

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO REFRIGERANTE À BASE DE GUARANÁ  
PREJUDICA SISTEMAS CARDIOVASCULAR, GÁSTRICO E  
HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS LDLr<sup>-/-</sup>: PAPEL DO ESTRESSE  
OXIDATIVO**

**LAYLA APARECIDA CHISTÉ**

**VILA VELHA - ES**  
**SETEMBRO/2017**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO REFRIGERANTE À BASE DE GUARANÁ  
PREJUDICA SISTEMAS CARDIOVASCULAR, GÁSTRICO E  
HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS LDLr<sup>-/-</sup>: PAPEL DO ESTRESSE  
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

**LAYLA APARECIDA CHISTÉ**

**VILA VELHA - ES**  
**SETEMBRO/2017**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C542e

Chisté, Layla Aparecida.

Exposição crônica ao refrigerante à base de guaraná prejudica sistemas cardiovascular, gástrico e hepático em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>: papel do estresse oxidativo / Layla Aparecida Chisté. – 2017.

53 f.: il.

Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Aterosclerose.  
3. Apoptose. I. Pereira, Thiago de Melo Costa. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

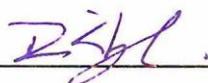
**LAYLA APARECIDA CHISTÉ**

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO REFRIGERANTE À BASE DE GUARANÁ  
PREJUDICA SISTEMAS CARDIOVASCULAR, GÁSTRICO E  
HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS LDLr<sup>-/-</sup>: PAPEL DO ESTRESSE  
OXIDATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de setembro de 2017,

Banca Examinadora:



**Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa - UFES**



**Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez - UVV**



**Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - UVV**

**(Orientador)**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida, por me guiar em cada escolha e por abençoar toda esta trajetória;

Aos meus pais, Tadeu e Angela, e minha irmã, Ramony, que sempre acreditaram em mim e me deram suporte para a realização desse sonho. Ao meu namorado, Édipo, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência pelo qual ao curso me dediquei. À toda minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso profissional;

Ao Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, pela oportunidade e privilégio de ser sua aluna. Muito obrigada, professor! Pela orientação neste trabalho, pelo incentivo, atenção, carinho e dedicação. Obrigada por acreditar em mim e pelos inúmeros ensinamentos dia-a-dia. É uma honra ser sua aluna e orientanda!

À aluna de iniciação científica, Beatriz Peters, por todo carinho, amor e dedicação. Obrigada por abraçar essa causa junto comigo e não me deixar fraquejar nos momentos difíceis; por me ajudar e acompanhar na realização dos experimentos. Obrigada pela preocupação, jovem!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro pelas sugestões e apoio nos momentos em que a procurei. Obrigada pela disponibilidade e atenção!

Ao Prof. Dr. Márcio Fronza, pelos ensinamentos;

Aos professores Marcella Porto (IFES) e Breno Valentim (UFES), por toda ajuda e contribuição;

Aos alunos e IC's do Lab 33 e do Lab 31 pelo companheirismo e amizade;

Aos alunos e colegas de outros laboratórios, Ananda, Jean e Fran pelos momentos compartilhados, incentivo e conselhos dados;

Às agências de fomento, FAPES e CNPq;

À UVV e todos os professores e funcionários do PPGCF e Biopráticas;

Enfim, a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 ANIMAIS .....	12
2.2 GRUPOS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	12
2.3 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL .....	13
2.4 TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL A GLICOSE .....	14
2.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	14
2.6 PREPARO “EN FACE” .....	15
2.7 DEPOSIÇÃO LIPÍDICA VASCULAR.....	15
2.8 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE.....	16
2.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE EROS.....	18
2.10 PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA .....	19
2.11 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO.....	19
2.12 ENSAIO COMETA ALCALINO .....	20
2.12.1 Preparo das Lâminas .....	20
2.12.2 Lise, Desenvolvimento e Eletroforese.....	20
2.12.3 Análise Citológica .....	21
2.13 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	23
2.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	23
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Parâmetros biométricos, ingestão de ração, líquido e calórica.....	24
3.2 Perfil lipídico e análise “En face” .....	24

3.3	<i>Outros parâmetros bioquímicos séricos</i> .....	25
3.4	<i>Parâmetros hemodinâmicos</i> .....	26
3.5	<i>Biomarcadores do estresse oxidativo em células sanguíneas</i> .....	27
3.6	<i>Viabilidade e apoptose em células sanguíneas</i> .....	28
3.7	<i>Oxidação proteica e análises histológicas do fígado e estômago</i> .....	29
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Pletismógrafo de cauda** (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, KENT Scientific CO., Connecticut, USA). **14**
- Figura 2. Etapas para análise de deposição lipídica vascular.** (A) Aorta com tecido adventício perivascular removido, (B) aorta aberta, (C) aorta pregada em EVA com pinos de aço, (D) aorta após coloração com *Oil-Red* 0,3% e (E) interface do programa *Image J*. **16**
- Figura 3. Etapas do Ensaio Cometa Alcalino.** (A) Preparo da segunda camada de agarose, (B) Lise, (C) Lavagens, (D) Desenovelamento, (E) Eletroforese, (F) Neutralização e fixação e (G) detalhe da interface do programa CASP com o cometa selecionado e a análise do seu perfil. **22**
- Figura 4. Variação na ingestão de nutrientes e peso corporal em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> após dieta com refrigerantes guaraná (normal e zero) por 8 semanas consecutivas.** A) Os camundongos do grupo guaraná (G) consumiram diariamente menos alimento do que o grupo controle (C) ou guaraná zero (GZ) durante as 8 semanas (\*p<0,05). B) Por outro lado, o grupo G apresentou polidipsia em comparação com os grupos C (\*p<0,05) e GZ (#p<0,05). C) Não houve diferença na ingestão calórica entre os grupos. (D) Durante este período, não foram observadas alterações transitórias de peso em resposta a ingestão de guaraná (ANOVA duas vias com medidas repetidas). **24**
- Figura 5. Perfil de lipoproteínas plasmáticas nos três grupos experimentais de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> mostrando que somente o grupo G aumenta o nHDL-C (~30%) e deposição lipídica vascular (~60%) em comparação com os grupos C e GZ.** A) Gráfico de barras mostrando o perfil lipídico entre os grupos. B) Imagens representativas do “*En face*” da aorta corada com *Oil-Red* e respectiva densitometria (parte superior). Abaixo, **25**

gráfico de barras representando as áreas de deposição lipídica vascular. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para n= 9-12 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

**Figura 6. Variação nos parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial sistólica, diastólica e média) entre os três grupos experimentais de camundongos LDLr<sup>-/-</sup> mostrando que ambos os guaranás (normal e zero) durante as 8 semanas consecutivas de dieta apresentaram aumento na pressão arterial absoluta.** Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM para n = 3-5 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C (ANOVA uma via) (final - inicial). 27

**Figura 7. A superprodução de EROs e o estresse oxidativo estão envolvidos na ingestão de guaraná.** A) A produção de EROs no sangue foi avaliada por DHE, DCF e HPF através da citometria de fluxo. B) Quantificação de homocisteína e C) oxidação proteica (AOPP) no plasma dos três grupos. D) Detecção do dano ao DNA no sangue pelo Ensaio Cometa Alcalino. Painel superior: cometas típicos apresentando maior fragmentação do DNA no grupo G em comparação com os grupos C e GZ, quantificado e representado no painel do meio. No painel inferior, gráfico de barras representando o momento de cauda (~2 vezes maior no grupo G). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para n= 6-7 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). 28

**Figura 8. Guaraná aumenta a apoptose e compromete a viabilidade em células do sangue.** A) *Dot plots* representando o índice de apoptose no grupo C, G e GZ (n= 5). B) A apoptose e (B) viabilidade celular foram determinadas usando iodeto de propídio (PI) e Anexina V – FITC. Os quadrantes Q2-Q4 representam as células que estão em apoptose. Observa-se diminuição notável do número de células apoptóticas (Q2+Q4) no grupo GZ. Os valores 29

são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

**Figura 9. A ingestão crônica de guaraná aumenta o dano no fígado e no estômago.** A) A ingestão crônica de guaraná aumenta os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) e B) deposição lipídica no fígado, ilustrada através das imagens típicas no painel superior. C) Da mesma forma, o guaraná aumenta a formação de AOPP no estômago. D) Somente o grupo guaraná desenvolveu atrofia e degeneração nas células gástricas. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 4-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey). **30**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos proteicos de oxidação avançada
ASC	Área sob a curva
AST	Aspartato aminotransferase
BAA	Bebidas adoçadas com açúcar
C	Grupo tratado com água potável
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CT	Colesterol total
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'- diacetato de diclorofluoresceína
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihidroetideo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamina tetra acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
EVA	Etil Vinil Acetato
FS	Fosfatidilserina
G	Grupo tratado com Guaraná
GGT	Glutamil transpeptidase
GZ	Grupo tratado com Guaraná Zero
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	High-density lipoprotein
HE	Hematoxilina-eosina
HPF	Hidroxifenilfluoresceína
KI	Iodeto de potássio
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDL <sup>r-/-</sup>	<i>Knockout</i> para receptor LDL
LMA	<i>Low Melting Point Agarose</i>

MDA	Malondialdeído
nHDL-C	Colesterol não-HDL
NMA	<i>Normal Melting Point Agarose</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Proteína C Reativa
PI	Iodeto de propídio
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TTOG	Teste de Tolerância Oral a Glicose
UVV	Universidade Vila Velha
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
•OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila

## RESUMO

CHISTÉ, LAYLA APARECIDA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2017. **Exposição crônica ao refrigerante à base de Guaraná prejudica sistemas cardiovascular, gástrico e hepático em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>: papel do estresse oxidativo** Orientador: Thiago de Melo Costa Pereira.

O consumo excessivo de refrigerantes tornou-se um grave problema de saúde pública, uma vez que sua ingestão tem sido associada com o aumento de Doenças Crônicas como a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares principalmente as quais se manifestam em maior magnitude após 40 anos de idade (idade adulta média). Na tentativa de minimizar os riscos à saúde referente ao consumo de bebidas hiperglicídicas, surge no mercado opções de refrigerantes adoçados artificialmente. No entanto, seus benefícios não estão claramente elucidados. Nesse contexto, o objetivo deste estudo, foi investigar em camundongos dislipidêmicos possíveis impactos morfofuncionais e bioquímicos associados ao consumo de refrigerantes a base de guaraná (“normal e zero”). Para tanto, foram utilizados camundongos LDLr<sup>-/-</sup> fêmeas idosas, divididos em três grupos experimentais (C: controle; G: Guaraná Antártica<sup>®</sup> e GZ: Guaraná Antártica Zero<sup>®</sup>), sob livre acesso às respectivas bebidas durante oito semanas. Durante o período experimental foi realizado a medida da pressão arterial por pletismografia de cauda, teste de tolerância oral a glicose (TTOG) e a urina coletada para dosagem de biomarcadores renais (Gama-GT e creatinina). O sangue foi coletado para análises bioquímicas, viabilidade celular e estresse oxidativo (AOPP, EROs e Ensaio Cometa Alcalino); fígado e estômago para análises histológicas, avaliação da oxidação proteica (AOPP), peroxidação lipídica (TBARS), e a extração da aorta total foi realizada para quantificação de deposição lipídica vascular pelo método “*En face*”. Verificou-se que consumo crônico de refrigerantes clássicos de guaraná (mas não o guaraná zero), promoveu acúmulo de deposição lipídica vascular (~60%, p<0,05), associado ao aumento da hipercolesterolemia, pressão arterial, estresse oxidativo, fragmentação do DNA e apoptose em células sanguíneas além de maior dano hepático e gástrico. O guaraná zero foi capaz de evitar a maioria dos danos descritos, exceto nos parâmetros hemodinâmicos e renais. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a administração crônica de guaraná é capaz de prejudicar os sistemas cardiovascular, gástrico e hepático em camundongos, pelo menos em parte pela influência dos carboidratos no aumento do estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** aterosclerose, apoptose, espécies reativas do oxigênio, guaraná zero, acessulfame K, aspartame.

## ABSTRACT

CHISTÉ, LAYLA APARECIDA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, September, 2017. **Chronic exposure to Guarana soft drinks impairs cardiovascular, gastric and hepatic systems in LDLr<sup>-/-</sup> mice: role of oxidative stress.** Advisor: Thiago de Melo Costa Pereira.

Excessive consumption of soft drinks has become a serious public health problem, since its intake has been associated with an increase in chronic diseases such as obesity, diabetes and cardiovascular disorders, which are manifested in greater magnitude after 40 years of age (average adult age). In an attempt to minimize the health risks related to the consumption of hyperglycemic beverages, artificially sweetened soft drink options appear on the market. However, its benefits are not clearly elucidated. In this context, the objective of this study was to investigate in dyslipidemic mice possible morphofunctional and biochemical impacts associated with the consumption of guaraná ("normal and zero") soft drinks. Then, we used old female LDLr<sup>-/-</sup> mice, divided into three experimental groups (C: control, G: guarana Antártica<sup>®</sup> and GZ: guarana Antartica Zero<sup>®</sup>) *ad libitum* respectively, for eight weeks. During the experimental period, measurements of blood pressure by tail plethysmography, oral glucose tolerance test (TTOG) and urine collected for the determination of renal biomarkers (Gama-GT and creatinine) were performed. Blood was collected for biochemical analyzes, cell viability and oxidative stress (AOPP, ROS and Alkaline Comet Test); liver and stomach for histological analysis, protein oxidation evaluation (AOPP), lipid peroxidation (TBARS), and extraction of the total aorta was performed for quantification of vascular lipid deposition through "en face" method. Chronic consumption of classic guarana soft drinks (but not guarana zero) increased vascular lipid deposition (~60%, p<0,05), associated with hypercholesterolemia, hypertension, oxidative stress, fragmentation of DNA and apoptosis in blood cells associated to increased liver and gastric damage. Interestingly, guarana zero was able to avoid most of the described damages, except in hemodynamic and renal parameters. Taken together, our results demonstrate that chronic administration of guarana is able to impair the cardiovascular, gastric and hepatic systems in mice, at least in part by influence of carbohydrates ingestion on oxidative stress.

