ar, verificar se existe pressão da mistura carbogênica no mesmo.

#### **9. PROCEDIMENTO:**

**1. Em agitador automático com base aquecedora colocar 300 ml de água em um Becker de 1000mL e aquecê-la em 80°C.**

#### **2. Preparação da solução de ágar**

a. Pesar 2,4g de Agar.

b. Dissolver Agar em 50ml de Solução de Krebs (KRB) em Becker de 100 ml.

c. Ferver a solução em banho-maria dentro do Becker de 1000 ml. Deixar agitando na velocidade 3 do agitador automático, para que a solução fique homogênea.

d. Quando Agar estiver translúcido, a solução está pronta.

e. Abaixar a temperatura da base aquecedora.

f. Com a solução de Agar morna, succione um pouco da mesma com uma seringa de ponta adaptada.

g. Preencha os cartuchos para eletrodos de voltagem (azul) e enrosque o respectivo eletrodo.

h. Preencha os cartuchos para eletrodos de corrente (vermelho) enrosque o respectivo eletrodo.

#### **10. VERIFICAÇÃO DOS DADOS:**

Os dados deverão ser verificados periodicamente pelo responsável pela técnica praticada e por seu orientador.

#### **11. NOTAS:**

Caso necessário qualquer alteração, os dados poderão ser atualizados ou modificados com prévia aprovação do orientador responsável.

**REDIGIDO POR:**

**REVISADO POR:**

**APROVADO POR:**

**DATA DA REDAÇÃO:**

**DATA DA REVISÃO:**

**DATA DA APROVAÇÃO:**

## ANEXO H – PREPARO DE MEMBRANA PARA CAMARAS DE USSING



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMEDICINA

### Procedimento Operacional Padrão – POP

|   |
|---|
| <b>1. TÍTULO:</b> Preparo e teste das membranas para Câmaras de Ussing  |
| <b>2. NOME DA INSTITUIÇÃO:</b> Instituto de Biomedicina   |
| <b>3. DEPARTAMENTO:</b> Patologia e Medicina Legal  |
| <b>4. OBJETIVO:</b> Preparo de membranas para Câmaras de Ussing   |
| <b>5. ALCANCE:</b><br>Setor de Câmaras de Ussing.   |
| <b>6. RESPONSABILIDADE:</b><br><b>Professor orientador:</b> Dr. Aldo A. M. Lima   |
| <b>7. MATERIAIS NECESSÁRIOS:</b><br><br><b>7.1. Vidraria:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pipeta de 1 mL</li> <li>2. Becker de 300 mL</li> <li>3. Placa de Petri de vidro de 100 mm</li> <li>4. Pipetas de 20 mL</li> </ol><br><b>7.2. Material para cirurgia e dissecação</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bisturi</li> <li>2. Seringa de 1 mL para anestésiar camundongo</li> <li>3. Tesoura</li> <li>4. Compressas de gase</li> <li>5. Seringa de lavagem auricular preenchida com Ringer, para lavagem da alça intestinal</li> <li>6. Pinças de tamanhos diversos</li> <li>7. Luvas descartáveis</li> <li>8. Caixa de isopor com gelo</li> </ol><br><b>7.3. Outros materiais</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cânulas de vidro</li> <li>2. Pinças metálicas</li> <li>3. Foco de luz</li> <li>4. Lupa de aumento</li> <li>5. Cânulas de polietileno de fino calibre</li> </ol> |

**9. PROCEDIMENTO:****9.1. Preparação das membranas**

1. Pesar o animal.
2. Organizar o local onde será realizada a anestesia com todo material necessário.
3. Anestésiar o camundongo com 35mg/Kg de Cetamina e 5mg/Kg de Xilazina.
4. Umedecer uma gaze com água destilada e passe delicadamente sobre a região abdominal do animal.
5. Com o bisturi abrir o abdômen do animal e com as mãos (calçadas com luvas) umedecidas em Ringer, faça uma ligeira pressão no abdômen a fim de as alças intestinais sejam expostas.
6. Após a identificação do apêndice, meça cerca de 4cm e, a partir daí, retire o tamanho desejável de íleo para que as membranas possam ser preparadas.
7. Transferir a parte de íleo seccionada para placa de Petri de 100 mm contendo 2 ml de solução de Ringer gelada, com a placa de Petri repousando sobre o gelo.
8. Sacrifique o animal imediatamente.
9. Lavar a alça intestinal com solução de Ringer presente na seringa de lavagem auricular.
10. Inserir a cânulas de vidro na alça intestinal a fim de que esta possa ficar um pouco tensionada para realizar a dissecação da camada serosa intestinal.
11. Ligar o foco de luz, colocar as lupas e com ajuda do bisturi e de uma pinça bem fina começar a retirar delicadamente a camada serosa intestinal.
12. Depois de retirada a camada serosa, cortar a alça intestinal em pedaços de  $\pm 1$  cm<sup>2</sup> para serem montados nas câmaras.
13. Colocar a membrana sobre o lado da câmara onde se encontra o anel de borracha, deixando a camada mucosa para cima.
14. Encaixar o outro lado da câmara e levar ao sistema para que possa começar a ser aerada e irrigada com as soluções de manutenção.

