



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruna Gonçalves da Silva

**Efeito do consumo crônico do adoçante natural stevia (*S. rebaudiana*
Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido
adiposo branco de camundongos obesos hiperalimentados
durante a lactação**

Rio de Janeiro

2019

Bruna Gonçalves da Silva

Efeito do consumo crônico do adoçante natural stevia (*S. rebaudiana* Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Bruna Gonçalves da.

Efeito do consumo crônico do adoçante natural stevia (*S. rebaudiana* Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação/
Bruna Gonçalves da Silva. – 2019.

133 f.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Teses. 2. Lactação – Teses. 3. Tecido adiposo – Teses. 4. Stevia. 5. Hipernutrição. 6. Camundongos como animal de laboratório. I. Moura, Aníbal Sanchez. II. Souza, Érica Patrícia Garcia de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.052.52

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 - 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Bruna Gonçalves da Silva

Efeito do consumo crônico do adoçante natural stevia (*S. rebaudiana* Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez
Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Luana Lopes de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosinete Dias Gonçalves e Ailton Firmino da Silva, que me ensinaram, desde muito cedo, que o estudo é a única forma de chegar à algum lugar, pois o conhecimento é libertador. Essa foi a maior liberdade que eu sempre busquei! À minha irmã, Bianca Gonçalves da Silva, que sempre esteve ao meu lado dividindo o peso das nossas lutas. Minha maior sorte é poder compartilhar toda a minha vida com vocês.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço, primeiramente, a Deus, por que acredito que Ele nos sustenta e nos ajuda a superar todas as dificuldades, demonstrando que elas existem para que nos tornemos pessoas mais capazes e fortes.

Ao professor Aníbal Sanchez Moura por todos os seus ensinamentos transmitidos ao longo destes anos de convivência;

À minha coorientadora, Prof^{ra}. Dr^a. Érica Patrícia Garcia de Souza, por todo o suporte, aprendizado e incentivo na elaboração deste trabalho. Agradeço por me conceder a oportunidade de fazer parte de seu grupo de alunos.

À minha amiga, Tyanne Malafaia, que sempre esteve ao meu lado me apoiando desde a graduação. Devo muito a você, por todo apoio e por sempre me trazer tranquilidade nos dias de angústia.

À Anatália Kutianski, que nunca mediu esforços para me ajudar. Compartilhou de maneira extremamente humilde todo o seu conhecimento e me concedeu a honra da sua presença, juntamente a mim, na bancada. Muito obrigada por toda ajuda, jamais serei capaz de retribuir. Ter seu apoio fez total diferença.

À Fabiana Alves Neves e Vivian de Melo Soares, por terem idealizado esse projeto tão bonito. É uma responsabilidade muito grande representá-las, de alguma forma, no desenvolvimento deste projeto. Espero ter feito um bom trabalho, a ponto de agradar vocês duas. Obrigada por se mostrarem sempre dispostas a me ajudar e por compartilharem seus conhecimentos e experiências de vida comigo.

Aos estagiários e técnicos do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento (LFND): Ana Luiza, Bernardo Rezende, João Paulo, Lucas Santos, Mariana Marques, Mylena Yahata, Priscila Estolano, Raiza Cillero, Stephanie Silva, Nelcir Rodrigues e Nilton França. Sem vocês a elaboração deste trabalho não seria possível. Muito obrigada por todo o carinho, por dividirem comigo o trabalho pesado, as diversas idas à bancada para repetir experimentos, as escalas de finais de semana e feriados para cuidarmos dos nossos animais, que por sinal, são os elementos mais importantes nesse estudo, e por sempre me falarem: “Fique calma, vai dar certo!” Obrigada por se empenharem e por me ajudarem a tornar o nosso projeto possível.

À minha mãe, Rosinete Dias, que possui um coração puro e bondoso. Por me ensinar, todos os dias, a ser uma pessoa melhor. Obrigada por me incentivar e, principalmente, me conceder os melhores conselhos da minha vida. Obrigada por ser a melhor mãe do mundo.

À minha irmã, Bianca Gonçalves, que com seu pensamento crítico e personalidade forte, sempre consegue me fazer refletir sobre o mundo, me mostrando a importância de pensar fora da “caixa”.

À Carolina Araújo por toda amizade, por sempre fazer questão de estar presente na minha vida. Você é um ser de luz que agrega todos dentro desse grande coração.

À Aline e Thaíssa, que foram a minha família em Portugal, pelas histórias inesquecíveis. Por me ensinarem que os momentos são muito mais valiosos do que as coisas.

Ao Igor Monassa, por ser um dos meus maiores incentivadores. Mas, principalmente, por toda a paciência nesses últimos meses. Por não reclamar todas as vezes que eu precisava estar ausente. Obrigada, por ser a pessoa que mais me tranquilizou e por ser a primeira pessoa que eu pensava quando precisava de apoio.

Eu agradeço a todas as pessoas de laboratórios “vizinhos” que nos ajudaram, sobre tudo, durante a crise financeira do estado do Rio de Janeiro. Infelizmente ainda vivemos um período em que é extremamente difícil “fazer ciência” no Brasil, mas durante a crise econômica eu pude entender o quanto existem pessoas que investem suas vidas para melhorar essa situação. A UERJ está repleta destas pessoas, e eu agradeço por ter tido o auxílio delas.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram dando apoio e suporte para que eu conseguisse percorrer o caminho que sonhei, que, aliás, está só começando.

À empresa Stevita Soul, que doou ao nosso laboratório o adoçante stevia, para que o projeto fosse realizado.

Aos órgãos de apoio financeiro CAPES, CNPQ e FAPERJ.

A história será gentil comigo, pois eu pretendo escrevê-la.

Sir Winston Churchill

RESUMO

SILVA, Bruna Gonçalves da. *Efeito do consumo crônico do adoçante natural stevia (S. rebaudiana Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação*. 2019. 133 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A obesidade é definida como um acúmulo de tecido adiposo corporal correlacionado ao aumento de morbimortalidade. Com o objetivo de reduzir o consumo de calorias e melhorar a forma física, a população tem aumentado o consumo de adoçantes não calóricos. Os adoçantes podem ser naturais ou artificiais, e sabe-se, hoje, que estes não são compostos inertes e que alguns tipos apresentam correlação positiva com aumento da massa corporal e obesidade. A *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma planta nativa da América do sul que apresenta alto poder edulcorante, por este motivo é utilizada na produção do adoçante natural Stevia. Estudos experimentais recentes mostram o papel positivo deste adoçante sobre parâmetros metabólicos devido a sua capacidade de ativar receptores de sabor doce (T1R2/T1R3) presentes nas papilas gustativas e em outros órgãos, influenciando no processo de adipogênese. Desta maneira, torna-se necessária a investigação do efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o metabolismo energético e sua relação com o processo de adipogênese. Foram utilizados camundongos Swiss hiperalimentados. Para induzir a hiperalimentação, as ninhadas foram reduzidas a 3 filhotes machos por lactante no 3º dia de vida pós-natal (grupo hiperalimentado - GH). As ninhadas controles foram ajustadas em 6 filhotes por lactante (grupo controle - GC). Aos 90 dias de vida, os grupos controle e hiperalimentado foram divididos em dois subgrupos, grupo controle e hiperalimentado que receberam água contendo 0,3% de Stevia (GC-ST e GH-ST) ou grupo controle e hiperalimentado que receberam água pura (GC-AG e GH-AG). Os animais foram sacrificados aos 180 dias de vida. Avaliamos o consumo alimentar e hídrico pelos animais durante todo o estudo. A composição corporal foi aferida por ressonância magnética e verificamos o peso de alguns tecidos, como: fígado e tecido adiposo branco. Analisamos alguns parâmetros bioquímicos, como: glicemia, triglicérides e colesterol-total. Através da técnica de Western Blotting e PCR, quantificamos o conteúdo de algumas proteínas da via de sinalização da insulina e do metabolismo lipídico. O metabolismo mitocondrial foi analisado por respirometria de alta resolução e dosagem de ATP. Os dados demonstraram que a hiperalimentação induz aumento da massa corporal, gordura epididimal e hiperglicemia nos animais adultos. O consumo do adoçante Stevia foi capaz de diminuir a massa corporal e gordura epididimal no GH-ST, assim como melhorar a resposta glicêmica e aumentar o conteúdo do receptor de insulina tipo 1 (IRS-1). Em contraste o GC-ST apresentou aumento desses parâmetros antropométricos e aumento do percentual de gordura corporal, sem alterar o conteúdo de IRS-1. Assim, nosso trabalho sugere que o consumo crônico do adoçante natural produzido a base de Stevia promove alterações metabólicas distintas de acordo com o estado nutricional do animal, melhorando a homeostase glicêmica e parâmetros antropométricos em animais adultos hiperalimentados durante o período de lactação.

Palavras-chave: Obesidade. Hiperalimentação. Adoçante. Stevia. Tecido adiposo branco.

ABSTRACT

SILVA, Bruna Gonçalves da. *Effect of chronic consumption of stevia sweetener (S. rebaudiana Bertoni) on metabolic parameters and mitochondrial activity of white adipose tissue of overnutrition during lactation*. 2019. 133 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Obesity is defined as an accumulation of body adipose tissue correlated with increased morbidity and mortality. In order to reduce calorie consumption and improve fitness, the population has increased the consumption of non-caloric sweeteners. The sweeteners may be natural or artificial, and it is now known that these are not inert compounds and some types have a positive correlation with increased body mass and obesity. *Stevia rebaudiana* Bertoni is a South America native plant that has a high sweetening power, for this reason it is used in the production of Stevia natural sweetener. Recent experimental studies show the positive role of this sweetener in metabolic parameters due to its ability to activate sweet taste receptors (T1R2/T1R3) present in the taste buds and other organs, influencing the adipogenesis process. In this way, it is necessary to investigate the effect of Stevia sweetener consumption on energy metabolism and its relation to the process of adipogenesis. Hyperalimentated Swiss mice were used. To induce hyperalimentation, litters were reduced to 3 male offspring per infant on the 3rd day of postnatal life (hyperalimentated group - OG). The control litters were adjusted in 6 pups per infant (control group - CG). At 90 days of age, the control and hyperalimentary groups were divided into two subgroups, (CG-ST and OG-ST) or control and hyper-fed groups that received pure water (CG-WA and OG-WA). The animals were sacrificed at 180 days of age. We evaluated food and water consumption by the animals throughout the study. The body composition was measured by magnetic resonance imaging and we verified the weight of some tissues such as liver and white adipose tissue. We analyzed some biochemical parameters such as glycemia, triglycerides and total cholesterol. Through Western Blotting and PCR, we quantified the content of some proteins of the insulin signaling pathway and lipid metabolism. Mitochondrial metabolism was analyzed through high resolution respirometry and ATP dosing. Data demonstrated that hypernutrition induces an increase in body mass, epididymal fat and hyperglycemia in adult animals. Stevia sweetener consumption was able to decrease body mass and epididymal fat in OG-ST, as well as improve glycemic response and increase insulin receptor 1 (IRS-1) content. In contrast, CG-ST showed an increase in these anthropometric parameters and an increase in body fat percentage without altering the IRS-1 content. Thus, our work suggests that the chronic consumption of the natural sweetener produced with Stevia promotes different metabolic alterations according to the nutritional state of the animal, improving glycemic homeostasis and anthropometric parameters in overnutrition adult animals during the lactation period.

Key-words: Obesity. overnutrition. Sweetener. Stevia. White adipose tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Processos através dos quais a obesidade leva à comorbidades.....	22
Figura 2 –	Prevalência da obesidade em 2016, entre adultos, maiores de 18 anos e de ambos os sexos.....	25
Figura 3 –	Potenciais mecanismos envolvidos na programação materna e pós-natal.....	28
Figura 4 –	Efeitos fisiopatológicos da hiperalimentação durante a lactação em roedores.....	30
Figura 5 –	Representação esquemática do tecido adiposo como um órgão endócrino.....	34
Figura 6 –	Deposição ectópica de gordura sobre os tecidos.....	38
Figura 7 –	Processo de captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e biossíntese de triacilglicerol.....	40
Figura 8 –	Imagem e ilustração da planta <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	46
Figura 9 –	Estruturas químicas de glicosídeos de esteviol: esteviosídeo, rebaudiosídeo A e seu núcleo e metabólito semelhante, esteviol.....	47
Figura 10 –	Principais vias de absorção, digestão, metabolismo e excreção dos glicosídeos de esteviol.....	51
Figura 11 –	Estrutura do receptor heterodímero de sabor doce, tipo 1, membro 2 (T1R2) e tipo 1, membro 3 (T1R3)	56
Figura 12 –	Órgãos extraorais em que os receptores de sabor doce (T1R2 e T1R3) são expressos.....	57
Figura 13 –	Sinalização através de T1R2/T1R3 em células do tipo II de botões gustativos, no intestino e nas células β do pâncreas.....	60
Figura 14 –	Esquema do modelo de redução de ninhada e formação dos grupos hiperalimentado e controle até 180 dias de vida.....	65
Figura 15 –	Modelo de divisão dos grupos hiperalimentado e controle em subgrupos até 180 dias de vida.....	66
Figura 16 –	Consumo alimentar semanal corrigido pela massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados até 180 dias de vida.....	76

Figura 17 –	Avaliação da ingestão hídrica semanal corrigida pela massa corporal de camundongos controles e hiperalimentados dos 90 até 180 dias de vida.....	77
Figura 18 –	Avaliação da massa corporal (g) semanal de camundongos controles e hiperalimentados durante a lactação até os 180 dias de vida.....	79
Figura 19 –	Massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida.....	80
Figura 20 –	Porcentagem de gordura corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida.....	81
Figura 21 –	Porcentagem de massa magra dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida.....	82
Tabela 1 –	Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controles e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	84
Tabela 2 –	Parâmetros bioquímicos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	85
Figura 22 –	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	87
Figura 23 –	Análise histológica do tecido adiposo branco de camundongos adultos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	88
Figura 24 –	Conteúdo de IRS-1 no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	89
Figura 25 –	Conteúdo de IRS- β no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	90
Figura 26 –	Conteúdo de PI3K no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	91
Figura 27 –	Conteúdo de GLUT4 no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias.....	92
Figura 28 –	Conteúdo de pAMPK no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias.....	93
Figura 29 –	Respirometria de alta resolução do tecido adiposo branco de animais adultos.....	94
Figura 30 –	Produção de ATP do tecido adiposo branco de camundongos adultos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	95

Figura 31 – Expressão dos genes das enzimas LPL e FAS no tecido adiposo branco de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Adoçantes artificiais
AC	Acetil-Coa
AC	Adoçantes calóricos
PLAC	Proteína ligada ao Acil-CoA
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACC1	Acetil-CoA carboxilase 1
ACC2	Acetil-CoA carboxilase 2
ACCa	Acetil-CoA carboxilase a
ACCb	Acetil-CoA carboxilase b
Acessulfame K	Acessulfame de potássio
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido graxo
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGL	Ácido graxo livre
AgRP	Peptídeo agouti
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Adenosina monofosfato
AN	Adoçante natural
ANC	Adoçante não calórico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT2R	Receptor do tipo 2 de angiotensina
ATP	Adenosina trifosfato
ATP-CL	Adenosina trifosfato citratoliase
AVE	Acidente vascular encefálico
C/EBP α	Proteínas de ligação a potenciadores de CCAAT
CACT	Carnitina aciltranslocase
CCVD	Canal de cálcio voltagem-dependente