**Keywords:** atherosclerosis, apoptosis, reactive oxygen species, guarana zero acesulfame K, aspartame.

# 1. INTRODUÇÃO

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) têm se mostrado ao longo das últimas décadas como um problema de saúde global e uma ameaça à saúde e ao desenvolvimento humano (Schmidt et al., 2011). Dentre os fatores de risco comportamentais para o seu desenvolvimento, podemos citar o uso de tabaco, consumo excessivo de álcool, sedentarismo e dieta inadequada que estão associados a quatro grupos de doenças (doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças pulmonares). Estas representam cerca de 80% das mortes por doenças não transmissíveis (Lozano et al, 2012). Dentre as DCNT, as doenças cardiovasculares (DCV) estão entre as de maior impacto no mundo (MS, 2011, Murray et al., 2012) sendo a principal causa de morbimortalidade e incapacidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2014). No Brasil, as DCNT são responsáveis por cerca de 70% das causas de morte (DATASUS, 2012; Ribeiro et al., 2016).

Apesar dos inúmeros avanços terapêuticos ao longo das últimas décadas, segundo projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa repercussão sobre o padrão de morbimortalidade por DCNT tende a persistir. Entre os principais motivos, podemos citar o “casamento” do aumento da expectativa de vida associado ao contemporâneo estilo de vida da sociedade brasileira (sedentarismo, dietas com baixo consumo de fibras, frutas/verduras, hiperlipídicas e especialmente, ricas em carboidratos), contribuindo para a constatação desses dados epidemiológicos (Schmidt et al., 2011; V Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção Da Aterosclerose, 2013; Ribeiro et al., 2016; Pitanga et al., 2017).

Entre os alimentos ricos em carboidratos disponíveis no mercado, houve um aumento importante no consumo de bebidas adoçadas com açúcar (BAA) no Brasil na última década (Cervieri Júnior et al., 2014). O crescimento acelerado das indústrias de processamento de alimentos associado à expansão dos supermercados permitiu uma diversificação das opções de bebidas no Brasil, especialmente as BAA, categoria esta que inclui os refrigerantes (Monteiro e Cannon, 2012; Reardon et al., 2003; Aguiar, 2009; Kleiman, Ng e Popkin, 2012). Segundo o Euromonitor International (2016), o Brasil está entre os três maiores produtores e consumidores mundiais de refrigerantes, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Quanto a relação per capita de consumo, o Brasil está na 12ª posição do ranking mundial (85 litros/habitante/ano), cujas primeiras posições

estão os países norte-americanos Estados Unidos (170 litros/habitante/ano) e México (146 litros/habitante/ano), seguido de mais um latino-americano: Chile (127 litros/habitante/ano).

Ao longo das últimas décadas, um aumento no consumo de refrigerantes açucarados foi paralelo ao aumento da obesidade no mundo e especialmente no Brasil. Apesar dos dados preliminares de estudos observacionais que apoiam uma associação entre consumo de refrigerantes e ganho de peso, existem fragilidades nestes tipos de estudo (Wolff e Dansinger, 2008; Mantzari et al., 2017). Com isso, faltam dados mais claros quanto à real alteração de peso bem como outros efeitos clínicos esperados como resultado do consumo dessas bebidas (Wolff e Dansinger, 2008; Mantzari et al., 2017). Inclusive, Bes-Rastrollo e colaboradores (2013) demonstraram que as revisões sistemáticas com conflitos de interesse financeiros eram cinco vezes mais propensas a apresentar uma conclusão de associação não positiva entre o consumo de bebidas açucaradas e a obesidade do que aqueles sem conflitos de interesse, alertando assim para possíveis imprecisões em evidências científicas de pesquisas financiadas pela indústria de alimentos.

Em paralelo, na tentativa de minimizar os riscos à saúde referente ao consumo de carboidratos (e ao mesmo tempo não perder mercado) os membros da indústria respondem com lançamento de novos produtos. Neste contexto, as bebidas açucaradas artificialmente, tais como refrigerantes com edulcorantes artificiais emergiram como uma alternativa relevante para manter as vendas e os lucros das indústrias (Borges et al, 2017) se apresentando como uma resposta às necessidades de consumo saudável. Adoçantes artificiais como aspartame e acesulfame K foram introduzidos para satisfazer o desejo do sabor doce sem consumo de energia concomitante. Dados da Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Especiais (ABIAD, 2010) mostram que o mercado de produtos diet/light no Brasil cresceu mais de 800% nos últimos dez anos e continua em constante crescimento, sendo que os refrigerantes adoçados artificialmente apresentaram crescimento extensivo, o que torna necessário estudá-los da mesma forma que os refrigerantes convencionais. Até hoje, o impacto do consumo desses produtos adoçados artificialmente a longo prazo também carecem de mais investigações.

Na última década, estudos observacionais têm indicado que a ingestão de bebidas adoçadas artificialmente esteja relacionada com o aumento do índice de massa corporal em crianças (Brown et al., 2010) e adultos (Imamura et al, 2015;

Miller e Perez, 2014), demência (Pase et al., 2017), risco aumentado de doenças cardiometabólicas (Imamura et al, 2015) e acidente vascular cerebral (Narain, 2016; Pase et al., 2017). Entretanto, convém salientar que os achados de estudos observacionais em humanos podem ser tendenciosos e confusos devido aos fatores do estilo de vida e causalidade reversa, já que as pessoas com sobrepeso/obesidade são mais propensas a consumirem bebidas com adoçantes artificiais na tentativa de controlar o peso (De Koning et al., 2011). Por outro lado, existem estudos clínicos randomizados que indicam efeito nulo sobre o controle de peso com esse tipo de bebida (Njike et al, 2011; Maersk et al, 2012; Kanders et al., 1988; Ebbeling et al., 2012), tornando-se necessário o desenvolvimento de estudos mais controlados sobre esse assunto.

Em animais experimentais, Otero-Losada e colaboradores (2013), observaram que camundongos ApoE<sup>-/-</sup> foram sensíveis a ingestão de Coca-cola Light®, com aumento de aspartato amino transferase (AST), ureia e creatinina o que sugere interferência funcional em um ou mais órgãos (fígado, rim, músculo), além de aumento irreversível na área da formação de placa aterosclerótica e aumento da estenose aórtica. Entretanto, tais dados não podem ser extrapolados para quaisquer tipos de refrigerantes, como por exemplo o do tipo “guaraná”, consumido tipicamente em nosso país.

Os modelos animais têm sido amplamente utilizados para o estudo de doenças cardiovasculares (Chen et al; Tse et al., 2016). Quando comparados com os estudos em humanos, estes modelos apresentam vantagens de serem mais fáceis de gerenciar, com dieta e fatores de risco ambientais controláveis (Lee et al., 2017). Em especial, camundongos *knockout* para os receptores de LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) tem sido um modelo útil para avaliar a relação existente entre diabetes e aterosclerose (Merat et al. 1999), já que os camundongos selvagens (não-modificados geneticamente) são resistentes as disfunções cardiometabólicas. Sabe-se que a deficiência de receptores LDL (LDLr) prejudica a captação e depuração de lipoproteínas, resultando em um acúmulo da lipoproteína LDL (Ishibashi et al, 1993), além de torna-lo suscetível à obesidade e à resistência insulínica (Lee et al., 2017), se mostrando dessa forma, um modelo experimental adequado para o estudo dos efeitos dos refrigerantes.

Embora algumas evidências tenham demonstrado relação entre o consumo de bebidas adoçadas com açúcar e adoçadas artificialmente com doenças cardio-metabólicas, os riscos e benefícios ainda não foram completamente

esclarecidos. Além disso, ainda existe uma lacuna na literatura a respeito do consumo a longo-prazo de refrigerantes a base de guaraná (“normal e zero”- amplamente consumidos no Brasil) justificando esse desenho experimental. Portanto, o objetivo deste estudo, foi investigar em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> fêmeas possíveis impactos morfofuncionais e bioquímicos associado ao consumo de refrigerantes a base de guaraná (“normal e zero”).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos LDLr *knockout* (homozigoto com deficiência para receptores de lipoproteínas de baixa densidade, LDLr<sup>-/-</sup>) fêmeas, peso inicial médio de 23,85g (~16 meses de idade), provenientes do Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas da Universidade Vila Velha – UVV. Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas com maravalhas, à temperatura de 22 ± 2°C e umidade (60 ± 10%), com ciclos claro/escuro de 12 horas, controlados automaticamente e em ambiente com exaustão de ar. Os camundongos foram alimentados com ração comercial padrão para roedores (Nutri Laboratório Roedores - Nutriave) *ad libitum* e livre acesso a água potável até o início do tratamento. Os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA-UVV, protocolo nº 375-2016).

### 2.2 Grupos e Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais em conformidade com o livre acesso a uma das seguintes bebidas: água potável (C), Guaraná (G) (bebida gaseificada adoçada, Guaraná Antártica®) e Guaraná Zero (GZ) (bebida gaseificada de baixa caloria adoçada com aspartame e acessulfame K, Guaraná Antártica Zero®). Os refrigerantes tiveram o teor de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) removido por meio de agitação vigorosa em agitador magnético antes de serem ofertados aos animais, à temperatura ambiente. O tratamento se deu por 8 semanas, sendo que o grupo C (n=12) recebeu água potável e ração padrão, o grupo G (n=12) recebeu guaraná e ração padrão e o grupo GZ (n=12) recebeu guaraná zero e ração padrão, todos de livre acesso. O peso corporal dos animais e a ingestão individual de ração e de líquido foram medidos semanalmente, por meio da diferença entre o peso da ração e volume de líquido oferecido, menos o peso/volume das sobras, divididos pelo número de animais em cada gaiola. O consumo calórico médio foi determinado seguindo os parâmetros nutricionais clássicos: carboidratos (4 kcal/g), proteína (4 kcal/g) e gordura (9 kcal/g) proporcionalmente à ingestão alimentar.

Ao final do período de tratamento os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil, 100mg/Kg). A coleta de sangue se fez por punção cardíaca no ventrículo direito para

dosagens bioquímicas, AOPP, citometria de fluxo e Ensaio Cometa Alcalino. A remoção do fígado e estômago foi realizada para análises histológicas e dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo (AOPP e TBARS) e a remoção da aorta total se fez para a quantificação de deposição lipídica vascular.

### **2.3 Medida indireta da pressão arterial**

A aferição da pressão arterial sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca foi realizada duas vezes durante o período experimental: antes do início do tratamento e ao final das 8 semanas de tratamento. A avaliação foi realizada através de medida indireta por pletismografia de cauda (*CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, KENT Scientific CO., Connecticut, USA*), em todos os grupos. Os animais permaneciam acordados, em repouso, em ambiente livre de ruído e mantidos sob restrição de movimentos em uma câmara cilíndrica de acrílico colocada sobre uma manta de aquecimento para que as medidas fossem realizadas (Fernandes et al., 2012). A temperatura do animal foi mantida entre 29 a 32°C.

O pletismógrafo de cauda consiste em um manguito de borracha (cuff) que é adaptado à região proximal da cauda do animal e fica conectado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300mmHg. Na região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de pressão arterial na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de dados.

Foram obtidas 35 medidas para cada animal, sendo que as 5 primeiras medidas eram descartadas. Para evitar erros de medida e análise, os camundongos foram previamente submetidos à ambientação com a técnica de medida e aclimatação de 15 minutos antes de iniciar as medidas. A adaptação dos animais ao pletismógrafo foi realizada por dois dias consecutivos. Foram utilizadas no mínimo 10 medidas para o cálculo da média dos parâmetros hemodinâmicos.



**Figura 1.** Pletismógrafo de cauda (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, KENT Scientific CO., Connecticut, USA). Fotos da própria autora.

#### **2.4 Teste de Tolerância Oral a Glicose**

O Teste de Tolerância Oral a Glicose (TTOG) foi usado para estimar a resistência insulínica e foi realizado conforme descrito anteriormente por Ayala et al., (2010). No último dia de dieta, os animais foram deixados em jejum, por 6 horas. Em seguida, receberam solução de D-glicose, 2g/kg de peso corporal, por gavagem e a glicemia foi verificada em intervalos regulares (0, 20, 40, 60 e 120 minutos) com auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek Active) através da extração do sangue da cauda. Para tal, os animais foram colocados em um dispositivo de retenção e a porção final da cauda do animal foi coberta com creme de lidocaína (4%). Após alguns minutos, o anestésico foi removido com solução de etanol (70%) e os últimos 1mm da ponta da cauda foram removidos usando tesoura cirúrgica esterilizada. Então, a cauda foi massageada suavemente para garantir um fluxo sanguíneo adequado. A resposta da glicose *versus* tempo foi avaliada através área sob a curva (ASC) usando o *software* Prisma (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

#### **2.5 Análises bioquímicas**

O sangue coletado por meio de punção cardíaca foi imediatamente transferido para tubos de poliestireno contendo 30ul de EDTA 0,33mol/L e homogeneizados por inversão vagarosa. Posteriormente foi centrifugado por 10 minutos a 4000rpm e o plasma coletado e armazenado a -80 °C até a análise. As concentrações séricas de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL),

triglicerídeos (TG), glicose, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), ureia, creatinina, proteína C reativa (PCR), ácido úrico e homocisteína foram mensuradas em parceria com o laboratório de Análises Clínicas “Tommasi” (AU 400 ou 680, Olympus/Beckman Coulter, Munique, Alemanha). Os níveis de colesterol não-HDL (nHDL-C) foram calculados subtraindo HDL do colesterol sérico total.