**9.2. Teste funcional das membranas**

1. Depois de parafusar as câmaras no aparato, encaixar os eletrodos e adicionar 1 ml de Manitol ao lado mucoso (esquerdo) e 1 ml de Glicose ao lado seroso (direito).
2. Recolocar as conexões entre colunas e câmaras que já dever estar previamente preenchidas com manitol e glicose.

|   |                         |                           |
|---|-------------------------|---------------------------|
| <p>3. Retirar as pinças.</p> <p>4. Checar se há formação de bolhas. Caso haja bolhas no lado mucoso (direito), usar cânula de polietileno marcada com a etiqueta M (manitol) para retirar as bolhas. Caso haja bolhas do lado seroso, usar cânula de polietileno marcada com a etiqueta G (glicose) para retirar as bolhas.</p> <p>5. Verificar se há aeração suficiente para todas as câmaras (se há borbulhamento).</p> <p>6. Ligar botão para “operate” após o preparo de cada câmara.</p> <p>7. Deixar as membranas estabilizando por aproximadamente 30 min.</p> <p>8. Realizar a primeira leitura usando uma tabela previamente preparada para a leitura onde devem constar os seguintes parâmetros: PD, VC e CCC.</p> <p>9. Realização da leitura:</p> <p>a) Ler o PD – anotar valor na tabela.</p> <p>b) Apertar em VC – anotar valor na tabela.</p> <p>c) Girar “Set Clamp” até ler zero, mudar o botão “Meter” para “<math>\mu</math>A” – anotar valor em CCC na tabela.</p> <p>d) Voltar todos os botões para a posição inicial. (PD, botão “meter” em mV e recarregar o botão “set clamp” para 50.</p> <p>e) Fazer essa ação em todas as 8 câmaras.</p> <p>f) O intervalo de leitura é de 5 min.</p> <p>10. Aos dez minutos de leitura, 200 <math>\mu</math>L de solução de manutenção devem ser retirados do lado esquerdo das colunas e colocados em seguida 200 <math>\mu</math>L de solução de Teofilina (serosa).</p> <p>11. Aos dez minutos de leitura, 200 <math>\mu</math>L de solução de manutenção devem ser retirados do lado direito das colunas e colocados em seguida 200 <math>\mu</math>L de solução de Glicose (mucosa).</p> <p>12. As leituras são realizadas até 30 minutos quando então podem ser iniciados os testes farmacológicos ou fisiológicos.</p> |                         |                           |
| <p><b>10. VERIFICAÇÃO DOS DADOS:</b><br/>Os dados deverão ser verificados periodicamente pelo responsável pela técnica praticada e por seu orientador.</p>  |                         |                           |
| <p><b>11. NOTAS:</b><br/>Caso necessário qualquer alteração, os dados poderão ser atualizados ou modificados com prévia aprovação do orientador responsável.</p>  |                         |                           |
| <b>REDIGIDO POR:</b>  | <b>REVISADO POR:</b>    | <b>APROVADO POR:</b>      |
| <b>DATA DA REDAÇÃO:</b>   | <b>DATA DA REVISÃO:</b> | <b>DATA DA APROVAÇÃO:</b> |