CD36	Codificador de proteína 36
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética do instituto de biologia Roberto Alcantara Gomes
CID-10	Código internacional de doenças 10
CoA	Coenzima A
COBEA	Colégio Brasileiro de Exeperimentação Animal
CpG	Regiões do DNA ricas em sequências dinucleotídicas
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase do tipo 1
CPT-2	Carnitina palmitoil transferase do tipo 2
CREB	Proteína de ligação do elemento de resposta do AMPc
CT	Comprimento da tibia
DAG	Diacilglicerol
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
dL	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Domínio curto rico em cisteína
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
DTM	Domínio transmembrana
DTV	domínio do trapézio de Vênus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDTA-free	Livre de ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGTA	Ácido egtálico
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FABP	Proteína de ligação a ácidos graxos
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FAS	Ácido graxo sintase

FAT	Translocador de ácido graxos
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXO1	Proteína 1
GABA _B	Receptores metabotrópicos transmembranares
GC	Grupo controle
GC-AG	Grupo controle água
GC-ST	Grupo controle Stevia
GDA	Grande domínio aminoterminal
GE	Gordura epididimal
GH	Grupo hiperalimentado
GH-AG	Grupo hiperalimentado água
GHSR	Receptor de grelina
GH-ST	Grupo hiperalimentado Stevia
GIP	Péptido insulínico dependente da glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
SGLT-1	Cotransportador sódio-glicose-
GLUT1	Transportador de glicose tipo 1
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
GV	Gordura visceral
HCL	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEPES	Agente tamponante químico
HOMA-IR	Índice de resistência à insulina
HRP	Estreptavidina-peroxidase
HSD	Hidroxiesteróide desidrogenase
HSL	Lipase hormônio-sensível
IDA	Ingestão diária aceitável
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina

IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IP3	Inositol trifosfato
IP ₃ -R	Inositol trifosfato receptor
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina tipo 1
Ir β	Receptor de insulina beta
JAK2	Janus quinase 2
JECFA	<i>Codex Alimentarius</i> , do <i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LHS	Lipase hormônio sensível
LPL	Lipoproteína lipase
Malonil-CoA	Malonil coenzima A
Mir05	Solução de Respirometria Mitocondrial 5
miRNA	Micro RNA
MR	Medidas repetidas
N	Número de animais por grupos
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF κ B	Nuclear kappa B
NP-40	Detergente comercial
NPY	Neuropeptídeos Y
OMS	Organização mundial de saúde
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PAI-1	Inibidor de atividade de plasminogênio 1
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
pAMPK	Proteína quinase ativada por AMP fosforilada
PCR	Proteína C reativa
PDH	Piruvato desidrogenase
PGC1 α	Coativador gama do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1

PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKB	Proteína quinase B
PLC- β 2	Fosfolipase C específica de fosfoinosítídeo beta
POF	Pesquisa de orçamento familiar
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PPAR α	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR γ	Receptor gamma ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR δ	Receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma
PTNG	Proteína G
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
PX1	Proteína panexina 1
PYY	Peptídeo YY
QM	Quilomicron
RAPGs	Receptores acoplados à proteína G
RCR	Razão do controle respiratório
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Retículo Endoplasmático
Rf	Ração fornecida
Ri	Ração ingerida
Ria	Radioimunoensaio
RM	Ressonância magnética
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SBEM	Sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>
SDS-PAGE	Variante da eletroforese em gel de poliacrilamida
SGLT-1	Co-transportadores de glicose dependentes de sódio
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervosos simpático
SOD	Enzima superóxido dismutase

SOP	Síndrome do ovário policístico
SREBP-1	Proteínas ligadoras de elementos reguladores de esterol tipo 1
STAT3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição tipo 3
STSRs	Receptores sensíveis ao sabor doce
T0	Tempo zero (antes da infusão de glicose)
T120	Tempo cento e vinte (após 120 minutos da infusão de glicose)
T1R2	Receptor de sabor tipo 1 membro 2
T1R3	Receptor de sabor tipo 1 membro 3
T30	Tempo trinta (após 30 minutos da infusão de glicose)
T60	Tempo sessenta (após 60 minutos da infusão de glicose)
T90	Tempo noventa (após 90 minutos da infusão de glicose)
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TASP	Tecido adiposo subcutâneo profundo
TASS	Tecido adiposo subcutâneo superficial
TAV	Tecido adiposo visceral
TG	Triglicerídeos
TITG	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNFR1	TNF- α -receptor-1
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
Tris	Trisaminometano
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TRPM5	Membro 5 da subfamília do canal catiônico do receptor transiente
TTBS	Mistura de solução salina tris-tamponada
UCP1	Proteína desacopladora do tipo 1
UCP2	Proteína desacopladora do tipo 2
VIGITEL	Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
α 1	Subunidade catalítica da AMPK

α -MSH	Hormônio estimulante de α -melanócito
β 1	beta adrenoceptor 1
β 2	beta adrenoceptor 2
14C	Carbono quatorze
3T3L1	Linhagem celular derivada de 3T3

LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	Quilogramas
m ²	Metros quadrados
Kg/m ²	Quilogramas por metro quadrado
%	Porcentagem
Mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilograma
ml	Mililitros
Ca ²⁺	Íons de cálcio
±	Mais ou menos
°C	Graus celsius
min/hora	Minutos por hora
H	Hora
g	Gramas
g/Kcal	Gramas por quilocalorias
N	Número de animais por grupo
Mm	Milímetros
ml/g	Mililitros por gramas
mg/ml	Miligramas por mililitros
Nm	Nanómetro
µUI/ml	Microunidades internacionais por mililitros
mmol/L	Milimol por litro
Pmol	Picomolar
Cm	Centímetros
g/kg	Gramas por quilogramas
pH	Potencial hidrogeniônico
g/l	Gramas por litros
O ₂	Oxigênio
Mm	Milimolar
µg/ml	Microgramas por mililitros
µl	Microlitros

μg	Microgramas
P	Probabilidade de significância
<	Menor
ml/kg	Mililitros por quilogramas
mg/g tec	Miligramas por grama de tecido
mg/dl	Miligramas por decilitros
α	Alfa
β	Beta
Γ	Gama
Δ	Delta
mm/mg	Milimolar por miligramas

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	21
1	JUSTIFICATIVA	62
2	OBJETIVOS	63
2.1	Geral	63
2.2	Específicos	63
3	MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.1	Animais e modelo experimental	64
3.2	Composição e obtenção do adoçante natural Stevia	67
3.3	Análise do ganho de peso corporal dos animais durante o crescimento	67
3.4	Consumo alimentar e hídrico	67
3.5	Ressonância magnética nuclear	68
3.6	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)	69
3.7	Eutanásia e coleta de tecidos	69
3.8	Análise dos parâmetros bioquímicos, plasmáticos e dosagem hormonal	70
3.9	Mensuração da gordura epididimal e fígado	70
3.10	Comprimento naso-anal e comprimento da tíbia	70
3.11	Análise histológica	70
3.12	Análise das proteínas através de western Blotting	71
3.12.1	<u>Lise do tecido adiposo branco</u>	71
3.12.2	Análise por Western Blotting.....	71
3.13	Análise da função mitocondrial por Respirimetria de Alta Resolução	72
3.13.1	<u>Obtenção do tecido adiposo epididimal permeabilizado</u>	72
3.13.2	<u>Respirimetria de alta resolução</u>	73
3.14	Determinação das concentrações de ATP	74
3.15	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	74
3.15.1	<u>Extração do RNA total</u>	74
3.15.2	PCR em tempo real.....	74
3.16	Análise estatística	75
4	RESULTADOS	76

4.1	Consumo alimentar semanal corrigido pela massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados até 180 dias de vida.....	76
4.2	Avaliação da ingestão hídrica semanal corrigida pela massa corporal de camundongos controles e hiperalimentados dos 90 até 180 dias de vida.....	77
4.3	Efeitos da hiperalimentação durante a lactação e do consumo de adoçante natural Stevia sobre a massa corporal de camundongos até 180 dias de vida.....	78
4.4	Massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 de vida.....	80
4.5	Porcentagem de gordura corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida.....	81
4.6	Porcentagem de massa magra dos grupos controle e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida.....	82
4.7	Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	83
4.8	Efeitos do consumo do adoçante natural Stevia sobre parâmetros metabólicos de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação aos 180 dias de vida.....	85
4.9	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	86
4.10	Análise histológica do tecido adiposo branco de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	87
4.11	Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de IRS-1 no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	89
4.12	Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de IR-β no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	90
4.13	Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de PI3K no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	91

4.14	Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	92
4.15	Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de pAMPK no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	93
4.16	Efeito do consumo do adoçante Stevia sobre o metabolismo de ácidos graxos no tecido adiposo branco de camundongos aos 180 dias de vida hiperalimentados durante a lactação.....	94
4.17	Efeito do consumo de Stevia sobre produção de ATP no tecido adiposo branco de camundongos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	95
4.18	Efeitos do consumo do adoçante natural Stevia sobre a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo energético.....	96
5	DISCUSSÃO	97
	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS	111
	ANEXO – Protocolo de extração dos glicosídeos de esteviol.....	130

INTRODUÇÃO

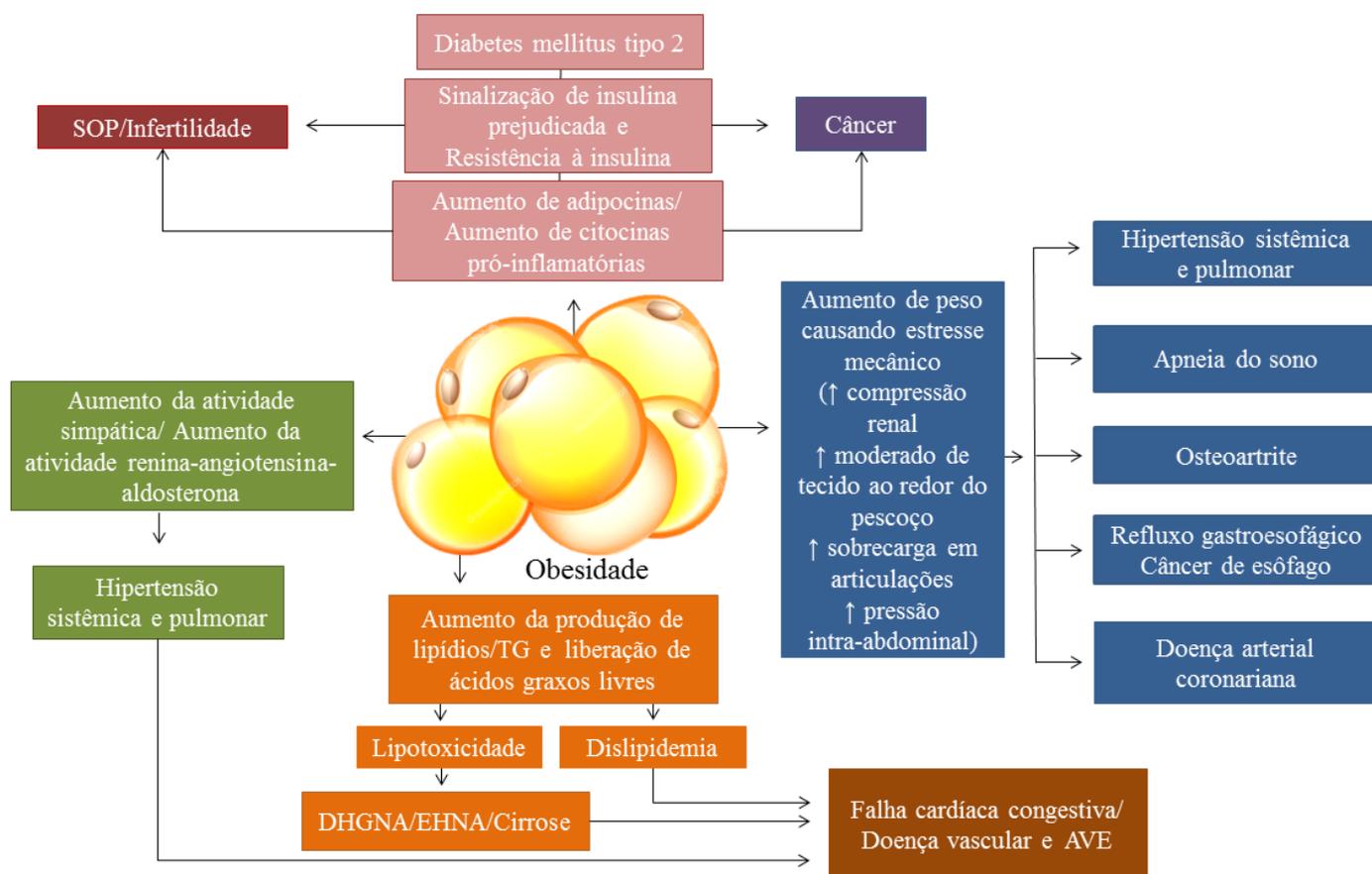
Obesidade

A obesidade é definida, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como um acúmulo excessivo de gordura corporal correlacionado com aumento de morbidade e diminuição da qualidade de vida do indivíduo. Dessa forma, acarreta prejuízos à saúde, tais como: metabolismo alterado do tecido adiposo, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, aumentando o risco de doenças potencialmente fatais, incluindo dislipidemias, doenças micro e macrovasculares, resistência à insulina, diabetes não-insulino-dependente (DM2), hipertensão arterial, dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos e distúrbios do aparelho locomotor (Figura 1) (RIBEIRO FILHO et al., 2006; HRUBY; HU, 2015; SEIDELL; HALBERSTADT, 2015; SONG et al., 2015; COLLINS; MENG; ENG, 2016; HARPER; ZISMAN, 2016; DIAS et al., 2017; OMS, 2017; MELLO et al., 2018; ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018).

Além das doenças já listadas, aproximadamente 15 mil dos 596 mil casos de câncer que foram estimados para 2016, estavam associados ao sobrepeso e à obesidade (INCA, 2016). Vasta evidência científica comprova que o excesso de peso está ligado a, pelo menos, 13 tipos distintos de câncer, como esôfago (adenocarcinoma), estômago (cárdia), pâncreas, vesícula biliar, fígado, intestino (cólon e reto), rins, mama (mulheres na pós-menopausa), ovário, endométrio, meningioma, tireoide e mieloma múltiplo (Figura 1) (KAHN; FLIER, 2000; PINHEIRO et al., 2004; BOEHM; CLAUDI-BOEHM, 2005; LÓPEZ-ALARCÓN; RODRÍGUEZ-CRUZ, 2008; QUEIROZ et al., 2009; GALLAGHER; LEROITH, 2015; ABENTE et al., 2016; MELO; PINHO, 2017; STRYJECKI; ALYASS; MEYRE, 2018; KILOV; KILOV, 2018; KUSHNER; SCOTT, 2018; TSAI et al., 2018).

Desta maneira, a obesidade, por si só, é considerada uma doença integrante do grupo de doenças crônicas não transmissíveis (UPADHYAY et al., 2018), categorizada na 10ª revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), no item de doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas, sendo E66 o código relativo à obesidade (CID10, 1992; DIAS et al., 2017). Dados da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, 2016), apontam que a perda de 5% a 10% do peso corporal pode ser capaz de reduzir a quantidade de casos de complicações provocadas por esta doença e, conseqüentemente, a mortalidade causada pelas mesmas.