Para a determinação da enzimúria, como descrito por Fang et al., (2008), amostras de urina foram coletadas antes da eutanásia para dosagem de glutamyl transpeptidase (GGT) e creatinina. As amostras foram mantidas a -80°C até a análise. Todas as medidas foram realizadas por métodos laboratoriais padronizados utilizando o mesmo analisador bioquímico automático.

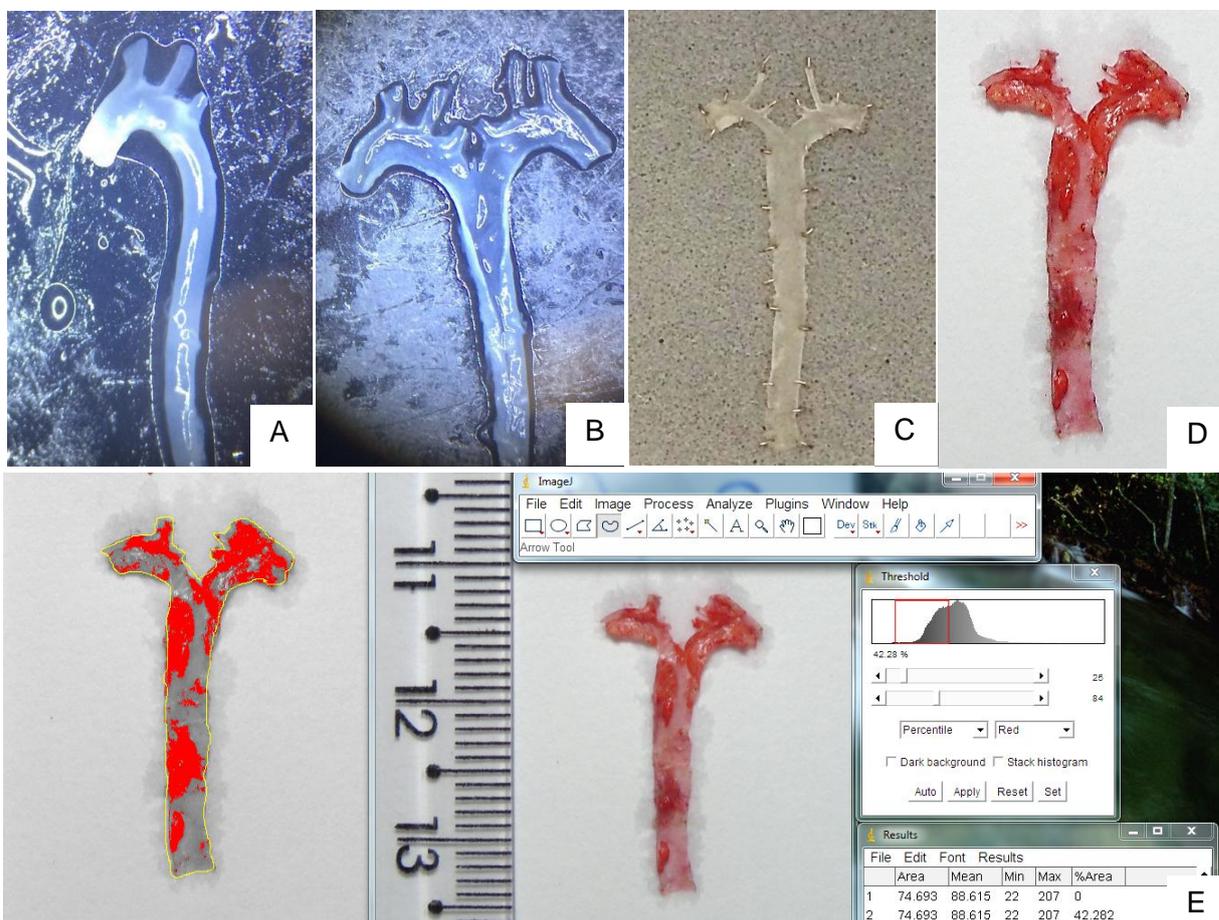
## **2.6 Preparo “En face”**

A análise quantitativa das lesões ateroscleróticas nas aortas foi realizada através da mensuração do percentual de deposição lipídica segundo o método “*En face*”. Para tal, a aorta foi dissecada desde o ponto inicial da aorta ascendente até a bifurcação ileal e armazenada em solução de PBS + formol 4%. A completa remoção do tecido adventício perivascular foi realizada cuidadosamente no dia seguinte. Posteriormente, o corte inicial foi realizado através da curvatura aórtica menor e estendido até a bifurcação ilíaca. O segundo corte foi feito de forma simétrica ao longo da curvatura maior até o nível da artéria subclávia. Tomou-se cuidado para não deslocar lesões ateroscleróticas da superfície intimal. A padronização da dissecação é de extrema importância para manter intactas as regiões com lesão, conforme descrito previamente por Paigen et al. (1987) e pormenorizado por Daugherty e Rateri (2006). Após o corte, as aortas foram fixadas em Etil Vinil Acetato (EVA) com auxílio de pequenos pinos de aço com o intuito de manter o tecido na sua posição plana e horizontal para posterior coloração.

## **2.7 Deposição lipídica vascular**

As aortas previamente preparadas pelo método “*En face*” foram submetidas à coloração com *Oil-Red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) que cora lipídeos neutros permitindo a visualização dos acúmulos (coloração vermelha). As amostras foram submersas em uma solução alcoólica de *Oil-Red* a 0,3% (300mg de *Oil-Red* em 100ml de isopropanol) por dez minutos e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da

deposição lipídica foi avaliada através da extensão e da intensidade da coloração vermelha, sendo que as imagens foram obtidas usando uma câmera digital de alta resolução e posteriormente digitalizadas para análise morfológica pelo software “Image J” (Image-J 1.35 d, USA), de domínio público. Para tanto, esta análise foi realizada por pesquisador cego para os grupos experimentais.



**Figura 2. Etapas para análise de deposição lipídica vascular.** (A) Aorta com tecido adventício perivascular removido, (B) aorta aberta, (C) aorta pregada em EVA com pinos de aço, (D) aorta após coloração com *Oil-Red* 0,3% e (E) interface do programa *Image J*. Fotos da própria autora.

## 2.8 Determinação da viabilidade e apoptose

A determinação da viabilidade e apoptose em células sanguíneas após lise de hemácias foi realizada através da marcação com o reagente Annexin V-FITC *Apoptosis Detection Kit* (BP Pharmingem, San Diego, CA, USA), que é composto pela proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante intracitoplasmático iodeto de propídio (PI, *Propidium Iodide*), seguida de análise em citômetro de fluxo.

Esse ensaio baseia-se na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina (FS). Esses resíduos são predominantemente

observados na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol, quando a célula é viável. No entanto, ao iniciar o processo de morte celular programada (apoptose), esses resíduos são translocados para a face externa da membrana, o que permite a sua ligação com a anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é utilizado para distinguir células viáveis de não viáveis, pois células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis (Campagnaro et al., 2013). Além disso, a exposição simultânea à anexina V e ao PI permite determinar a proporção de células vivas (anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose, na qual ocorre apenas a exposição do FS na face externa na membrana plasmática com consequente marcação com anexina V (anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou necrose, na qual além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI, fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V+/PI+); e células danificadas, em necrose (anexina V-/PI+).

Para tal protocolo, foram retiradas alíquotas de 200µl de células sanguíneas e estas, centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. Em seguida, ressuspensas em 400µl de tampão *Binding Buffer* 10% (10 mmol HEPES, NaOH, pH 7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl<sub>2</sub>) na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/ml. A seguir, 100µl desta solução (1x10<sup>5</sup> células) foram transferidas para um novo tubo, onde receberam 2µl de anexina V-FITC e 2µl de PI. As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Para controle positivo foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente às marcações, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200rpm e por fim, 400µl de PBS com 10% soro fetal bovino (SFB) foram adicionados a cada tubo e as amostras avaliadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA). Os dados foram analisados com auxílio do software FACSDiva (BD) e os histogramas de sobreposição foram analisados por meio do FCS Express software trial pela determinação da porcentagem de células encontradas em cada quadrante do gráfico *dot plot*, sendo, Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Apoptose (positiva para anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para anexina e PI); Q4: apoptose inicial (Positiva para anexina e negativa para PI). Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4 (Tonini et al., 2013).

## **2.9 Determinação dos níveis citoplasmáticos de EROs**

As espécies reativas de oxigênio (EROs), ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxinitrito/hidroxila ( $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ ) foram medidas por citometria de fluxo nas amostras de sangue após lise de hemácias através da mediana de intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetídeo (DHE), 2',7' - diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e hidroxifenilfluoresceína (HPF), respectivamente.

Os níveis de  $\bullet\text{O}_2^-$  foram medidos através da fluorescência emitida pelo etídeo, um produto da oxidação do dihidroetídio ou hidroetidina. O DHE, que é a forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o  $\bullet\text{O}_2^-$  formando etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420 nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando à amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm). A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi estimada por meio da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é um produto da oxidação do 2',7' - diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) um éster, não fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. No interior da célula sofre ação das esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que por sua vez pode ser oxidado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando um composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que pelo fato de ser uma molécula apolar fica aprisionado no interior da célula (Campagnaro et al., 2013; Tonini et al., 2013).

As células sanguíneas foram ressuspendidas em 1mL de PBS na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. As amostras foram incubadas, no escuro, com 20ul de solução de DCF-DA ( $10\mu\text{M}$ ) e 20ul de DHE ( $160\mu\text{M}$ ), por 30 minutos à  $37^\circ\text{C}$ . Para a determinação das espécies altamente reativas ( $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ ) as amostras foram incubados com o corante HPF  $5\mu\text{M}$ . Para o controle positivo, foi utilizado  $\text{H}_2\text{O}_2$   $50\mu\text{M}$  por 5 minutos e para controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em PBS. Após a marcação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas com PBS e mantidas ao abrigo da luz até a aquisição dos dados no citômetro.

A aquisição dos dados foi realizada com citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585/42nm para DHE e 530/30 nm para DCF e HPF.

### **2.10 Produtos Proteicos de Oxidação Avançada**

O marcador de estresse oxidativo denominado Produto Proteico de Oxidação Avançada (AOPP) foi determinado de acordo com Witko-Sarsat et al. (1996) e Coutinho et al. (2017). O AOPP é gerado por meio da ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos, pela ação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas. Para a determinação dos níveis dos produtos de oxidação proteica foi necessário inicialmente a preparação das amostras (fígado e estômago). Aproximadamente 200mg do órgão foi homogeneizado juntamente com 1mL de PBS *Phosphate Buffered Saline* – PBS 0,1M – pH 7,4) em homogeneizador tipo “turrax” e posteriormente centrifugados a 4°C, a 3500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi diluído 1:30 (fígado) e 1:10 (estômago) em PBS. O plasma foi apenas diluído 1:10 em PBS sem necessidade de preparo prévio. 40µL das amostras foram acrescentados a 160µL de PBS, 10µL de iodeto de potássio (KI) e 20µL de ácido acético glacial em uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 340nm, em um leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) após agitação por seis minutos, contra o branco contendo 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100µM realizadas com equivalentes de cloramina T. Os resultados foram expressos em µM de cloramina T/mg proteína. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

### **2.11 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico**

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações que ocorrem rapidamente e podem ser mensuradas através de seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malondialdeído (MDA) é o principal produto e é formado pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados. A mensuração de metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada para determinar o nível de peroxidação lipídica no fígado e estômago dos animais. Resumidamente, adicionou-se 50µL de amostra de fígado e estômago (diluída 1:10 e 1:4, respectivamente) em 200µL de TBA a 1%. Assim, os tubos foram levados em banho-maria, a 100°C, durante 1 h e 30 min (sob agitação frequente) até a obtenção de uma coloração rosa persistente e resfriados à temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 200µL em poços de

microplacas e lidos a 532nm em leitor de microplaca (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Para o cálculo da concentração de MDA nas amostras foi utilizada a seguinte fórmula: Concentração de MDA (nmol) = [Absorbância a 532nm/ (coeficiente de extinção molar do MDA x caminho óptico)] x diluição. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de proteína total, utilizando o método de Bradford como citado acima.

## **2.12 Ensaio Cometa Alcalino**

O Ensaio do Cometa Alcalino é uma técnica bem validada para avaliar o dano do DNA em células individuais (Rodrigues et al., 2013). Ostling e Johanson desenvolveram a técnica em 1984 usando um pH neutro que limitava seus experimentos (Ostling e Johanson, 1984). Porém Singh em 1988 aprimorou a técnica utilizando o pH básico (pH >13) que aumenta a velocidade de migração do DNA (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). O ensaio cometa foi realizado em amostras de sangue coletadas por punção cardíaca e armazenadas à 4°C ao abrigo da luz.

### **2.12.1 Preparo das lâminas**

Foram utilizadas lâminas de vidro com extremidade fosca que receberam, previamente, um filme de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose* - NMA) 1,5% a 65°C, secaram a temperatura ambiente por 24 horas e foram armazenadas à 4°C. O preparo das lâminas com o material biológico foi realizado com aproximadamente  $2 \times 10^4$  células que foram misturadas a 110µl de agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose* - LMA) a 1% dissolvida em PBS e mantida a 37°C em banho-maria. O material contendo agarose de baixo ponto de fusão (LMA) e a suspensão celular foi espalhada sobre as lâminas previamente gelatinizadas. As lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas à 4°C por cerca de 30 minutos até a polimerização da agarose.