## ANEXO I – FINALIZAÇÃO E LIMPEZA DAS CAMARAS DE USSING



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
UNIDADE DE PESQUISAS CLÍNICAS & INSTITUTO DE BIOMEDICINA

### Procedimento Operacional Padrão – POP

|   |
|---|
| <b>1. TÍTULO:</b> Finalização e limpeza das Câmaras de Ussing   |
| <b>2. NOME DA INSTITUIÇÃO:</b> Instituto de Biomedicina   |
| <b>3. DEPARTAMENTO:</b> Patologia e Medicina Legal  |
| <b>4. OBJETIVO:</b> Finalização e limpeza das Câmaras de Ussing   |
| <b>5. ALCANCE:</b><br>Setor de Câmaras de Ussing.   |
| <b>6. RESPONSABILIDADE:</b><br><b>Professor orientador:</b> Dr. Aldo A. M. Lima   |
| <b>7. MATERIAIS NECESSÁRIOS:</b><br><br><b>7.1. Vidraria:</b><br>1. Becker de 500 mL<br><br><b>7.2. Outros materiais</b><br>1. Escova<br>2. Swab<br>3. Esponja<br>4. Seringa com ponta adaptada<br>5. Pisseta com água destilada<br>6. Manta aquecedora<br>7. Sabão neutro<br>8. Solução de manutenção de eletrodos   |
| <b>8. PROCEDIMENTO:</b><br><br><b>1. Ao finalizar todas as leituras em seus devidos tempos, girar o botão de “operate” para “stand by”.</b><br><br><b>2. Desligando o sistema</b><br>a) Desligar EVC-4000<br>b) Deixar em zero os botões “compensation” e “set clamp”.<br>c) No pré-amplificador deixar os botões “coarse” e “fine” em suas marcações originais |

- d) Desligar a bomba propulsora de água
- e) Desencaixar os conectores entre câmaras e colunas para escoar as soluções presentes nas colunas.
- f) Fechar válvula do gás seguindo os seguintes passos: fechar a válvula cinza em sentido horário para que haja queda de pressão do ar e, em seguida, fechar a válvula verde em sentido anti-horário
- g) Desprender as câmaras e retirá-las para serem higienizadas.
- h) Colocar as membranas em lixo adequado para que possam ser descartadas corretamente.
- i) Descartar as soluções em local adequado.
- j) Desligar a bomba de circulação termoestável.

### **3. Limpeza dos componentes das Câmaras de Ussing**

#### a) Colunas:

- Depois de esvaziadas, prender as conexões das colunas com as pinças, preencher as colunas com água destilada e um pouco de sabão e esfregue levemente com uma escova.
- Desprender as pinças, deixar a água escoar (use um becker) e, com a ajuda de uma pisseta, enxaguar as colunas abundantemente com água destilada.
- Após enxaguar todas as colunas com água destilada, enxaguar então com água destilada quente usando uma seringa para auxiliar nessa ação.

#### b) Câmaras:

- Após desmontar as câmaras e descartar a membrana, lavar as câmaras com um pouco de sabão em uma esponja macia.
- Enxaguar bem até que todo sabão tenha saído.
- Colocar as câmaras dentro de um recipiente com água destilada por alguns minutos para que saia qualquer resíduo de sabão.

#### c) Pontes

- Desconectar as pontes dos eletrodos.
- Com ajuda de uma seringa com a ponta adaptada, enchê-la de ar e pressionar contra a ponte até que o Agar saia. A pressão deve ser aplicada no lado contrário do encaixe do eletrodo.

|  |                         |                           |
|--|-------------------------|---------------------------|
| <p>d)Eletrodos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Depois de desconectados das pontes, limpar os eletrodos suavemente com a ajuda de um swab de cerdas macias, para retirada de possíveis resíduos de Agar.</li> <li>- Colocar os eletrodos em solução de manutenção de eletrodos (KCl/NaCl) pH=7,4</li> <li>- Colocar os eletrodos, só a parte metálica, em hipoclorito de sódio a 10% e deixar overnight. Após isso, tirar o excesso de hipoclorito com swab macio e água destilada.</li> </ul> |                         |                           |
| <p><b>9. VERIFICAÇÃO DOS DADOS:</b><br/>Os dados deverão ser verificados periodicamente pelo responsável pela técnica praticada e por seu orientador.</p>  |                         |                           |
| <p><b>10. NOTAS:</b><br/>Caso necessário qualquer alteração, os dados poderão ser atualizados ou modificados com prévia aprovação do orientador responsável.</p>   |                         |                           |
| <b>REDIGIDO POR:</b>   | <b>REVISADO POR:</b>    | <b>APROVADO POR:</b>      |
| <b>DATA DA REDAÇÃO:</b>  | <b>DATA DA REVISÃO:</b> | <b>DATA DA APROVAÇÃO:</b> |