Figura 1 – Processos através dos quais a obesidade leva à comorbidades



Legenda: SOP – síndrome do ovário policístico; DRGE – doença do refluxo gastroesofágico; DHGNA – doença hepática gordurosa não alcoólica; EHNA – esteato-hepatite não alcoólica; AVE – acidente vascular encefálico; TG – triglicerídeos;

Nota: Processos através dos quais a obesidade leva à comorbidades;

Fonte: Adaptado: UPADHYAY et al., 2018.

A obesidade não é decorrente somente da alta disponibilidade de alimentos calóricos, (LÓPEZ-ALARCÓN; RODRÍGUEZ-CRUZ, 2008; ABENTE et al., 2016; DIAS et al., 2017; UPADHYAY et al., 2018), sua etiologia é uma condição crônica e multifatorial complexa, difícil de ser definida (GRAHAM; MULLEN; WHELAN, 2015; HRUBY; HU, 2015; DIAS et al., 2017; UPADHYAY et al., 2018). De acordo com a literatura, é uma doença que envolve aspectos ambientais, interação entre genética e predisposição epigenética, nutrição, estilo de vida (PINHEIRO et al., 2004; COMPARE et al., 2016; UPADHYAY et al., 2018; ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018), qualidade e tempo de sono (THEORELL-HAGLÖW; LINDBERG, 2016), alteração na microbiota gastrointestinal (GRAHAM; MULLEN;

WHELAN, 2015) e, ainda, pode ser desenvolvida por aspectos psicológicos que resultam em lutas contínuas contra o excesso de peso por toda a vida (COLLINS; MENG; ENG, 2016).

Entretanto, a principal causa da obesidade é o desbalanço energético positivo (DIAS et al., 2017; HALL, 2018; MELLO et al., 2018), onde ocorre o desequilíbrio crônico entre o consumo de calorias e o gasto energético. Tal desequilíbrio é capaz de resultar em acúmulo excessivo de energia e disfunção do tecido adiposo, podendo levar o indivíduo ao estado de doença metabólica (SICHERI, 1998; ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018). Portanto, o Guia Alimentar para a População Brasileira (2014), orienta a redução do consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em gorduras e/ou açúcares e com baixo teor de nutrientes, haja vista que segundo o Ministério da Saúde, os padrões de alimentação, na maioria dos países, estão mudando, as pessoas estão diminuindo o consumo de alimentos considerados *in natura* – minimamente processados de origem vegetal – e aumentando a ingestão de produtos industrializados prontos para consumo causando, principalmente, desequilíbrio na oferta de nutrientes e ingestão excessiva de calorias (BRASIL, 2014).

O diagnóstico de sobrepeso e obesidade vem sendo realizado por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), representado por: $IMC = \text{massa corporal (kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$. Através desse método de avaliação física é possível classificar indivíduos adultos como obesos, quando apresentam IMC igual ou superior a 30 kg/m² (PINHEIRO et al., 2004; COLLINS; MENG; ENG, 2016; HARPER; ZISMAN, 2016; DIAS et al., 2017; UPADHYAY et al., 2018). Segundo Kilov (2018), IMC superior a 40 kg/m² (obesidade extrema ou grave) é capaz de reduzir a expectativa de vida em 10 anos. Embora seja bastante utilizado, o IMC apresenta baixa especificidade, visto que não leva em consideração a ampla variação que ocorre na composição corporal de indivíduos. Sendo assim, não é avaliado como o melhor meio para determinar composição corporal e identificar risco elevado de saúde, uma vez que esses parâmetros são de extrema importância para o diagnóstico do estado nutricional (PINHEIRO et al., 2004; ORTEGA; LAVIE; BLAIR, 2016; DIAS et al., 2017; RYAN; KAHAN, 2018).

Acredita-se que o principal problema do excesso de peso seja a adiposidade abdominal, pois esta representa excesso de gordura visceral (GV) metabolicamente ativa, que envolve os órgãos e está associada à desregulação metabólica, predispondo os indivíduos à doença cardiovascular e condições relacionadas (HRUBY; HU, 2015). De tal forma, foi proposto que a circunferência abdominal, por si só, seja um bom indicador de riscos à saúde e, de certo, mais eficaz que o IMC (SEIDELL; HALBERSTADT, 2015). Uma vez que a OMS estabelece que a medida igual ou superior a 94 cm em homens e 80 cm em mulheres indica risco de doenças ligadas ao coração (OMS, 2017).

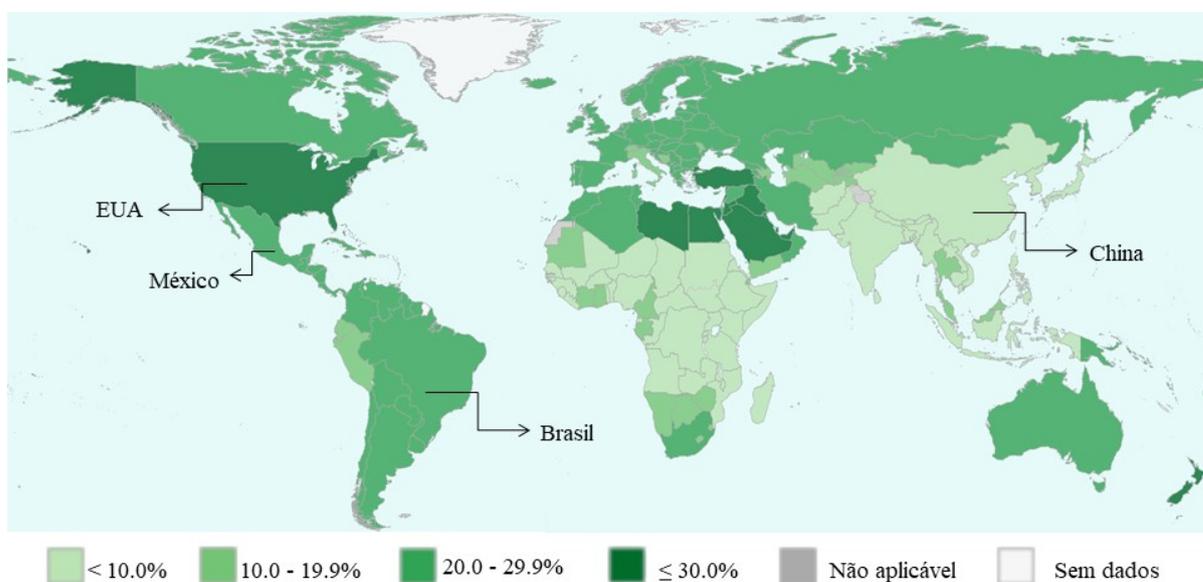
A obesidade é considerada como a maior desordem nutricional de proporção pandêmica, devido ao aumento da sua incidência nos últimos 60 anos sendo, assim, um problema mundial de saúde pública (LÓPEZ-ALARCÓN; RODRÍGUEZ-CRUZ, 2008; DE ANDRADE; PEREIRA; SICHIERI, 2010; FINUCANE et al., 2011; MARRA; BARBOSA; SICHIERI, 2011; GRAHAM; MULLEN; WHELAN, 2015; MELLO et al., 2018). Desde 1980, a prevalência de obesidade aumentou acentuadamente em todo o mundo (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015; OHKUMA; HIRAKAWA; NAKAMURA, 2015; SEIDELL; HALBERSTADT, 2015; ABENTE et al., 2016; COMPARE et al., 2016; DIAS et al., 2017; MELLO et al., 2018; KILOV; KILOV, 2018; KUSHNER; SCOTT, 2018; STRYJECKI; ALYASS; MEYRE, 2018) e nos últimos 50 anos nenhum país mostrou redução desta doença (HRUBY; HU, 2015; ORTEGA; LAVIE; BLAIR, 2016; UPADHYAY et al., 2018). Alguns países de renda elevada, apresentaram estatísticas estabilizadas, mas o mesmo não ocorreu nos países mais pobres (SEIDELL; HALBERSTADT, 2015).

Segundo a OMS, atualmente, a obesidade afeta mais de um terço da população mundial. Existem no mundo mais de um bilhão de adultos com excesso de peso e, pelo menos, 300 milhões destes são obesos (Figura 2) (LÓPEZ-ALARCÓN; RODRÍGUEZ-CRUZ, 2008; COMPARE et al., 2016). Se a tendência de aumento permanecer, a projeção estimada para 2025, é de que cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos (OMS, 2017). Estima-se, ainda, que em 2030, 38% da população adulta do mundo tenha excesso de peso e outros 20% sejam obesos. Especificamente nos Estados Unidos (EUA), essa porcentagem pode chegar à 85% dos adultos com excesso de peso, neste mesmo período. Além disso, a prevalência de obesidade nos países em desenvolvimento continua apresentando uma tendência elevada, em direção aos níveis dos EUA (GRAHAM; MULLEN; WHELAN, 2015; HRUBY; HU, 2015), com exceção do Japão e China que, apesar de serem desenvolvidos, não apresentam epidemia da obesidade, com menos de 5% da população acima do peso (ORTEGA; LAVIE; BLAIR, 2016). Os índices de obesidade em países latino americanos, como o México, são de 18% em homens e 28,1% em mulheres, já nos EUA, os homens apresentam 31% de obesidade e as mulheres 33,2%, na Inglaterra, homens apresentam 22,3% e mulheres 23% (Figura 2) (LÓPEZ-ALARCÓN; RODRÍGUEZ-CRUZ, 2008; COLLINS; MENG; ENG, 2016).

No Brasil, a situação também é alarmante, a obesidade vem crescendo cada vez mais e, de acordo com os dados nacionais, constatou-se que mais de 50% da população está acima do peso. O sobrepeso no país também aumentou nos últimos dez anos, em 2006, 42,6% da população apresentava sobrepeso, já em 2016, esse valor passou para 53,8%, sendo mais

prevalente em homens, pessoas com mais idade e de menor escolaridade (POF, 2008-2009; VIGITEL, 2017). Atualmente, o país apresenta aumento na incidência de sobrepeso e obesidade em todas as faixas etárias, em ambos os sexos e em todos os níveis de renda, no entanto, esse aumento é significativamente maior nas populações com renda familiar reduzida (Figura 2) (PINHEIRO et al., 2004; SEIDELL; HALBERSTADT, 2015; DIAS et al., 2017).

Figura 2 – Prevalência da obesidade em 2016, entre adultos, maiores de 18 anos e de ambos os sexos



Legenda: EUA – Estados Unidos da América; < – menor; % - porcentagem; ≤ – maior ou igual;
 Nota: Prevalência da obesidade no mundo em 2016;
 Fonte: Adaptado: OMS, 2017.

A crescente prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil e no mundo tem contribuído para a elevação da morbimortalidade. Em 2015, o IMC elevado contribuiu para 4,0 milhões de mortes no mundo, o que representou 7,1% das mortes por qualquer causa (KUSHNER; SCOTT, 2018) e, conseqüentemente, acarretou maiores custos para os setores relacionados aos serviços de saúde e àqueles indiretamente relacionados ao impacto sobre a qualidade de vida e produtividade. Como todos esses fatores têm conseqüências econômicas relevantes, a obesidade tem se tornado um problema de saúde pública com forte impacto na economia do país (ATELLA et al., 2015). O custo global com obesidade, e complicações causadas pela mesma, chega a ser mais de 2 trilhões de dólares, ou 2,8% do PIB global (HARPER; ZISMAN, 2016; UPADHYAY et al., 2018; KUSHNER; SCOTT, 2018). A

obesidade é um dos principais encargos sociais globais, sendo apenas superada pelo tabagismo, violência armada, guerra e terrorismo (KUSHNER; SCOTT, 2018).

Apesar da epidemia da obesidade ser global, estudos mostram que alguns grupos étnicos apresentam maior susceptibilidade a expressar o fenótipo de obesidade, como os afro-americanos e hispânicos. Evidências científicas sugerem que o fator genético é responsável por cerca de 40% dos casos de obesidade (LÓPEZ-ALARCÓN; RODRÍGUEZ-CRUZ, 2008). Acredita-se que a obesidade estabelecida na idade adulta seja um processo prospectivo com início da infância. Diante do exposto, sugere-se que alterações nutricionais no ambiente intrauterino e pós-natal podem ser consideradas essenciais para o desenvolvimento da obesidade e, também, no comprometimento de diferentes órgãos centrais e periféricos, levando a uma comorbidade associada ao ganho de peso e à síndrome metabólica (SM) (Figura 3) (JAMES et al., 2004; HABBOUT et al., 2013).

Programação metabólica e obesidade

A programação metabólica é definida como a influência de mudanças no padrão fisiológico ou ambiental, ocorridas em períodos críticos da vida que podem trazer consequências duradouras ou permanentes, provocando alterações nos processos fisiológicos e, até mesmo, dando origem à doenças (LUCAS, 1991; BARKER, 1995; HABBOUT et al., 2013). O período de desenvolvimento que vai desde o pré-concepcional até a primeira infância (1000 dias pós-natal) é o período da vida em que a atividade de imprinting do DNA é mais ativa. As alterações epigenéticas têm efeitos duradouros sobre a expressão gênica e são frequentemente induzidas pelo ambiente (SIMEONI et al., 2014).

Estudos demonstram que alterações nutricionais no período pré-concepcional, gestacional, pós-natal e durante a lactação, causam modificações metabólicas importantes que levam ao surgimento da obesidade (SRINIVASAN et al., 2003; ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005; REILLY et al., 2005; TAYLOR, POSTON, 2007; SIMEONI et al., 2014; ELLSWORTH et al., 2018; LI et al., 2018; MILLIKEN-SMITHA; POTTER, 2018). Por possuir características mais probabilísticas que determinísticas, o termo programação metabólica tem sido descrito como plasticidade ontogenética (GLUCKMAN; HANSON, 2007).

Um dos principais fatores de risco para obesidade da prole é o estado nutricional dos pais, onde o risco de obesidade da criança é 2,5 a 4 vezes maior, se um dos pais for obeso e 10 vezes maior, se ambos os pais forem obesos, comparados a pais com IMC caracterizados

como eutróficos. Tal aumento de risco pode ser explicado tanto por hábitos obesogênicos compartilhados entre a família, quanto por fatores genéticos transmitidos para os filhos (REILLY et al., 2005; STRYJECKI; ALYASS; MEYRE, 2018). No entanto, estudos mostram que a genética apresenta maior impacto sobre o peso corporal do que o ambiente (HINNEY; VOGEL; HEBEBRAND, 2010; STRYJECKI; ALYASS; MEYRE, 2018). O estado nutricional, pré-concepcional dos pais, pode programar alterações metabólicas na prole (MILLIKEN-SMITHA; POTTER, 2018). Segundo Li et al. (2018), alimentar ratos machos com dieta hiperlipídica antes do acasalamento foi capaz de prejudicar a tolerância à glicose na prole feminina.