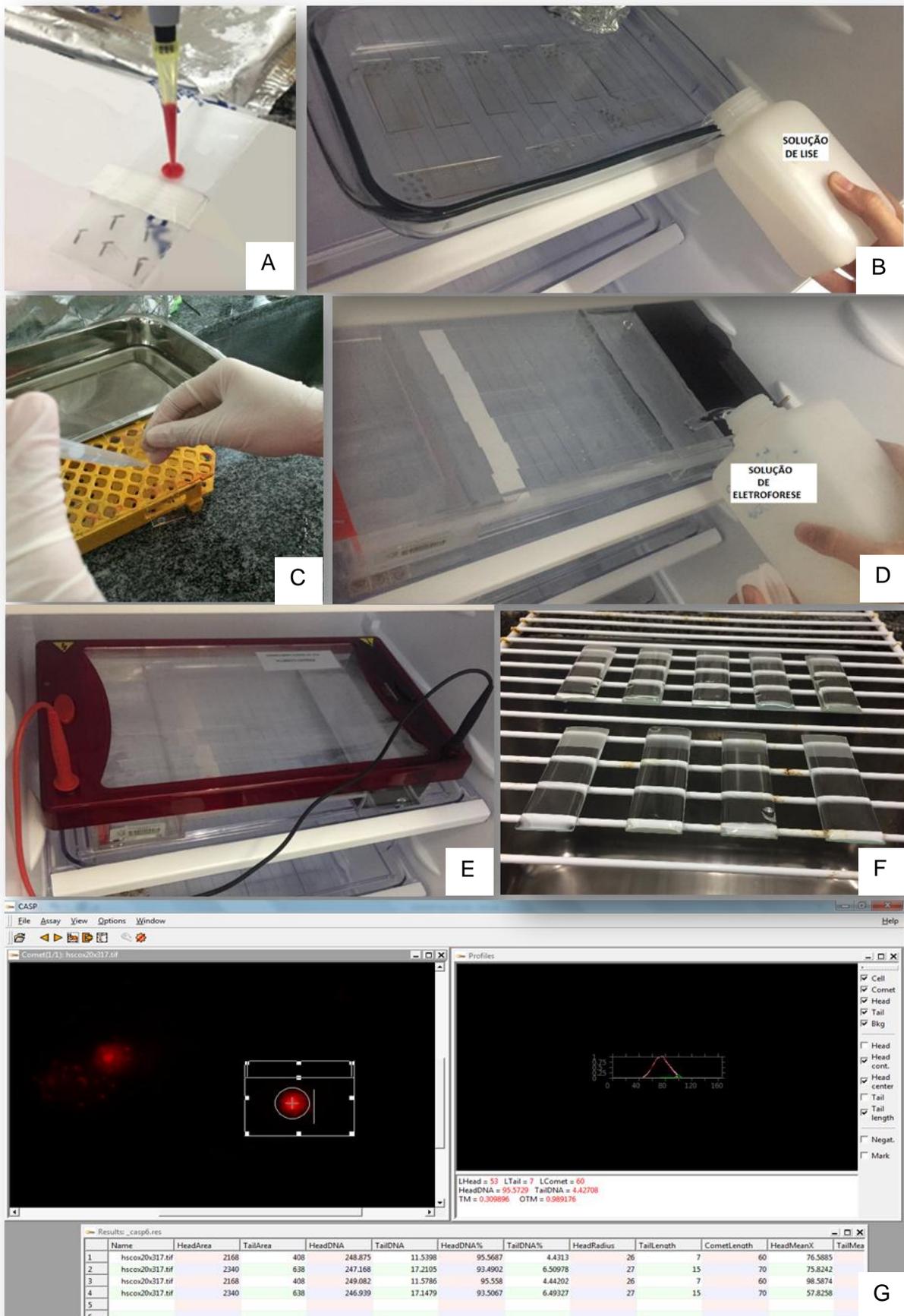
### **2.12.2 Lise, desenovelamento e eletroforese**

Seguinte a gelatinização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas submersas em solução de lise contendo 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, gelada e recém preparada. A lise se deu por 1 hora, à temperatura de 4°C e protegida da luz, com a finalidade de rompimento das membranas celulares. Com objetivo de inibir as enzimas reparadoras do DNA,

as lâminas foram lavadas com água gelada e posteriormente com PBS e levadas para a cuba eletroforética (Biorad), embebidas com tampão de eletroforese alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13), gelado (4°C), onde permaneceram em repouso, na ausência de luz, por 40 minutos para a desnaturação das proteínas histonas, o que permitiu o desenovelamento do DNA. A eletroforese foi realizada à 4°C por 20 minutos, à 32V (1V/cm) e 300mA. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (TRIS-HCl 0,4M), lavadas em três ciclos de 5 minutos cada, secadas ao ar e fixadas em álcool metílico 100% por 2 minutos.

### *2.12.3 Análise citológica*

As lâminas foram coradas no momento da análise com 40µL de brometo de etídio (20µg/ml,) e cobertas com lamínulas. As células foram analisadas no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TI, Melville, NY, USA) em objetiva de 20X, com filtro de excitação de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. As imagens foram adquiridas usando uma câmera CCD (Nikon) e foram analisadas com o programa CASP 98 (domínio público). Entre vários parâmetros fornecidos pelo programa CASP, utilizamos a porcentagem de DNA na cauda e o momento da cauda para análise do dano do DNA. Finalmente, foram analisadas as imagens de 50 células selecionadas aleatoriamente de cada amostra obtida a partir de lâminas duplicadas para cada animal. Durante a análise da imagem, foram excluídos cometas sem cabeças claramente identificáveis, mostrando sobreposição ou contendo artefatos, como parâmetro de controle de qualidade.



**Figura 3. Etapas do Ensaio Cometa Alcalino.** (A) Preparo da segunda camada de agarose, (B) Lise, (C) Lavagens, (D) Desenovelamento, (E) Eletroforese, (F) Neutralização e fixação e (G) detalhe da interface do programa CASP com o cometa selecionado e a análise do seu perfil. Fotos da própria autora.

### **2.13 Análises histológicas**

Para avaliar o acúmulo de lipídeos neutros no fígado e a arquitetura do tecido gástrico foram confeccionadas lâminas histológicas. Os órgãos foram removidos e fixados em solução tamponada de formaldeído a 4% durante 48 horas, depois seccionados em cortes com espessuras de 8µM a -25°C (Jung CM 1860; Leica, Wetzlar, Alemanha). As secções foram montadas, revestidas com gelatina e coradas. As lâminas contendo tecido hepático foram coradas com *Oil-Red* (Sigma, Estados Unidos) que cora em vermelho o acúmulo de lipídeos neutros e as lâminas do tecido gástrico com hematoxilina-eosina (HE) que cora em azularroxeadas as estruturas basófilas e em roseo-avermelhado as estruturas acidófilas. As imagens das secções coradas foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA) usando objetiva de 40X, e câmera digital (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Germany), acoplada a um sistema computadorizado, o *software Image J* (domínio público – *National Institute of Health, USA*). Para a análise de deposição lipídica, foram utilizados aleatoriamente 10 campos diferentes por animal para calcular a percentagem média de área corada. O examinador foi cego para os grupos experimentais.

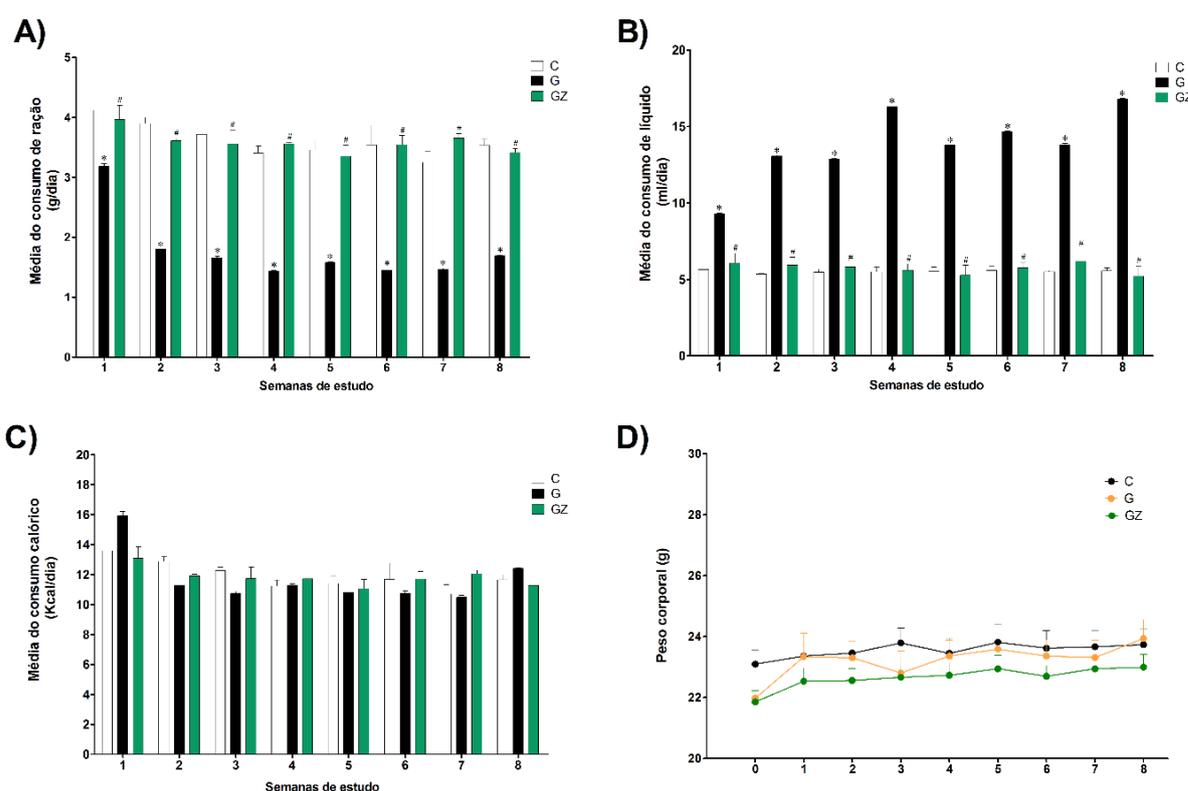
### **3.14 Análises estatísticas**

Os resultados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey, usando o *software* Prisma (Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Parâmetros biométricos, ingestão de ração, líquido e calórica

A Figura 4 resume os parâmetros gerais de consumo de ração e líquido, consumo calórico e peso corporal, durante as 8 semanas de dieta. O grupo guaraná (G) exibiu hipofagia (~ 50%,  $p < 0,05$ , Figura 4A) e polidipsia (~ 2,5 vezes,  $p < 0,05$ , Figura 4B) quando comparado aos grupos C e GZ, sem modificação no consumo calórico e peso corporal.

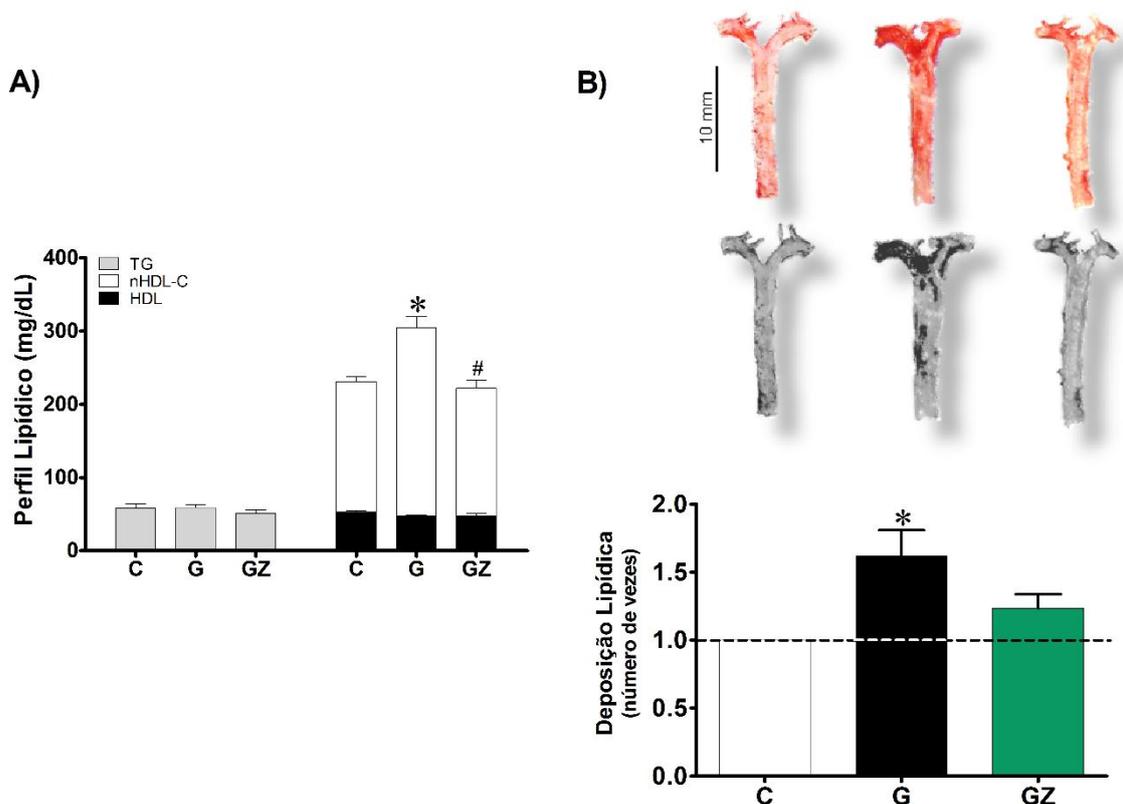


**Figura 4. Variação na ingestão de nutrientes e peso corporal em camundongos  $LDLr^{-/-}$  após dieta com refrigerantes guaraná (normal e zero) por 8 semanas consecutivas.** A) Os camundongos do grupo guaraná (G) consumiram diariamente menos alimento do que o grupo controle (C) ou guaraná zero (GZ) durante as 8 semanas ( $*p < 0,05$ ). B) Por outro lado, o grupo G apresentou polidipsia em comparação com os grupos C ( $*p < 0,05$ ) e GZ ( $\#p < 0,05$ ). C) Não houve diferença na ingestão calórica entre os grupos. (D) Durante este período, não foram observadas alterações transitórias de peso em resposta a ingestão de guaraná (ANOVA duas vias com medidas repetidas).

#### 3.2 Perfil lipídico e análise “En face”

A Figura 5 representa o perfil lipídico sérico e a deposição lipídica nas aortas dos três grupos estudados. Entre eles, observamos um aumento do nHDL-C em camundongos do grupo G (~ 50%,  $p < 0,05$ ) em comparação com os grupos C e GZ ( $168 \pm 8$  e  $174 \pm 11$  mg/dL, respectivamente) sem modificação no HDL e triglicerídeos (Figura 5A). Na Figura 5B estão apresentados os resultados típicos das

aortas coradas pelo método “*En face*” mostrando que os camundongos do grupo G aumentaram a deposição lipídica em aproximadamente 60% ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo C ( $3,5 \pm 0,5\%$ ). Por outro lado, nas aortas obtidas a partir de camundongos do grupo GZ, a deposição lipídica foi semelhante às condições do controle ( $4,4 \pm 0,4\%$ ,  $p > 0,05$ ).



**Figura 5. Perfil de lipoproteínas plasmáticas nos três grupos experimentais de camundongos  $LDLr^{-/-}$  mostrando que somente o grupo G aumenta o nHDL-C e deposição lipídica vascular em comparação com os grupos C e GZ.** A) Gráfico de barras mostrando o perfil lipídico entre os grupos. B) Imagens representativas do “*En face*” da aorta corada com *Oil-Red* e respectiva densitometria (parte superior). Abaixo, gráfico de barras representando as áreas de deposição lipídica vascular. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 9-12$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

### 3.3 Outros parâmetros bioquímicos séricos

A Tabela 1 resume os resultados de algumas outras análises bioquímicas relevantes dos três grupos estudados após 8 semanas de dieta. Curiosamente, destacamos que o nível de glicemia casual não foi diferente entre os grupos. Surpreendentemente, os grupos G e GZ mostraram sensibilidade aumentada à insulina (~30%) em comparação com o grupo C ( $p < 0,05$ ). Paralelamente, os biomarcadores renais demonstraram piorar com a suplementação de GZ: a creatinina sérica aumentou (~ 65%,  $p < 0,05$ ) em GZ em comparação com os grupos

C e G. Além disso, a relação GGT/creatinina urinária também foi maior em comparação com os grupos C e G (~ 100 e 65%, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre os biomarcadores inflamatórios (PCR), hepáticos (ALT e AST) e não específicos.

**Tabela 1.** Parâmetros bioquímicos dos três grupos experimentais LDLr<sup>-/-</sup>.

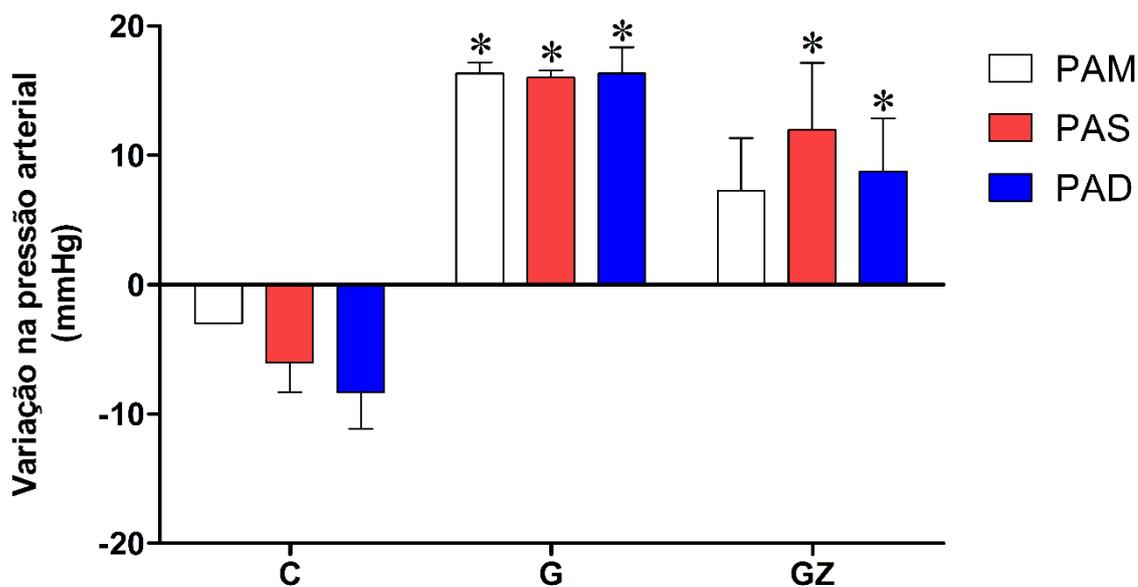
Parâmetros	Grupos			p
	CONTROLE	GUARANÁ	GUARANÁ ZERO	
Glicose (mg/dL)	206 ± 12	211 ± 19	196 ± 20	0,2856
TTOG (ASC <sub>0-120</sub> )	28476 ± 2159	20170 ± 1962*	20830 ± 1552*	0,0154
Ácido úrico (mg/dL)	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,7	0,9577
Uréia (mg/dL)	57 ± 4	57 ± 4	58 ± 4	0,9651
Creatinina sérica (mg/dL)	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,33 ± 0,05**	0,0082
GGT/Creatinina urinária (100U/g)	1,66 ± 0,34	2,00 ± 0,46	3,34 ± 0,46*	0,0323
ALT (U/L)	37 ± 3	41 ± 6	39 ± 8	0,8829
AST (U/L)	168 ± 29	250 ± 52	371 ± 134	0,2626
AST/ALT	3,9 ± 0,5	4,4 ± 0,5	4,5 ± 0,6	0,7576
PCR (mg/L)	0,29 ± 0,03	0,39 ± 0,09	0,31 ± 0,04	0,4656

Legenda: Os valores são expressos como média ± EPM para n = 7 a 12 animais por grupo.

\* $p < 0,05$  vs. grupo C. \*\* $p < 0,05$  vs. grupo G.

### 3.4 Parâmetros hemodinâmicos

A ingestão de bebida de guaraná promoveu aumento na pressão arterial sistólica, diastólica e média (+22, 24 e 19 mmHg, respectivamente,  $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo C. Por outro lado, os camundongos do grupo GZ apresentaram aumento apenas na pressão arterial sistólica e diastólica (18 e 17 mmHg, respectivamente,  $p < 0,05$ ). Em relação à frequência cardíaca, não houve alteração entre os grupos (dados não apresentados).

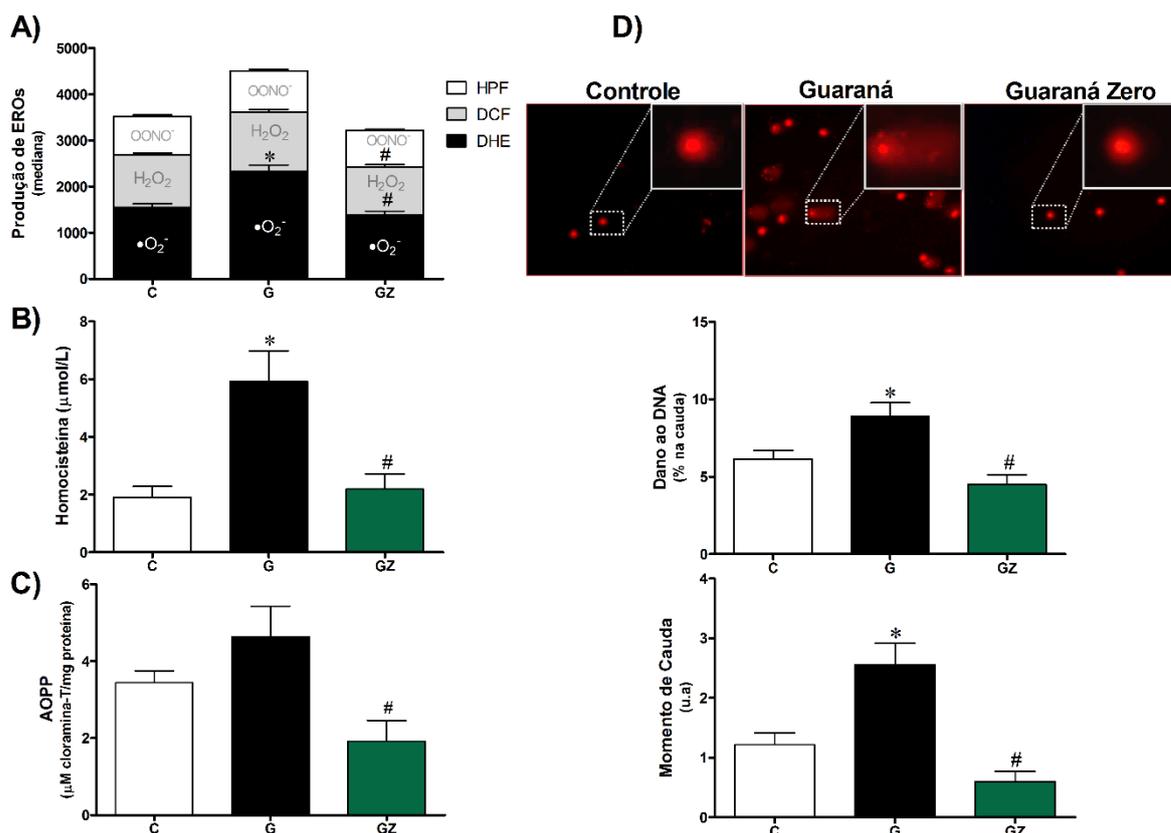


**Figura 6.** Variação nos parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial sistólica, diastólica e média) entre os três grupos experimentais de camundongos  $LDLr^{-/}$  mostrando que ambos os guaranás (normal e zero) durante as 8 semanas consecutivas de dieta apresentaram aumento da pressão arterial absoluta. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 3-5$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C (ANOVA uma via) (final – inicial).

### 3.5 Biomarcadores do estresse oxidativo em células sanguíneas

Baseado em dados anteriores que mostram que os altos níveis de EROs são cruciais para o desenvolvimento da aterosclerose (Pereira et al., 2010; Vasquez et al., 2012; Balarini et al., 2013; Coutinho et al., 2017; Fu et al., 2017) e hipertensão (McMaster et al., 2015; Guzik e Touyz, 2017; Pawluk et al., 2017), avaliamos os níveis intracelulares de EROs em células sanguíneas em todos os grupos estudados. Conforme ilustrado na Figura 7A, mostramos que a ingestão de refrigerante de guaraná aumentou a produção de EROs e, mais especificamente, os níveis de  $\bullet O_2^-$  no grupo G ( $\sim 50\%$ ,  $p < 0,05$ ) em comparação com os camundongos do grupo C. Curiosamente, o GZ não promoveu superprodução do EROs ( $\bullet O_2^-$ :  $1388 \pm 79$  u.a,  $H_2O_2$ :  $1038 \pm 48$  u.a), sendo semelhante ao grupo C ( $\bullet O_2^-$ :  $1544 \pm 85$  u.a,  $H_2O_2$ :  $1140 \pm 41$  u.a,  $p > 0,05$ ). Em relação as espécies altamente reativas, não detectamos diferença entre os grupos (C:  $831 \pm 41$  u.a, G:  $897 \pm 30$  u.a, GZ:  $792 \pm 29$  u.a.,  $p > 0,05$ ). No que diz respeito a outros biomarcadores séricos de estresse oxidativo, demonstramos que o grupo G aumenta os níveis de homocisteína plasmática ( $\sim 3$  vezes, Figura 7B) e AOPP ( $\sim 2,5$  vezes, Figura 7C) em comparação com o grupo GZ ( $p < 0,05$ ). Além disso, a avaliação do estresse genotóxico pelo Ensaio Cometa Alcalino indicou maior dano ao DNA no grupo G ( $8,9 \pm 0,9\%$ ,  $p < 0,05$ )

em comparação com o grupo C ( $6,2 \pm 0,5\%$ ) e foi reduzido no grupo GZ ( $4,5 \pm 0,6\%$ ) (Figura 7D, painel superior e meio). Outro parâmetro avaliado foi o momento de cauda do cometa, um produto do comprimento da cauda e a porção do DNA total na cauda (Lin et al., 2009; Rodrigues et al., 2013). Esta análise demonstrou um aumento da fragmentação do DNA no grupo G ( $2,6 \pm 0,35$  a.u.,  $p < 0,05$ ) em comparação com os camundongos do grupo C e GZ ( $1,2 \pm 0,2$  e  $0,6 \pm 0,2$  a.u., respectivamente, Figura 7D, painel inferior).