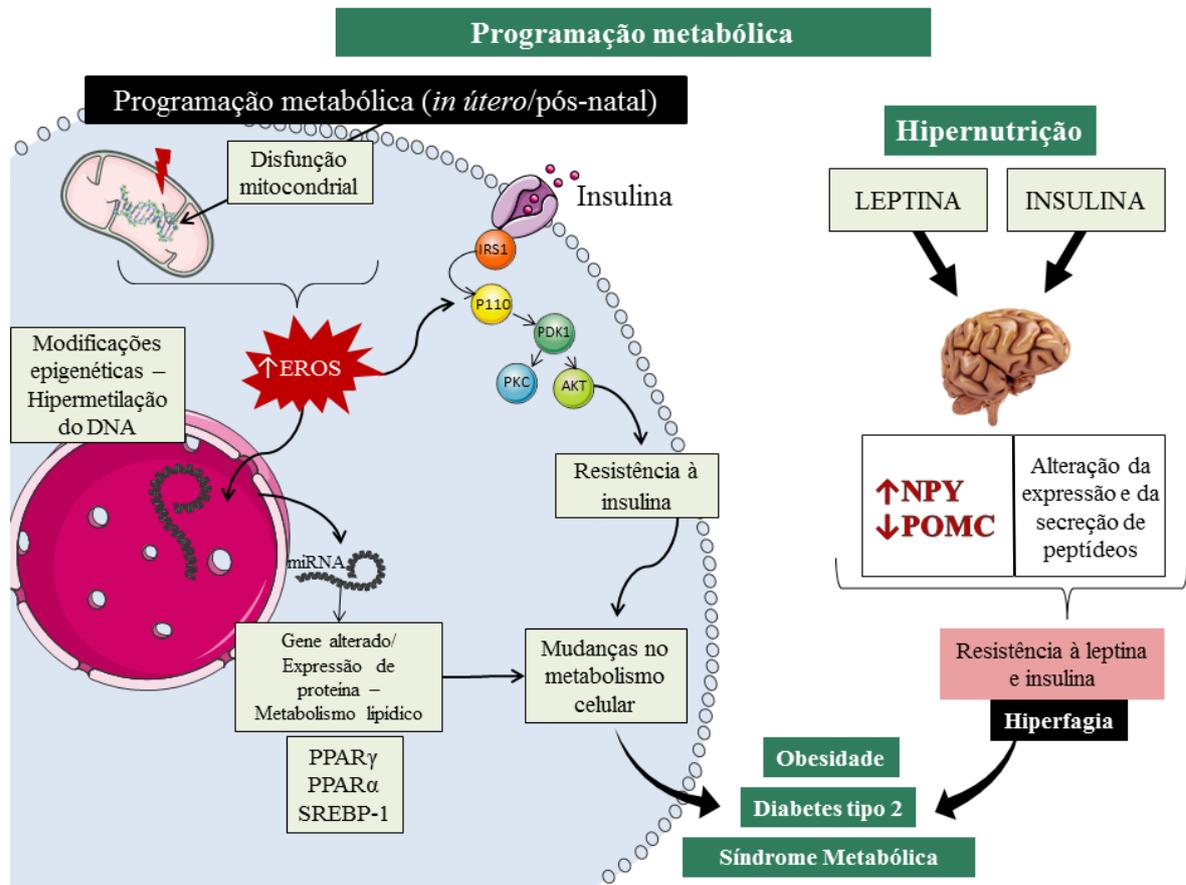
O ambiente onde o embrião e o feto se desenvolvem também é capaz de induzir alterações fenotípicas a longo prazo. Desta forma, a qualidade do ambiente de desenvolvimento em que os fetos e embriões são expostos é capaz de induzir mudanças no fenótipo das crianças ao longo da vida, tanto em termos morfológicos quanto metabólicos (LILLYCROP; BURDGE, 2011).

Gestantes obesas possuem menor adaptação às alterações metabólicas da gestação favorecendo, desta maneira, o surgimento de intercorrências como a dislipidemia gestacional (NASCIMENTO et al, 2018). Hillier e colaboradores (2007), através de uma análise de estudo populacional multiétnico dos Estados Unidos, verificaram que o aumento da glicemia durante o período gestacional está associado com aumento do risco de desenvolvimento da obesidade infantil, sugerindo que a programação metabólica ocorrida durante o período gestacional poderia levar ao desenvolvimento da obesidade no futuro. Por sua vez, a exposição à obesidade materna também é capaz de induzir alterações fisiológicas no tecido adiposo branco (TAB) da prole (ALFARADHI; OZANNE, 2011; ELLSWORTH et al., 2018). Proles de mães obesas demonstraram hipertrofia dos adipócitos e aumento da expressão do PPAR γ , assim como, redução da expressão dos adrenoreceptores β 2 e β 3, indicativo de aumento na regulação da lipogênese e diminuição da lipólise. O acúmulo de triglicerídeos no fígado também está associado a modelos de hipernutrição materna (SAMUELSSON et al., 2008). Shankar e colaboradores (2010) observaram que a hipernutrição materna altera a regulação de genes envolvidos na biossíntese de lipídios hepáticos, como a redução da SREBP-1 e redução da expressão do PPAR α .

Alguns estudos demonstram a associação de marcadores do estresse oxidativo com a obesidade, resistência à insulina e diabetes, pela interferência na sinalização da insulina (URAKAWA et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2007). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pode ser o evento que precede o início da resistência à insulina e obesidade

em resposta à nutrição materna, como a elevação de genes associados com o estresse oxidativo na placenta de mães obesas e no músculo esquelético de fetos (RADAELLI et al., 2003; YAN et al., 2015). Estes dados sugerem que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo associado às alterações na expressão de genes, resistência à insulina e, subsequentemente, alterações no fenótipo metabólico (Figura 3) (ALFARADHI; OZANNE, 2011).

Figura 3 – Potenciais mecanismos envolvidos na programação materna e pós-natal



Legenda: EROS – espécies reativas de oxigênio; miRNA – microRNA; NPY – neuropeptídeo Y; POMC – gene própiomelanocortina; PPAR γ – receptores ativados por proliferador de peroxissoma; PPAR α – receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; SREBP-1 – proteínas de ligação ao elemento de regulação do esterol; PI3K – enzima fosfatidilinositol-3-cinase; AKT/ PKB – proteína quinase B;

Nota: Mecanismos envolvidos na programação materna e pós-natal, causando obesidade, diabetes do tipo 2 e síndrome metabólica;

Fonte: Adaptado: ALFARADHI; OZANNE, 2011.

Inúmeros mecanismos fisiológicos e metabólicos não estão completamente desenvolvidos ao nascimento e estes processos de maturação continuam logo após esse

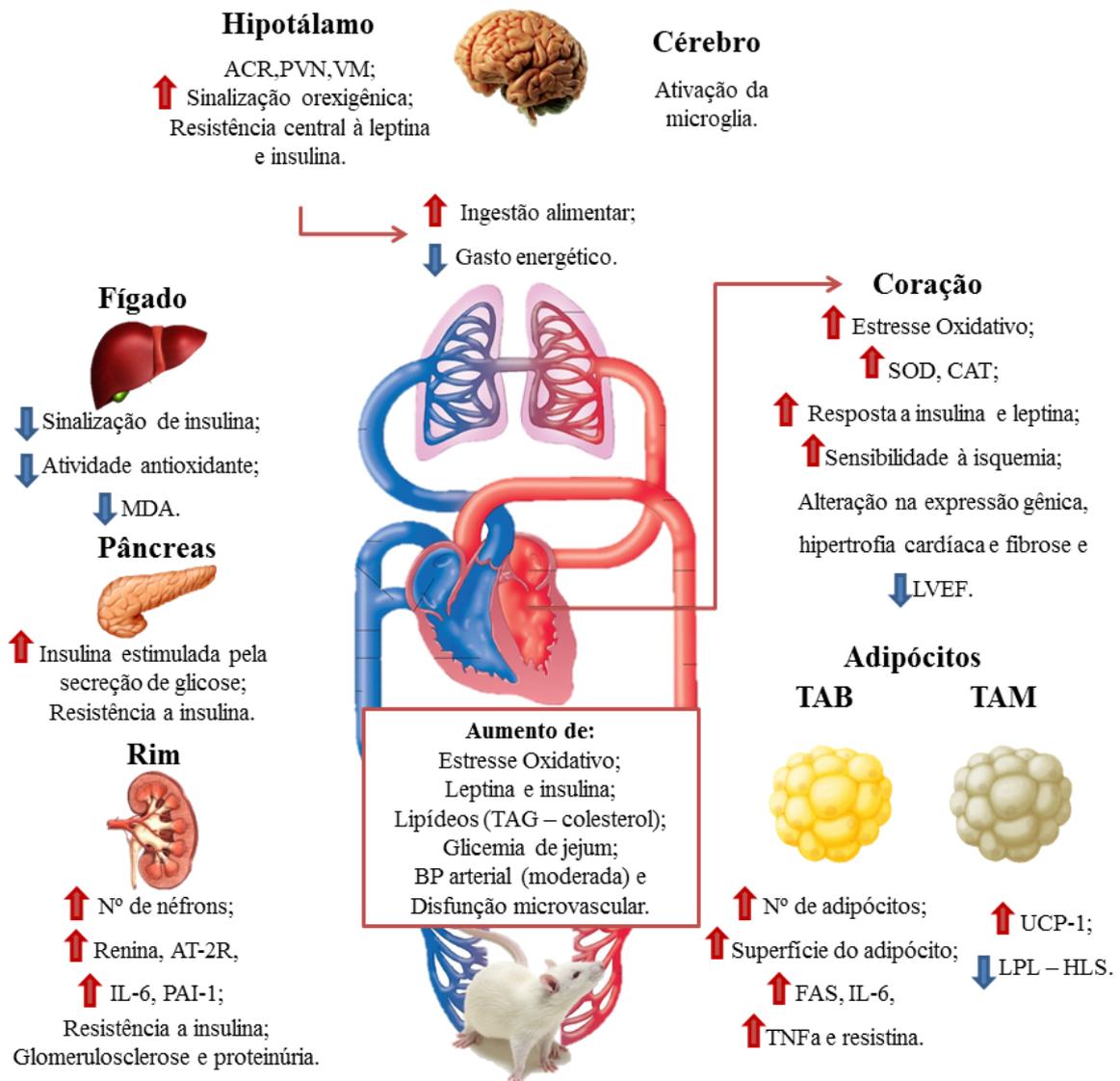
período (GLUCKMAN; HANSON, 2007). Estudos com roedores demonstraram que até o 16º dia de vida pós-natal, o circuito neuronal não está totalmente maduro (LILLYCROP; BURDGE, 2011). O período pós-natal também é conhecido como “janela crítica para a programação”, onde o desenvolvimento da prole ainda pode ser influenciado, por se caracterizar como um período de contínuo crescimento e desenvolvimento (ALFARADHI; OZANNE, 2011; ELLSWORTH et al., 2018). Desta forma, inúmeros estudos suportam a hipótese de que alterações nutricionais e hormonais durante o período gestacional e pós-natal podem induzir modificações metabólicas a longo-prazo e aumentar a susceptibilidade a doenças metabólicas na vida adulta (MOURA et al., 1997; GARCIA-SOUZA et al., 2008; TREVENZOLI et al., 2010; LISBOA et al., 2012; FIDALGO et al., 2013; ELLSWORTH et al., 2018). Modelos animais de hipernutrição durante a lactação acarretam em aumento de peso que pode variar de 10 a 40% (ELLSWORTH et al., 2018). Plagemann e colaboradores (1992) descreveram o modelo de redução de ninhada durante o período da lactação. Eles demonstraram que a redução da ninhada no terceiro dia de vida era capaz de promover aumento da adiposidade, desenvolvimento de hiperleptinemia e hipertensão em ratos adultos alimentados com dieta comercial padrão após o desmame (Figura 4).

O modelo de hipernutrição durante o período da lactação já está bem estabelecido em nosso grupo. Ao longo dos últimos anos, demonstramos que animais hipernutridos durante a lactação apresentam alterações na fisiologia que são prejudiciais a longo prazo, como aumento da secreção de insulina e dos níveis de GLUT-2 nas ilhotas pancreáticas, hipertrofia do ventrículo esquerdo com prejuízo na sinalização da insulina, alteração da sinalização da grelina via GHSR/PI3K e AKT no coração (Figura 4) (MARTINS et al., 2008; CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; LACERDA-MIRANDA et al., 2012), alterações na hemodinâmica cardíaca e deposição de colágeno (VIEIRA et al., 2015) em proles na idade jovem e/ou adulta (120 dias) (BERNARDO et al., 2016), prejuízo na via de sinalização da insulina em adipócitos de ratos (RODRIGUES et al., 2007), e hipogrelinemia, acompanhada de aumento da regulação da via de sinalização de grelina no TAB de camundongos jovens (SOARES et al., 2012).

O desenvolvimento da hiperfagia no período da lactação (CUNHA et al., 2009) e na idade adulta (RODRIGUES et al., 2011), observada na prole de mães obesas e em proles hiperalimentadas no início da vida, sugerem alterações persistentes nas vias de sinalização que controlam a ingestão alimentar e gasto energético através da síntese de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo, integrando-os com sinais periféricos do estado

nutricional. A desregulação na expressão hipotalâmica desses neuropeptídeos está associada com a obesidade (Figura 3) (ALFARADHI; OZANNE, 2011).

Figura 4 – Efeitos fisiopatológicos da hiperalimentação durante a lactação em roedores
 Legenda: TAG – triglicerídeos; TAB – tecido adiposo branco; TAM – tecido adiposo marrom; UCP-1 –



proteína desacopladora do tipo 1; LPL – lipoproteína lipase; LHS – lipase hormônio sensível; FAS – ácido graxo sintase; TNF- α – fator de necrose tumoral; IL-6 – interleucina 6; AT2R – receptor do tipo 2 de angiotensina; PAI-1 – inibidor-1 do ativador do plasminogênio;

Nota: Efeitos da hiperalimentação durante a lactação sobre os principais tecidos dos roedores;

Fonte: Adaptado: HABBOUT et al, 2013.

A regulação da alimentação a longo e curto prazo é exercida pelos níveis circulantes de grelina, leptina e insulina. A leptina, hormônio produzido nos adipócitos, tanto de seres humanos quanto de roedores, age como fator de sinalização no tecido adiposo e no sistema

nervoso central (SNC), reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético, através da inibição dos neurônios orexigênicos produtores de NPY/AgRP e ativação dos neurônios anorexigênicos produtores de α -MSH (EGUCHI et al., 2008). No modelo de hipernutrição por redução de ninhada, foi descrito que animais jovens (21 dias) apresentam hiperleptinemia (PEREIRA et al., 2006; PLAGEMANN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011), apesar de não apresentarem alteração no conteúdo de Ob-R e na via de sinalização da leptina hipotalâmico (RODRIGUES et al., 2011). Na idade adulta esses animais apresentam resistência à hipotalâmica leptina, caracterizada pela redução no conteúdo de JAK2 e menor fosforilação de STAT3, principais proteínas envolvidas na via de sinalização da leptina. Apesar da redução da sensibilidade à leptina, os animais adultos não apresentam alterações nos níveis plasmáticos de leptina e no conteúdo de Ob-R (Figura 4) (RODRIGUES et al., 2011).

Por sua vez, a insulina também apresenta papel neurotrófico na regulação da ingestão alimentar e demonstrou envolvimento na formação de sinapse, morfogênese dendrítica e plasticidade (ALFARADHI; OZANNE, 2011). Além disso, a insulina apresenta feedback negativo sobre os neurônios do núcleo arqueado (predominantemente nos neurônios NPY e AgRP), emitindo um sinal de saciedade. Este efeito é reduzido no período pós-natal em ratos hiperalimentados, sugerindo resistência à insulina induzida durante o desenvolvimento da prole e que persiste na vida adulta (DAVIDOWA, PLAGEMANN, 2007).