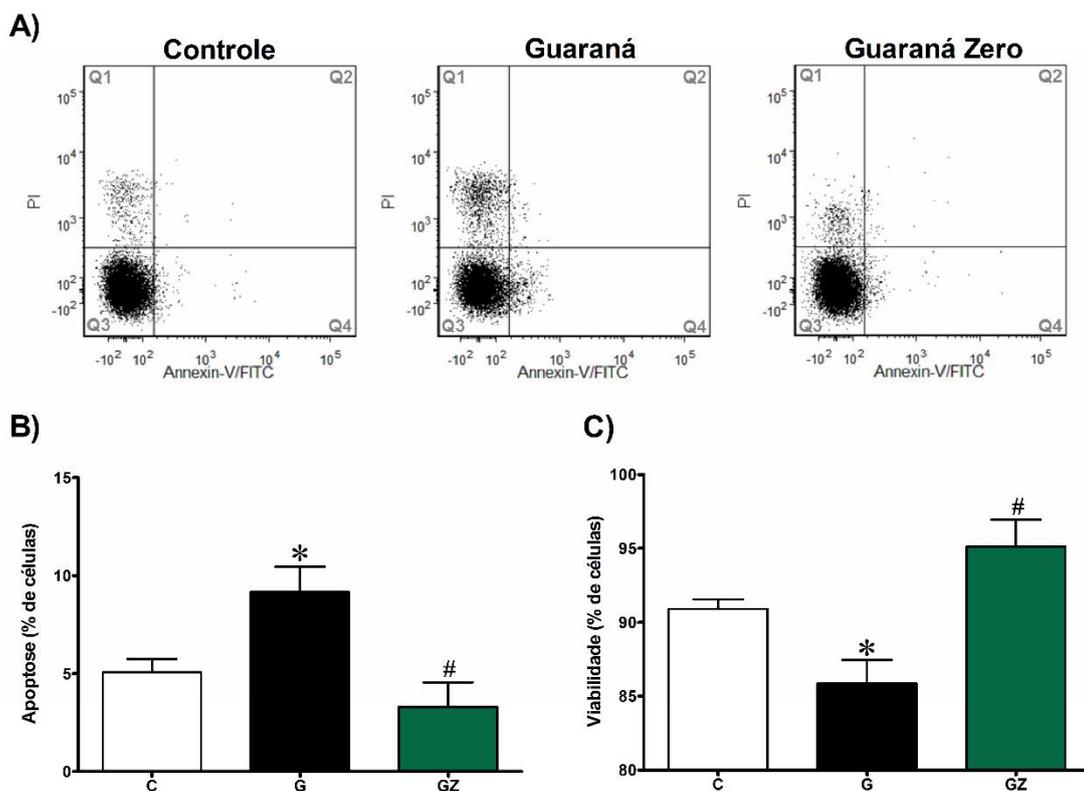


**Figura 7. A superprodução de EROs e o estresse oxidativo estão envolvidos na ingestão de guaraná.** A) A produção de EROs no sangue foi avaliada por DHE, DCF e HPF através da citometria de fluxo. B) Quantificação de homocisteína e C) oxidação proteica (AOPP) no plasma dos três grupos. D) Detecção do dano ao DNA no sangue pelo Ensaio Cometa Alcalino. Painel superior: cometas típicos apresentando maior fragmentação do DNA no grupo G em comparação com os grupos C e GZ, quantificado e representado no painel do meio. No painel inferior, gráfico de barras representado o momento de cauda (~2 vezes maior no grupo G). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 6-7$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G. (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

### 3.6 Viabilidade e apoptose em células sanguíneas

A apoptose celular foi investigada nas células sanguíneas por citometria de fluxo utilizando a coloração com anexina V. A Figura 8A mostra imagens típicas de *dot plots* para cada grupo. Nossos resultados, na Figura 8B indicam que o guaraná aumentou em 80% ( $p < 0,05$ ) o número de células apoptóticas (Q2 + Q4) em

comparação com o C ( $5,1 \pm 0,7$ ). Por outro lado, os camundongos do grupo GZ mostraram um perfil semelhante aos do grupo C ( $3,3 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$ ). Quanto à viabilidade celular (Figura 8C), o grupo G apresentou viabilidade celular prejudicada ( $86 \pm 1,6\%$ ) em comparação com outros grupos (C:  $91 \pm 0,7\%$  e GZ:  $95 \pm 1,8\%$ ,  $p < 0,05$ ).

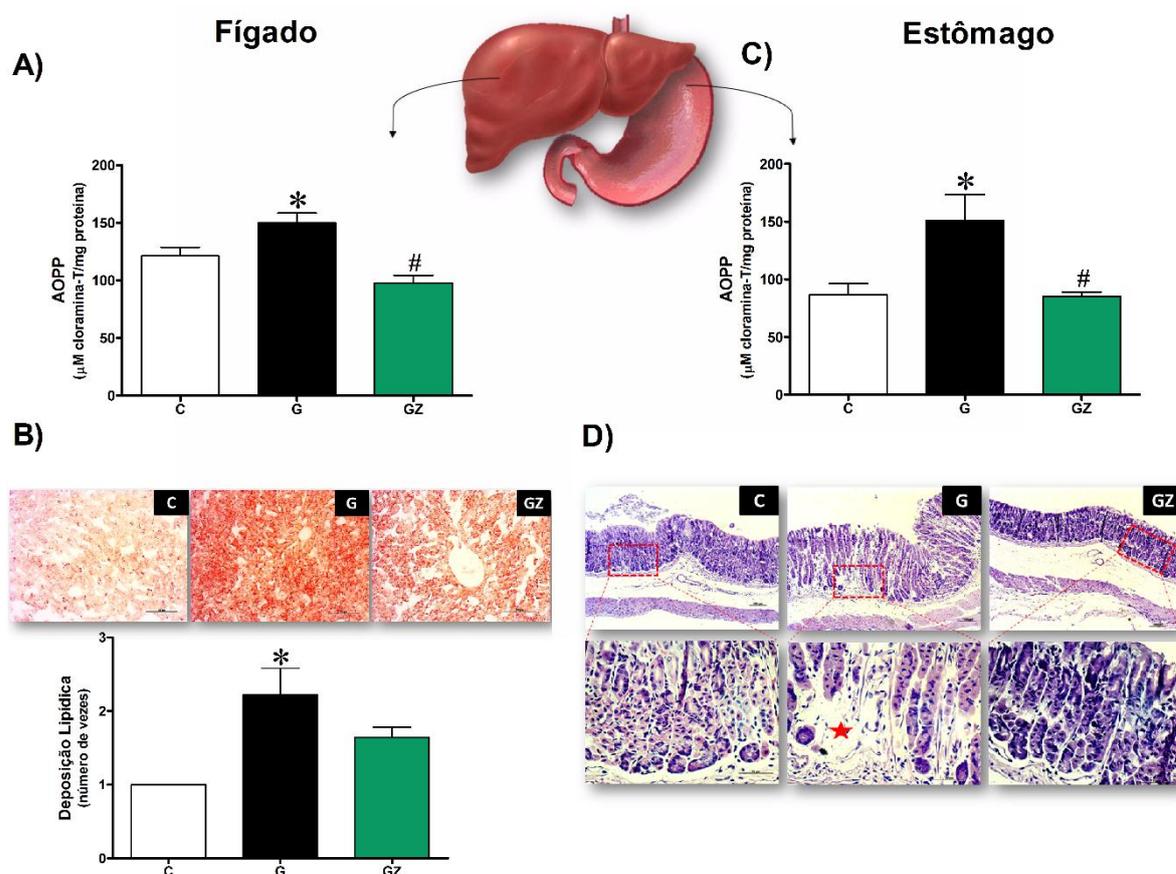


**Figura 8. Guaraná aumenta a apoptose e compromete a viabilidade em células do sangue.** A) *Dot plots* representando o índice de apoptose no grupo C, G e GZ ( $n=5$ ). B) A apoptose e (B) viabilidade celular foram determinadas usando iodeto de propídio (PI) e Anexina V – FITC. Os quadrantes Q2+Q4 representam as células que estão em apoptose. Observa-se diminuição notável do número de células apoptóticas (Q2+Q4) no grupo GZ. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

### 3.7 Oxidação proteica e análises histológicas do fígado e estômago

Investigamos também o impacto do consumo crônico de refrigerantes de guaraná em danos oxidativos no fígado e no estômago em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Mais uma vez, o grupo G aumentou a oxidação proteica tanto no fígado (25%,  $p < 0,05$ , Figura 9A) quanto no estômago (75%,  $p < 0,05$ , Figura 9C) em comparação com os animais do grupo C. Curiosamente, o grupo GZ revelou perfil semelhante ao grupo C ( $p > 0,05$ ) em ambos os órgãos (Figuras 9A e 9C). Além disso, o grupo G apresentou maior deposição lipídica (120%,  $p < 0,05$ ) nas células do fígado (Figura 9B) em comparação com o grupo C. O grupo GZ não mostrou diferença entre

demais grupos ( $p > 0,05$ ). Em relação ao dano estomacal (Figura 9D), observamos que apenas o grupo G desenvolveu atrofia e degeneração nas células gástricas.



**Figura 9. A ingestão crônica de guaraná aumenta o dano no fígado e no estômago.** A) A ingestão crônica de guaraná aumenta os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) e B) deposição lipídica no fígado, ilustrada através das imagens típicas no painel superior. C) Da mesma forma, o guaraná aumenta a formação de AOPP no estômago. D) Somente o grupo guaraná desenvolveu atrofia e degeneração nas células gástricas. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM para  $n = 4-6$  animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. grupo C e # $p < 0,05$  vs. grupo G (ANOVA uma via, seguida do *post-hoc* de Tukey).

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos que o consumo a longo prazo do refrigerante clássico de guaraná (adoçado com açúcar) em camundongos adultos/idosos dislipidemicos resultou em aumento da hipercolesterolemia, deposição lipídica vascular, pressão arterial, estresse oxidativo, fragmentação do DNA e apoptose em células sanguíneas além de maior lesão hepática e gástrica (mesmo sem ganho de peso ou hiperglicemia). Curiosamente, o guaraná zero foi capaz de evitar a maioria dos danos descritos, exceto nos parâmetros hemodinâmicos e renais.

Embora vários estudos clínicos tenham indicado uma associação positiva entre o consumo de bebidas adoçadas com açúcar e o risco de obesidade (Malik et al., 2006; Bucher Della Torre et al., 2016; Marshall et al., 2017), sabe-se que muitos fatores em seres humanos (por exemplo, dieta, atividade física, composição corporal, cultura familiar, estilo de vida) podem confundir a relação entre eles (Bucher Della Torre et al., 2016; Slavin, 2012). Assim, estudos experimentais são importantes para esclarecer o papel das bebidas açucaradas no ganho de peso. Nossos resultados, bem como outros achados experimentais relacionados (Jürgens et al., 2005; Otero-Losada et al., 2013) não confirmaram a hipótese clínica de que o consumo regular de bebidas adoçadas com açúcar poderia, por si só, induzir ao aumento de peso. É importante enfatizar que, ao contrário do comportamento racional humano, os animais expostos ao guaraná normal reduziram pela metade o consumo de alimentos, normalizando a ingestão calórica, fundamentado de maneira semelhante por Otero-Losada et al. (2013) que investigou o consumo de bebidas de cola no mesmo período de tempo. Quanto aos edulcorantes não nutritivos, mesmo que alguns pesquisadores sugeriram que sua exposição possa aumentar o apetite (Mattes e Popkin, 2009; Milei et al., 2011; Swithers, 2013) nossos resultados usando guaraná zero não indicam modificação na ingestão de alimentos e nem no peso corporal. Portanto, nossos dados corroboram os resultados experimentais recentes usando refrigerantes de cola que tiveram resultados semelhantes (Milei et al., 2011; Otero-Losada et al. 2013), sugerindo assim, que um aumento no consumo de alimentos associado a bebidas adoçadas artificialmente com aspartame em humanos possa estar mais relacionado a influências psicológicas que, aparentemente, não ocorreram em nossos animais experimentais.

O consumo de refrigerantes tem sido associado a fatores de risco cardiometabólicos (Dhingra et al., 2007; Fung et al., 2009; Pase et al., 2017). No entanto, o perfil bioquímico sérico (glicemia, triglicerídeos, colesterol) sob exposição a refrigerantes ainda é conflitante tanto em estudos experimentais (Jürgens et al., 2005; Milei et al., 2011; Otero-Losada et al. 2013) quanto clínicos (Swithers, 2013; Dhingra et al., 2007; Van Rompay et al., 2015; Smith et al., 1996; Surwit et al., 1997; Pase et al., 2017). Nossos resultados mostraram que o guaraná aumenta apenas o colesterol não-HDL, mantendo os níveis basais de triglicerídeos e glicose. Uma possível explicação para o controle glicêmico é a quantidade moderada de cafeína contida nos refrigerantes (Jürgens et al., 2005; Park et al., 2007; Celec et al., 2010) e/ou acessulfame K (Pepino e Bourne, 2011; Otero-Losada et al. 2013) que pode estimular a secreção de insulina e/ou aumentar a regulação dos transportadores de glicose, contribuindo parcialmente com a melhora do perfil do TTOG detectado em nosso estudo. Apesar do impacto metabólico aparentemente discreto observado, nós demonstramos várias conseqüências do consumo crônico de guaraná, descritos abaixo.