Todos estes achados demonstram que o período gestacional e pós-natal tem papel crítico na indução do desenvolvimento da obesidade. Neste campo, existem evidências de que processos epigenéticos são mecanismos pelos quais a nutrição no início da vida pode aumentar a susceptibilidade à obesidade na idade adulta (Figura 3). O termo epigenética significa “além da genética” e refere-se aos processos que induzem alterações hereditárias na expressão do gene sem alterar a sequência de nucleotídeos (LILLYCROP; BURDGE, 2011). Os três principais processos epigenéticos são: metilação, desmetilação do DNA e modificações das histonas e de RNAs não-codificantes, tais mecanismos regulam a expressão do gene sem alterar a sequência do DNA. Os genes podem ser *up* ou *down* regulados de acordo com as influências que recebe, normalmente a metilação do DNA promove regulação negativa e a desmetilação, regulação positiva do gene. Os grupos metila envolvidos no processo de metilação, bem como vários cofatores das enzimas correspondentes (DNA-metiltransferases) se originam tipicamente no ambiente nutricional (SIMEONI et al., 2014).

A metilação do DNA está relacionada ao silenciamento de genes que normalmente ocorre nas ilhas CpG (nucleotídeos de citosina e guanina ligados por fosfato) que estão

associadas aos promotores gênicos (LILLYCROP; BURDGE, 2011). Os desreguladores endócrinos afetam, marcadamente, os pequenos RNAs não-codificantes, como micro-RNAs, que são capazes de interferir no mRNA e afetar a síntese de proteínas (SIMEONI et al., 2014).

As alterações epigenéticas não afetam a sequência de DNA do gene, mas são preservadas ao longo do processo da mitose, e podem ser transmitidas transgeracionalmente ao longo de várias gerações. Os gametas maternos e paternos podem carregar marcas epigenéticas pré-adquiridas que serão preservadas no epigenoma da prole em desenvolvimento (SIMEONI et al., 2014).

As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente, como o tipo de alimentação. Animais submetidos à hipernutrição no início da vida apresentam hipermetilação da pró-opiomelanocortina (POMC), um gene essencial para a regulação do peso corporal que resulta em alterações na homeostase do apetite e de energia e aumento da prevalência da obesidade na vida adulta (PLAGEMANN et al., 2009). A hipermetilação do receptor de insulina hipotalâmico também foi observada na prole com ninhada reduzida, acarretando em resistência à insulina hipotalâmica, hiperfagia e obesidade em ratos jovens (PLAGEMANN et al., 2010).

Tecido adiposo branco

Para melhor compreensão da relação entre obesidade e suas complicações crônicas, torna-se necessário explorar diversos aspectos, levando em consideração o tecido adiposo e sua unidade celular, o adipócito, como sendo o núcleo dessa fisiopatologia.

O tecido adiposo é um regulador crítico da homeostase energética, atuando como reservatório calórico. Existem dois tipos principais de tecido adiposo: tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). Os dois tecidos são distintos no que diz respeito à funcionalidade, níveis morfológicos e moleculares (ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018).

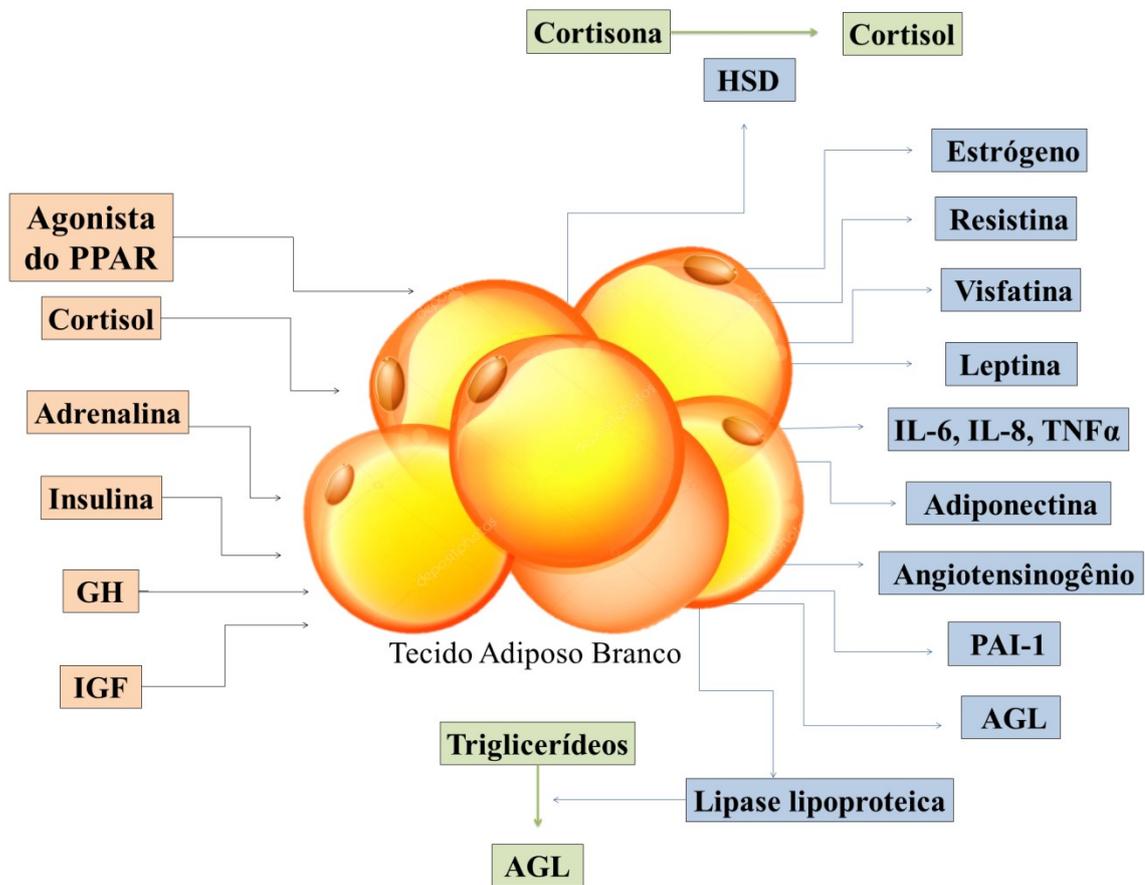
O TAB é um órgão endócrino que, durante o seu desenvolvimento, é formado a partir de células mesenquimatosas, os lipoblastos, que apresentam múltiplas gotículas lipídicas em seu citosol. Contudo, à medida que amadurece as múltiplas gotículas lipídicas se coalescem formando uma única inclusão citosólica, que ocupa todo o citosol da célula, correspondendo de 80% a 95% da massa celular (PINTO, 2014) sendo assim, o TAB maduro é denominado como tecido adiposo unilocular, pois contém gotículas lipídicas grandes e únicas, sendo capaz de estocar energia excedente, principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG), ao passo que o TAM é caracterizado por gotículas lipídicas multiloculares e elevado conteúdo

mitocondrial, capaz de dissipar energia na forma de calor (termogênese). A nível molecular, C/EBP α e C/EBP β foram identificados como reguladores da diferenciação do TAB e TAM, respectivamente (ABENTE et al., 2016; ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018).

O tecido adiposo branco possui distribuição generalizada pelo organismo, envolvendo e infiltrando-se por quase toda a região subcutânea, órgãos e vísceras da cavidade abdominal. Neste contexto, o TAB é descrito como o principal reservatório de energia do organismo, desempenhando um papel importante na regulação da homeostase energética, como sensibilidade à insulina, controle do apetite, balanço energético, imunidade, angiogênese, pressão arterial e metabolismo lipídico, através de proteínas bioativas, secretadas pelos adipócitos, as citocinas, que são chamadas de adipocinas (ou adipocitocinas). O TAB contém matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (JENSEN, 1997; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; FISCHER-POSOVSZKY; WABITSCH; HOCHBERG, 2007; PINTO, 2014; ABENTE et al., 2016).

Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios em forma de TAG, no citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triacilgliceróis em períodos que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los, através da lipólise, quando há déficit calórico, gerando assim substratos para o metabolismo energético através da β -oxidação. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais, dependentes das necessidades energéticas do indivíduo (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; BÓDIS; RODEN, 2018). Atualmente, sabe-se que os adipócitos recebem influência de diversos sinais, como a insulina, cortisol e catecolaminas, e, em resposta, expressam e secretam uma ampla variedade de moléculas bioativas, que atuam a nível local (autócrina e/ ou parácrina) e sistêmico (endócrino), algumas destas são: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fatores de crescimento, adiponectina, resistina, leptina, inibidor de atividade de plasminogênio 1 (PAI-1) e lipoproteína lipase (LPL) (Figura 5). As adipocinas liberadas pelos adipócitos possuem capacidade de atuar como um sinal auto-regulador e regulador do metabolismo de outros tecidos e, por vezes, correlaciona-se com diabetes, sensibilidade à insulina, e ainda atuam como imunoreguladores (KERSHAW; FLIR, 2004; RIBEIRO FILHO et al., 2006; GOOSSENS, 2008; MELLO et al., 2018).

Figura 5 – Representação esquemática do tecido adiposo como um órgão endócrino



Legenda: PPAR – receptores ativados por proliferador de peroxissoma; GH – hormônio do crescimento; IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; AG – ácidos graxos livres; PAI-1 – inibidor de atividade de plasminogênio 1; IL – interleucina; TNF – fator de necrose tumoral; HSD – hidroxisteróide desidrogenase;

Nota: Moléculas bioativas, expressas e secretadas pelos adipócitos, atuando a nível local (autócrina e/ ou parácrina) e sistêmico (endócrino);

Fonte: Adaptado: RIBEIRO FILHO et al, 2006.

A obesidade é capaz de modificar a produção de adipocinas. O aumento excessivo do número de adipócitos e do tecido adiposo, propriamente dito, é capaz de prejudicar o fluxo sanguíneo e causar, conseqüentemente, hipóxia, que está relacionada à necrose e infiltração de macrófagos neste tecido. Os macrófagos, quando infiltrados no TAB, formam estruturas que cercam os adipócitos, levando à superprodução de adipocinas, que incluem mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6. A nível sistêmico, a secreção alterada de adipocinas pode acarretar em aumento da ingestão de alimentos e redução do

gasto energético por meio do hipotálamo, bem como diminuição da sensibilidade à insulina a nível muscular e hepático (MELLO et al., 2018).

Desta maneira, a obesidade pode ser vista como uma inflamação crônica de baixo grau, detectada pela elevação de marcadores inflamatórios e citocinas, e pela presença de macrófagos infiltrados no TAB. Esta inflamação se expande tornando-se uma inflamação sistêmica que contribui para o início e progressão de distúrbios metabólicos associados, como a resistência à insulina, DM2, hiperlipidemias e aterosclerose (MELLO et al., 2018).

O acúmulo de lipídios leva à hipertrofia dos adipócitos, que induz a ativação de vias pró-inflamatórias, especialmente pelo fator nuclear kappa B (NFκB). Além de aumentar o número de macrófagos, a obesidade induz um estado pró-inflamatório destas células. Desta forma, os macrófagos ativados secretam adipocinas pró-inflamatórias de maneira abundante (MELLO et al., 2018).

O TNF- α , é uma citocina que, inicialmente, foi relacionada à caquexia, no entanto hoje tem sido associada à fisiopatologia da obesidade e resistência à insulina, haja vista que, estudos têm demonstrado que o aumento da expressão do TNF- α em indivíduos obesos favorece a sensibilidade à insulina. Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos e parece ser um importante contribuinte para a desregulação de adipocinas nos adipócitos. Indivíduos obesos produzem adipocinas em maior quantidade, em resposta ao TNF- α . Esta hiperresponsividade é mediada pelo TNF- α -receptor-1 (TNFR1) e pela hiperativação da via NFκB. O TNF- α induz a liberação de ácidos graxos através da lipólise. Os ácidos graxos saturados, por sua vez, ligam-se ao receptor do tipo Toll 4 (TLR4) na superfície de adipócitos e macrófagos, e ativam a sinalização NFκB, aumentando a produção de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 (PINTO, 2014).

No tecido adiposo, o TNF- α causa os seguintes efeitos genéticos: a) supressão de genes relacionados à síntese de proteínas responsáveis pelo armazenamento de ácidos graxos não esterificados e na captação de glicose; b) repressão de genes relacionados à transcrição de fatores ligados à adipogênese e lipogênese, ao mesmo tempo em que modifica a expressão de diversos fatores liberados por adipócitos, tais como adiponectina e IL-6. O TNF- α também pode interferir na sinalização da insulina de forma indireta, já que promove aumento da concentração sérica de ácidos graxos não esterificados (PINTO, 2014).

Além disso, o consumo de determinados alimentos, por si só, pode ter um efeito imediato na circulação de marcadores inflamatórios, uma vez que após a ingestão de uma refeição rica em gordura é identificado um aumento transitório destes marcadores na circulação sanguínea. Elgazar-Carmon e colaboradores (2008) demonstraram que uma dieta

rica em gordura está relacionada com a infiltração de neutrófilos no TAB de camundongos, por tal motivo, a dieta mais amplamente estudada atualmente com intuito de indução da inflamação, é a dieta rica em ácidos graxos saturados.

A leptina, produzida principalmente pelo tecido adiposo branco (PINTO, 2014). Age de maneira endócrina (SALTIEL; KAHN, 2001). Estudos demonstraram que animais incapazes de produzir leptina são três vezes mais obesos que animais que produzem tal adipocina (PINTO, 2014).

Os níveis circulantes de leptina correlacionam-se positivamente com a quantidade de gordura corporal, sendo assim, indivíduos obesos apresentam hiperleptinemia, sugerindo uma condição de resistência tissular à leptina. Tal aumento é atribuído a modificações no receptor de leptina ou, ainda, a deficiência no sistema de transporte na barreira hematoencefálica, denominado resistência à leptina (SALTIEL; KAHN, 2001; PINTO, 2014). Glicocorticóides, estrógenos, citocinas inflamatórias e quadros de infecção aguda aumentam os níveis de leptina, enquanto que baixas temperaturas, estimulação adrenérgica, hormônio do crescimento, hormônios tireoidianos, esteróides androgênicos, melatonina e o tabagismo parecem diminuir os níveis de leptina. A insulina apresenta relação diretamente proporcional com os níveis de leptina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A adiponectina, também conhecida como AdipoQ ou Acrp30, é um hormônio produzido pelo tecido adiposo branco e em 1995 foi descrita como a proteína mais abundante do TAB, expressa exclusivamente em adipócitos diferenciados. A concentração plasmática de adiponectina apresenta relação inversamente proporcional com adiposidade, resistência à insulina e doenças cardiovasculares (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; PINTO, 2014). Estudos demonstram que o tratamento agudo com adiponectina em camundongos foi capaz de reduzir a resistência à insulina, ácidos graxos livres no plasma, conteúdo de TAG do músculo e fígado, além de aumentar a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e do gasto energético (YAMUCHI et al, 2001). Modificações em adipócitos maduros (diâmetro e volume) ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas – lipogênese e lipólise – tais alterações variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídios que depende, entre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo, gasto energético, da influência de hormônios (catabólicos e anabólicos) e da atividade de enzimas envolvidas nesse processo (JENSEN, 1997).

O tecido adiposo branco é capaz de se expandir através da hiperplasia (aumento do número de adipócitos) e hipertrofia (aumento do tamanho dos adipócitos) (QUEIROZ et al., 2009). Esta classificação torna-se importante no prognóstico e manejo da obesidade, sendo a

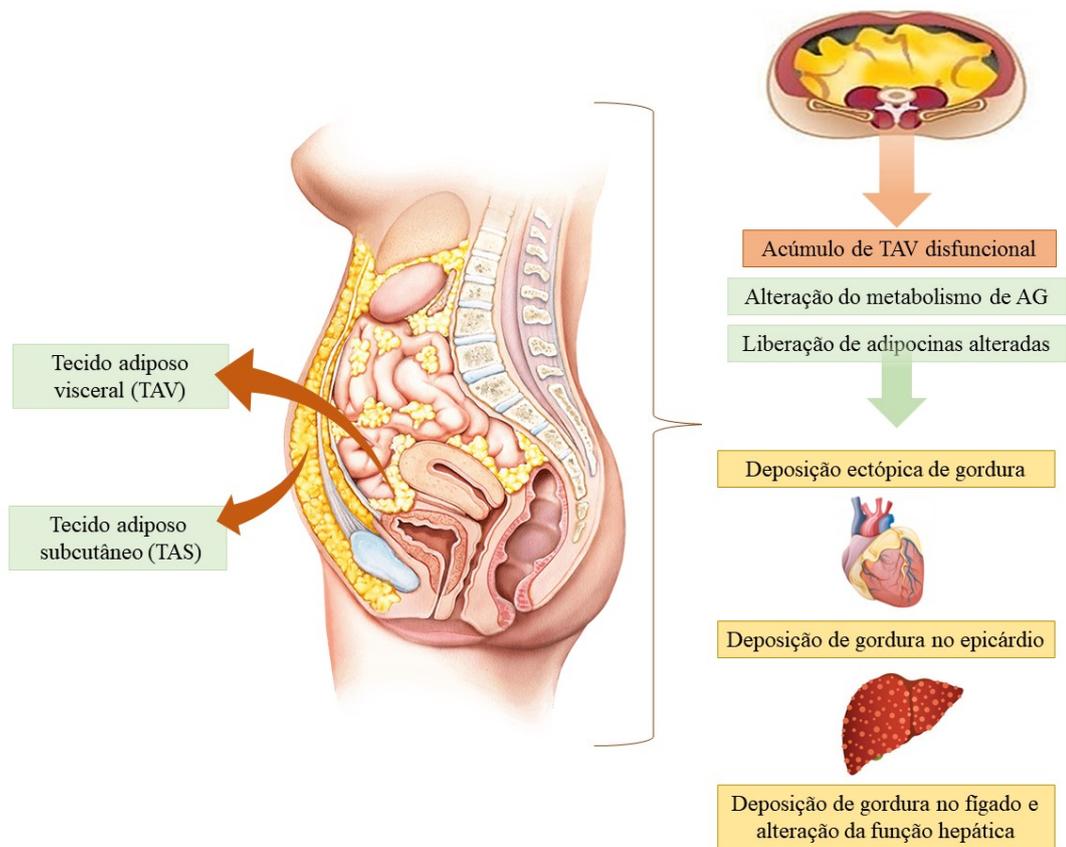
obesidade hiperplásica considerada a de mais difícil controle (SPALDING et al., 2008; ABENTE et al., 2016).

O TAB se distribui em diversos depósitos no organismo, anatomicamente classificados como tecido adiposo visceral (TAV) e tecido adiposo subcutâneo (TAS), este é compreendido em profundo (TASP) e superficial (TASS) (Figura 6) (BÓDIS; RODEN, 2018). O TAS é principalmente representado pelos depósitos abaixo da pele nas regiões abdominal, glútea e femoral. O TAV refere-se ao tecido depositado próximo ou mesmo no interior das vísceras da cavidade abdominal, sendo bem exemplificado pelas gorduras mesentérica, omental e retroperitoneal. O tecido adiposo visceral é mais sensível às catecolaminas, por apresentar maior quantidade de beta adrenocetores ($\beta 1$ e $\beta 2$) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; PINTO, 2014).

A hipertrofia dos adipócitos intra-abdominais é caracterizada por um estado hiperlipolítico devido a resistência à ação antilipolítica da insulina (MITTELMAN et al, 2002). Tal ação é agravada pelo TNF- α , que reduz a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), além de aumentar os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a lipase hormônio sensível (LHS). O TNF- α , é considerado um dos fatores que contribui para o aumento da lipólise associada à obesidade (ARNER, 1995).

O aumento da liberação de ácidos graxos (AG) pelos adipócitos hipertróficos para a circulação acarreta em prejuízos ao metabolismo de órgãos, como: fígado, pâncreas e coração, visto que a deposição ectópica de gordura ocasiona aumento da produção hepática de glicose, apoptose das células β pancreáticas e resistência à insulina no coração e músculo esquelético (Figura 1) (DESPRES; LEMIEUX, 2006).

Figura 6 – Deposição ectópica de gordura sobre os tecidos



Legenda: TAV – tecido adiposo visceral; TAS – tecido adiposo subcutâneo; AG – ácidos graxos;
 Nota: Representação esquemática do TAV e do TAS e consequências da deposição ectópica de gordura sobre os tecidos;
 Fonte: Adaptado: DESPRES, 2006.

Estudos descrevem que a resposta a essas disfunções metabólicas ocorre de maneira hierárquica, onde o tecido adiposo e o fígado agem como desreguladores primários do sistema metabólico, já o músculo esquelético e o pâncreas respondem de maneira secundária. O papel primário do tecido adiposo ocorre devido a sua atuação na regulação metabólica, como sua capacidade de produzir hormônios que modulam efeitos sobre a ingestão alimentar, balanço e homeostase energética (MUOIO; NEWGARD, 2006).

Estudos mostram que o TAB é inervado pelo sistema nervoso simpático (SNS), o qual desempenha um papel crítico no metabolismo dos lipídios em adipócitos. Diante do exposto, existem, atualmente, inúmeras evidências indicando que os sinais do circuito neuroendócrino controlam a massa de gordura corporal, modulando o armazenamento ou oxidação dos ácidos graxos. Algumas vias do SNC regulam o metabolismo dos adipócitos independente da

ingestão de alimentos, sugerindo que tais vias possuem mecanismos alternativos que regulam a homeostase da energia (MUOIO; NEWGARD, 2006).

Metabolismo dos adipócitos

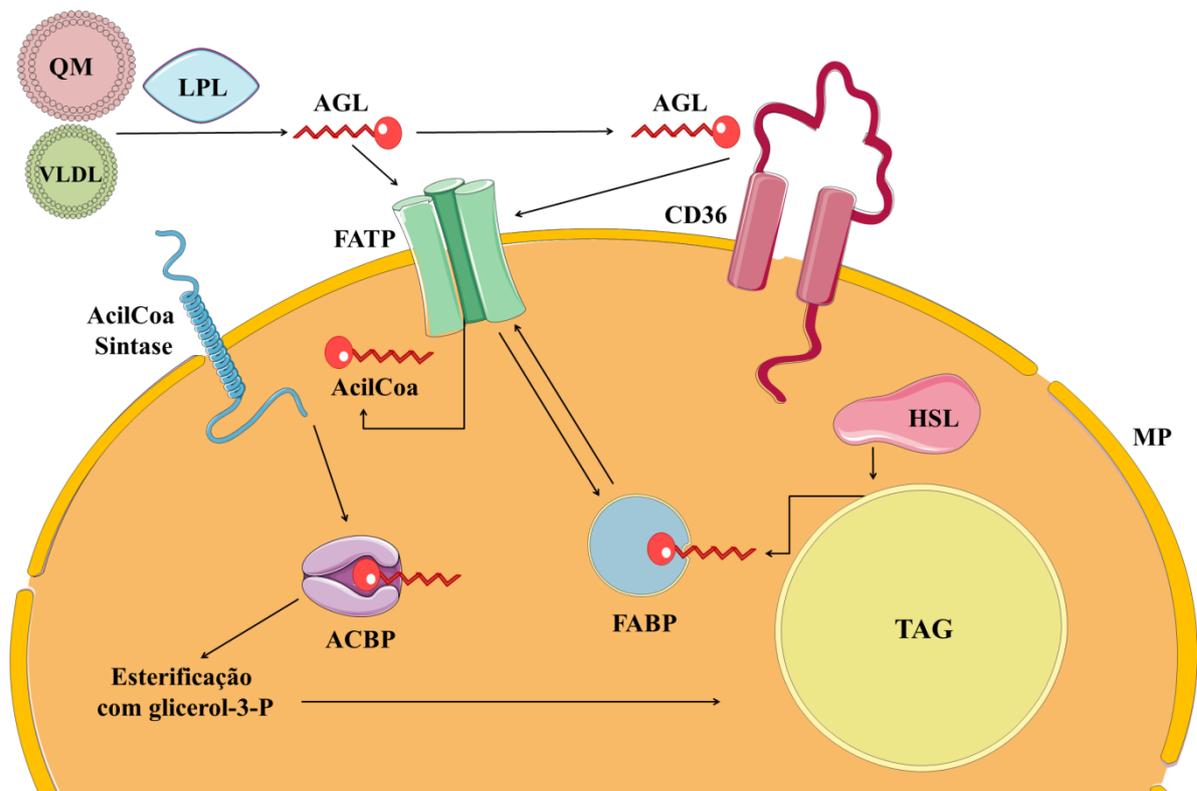
A principal fonte de energia para diversos tecidos e órgãos, como músculo e fígado, são os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). A maior parte dos tecidos possui uma reserva pequena de armazenamento de lipídios, desta maneira o fornecimento de AG torna-se contínuo para a produção de energia, a partir, principalmente, do tecido adiposo branco (KERNER; HOPPEL, 2000). As principais ações do tecido adiposo branco são processos metabólicos que resultam em biossíntese, incorporação e armazenamento TAG na gotícula de gordura intracitoplasmática – lipogênese – e ações que promovem a hidrólise do TAG armazenado, liberação de ácidos graxos livres (AGL) e de glicerol – lipólise – (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Os ácidos graxos livres circulam ligados à albumina plasmática ou, ainda, ligados covalentemente ao núcleo de triacilglicerol das lipoproteínas circulantes, uma vez que apresentam baixa solubilidade em água (MERKEL; ECKEL; GOLDBERG, 2002). O adipócito necessita de uma fonte de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) e de um complexo de AGL formado com a coenzima A (CoA) para a biossíntese de TAG. O glicerol-3-P é obtido como um dos produtos da via glicolítica, a partir da biossíntese de acetil-CoA ou da captação de ácidos graxos livres provenientes de lipoproteínas (quilomícrons e VLDL) plasmáticas que, no tecido adiposo branco, sofrem a ação da LPL, que hidrolisa o TAG nelas contido, liberando assim, AGL, que são transportados para o citoplasma dos adipócitos (Figura 7) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A produção de glicerol-3-P requer captação de glicose, ação que envolve proteínas transportadoras específicas, como GLUT4. A insulina é responsável por controlar tal processo estimulando, durante o período prandial, a translocação de GLUT4 para a membrana celular, aumentando, assim, a captação de glicose. Parte do fluxo metabólico da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato, que será transportado para o interior das mitocôndrias e transformado em acetil-CoA pela ação da piruvato desidrogenase (PDH). Este é acoplado ao oxalato pela ação da citrato sintase, gerando, em seguida, citrato. Parte deste citrato é transportado de volta para o citoplasma, onde sofre a ação da enzima ATP-citratoliase (ATP-CL), gerando novamente acetil-CoA (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). A acetil-CoA carboxilase (ACC) está presente em duas isoformas: ACC1 e ACC2, também conhecidas,

respectivamente, como ACCa e ACCb, que catalisam a carboxilação de acetil-CoA em malonil-CoA, um metabólito intermediário que exerce duas principais funções: (1) entrar na via de síntese de ácidos graxos, catalisada pela enzima ácido graxo sintase (FAS), acarretando a formação de acil-CoA, que é utilizado para esterificação com glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG, e desta forma ser incorporado à gotícula citoplasmática de gordura e (2) alostericamente inibir a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1) que controla o transporte de ácidos graxos ativados para oxidação na mitocôndria (DZAMKO; STEINBERG, 2009).

Figura 7 – Processo de captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e biossíntese de triacilglicerol



Legenda: QM – quilomicon; VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa; AGL – ácido graxo livre; LPL – lipoproteína lipase; TAG – triacilglicerol; MP – membrana plasmática; FATP – proteína transportadora de ácidos graxos; FABP – proteína ligadora de ácidos graxos; ACBP – proteína ligadora de acil-Coa; HSL – lipase hormônio-sensível;

Nota: Esquema ilustrativo do processo de captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e biossíntese de TAG;

Fonte: Adaptado: FONSECA-ALANIZ et al., 2006.

Em situações de privação da energia celular, como ocorre no jejum, os níveis de AMP aumentam, ativando a AMPK (DAVAL et al, 2005). Esta proteína quinase ativada por AMPK está presente na célula como um complexo heterodímero, possuindo uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ), no tecido adiposo, a subunidade catalítica $\alpha 1$ é a isoforma predominante. A AMPK tem por função, no metabolismo celular, a manutenção da homeostase energética. Quando ativada fosforila e, assim, inibe a ACC, diminuindo os níveis de malonil-CoA e reduzindo a inibição alostérica sobre a CPT-1 (DAVAL; et al, 2005).

Os ácidos graxos de cadeia longa são ativados dentro da mitocôndria, porém, a membrana mitocondrial não é permeável para os acil-CoAs. O sistema de transporte consiste em três proteínas, a CPT-1, a carnitina aciltranslocase (CACT) e a CPT-2, cada uma com distinta localização mitocondrial. A CPT-1 representa a chave da regulação na β -oxidação mitocondrial, porém, sua atividade é fortemente inibida pela malonil-CoA (KERNER; HOPPEL, 2000). A CPT-1 primeiro catalisa a formação de acil-carnitina de cadeia longa a partir de acil-CoA de cadeia longa para o espaço intermembranar e, em seguida, a carnitina aciltranslocase transporta a acil-carnitina através da membrana mitocondrial interna em troca de carnitina-CoA. Após a captação dos ácidos graxos na mitocôndria, estes passam pelo processo de β -oxidação, gerando NADH e FADH₂ que são utilizados na cadeia respiratória (KERNER; HOPPEL, 2000).

Estudos demonstram que os AG são capazes de estimular seu próprio catabolismo através de um conjunto de receptores nucleares, chamados de receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPARs) (ATHERTON et al., 2009). Os receptores ativados por PPARs pertencem a um subgrupo da superfamília de receptores nucleares, que são identificados em três formas: PPAR α , PPAR δ e PPAR γ . A identificação do PPAR γ foi fundamental para o entendimento da fisiologia do tecido adiposo (QUEIROZ et al., 2009). A atividade do PPAR γ influencia os estoques de gordura no tecido adiposo, além de induzir a maturação de pré-adipócitos. A maioria dos genes alvo do PPAR γ do tecido adiposo estão diretamente envolvidos na via lipogênica, incluindo LPL (KERNER; HOPPEL, 2000).

A mitocôndria, no TAB, possui um papel crucial na regulação da lipólise e reesterificação de AGL, assim como na diferenciação e maturação do adipócito, dado pela sincronização da adipogênese e biogênese mitocondrial (DE PAUW et al., 2009).

Na obesidade, as mitocôndrias dos adipócitos alteram a lipogênese e lipólise, regulam os processos de diferenciação dos adipócitos, apoptose, produção de EROS e a eficiência da fosforilação oxidativa (CEDIKOVA *et al.*, 2016). Logo, os excessos de substratos

energéticos, característico na obesidade e síndrome metabólica, podem levar à disfunção mitocondrial, resultando em alterações metabólicas que alteram o metabolismo energético (BOURNAT, BROWN, 2010).