Em relação à influência do consumo crônico de refrigerantes na aterosclerose, sua contribuição isolada ainda é pouco conhecida. Até agora, os dados experimentais foram demonstrados apenas através de bebidas do tipo cola (Otero-Losada et al. 2013; Otero-Losada et al. 2014). Portanto, o efeito pro-aterogênico observado com o guaraná (mas não o guaraná zero) abre novas perspectivas sobre essa questão, justificada por alguns aspectos: 1) é possível induzir deposição significativa de lipídios aórticos em camundongos LDLR<sup>-/-</sup> fêmeas idosas somente com exposição a bebidas açucaradas, sem dieta com alto teor de gordura, opondo-se à metodologia clássica (Getz e Reardon, 2012; Coutinho et al., 2017); 2) a aterogênese pode estar mais relacionada à exposição excessiva a carboidratos que outras substâncias (edulcorantes não nutritivos) contidas nos refrigerantes, diferentemente do observado em um estudo usando bebidas de cola que detectaram aterogênese mesmo em bebida de cola *light* (Otero-Losada et al. 2014); 3) a glicemia por si só pode não ser suficiente para avaliar o impacto da exposição crônica a bebidas ricas em carboidratos, verificadas por alterações hemodinâmicas, oxidativas e dano celular/tecidual detectadas em nosso estudo.

Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, vários relatos mostram que a hipertensão é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas à disfunção endotelial e à contratilidade alterada

(Briones e Touyz, 2010; Montezano et al., 2015; Leal et al., 2015). Nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, a influência do consumo crônico de guaraná na hipertensão. Embora nós e outros ainda não tenhamos explorado a reatividade vascular de animais expostos a refrigerantes, alguns estudos já demonstraram uma reatividade anormal em animais alimentados com uma dieta de alta frutose (Nakagawa et al., 2006; Wiernsperger et al., 2007) justificada, pelo menos em parte, devido ao aumento da angiotensina II e a redução da regulação da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) (Tran et al., 2009; Porto et al., 2015). Por outro lado, de acordo com os dados atuais, sugerimos que outras substâncias possam estar envolvidas na hipertensão, uma vez que o grupo tratado com adoçantes artificiais também demonstrou aumento da pressão arterial. Entre eles, não podemos descartar o papel do aspartame (que contém 50% de fenilalanina), um precursor relevante de substâncias altamente vasoativas (dopamina, noradrenalina e adrenalina) (Roberts, 2004) e a cafeína, um potenciador da atividade adrenérgica (Milei et al., 2011).

Está bem estabelecido que o estresse oxidativo é um fenômeno central da progressão cardiovascular (Pereira et al., 2010; Vasquez et al., 2012; Leal et al., 2015; Libby et al., 2015; Lee et al., 2017; Coutinho et al., 2017) e outras doenças relacionadas ao envelhecimento (Khansari et al., 2009; Guo et al., 2017). Ao mesmo tempo, vários estudos mostraram que a hiperglicemia aumenta a produção de EROs principalmente por disfunção mitocondrial e estresse no retículo endoplasmático (Avogaro et al., 2011; Fiorentino et al., 2013; Gomes et al., 2014; Porto et al., 2015b). Portanto, investigar o impacto da geração de EROs e possíveis danos oxidativos de células/tecidos sob exposição a bebidas de guaraná parece ser bastante pertinente. Pela primeira vez, mostramos que os refrigerantes clássicos de guaraná apresentam efeito pro-oxidativo detectado por biomarcadores diretos (citometria de fluxo) e indiretos (homocisteína, AOPP e fragmentação de DNA), e que todos esses fatores podem explicar, pelo menos em parte, a hipertensão e a deposição lipídica observadas em nosso estudo (Pereira et al., 2010; Pereira et al., 2016; Qasim et al., 2016; Chernyavskiy et al., 2016). Além disso, mostramos que o dano oxidativo já foi capaz de gerar outras consequências importantes, como aumento da apoptose e diminuição da viabilidade celular, cujos mecanismos possíveis já estão bem estabelecidos (por exemplo, clivagens cromossômicas, encurtamento de telômeros e /ou ativação de caspases) (Kannan e Jain 2000; Ungvari et al., 2010; Yang et al., 2017). Além disso, não podemos deixar de destacar

que a hiperhomocisteinemia observada sob uso crônico de bebidas de guaraná possa ser outro contribuinte direto para a hipertensão (Guo et al., 2017), dano ao DNA e ativador da apoptose observada em outros estudos (Currò et al., 2014; Ganguly e Alam, 2015).

Até o presente estudo, não havia evidências de que os refrigerantes de guaraná pudessem contribuir para danos hepáticos ou gástricos. Paralelamente, apenas alguns estudos demonstram um risco potencial de hepatotoxicidade sob exposição crônica ao aspartame (Alkafafy et al., 2015; Finamor et al., 2017) ou acesulfame K (Otero-Losada et al., 2013). Assim, nossos dados esclarecem esta questão, demonstrando que o consumo excessivo de carboidratos (mas não o guaraná por si) é o principal contribuinte para a esteatose e estresse oxidativo no fígado. Esses dados são embasados por pesquisas anteriores que mostram que frutose e glicose são indutores importantes de síntese “de novo” lipídica e produção de EROs (Lim et al., 2010; Jegatheesan et al., 2017). Em condições semelhantes, o impacto no estômago foi observado, revelando que o maior dano é observado em relação aos carboidratos (frutose, glicose, sacarose) em comparação com os edulcorantes artificiais (acesulfame K ou aspartame). É importante enfatizar que todos esses danos descritos acima foram gerados em condições normoglicêmicas, mesmo sob exposição crônica a refrigerantes clássicos (ricos em carboidratos). Assim, estes dados sugerem que, antes das alterações metabólicas observadas nas rotinas clínicas, podem ocorrer vários danos oxidativos causados pela ingestão de refrigerantes açucarados sendo um dado que alerta para a tomada de medidas nas políticas de saúde pública.

Por último, mas não menos importante, o único órgão que apresentou maior dano sob efeito do guaraná zero foi o rim com possível perda de filtração glomerular e lesão tubular, justificada por creatininemia e aumento da enzimúria, respectivamente (Whitining et al., 1996; Fang et al., 2008). Neste caso, sugerimos que o dano renal possa ser gerado pelo aspartame. Recentemente, alguns estudos demonstraram que a ingestão prolongada de aspartame possa desenvolver estresse oxidativo no rim de ratos através da desregulação da homeostase de glutatona (Finamor et al., 2014). No entanto, investigações futuras serão necessárias para explorar o impacto do acesulfame K ou de outras substâncias nesse contexto.

Algumas limitações devem ser consideradas em nosso estudo. Primeiro, a falta de monitoramento do ciclo estral em camundongos fêmeas adultos/idosos não nos permite especular sobre a influência de hormônios sexuais nos resultados

encontrados. Segundo, uma vez que este estudo com refrigerantes foi realizado em LDLr<sup>-/-</sup> pela primeira vez, a comparação com o modelo ApoE<sup>-/-</sup> não pode ser feita. E, em terceiro lugar, ainda não sabemos se todos os parâmetros seriam normalizados após um período de “washout”, indicando a necessidade de mais investigações para esclarecer seus efeitos.

## **5. CONCLUSÃO**

Nosso estudo permitiu concluirmos que a exposição crônica ao refrigerante guaraná (mas não o guaraná zero) aumenta os níveis de colesterol, deposição lipídica, pressão arterial além de promover danos hepáticos e gástricos, explicados, pelo menos em parte, por mecanismos pró-oxidativos, possivelmente referentes à ingestão excessiva de carboidratos.

### **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores revelam não haver conflitos de interesses.

## 6. REFERÊNCIAS

Aguiar DRD. The Case of Brazil. In: Stiegert KW, Kim DH, editors. *Structural Changes in Food Retailing: Six Country Case Studies*. Madison: Food System Research Group; 2009. p. 151.

Alkafafy Mel-S, Ibrahim ZS, Ahmed MM, El-Shazly SA. Impact of aspartame and saccharin on the rat liver: Biochemical, molecular, and histological approach. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015 Jun;28(2):247-55. doi: 10.1177/0394632015586134.

Associação Brasileira de Indústria para Alimentos Dietéticos – ABIAD. Tendências do mercado de alimentos. 2010. Disponível em: <http://www.abiad.org.br/index.php/estudos-sobre-o-setor>.

Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care*. 2011 May;34 Suppl 2:S285-90. doi: 10.2337/dc11-s239.

Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP; NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*. 2010 Sep-Oct;3(9-10):525-34. doi:10.1242/dmm.006239.

Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med*. 2013 Jan 5;11:3. doi: 10.1186/1479-5876-11-3.

Bes-Rastrollo M, Schulze MB, Ruiz-Canela M, Martinez-Gonzalez MA. Financial Conflicts of Interest and Reporting Bias Regarding the Association between Sugar Sweetened Beverages and Weight Gain: A Systematic Review of Systematic Reviews. Stuckler D, ed. *PLoS Medicine*. 2013;10(12):e1001578. doi:10.1371/journal.pmed.1001578.

Borges MC, Louzada ML, de Sá TH, Lavery AA, Parra DC, Garzillo JMF, Monteiro CA, Millett C. Artificially Sweetened Beverages and the Response to the Global Obesity Crisis. 2017. *PLoS Med* 14(1): e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002195>

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep*. 2010 Apr;12(2):135-42. doi: 10.1007/s11906-010-0100-z.

Brown RJ, de Banate MA, Rother KI. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes*. 2010;5(4):305–12.

Bucher Della Torre S, Keller A, Laure Depeyre J, Kruseman M. Sugar-Sweetened Beverages and Obesity Risk in Children and Adolescents: A Systematic Analysis on

- How Methodological Quality May Influence Conclusions. *J Acad Nutr Diet*. 2016 Apr;116(4):638-59. doi: 10.1016/j.jand.2015.05.020.
- Campagnaro BP, Tonini CL, Doche LM, Nogueira BV, Vasquez EC, Meyrelles SS. Renovascular Hypertension Leads to DNA Damage and Apoptosis in Bone Marrow Cells. *DNA and Cell Biology*. 2013;32(8):458-466. doi:10.1089/dna.2013.2065.
- Celec P, Pálffy R, Gardlík R, Behuliak M, Hodosy J, Jáni P, Bozek P, Sebeková K. Renal and metabolic effects of three months of decarbonated cola beverages in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Nov;235(11):1321-7. doi:10.1258/ebm.2010.010051.
- Cervieri Júnior, Teixeira Júnior JR, Galinari R, Rawet EL, Silveira CT. O Setor de bebidas no Brasil. *BNDES setorial*, Rio de Janeiro, n. 40, p. [93]-129, set. 2014.
- Chen YC, Huang AL, Kyaw TS, Bobik A, Peter K. Atherosclerotic plaque rupture: identifying the straw that breaks the Camel's back. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:e63–72. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307993.
- Chernyavskiy I, Veeranki S, Sen U, Tyagi SC. Atherogenesis: hyperhomocysteinemia interactions with LDL, macrophage function, paraoxonase 1, and exercise. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 Jan;1363:138-54. doi: 10.1111/nyas.13009.
- Coutinho PN, Pereira BP, Hertel Pereira AC, Porto ML, Monteiro de Assis ALE, Côgo Destefani A, Meyrelles SS, Vasquez EC, Nogueira BV, de Andrade TU, Endringer DC, Fronza M, Costa Pereira TM. Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr (-/-) mice. *J Ethnopharmacol*. 2017 Jul 12;206:65-72. doi: 10.1016/j.jep.2017.05.015.
- Currò M, Gugliandolo A, Gangemi C, Risitano R, Ientile R, Caccamo D. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. *Neurochem Res*. 2014 Aug;39(8):1485-95. doi: 10.1007/s11064-014-1338-7.
- DATASUS, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. 2012. Disponível em:<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.
- Daugherty A.; Rateri D. 2006 .A Handbook of Mouse Models of Cardiovascular Disease. (5), 53-66.
- de Koning L, Malik VS, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jun;93(6):1321-7. doi: 10.3945/ajcn.110.007922.
- Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, D'Agostino RB, Gaziano JM, Vasan RS. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation*. 2007 Jul 31;116(5):480-8.
- Ebbeling CB, Feldman HA, Chomitz VR, Antonelli TA, Gortmaker SL, Osganian SK, Ludwig DS. A randomized trial of sugar-sweetened beverages and adolescent body weight. *N Engl J Med*. 2012 Oct 11;367(15):1407-16. doi: 10.1056/NEJMoa1203388.

- Euromonitor Internacional. Carbonates in Brazil. 2016. Disponível em: <http://www.portal.euromonitor.com/portal/analysis/tab>.
- Fang HC, Lee PT, Lu PJ, Chen CL, Chang TY, Hsu CY, Chung HM, Chou KJ. Mechanisms of star fruit-induced acute renal failure. *Food Chem Toxicol*. 2008 May;46(5):1744-52. doi: 10.1016/j.fct.2008.01.016.
- Fernandes T, Roque FR, Castro F de, Carmo EC do, Oliveira EM de. O treinamento físico aeróbio corrige a rarefação capilar e as alterações nas proporções dos tipos de fibra muscular esquelética em ratos espontaneamente hipertensos. 2012. *Rev Bras Med Esporte* 18 (4): 267 -272.
- Finamor I, Pérez S, Bressan CA, Brenner CE, Rius-Pérez S, Brittes PC, Cheiran G, Rocha MI, da Veiga M, Sastre J, Pavanato MA. Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:701-707. doi: 10.1016/j.redox.2017.01.019.
- Finamor I, Pavanato MA, Pês T, Ourique G, Saccol E, Schiefelbein S, Llesuy S, Partata W. N-acetylcysteine protects the rat kidney against aspartame-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2014 Oct;75 Suppl 1:S30. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.759.
- Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2013;19(32):5695-703. Review.
- Fu Y, Wang X, Kong W. Hyperhomocysteinemia and Vascular Injury: The Advance of Mechanisms and Drug Targets. *Br J Pharmacol*. 2017 Aug 24. doi: 10.1111/bph.13988.
- Fung TT, Malik V, Rexrode KM, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr*. 2009 Apr;89(4):1037-42. doi: 10.3945/ajcn.2008.27140.
- Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015 Jan 10;14:6. doi: 10.1186/1475-2891-14-6.
- Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 May;32(5):1104-15. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237693.
- Gomes IB, Porto ML, Santos MC, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids Health Dis*. 2014 Dec 6;13:184. doi: 10.1186/1476-511X-13-184.
- Guo G, Sun W, Liu G, Zheng H, Zhao J. Comparison of oxidative stress biomarkers in hypertensive patients with or without hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Hypertens*. 2017 Sep 18:1-5. doi: 10.1080/10641963.2017.1368535.
- Guzik TJ, Touyz RM. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension*. 2017 Aug 7. pii: HYPERTENSIONAHA.117.07802. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.