A disfunção mitocondrial, no adipócito, está associada com a redução da oxidação de ácidos graxos, alteração da secreção de adipocinas e desregulação da homeostase energética. Nesta condição, o aumento da produção de EROS resulta em acúmulo de lipídios e resistência à insulina (MEDINA-GOMEZ, 2012).

Adoçantes

O ser humano apresenta preferência inata ao sabor doce e, por esta razão, sempre fez uso de produtos que pudessem conferir tal sabor aos alimentos. Relatos milenares da cultura chinesa e grega revelam que o primeiro adoçante a ser utilizado pelo o homem foi o mel, posteriormente, substituído pela sacarose, originada da cana-de-açúcar, e utilizada inicialmente na Índia, por volta de 2000 anos atrás (BARREIROS, 2012).

De uma forma geral, as substâncias de sabor adocicado podem ser divididas em dois grupos principais: o grupo dos açúcares e outros hidratos de carbono nutritivos e o grupo que engloba os adoçantes, que são isentos de carboidratos (FAUSTO et al., 2013).

Os adoçantes dietéticos são aqueles produzidos à base de edulcorantes, utilizados em alimentos e bebidas, possuem pouca ou nenhuma caloria e substituem a doçura do açúcar de mesa e, por vezes, apresentam poder de doçura bastante elevado em comparação à sacarose (QURRAT-UL-AIN; KHAN, 2015).

Os edulcorantes podem ser classificados como naturais, artificiais, calóricos ou não calóricos. Os adoçantes naturais (AN) são, normalmente, compostos por extratos de vegetais ou de frutas, já os adoçantes artificiais (AA) são substâncias químicas produzidas em laboratório. A classificação de adoçantes calóricos (AC) ou não calóricos (ANC) é dada de acordo com o valor nutricional, sendo os calóricos aqueles que apresentam calorias, fornecendo energia aos alimentos e os não calóricos, aqueles que não possuem calorias (FAUSTO et al., 2013). No grupo dos adoçantes calóricos, também chamados de adoçantes nutritivos, encontramos a sacarose, frutose, mel e xarope de milho. Já no grupo dos adoçantes não calóricos, estão inclusos: glicosídeos de esteviol, aspartame, neotame, sacarina, potássio de acesulfame e sucralose, dentre outros (BRASIL, 2008; BARREIROS, 2012).

A regulamentação dos edulcorantes no Brasil é de responsabilidade do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo os

edulcorantes não calóricos atualmente permitidos para comercialização no Brasil: manitol, isomaltiol, maltitol, esteviosídeos, lactitol, taumatina, xilitol e eritritol, classificados como naturais, e acessulfame de potássio (acessulfame K), aspartame, ciclamato de sódio, sacarina, sucralose, e neotame, classificados como artificiais (BRASIL, 2008; ZANINI; ARAÚJO; MARTÍNEZ-MESA, 2011). Na Europa e no EUA, o órgão responsável pelo controle do uso de adoçantes é a *Food and Drug Administration* (FDA), que liberou o uso de alguns adoçantes somente após grandes estudos científicos para confirmar a segurança dos mesmos, sendo eles: esteviosídeos, acessulfame-potássio, aspartame, neotame, sacarina, sucralose e o adventame, que foi recentemente aprovado, sendo este um derivado do aspartame utilizado principalmente pela indústria devido seu elevado poder edulcorante (QURRAT-UL-AIN; KHAN, 2015).

Os adoçantes dietéticos foram desenvolvidos com o objetivo de atender indivíduos portadores de diabetes mellitus, e até a década de 1980, no Brasil, estes produtos eram regulamentados como drogas, sendo vendidos em farmácias e consumidos somente por pessoas que precisavam controlar a ingestão de sacarose. Posteriormente, a prática do uso desses adoçantes passou a ser em decorrência da maior preocupação da população com a boa forma física, uma vez que é utilizado de maneira a reduzir o consumo de calorias e, conseqüentemente, o peso corporal, tornando-se assim, um mercado bastante lucrativo e em crescente expansão (BARREIROS, 2012). Estima-se que no Brasil cerca de 120 indústrias estejam voltadas à produção de alimentos *light* e *diet*, representando algo entre 3% e 5% dos alimentos vendidos no país, com projeções de crescimento. Cerca de 35% dos lares brasileiros utilizam algum produto *light* ou *diet* (OLIVEIRA; FRANCO, 2010).

Com um marketing agressivo voltado para fazer as pessoas acreditarem que o adoçante possui a capacidade de levar a perda de peso, a utilização de edulcorantes não calóricos representou, em 2007, 16% do mercado dos edulcorantes dos EUA, cerca de meio bilhão de dólares (WIEBE et al, 2011).

Segundo Sylvetsky e colaboradores (2012), ocorreu um aumento substancial no consumo de adoçantes de 1999-2000 em crianças e adultos, as pesquisas apontam que o crescente consumo das bebidas de baixa caloria está acarretando no aumento geral do uso de adoçantes. O aumento do consumo de ANC também pode estar relacionado com campanhas de prevenção à obesidade e de dietas voltadas para a perda de peso na última década. O aumento da prevalência da diabetes tipo 2, principalmente em idosos, estimulou ainda mais o consumo dos adoçantes pouco calóricos por essa população (SYLVETSKY et al., 2012).

A RDC nº 18 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina que os adoçantes somente devam ser utilizados nos alimentos e/ou bebidas em que se faz necessária a substituição parcial ou total do açúcar, com as seguintes finalidades: para controle de peso, dietas com ingestão controlada de açúcares, dietas com restrição de açúcares (BRASIL, 2008).

Neste contexto, o consumo de adoçantes tem aumentado em vários países (POPKIN; NIELSEN, 2003), e produtos dietéticos (especialmente refrigerantes diet e adoçantes de mesa) têm sido as principais fontes de ingestão de adoçantes não calóricos. Estudos populacionais indicam que o consumo de ANC aumentou 28% em pessoas de todas as idades, e esta tendência é altamente prevalente entre as crianças, especialmente quando se trata de consumo de bebidas. Dados indicam que do ano de 1999 até 2008 a ingestão de ANC em bebidas aumentou de 6,1% para 12,5% entre as crianças e de 18,7% para 24,1% entre os adultos (SYLVETSKY et al., 2012).

No Brasil, não há estudos que forneçam estimativas sobre a prevalência de utilização dos adoçantes dietéticos pela população em geral. Zanini e colaboradores (2011) realizaram uma pesquisa com adultos em Pelotas, RS, e demonstraram que 19% dos 2.732 entrevistados utilizavam adoçantes, sendo o percentual mais elevado em pessoas idosas, diabéticos, hipertensos e indivíduos com excesso de peso. O uso de adoçantes na forma líquida foi o mais comum (98%). Nesse estudo, cerca de 10% dos usuários de adoçante dietético líquido relataram a utilização do adoçante na forma de “esguichos” ao em vez de gotas. Sendo assim, a avaliação do consumo dos adoçantes torna-se difícil. Além do uso como adoçantes em bebidas, os edulcorantes podem ser encontrados nos mais diversos tipos de produtos industrializados, sendo desta forma muito mais fácil atingir o limite máximo diário de ingestão ou até mesmo ultrapassar tal limite (FDA, 2016).

A OMS, por meio da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, estabeleceu como meta a redução no consumo de bebidas açucaradas, visto ser de evidência sua associação com doenças crônicas não transmissíveis, incluindo diabetes tipo 2 (BARRETO, 2005). Diante do atual perfil nutricional da população, o uso de edulcorantes se torna cada vez mais presente para aqueles que necessitam reduzir o consumo energético para perda de peso e controle glicêmico, auxiliando no tratamento da obesidade e diabetes mellitus, visto que estes oferecem uma alternativa para a substituição do açúcar de mesa, fornecendo o sabor doce sem contribuir com o incremento de calorias e efeitos sobre a glicemia (FERNSTROM, 2015). Apesar de serem dispensáveis na alimentação, podem contribuir para

o controle metabólico do DM, possibilitando melhor qualidade de vida e reinserção no convívio social (OLIVEIRA; FRANCO, 2010).

Durante alguns anos, os adoçantes eram considerados seguros e substitutos saudáveis do açúcar, já que forneciam o sabor doce sem acréscimo de calorias e efeitos sobre a glicemia (PEPINO, 2011). Atualmente, novos estudos fornecem dados que revelam que ANC não são compostos inertes. Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de adoçantes não calóricos, principalmente em refrigerantes dietéticos destinados a indivíduos diabéticos e em processo de perda de peso, não está relacionado com melhora da saúde (BROWN et al., 2010; SWITHERS et al., 2010). De fato, alguns estudos encontraram associações positivas entre o consumo de ANC e ganho de peso, síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (DHINGRA et al., 2007; FOWLER et al., 2008; NETTLETON et al., 2009; SWITHERS et al., 2010; DE KONING et al., 2011; SWITHERS et al., 2012; FAGHERAZZI, et al., 2013), apesar de outros estudos não (LUDWIG, et al., 2001; SCHULZE, et al., 2004; SWITHERS, 2013).

Embora o consumo de adoçantes não nutritivos seja associado a diversos efeitos relacionados à obesidade, como o aumento da ingestão alimentar, ganho de peso e alterações na homeostase glicêmica, os mecanismos fisiológicos que contribuem para o aumento da adiposidade e o desbalanço energético ainda não foram bem elucidados. Além disso, os adoçantes são quimicamente diversos e, conseqüentemente, não acarretam os mesmos efeitos fisiológicos (BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017).

***Stevia rebaudiana* Bernoti**

Nos últimos anos a procura por adoçantes não calóricos naturais e mais saudáveis aumentou em todo o mundo e, como consequência, algumas plantas com poder edulcorante estão sendo amplamente estudadas (FIGLEWICZ et al., 2009; BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; SEKI; TAMURA; MURANAKA, 2017). O adoçante natural *Stevia* tem atraído interesse econômico e científico, devido ao conjunto de características que apresenta, tais como: elevado poder edulcorante, propriedades terapêuticas, alegação natural e relação custo-benefício positiva (FAUSTO et al., 2013; GARDANA; SIMONETTI, 2018).

A *Stevia rebaudiana* Bernoti, Ka'a He'e em tupi-guarani, popularmente conhecida como *Stevia*, folha de mel ou erva doce do Paraguai, é um gênero botânico pertencente à família *Asteraceae* (*Compositae*). A *Stevia rebaudiana* é uma das mais de 240 espécies do gênero, que estão distribuídas pela América, sendo a maioria delas encontradas no México

(± 100) e no Brasil (± 40) (PARK; CHA, 2010; SHARMA et al., 2015; FERRAZZANO et al., 2016). É um arbusto perene, que cresce espontaneamente em habitats subtropicais, mesotérmicos e úmidos, chegando a medir cerca de 50 a 120 cm (SHARMA et al., 2015).

Nativa da América do Sul, mais especificamente na região de Amambai, que está localizada entre o sul do Brasil e o norte do Paraguai, foi cultivada por índios Guaranis oriundos do Paraguai há centenas de anos e utilizada por eles para adoçar chás amargos, bebidas e medicamentos (BRANDLE; STARRATT; GIJZEN, 1998; GEUNS, 2003; LAILERD et al., 2004; SEHAR et al., 2008; AGÜERO et al., 2015; FERRAZZANO et al., 2016; SEKI; TAMURA; MURANAKA, 2017; PERRIER et al., 2018).

A planta é rizomatosa, com um sistema radicular bem desenvolvido; o caule é ereto e amadeirado, com penugem minúscula na parte inferior; e as folhas são ligeiramente pubescentes e sésseis, com uma margem dentada na parte superior da planta (Figura 8) (FERRAZZANO et al., 2016).

Figura 8 – Imagem e ilustração da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni



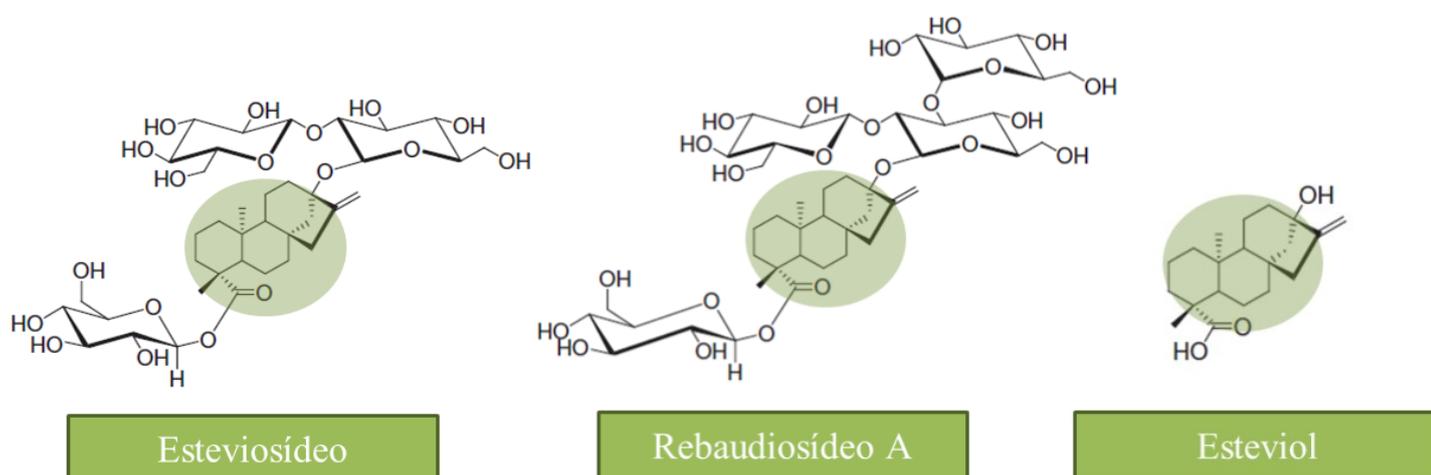
Nota: *Stevia rebaudiana* Bertoni. Planta herbácea perene pertencente à família Asteraceae;
Fonte: Adaptado: CARRERA-LANESTOSA; MOGUEL-ORDÓÑEZ; SEGURA-CAMPOS, 2017.

Embora a planta tenha sido utilizada por índios há décadas, somente em 1899 o naturalista suíço Moisés Santiago Bertoni (diretor da Faculdade de Agricultura de Assunção, Paraguai) descreveu a planta, pela primeira vez, e a classificou botanicamente como *Eupatorium rebaudiana*. Posteriormente, verificou-se que a planta pertencia ao gênero *Stevia*, e não *Eupatorium*. Em 1905, Bertoni a redefiniu como *Stevia rebaudiana*, membro da família

Compositae, como é conhecida atualmente. Mais tarde, a Sociedade Botânica do Paraguai a denominou como *Stevia rebaudiana* Bertoni. O nome "*rebaudiana*" é dado em homenagem ao químico paraguaio Dr. Ovídio Rebaudi, que foi o primeiro a extrair uma substância doce das folhas da *Stevia* (LIMA FILHO, VALOIS, LUCAS, 2004; PACKER, 2006; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

Os compostos responsáveis pelo sabor doce, encontrados nesta planta, foram purificados em 1931, por dois químicos franceses, M. Bridel e R. Lavieille, que isolaram os glicosídeos de esteviol, classificando-os como esteviosídeo e rebaudiosídeo (SEHAR et al., 2008; CARRERA-LANESTOSA et al., 2017). Em 1952, sua estrutura química foi estabelecida como um glicosídeo diterpênico ($C_{20}H_{32}$ - metabólito secundário da classe dos terpenos constituídos por 20 átomos de carbono, correspondendo a quatro unidades de isopreno), composto por três moléculas de glicose ligadas a uma aglicona, o esteviol (Figura 9) (LAILERD et al., 2004; LEMUS-MONDACA et al., 2012; FERRAZZANO et al., 2016; SEKI; TAMURA; MURANAKA, 2017).