Imamura F, O'Connor L, Ye Z, Mursu J, Hayashino Y, Bhupathiraju SN, Forouhi NG. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *BMJ*. 2015;351:h3576.

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92:883–893. doi: 10.1172/JCI116663.

Jegatheesan P, De Bandt JP. Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients*. 2017 Mar 3;9(3). pii: E230. doi: 10.3390/nu9030230.

Jürgens H, Haass W, Castañeda TR, Schürmann A, Koebnick C, Dombrowski F, Otto B, Nawrocki AR, Scherer PE, Spranger J, Ristow M, Joost HG, Havel PJ, Tschöp MH. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res*. 2005 Jul;13(7):1146-56.

Kanders BS, Lavin PT, Kowalchuk MB, Greenberg I, Blackburn GL. An evaluation of the effect of aspartame on weight loss. *Appetite*. 1988;11 Suppl 1:73-84.

Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000 Sep;7(3):153-163.

Kleiman S, Ng SW, Popkin B. Drinking to our health: can beverage companies cut calories while maintaining profits? *Obes Rev*. 2012 Mar;13(3):258-74. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00949.x.

Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009 Jan;3(1):73-80. Review. PubMed PMID: 19149749.

Leal MA, Balarini CM, Dias AT, Porto ML, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: The beneficial effects of sildenafil. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2015;16:517–530. doi: 10.2174/138920101606150407113458.

Lee YT, Lin HY, Chan YW, Li KH, To OT, Yan BP, Liu T, Li G, Wong WT, Keung W, Tse G. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis*. 2017 Jan 17;16(1):12. doi:10.1186/s12944-016-0402-5.

Libby, P, Hansson, GK, 2015. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res*. 116, 307-311.

Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 May;7(5):251-64. doi: 10.1038/nrgastro.2010.41.

Lin YL, Sengupta S, Gurdziel K, Bell GW, Jacks T, Flores ER. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair. *PLoS Genet*. 2009 Oct;5(10):e1000680. doi: 10.1371/journal.pgen.1000680.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095-128.

Maersk M, Belza A, Stødkilde-Jørgensen H, Ringgaard S, Chabanova E, Thomsen H, Pedersen SB, Astrup A, Richelsen B. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. *Am J Clin Nutr*. 2012 Feb;95(2):283-9. doi: 10.3945/ajcn.111.022533.

Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2006 Aug;84(2):274-88.

Mantzari E, Hollands GJ, Pechey R, Jebb S, Marteau TM. Impact of bottle size on in home consumption of sugar-sweetened beverages: a feasibility and acceptability study. *BMC Public Health*. 2017 Apr 7;17(1):304. doi:10.1186/s12889-017-4214-y.

Marshall TA, Van Buren JM, Warren JJ, Cavanaugh JE, Levy SM. Beverage Consumption Patterns at Age 13 to 17 Years Are Associated with Weight, Height, and Body Mass Index at Age 17 Years. *J Acad Nutr Diet*. 2017 May;117(5):698-706. doi: 10.1016/j.jand.2017.01.010.

Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan;89(1):1-14. doi: 10.3945/ajcn.2008.26792.

McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res*. 2015 Mar 13;116(6):1022-33. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303697.

Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but Do Not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels Are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1223–1230. doi: 10.1161/01.ATV.19.5.1223.

Milei J, Otero Losada M, Gómez Llambí H, Grana DR, Suárez D, Azzato F, Ambrosio G. Chronic cola drinking induces metabolic and cardiac alterations in rats. *World J Cardiol*. 2011 Apr 26;3(4):111-6. doi: 10.4330/wjc.v3.i4.111.

Miller PE, Perez V. Low-calorie sweeteners and body weight and composition: a meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr*. 2014;100(3):765–77.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Monteiro CA, Cannon G. The impact of transnational "big food" companies on the South: a view from Brazil. *PLoS Med.* 2012;9(7):e1001252. doi: 10.1371/journal.pmed.1001252.

Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015 May;31(5):631-41. doi: 10.1016/j.cjca.2015.02.008.

Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2197-223.

Narain A, Kwok CS, Mamas MA. Soft drinks and sweetened beverages and the risk of cardiovascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2016 Oct;70(10):791-805. doi: 10.1111/ijcp.12841.

Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Mar;290(3):F625-31.

Njike VY, Faridi Z, Shuval K, Dutta S, Kay CD, West SG, Kris-Etherton PM, Katz DL. Efeitos do cacau açucarado e sem açúcar na função endotelial em Adultos com excesso de peso. *Int J Cardiol.* 2011 19 de maio; 149 (1): 83-8. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.12.010.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 30;123(1):291-8..

Otero-Losada M, Cao G, Mc Loughlin S, Rodríguez-Granillo G, Ottaviano G, Milei J. Rate of atherosclerosis progression in ApoE<sup>-/-</sup> mice long after discontinuation of cola beverage drinking. *PLoS One.* 2014 Mar 26;9(3):e89838. doi:10.1371/journal.pone.0089838.

Otero-Losada ME, Loughlin SM, Rodríguez-Granillo G, Muller A, Ottaviano G, Moriondo M, Cutrin JC, Milei J. Metabolic disturbances and worsening of atherosclerotic lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice after cola beverages drinking. *Cardiovascular Diabetology.* 2013;12:57. doi:10.1186/1475-2840-12-57.

Paigen B, Morrow A, Holmes P, Mitchell D, Williams R. 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 68(3), 231–240.

Park S, Jang JS, Hong SM. Long-term consumption of caffeine improves glucose homeostasis by enhancing insulinotropic action through islet insulin/insulin-like growth factor 1 signaling in diabetic rats. *Metabolism.* 2007 May;56(5):599-607.

Pase MP, Himali JJ, Beiser AS, Aparicio HJ, Satizabal CL, Vasan RS, Seshadri S, Jacques PF. Sugar- and Artificially Sweetened Beverages and the Risks of Incident

Stroke and Dementia: A Prospective Cohort Study. *Stroke*. 2017 May;48(5):1139-1146. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.016027.

Pawluk H, Pawluk R, Robaczewska J, Kędziora-Kornatowska K, Kędziora J. Biomarkers of antioxidant status and lipid peroxidation in elderly patients with hypertension. *Redox Rep*. 2017 Sep 5:1-5. doi: 10.1080/13510002.2017.1372072.

Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011 Jul;14(4):391-5. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283468e7e.

Pereira TM, Nogueira BV, Lima LC, Porto ML, Arruda JA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis*. 2010 Aug 19;9:87. doi: 10.1186/1476-511X-9-87.

Pereira TM, Pimenta FS, Porto ML, Baldo MP, Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Coadjuvants in the Diabetic Complications: Nutraceuticals and Drugs with Pleiotropic Effects. *Int J Mol Sci*. 2016 Aug 5;17(8). pii: E1273. doi: 10.3390/ijms17081273.

Pitanga FJG, Almeida MCC, Queiroz CO, Aquino EML, Matos SMA. Physical Activity In Brazil: Lessons From Elsa-Brasil. Narrative Review. *Sao Paulo Med J*. 2017 Jul Aug;135(4):391-395. doi: 10.1590/1516-3180.2017.0023190317.

Porto ML, Lírio LM, Dias AT, Batista AT, Campagnaro BP, Mill JG, Meyrelles SS, Baldo MP. Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats. *Toxicol In Vitro*. 2015 Dec;29(8):1977-81. doi: 10.1016/j.tiv.2015.08.006.

Porto ML, Rodrigues BP, Menezes TN, Ceschim SL, Casarini DE, Gava, AL, Pereira TM, Vasquez EC, Campagnaro BP, Meyrelles SS, 2015. Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. *J Biomed Sci*. 22, 97.

Qasim M, Bukhari SA, Ghani MJ, Masoud MS, Huma T, Arshad M, Haque A, Ibrahim Z, Javed S, Rajoka MI. Relationship of oxidative stress with elevated level of DNA damage and homocysteine in cardiovascular disease patients. *Pak J Pharm Sci*. 2016 Nov;29(6 Suppl):2297-2302.

Reardon T, Timmer CP, Barrett CB e Berdegué J. 2003. The rise of supermarkets in Africa, Asia, and Latin America. *Am J Agr Econ.*, 85(5), 1140–146.

Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4):422-33. doi: 10.1161/Circulationaha.114.008727.

Roberts HJ. Aspartame disease: a possible cause for concomitant Graves disease and pulmonary hypertension. *Tex Heart Inst J*. 2004;31(1):105.

Rodrigues BP, Campagnaro BP, Balarini CM, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of

- spontaneous atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2013 Aug 28;12:128. doi: 10.1186/1476-511X-12-128.
- Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35, 206–221.
- Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet.* 2011 Jun 4;377(9781):1949-61. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60135-9.
- Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.*175, 184–191.
- Slavin J. Beverages and body weight: challenges in the evidence-based review process of the Carbohydrate Subcommittee from the 2010 Dietary Guidelines Advisory Committee. *Nutr Rev.* 2012. Nov;70 Suppl 2:S111-20. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00537.x.
- Smith JB, Niven BE, Mann JI. The effect of reduced extrinsic sucrose intake on plasma triglyceride levels. *Eur J Clin Nutr.* 1996 Aug;50(8):498-504. PubMed PMID: 8863009.
- Surwit RS, Feinglos MN, McCaskill CC, Clay SL, Babyak MA, Brownlow BS, Plaisted CS, Lin PH. Metabolic and behavioral effects of a high-sucrose diet during weight loss. *Am J Clin Nutr.* 1997 Apr;65(4):908-15. PubMed PMID: 9094871.
- Swithers SE. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Sep;24(9):431-41. doi: 10.1016/j.tem.2013.05.005.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35, 206–221.
- Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Int J Mol Sci.* 2013 Feb 5;14(2):3325-42. doi: 10.3390/ijms14023325.
- Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem.* 2009. Oct;330(1-2):219-28. doi: 10.1007/s11010-009-0136-z.
- Tse G, Lai ETH, Yeo JM, Tse V, Wong SH. Mechanisms of electrical activation and conduction in the gastrointestinal system: lessons from cardiac electrophysiology. *Front Physiol.* 2016;7:182. doi:10.3389/fphys.2016.00182.
- Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010 Oct;65(10):1028-41. doi: 10.1093/gerona/gdq113.

V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. Sociedade Brasileira de Cardiologia, vol.101, n.4, 2013.

Van Rompay MI, McKeown NM, Goodman E, Eliasziw M, Chomitz VR, Gordon CM, Economos CD, Satchek JM. Sugar-Sweetened Beverage Intake Is Positively Associated with Baseline Triglyceride Concentrations, and Changes in Intake Are Inversely Associated with Changes in HDL Cholesterol over 12 Months in a Multi Ethnic Sample of Children. *J Nutr.* 2015 Oct;145(10):2389-95. doi: 10.3945/jn.115.212662.

Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci.* 2012 Feb 13;19:22. doi: 10.1186/1423-0127-19-22.

Whiting PH, Brown PA. The relationship between enzymuria and kidney enzyme activities in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail.* 1996 Nov;18(6):899-909.

Wiernsperger N, Nivoit P, De Aguiar LG, Bouskela E. Microcirculation and the metabolic syndrome. *Microcirculation.* 2007 Jun-Jul;14(4-5):403-38.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoam T, Nguyen, AT, Zingraff J, Jungers, P, Descamps-Latscha, B. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 49, 1304-1313.

Wolff E, Dansinger ML. Soft drinks and weight gain: how strong is the link? *Medscape J Med.* 2008;10(8):189.

World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva: World Health Organization; 2014. p. 10.

Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol.* 2017 Aug 23;8:600. doi: 10.3389/fphys.2017.00600. eCollection 2017.

## 7. ANEXO



### **Universidade Vila Velha** **Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV)**

#### **PARECER DO RELATOR**

#### **Parecer Nº. 375-2016**

Pesquisador (a) Responsável: Thiago de Melo Costa Pereira

Tipo de Pesquisa: Efeito dos refrigerantes (tipo Guaraná) em camundongos LDLr Knockout

Instituição onde será desenvolvido: Universidade Vila Velha

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: **“Efeito dos refrigerantes (tipo Guaraná) em camundongos LDLr Knockout”**, tendo como pesquisador(a) responsável **Prof. Thiago de Melo Costa Pereira**, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**. Serão utilizados no projeto 30 fêmeas de camundongo.

Vila Velha , **30 de julho de 2016.**

---

**Prof. Bárbara Loureiro**  
Relator da CEUA-UVV

---

**Universidade Vila Velha**

Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP: 29102-770

E-mail ceua@uvv.br