Figura 9 – Estruturas químicas de glicosídeos de esteviol: esteviosídeo, rebaudiosídeo A e seu núcleo e metabólito semelhante, esteviol



Nota: Estruturas químicas de glicosídeos de esteviol: esteviosídeo, rebaudiosídeo A e seu núcleo e metabólito semelhante, esteviol;

Fonte: Adaptado: SHARMA et al., 2015.

Na década de 70, o Japão intensificou os estudos sobre a planta, com intenção de expandir o comércio, e foi o primeiro país da Ásia a regulamentar o uso do esteviosídeo como

agente edulcorante em alimentos, bebidas e na indústria farmacêutica e, atualmente, é o país que mais consome o adoçante em todo o mundo. Desde então, o cultivo desta planta se expandiu para vários outros países da Ásia, incluindo China, Malásia, Singapura, Coreia do Sul, Taiwan e Tailândia e, desta maneira, a planta ganhou importância do ponto de vista social, econômico, ambiental e político (LIMA FILHO, VALOIS, LUCAS, 2004; PACKER, 2006; SEHAR et al., 2008; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009; PARK; CHA, 2010; LOHNER; TOEWS; MEERPOHL, 2017).

As folhas da Stevia e os extratos feitos a partir dela, contêm uma mistura de nove terpenóides (terpenos - hidrocarbonetos isoméricos $C_{10}H_{16}$ - que foram desnaturados pela oxidação), chamados de glicosídeos de esteviol, que apresentam alto poder edulcorante (HOLVOET et al., 2015). O teor de cada um destes compostos, presentes na planta, varia entre 4 a 20% do peso seco das folhas, dependendo das condições de cultivo e crescimento. O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A representam, respectivamente, 5-10% e 2-4% das folhas, já os outros glicosídeos estão presentes na planta em menor quantidade: rebaudiosídeo B (traços), rebaudiosídeo C (dulcosídeo B) ($\pm 1,5\%$), rebaudiosídeo D e E (vestígios), rebaudiosídeo F (dulcosídeo A) ($\pm 0,5\%$), esteviolbiosídeo (traços) (GEUNS, 2002; LIMA FILHO, VALOIS, LUCAS, 2004; SEHAR et al., 2008; PARK; CHA, 2010; LEMUS-MONDACA, 2012; RIZWAN et al., 2018). Além dos glicosídeos esteviolares, a Stevia *rebaudiana* Bertoni possui mais de 100 fitoquímicos, e outros compostos, com propriedades antioxidantes e medicinais, incluindo terpenos, diterpenos, triterpenos, estigmasterol, taninos, esteróis, ácidos voláteis, vitaminas, carotenos, flavonoides, enzimas, ácidos orgânicos, polissacarídeos, hormônios, microelementos, fibras, fósforo, zinco, cálcio, potássio, sódio e magnésio. Propriedades biofuncionais interessantes foram encontradas em fitoquímicos que estão presentes na planta, sendo capazes de fornecer benefícios à saúde, no entanto o adoçante Stevia disponível para comercialização apenas possui em sua composição os glicosídeos de esteviol uma vez que no processo de purificação do adoçante os fitoquímicos são removidos da planta (GEUNS, 2003; PACKER, 2006; CARRERA-LANESTOSA et al., 2017; MAGNUSON et al., 2018).

Os glicosídeos de esteviol são os constituintes das folhas de Stevia responsáveis pelo sabor doce, no entanto, existem diferenças na intensidade de doçura entre os vários glicosídeos (SEHAR et al., 2008; AGÜERO et al., 2015; SHARMA et al., 2015; PERRIER et al., 2018). O esteviosídeo é cerca de 100 a 125 vezes mais doce que a sacarose, o rebaudiosídeo A 350 a 450, rebaudiosídeo B 300 a 350, rebaudiosídeo C (dulcosídeo B) 50 a

120, rebaudiosídeo D 200 a 300, rebaudiosídeos E 250 a 300, rebaudiosídeo F, (dulcosídeo A) 50 a 120 vezes mais doce (GEUNS, 2002; SHARMA et al., 2015; CARRERA-LANESTOSA et al., 2017).

O extrato das folhas da *Stevia rebusiana* possui diversas utilidades para a indústria, uma vez que é estável à 200°C, não contém calorias, não fermenta, não gera placa dentária, anticariogênico, não carameliza e não cristaliza (FERRAZZANO et al., 2016; CARRERA-LANESTOSA et al., 2017; LOHNER; TOEWS; MEERPOHL, 2017; RIZWAN et al., 2018). Uma das maiores desvantagens para a utilização em alimentos é a existência do sabor residual amargo. O esteviosídeo é o maior causador do sabor residual e, por isso, o rebaudiosídeo A é mais utilizado pela indústria alimentícia (AGÜERO et al., 2015; BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; SEKI; TAMURA; MURANAKA, 2017; MAGNUSON et al., 2018; GARDANA; SIMONETTI, 2018).

Um processo biotecnológico recente, envolvendo a produção microbiana, levou a uma nova geração de adoçantes de *Stevia* com um sabor doce mais limpo através da levedura *S. Cerevisiae*. Esta via de biossíntese foi desenvolvida através da otimização de uma glicosiltransferase para melhorar as produções de rebaudiosídeo D e M (BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017).

Os glicosídeos de esteviol são utilizados como edulcorantes para uma variedade de alimentos, tais como: doces, iogurtes, xaropes, balas, goma de mascar, leite em pó e condensado, vegetais em conserva, molhos de soja, cereais, bebidas, adoçante dietético propriamente dito, além do seu emprego em pastas de dente e outros produtos farmacêuticos, sem causar efeitos colaterais ao ser humano. É importante destacar que, com o nível atual de tecnologia, os produtos à base do adoçante natural já são competitivos em termos de custos com os adoçantes químicos artificiais (LIMA FILHO; VALOIS; LUCAS, 2004; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009; GSI, 2011).

O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A são considerados seguros para os seres humanos, sem nenhum efeito colateral (KIM; CHOI, 2002; GEUNS, 2002; SHARMA et al., 2015). Sua regulamentação para uso como um adoçante é realizada em todo o mundo. Atualmente, mais de 100 países autorizam a utilização da *Stevia*, como adoçante para alimentos, através de seus respectivos órgãos governamentais, incluindo Coréia do Sul, Japão, Argentina, Paraguai, Brasil, China, Rússia, Indonésia, México, Senegal, Tailândia e Israel (GSI, 2012).

Nos EUA, alguns edulcorantes são denominados como “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS), ou seja, existe consenso científico sobre sua segurança baseada em uma história de uso ou sobre informações científicas bem documentadas. Em 2008, a FDA

permitiu o *status* de GRAS para o rebaudiosídeo A e esteviosídeo purificados (pureza entre 95% e 98%), podendo ser legalmente comercializados e adicionados aos produtos alimentares vendidos nos Estados Unidos. O extrato da Stevia não deve ser confundido com esses glicosídeos purificados, uma vez que eles são vendidos como suplementos alimentares por conterem diversos outros componentes ativos (EFSA, 2010; FDA, 2012; FITCH, KEIM, 2012; AGÜERO et al., 2015; GARDANA; SIMONETTI, 2018; MAGNUSON et al., 2018; PERRIER et al., 2018).

No Brasil, a regulamentação ocorreu no fim da década de 80, como agente flavorizante e edulcorante em várias classes de alimentos (BRASIL, 1988). Em 2008, o JECFA/FAO/WHO afirmaram que o uso dos glicosídeos de esteviol puros ($\geq 95\%$) é seguro para consumo humano como um ingrediente não medicinal, não sendo cancerígenos, genotóxicos ou associados à qualquer toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento, em dose de até 5,5mg/kg de peso corporal por dia (EFSA, 2010; FDA, 2012; FITCH e KEIM, 2012; AGÜERO et al., 2015; MAGNUSON et al., 2018).

A ingestão diária aceitável (IDA) do JECFA foi estabelecida utilizando o NOAEL (nenhum nível de efeito adverso observado) de 970mg/kg/d de um estudo de carcinogenicidade com duração de 2 anos, interpretado de forma conservadora, utilizando esteviosídeos. Estes dados sugerem que a IDA atual fornece uma margem ampla de segurança.

As aprovações pelos órgãos regulamentadores em todo o mundo levaram ao aumento da produção de alimentos e produtos adoçados com Stevia. No primeiro semestre de 2011 houve um aumento de 15% em novos alimentos e bebidas lançados mundialmente, em comparação com o mesmo período de 2010, sendo que quase 80% destes produtos foram lançados nos Estados Unidos, Japão, França, Brasil e Chile (GSI, 2011, 2012).

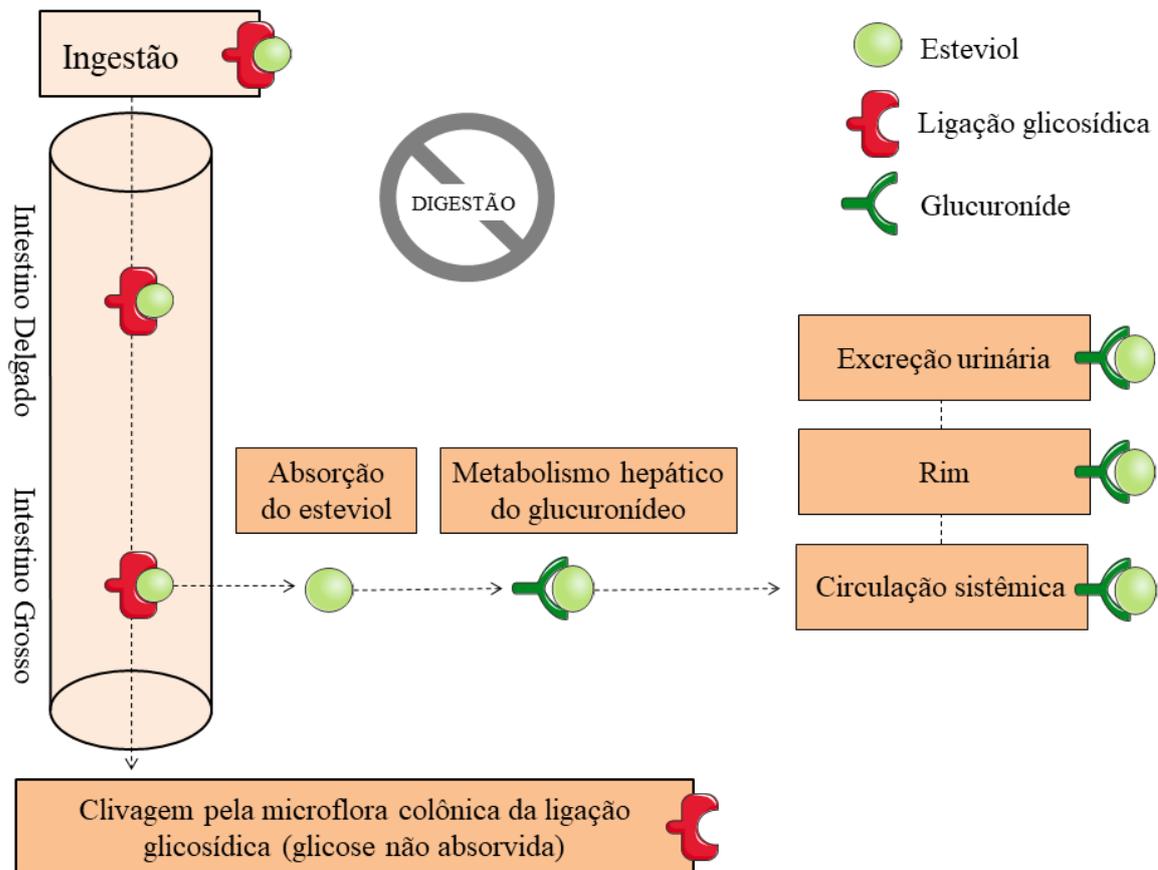
Absorção, metabolismo e excreção dos glicosídeos de esteviol

Todos os glicosídeos de esteviol contêm um núcleo químico comum, o esteviol (Figura 9). Este é o produto final do metabolismo dos glicosídeos por bactérias (microbiota intestinal) no cólon, e posteriormente, é absorvido pelo intestino (HOLVOET et al., 2015; MAGNUSON et al., 2018). Recentemente, o metabolismo de diferentes glicosídeos de esteviol para esteviol por bactérias intestinais foi descrito.

As enzimas e ácidos presentes no trato gastrointestinal superior não são capazes de hidrolisar os glicosídeos de esteviol (Figura 10) (MAGNUSON et al., 2018). Hutapea e

colaboradores, em 1997, já relatavam a ausência de metabolismo de esteviosídeo incubado com amilase salivar e pancreática, pepsina, secreção gástrica de ratos, camundongos e hamsters e resultados semelhantes foram encontrados com rebaudiosídeos A e D (NIKIFOROV et al., 2013).

Figura 10 – Principais vias de absorção, digestão, metabolismo e excreção dos glicosídeos de esteviol



Nota: Esquema ilustrativo do processo de absorção, digestão, metabolismo e excreção de glicosídeos de esteviol;
Fonte: Adaptado: MAGNUSON et al., 2018.

Diversos estudos demonstraram que o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A foram convertidos à esteviol por bactérias cecais, colônicas ou fecais, *in vitro* (WINGARD et al., 1980; HUTAPEA et al., 1997; GARDANA et al., 2003; KOYAMA et al., 2013). Outros estudos obtiveram o mesmo resultado ao expor rebaudiosídeos B, D, E e M à bactérias fecais humanas (NIKIFOROV et al., 2013; PURKAYASTHA et al., 2014; PURKAYASTHA et al., 2015). Gardana et al., (2003) foram os primeiros a relatarem que as espécies de *Bacteroides*

eram as únicas bactérias capazes de hidrolisar os glicosídeos de esteviol em esteviol. Já o esteviol, produto final desta degradação, é completamente resistente à ação bacteriana. O esteviolbiosídeo é um intermediário na degradação do esteviosídeo e dos rebaudiosídeos A e M, mas é rapidamente convertido em esteviol (GARDANA et al., 2003; PURKAYASTHA et al., 2014).

Diversos estudos *in vivo* foram realizados, com intuito de elucidar o metabolismo do glicosídeo de esteviol, tanto em ratos, camundongos, porcos e galinhas, quanto em humanos. A radioatividade foi observada nas fezes e na bile de ratos *Wistar*, com esteviosídeo marcado, indicando a presença de metabólitos na circulação entero-hepática (NAKAYAMA et al., 1986; KOYAMA et al., 2003). Foi administrado glicosídeo de esteviol, por via oral, em ratos, resultando em rápida absorção de esteviol no plasma portal, que permaneceu presente por horas (KOYAMA et al., 2003). Tais resultados corroboram com relatos da literatura que demonstram que os glicosídeos de esteviol são metabolizados lentamente pelas bactérias do cólon, levando ao aumento lento dos níveis plasmáticos de esteviol e seu metabólito, glicuronídeo de esteviol, de acordo com a espécie (MAGNUSON et al., 2018).

Em 2008, Roberts e Renwick, administraram oralmente, rebaudiosídeo A, esteviosídeo e esteviol marcados [14C] em ratos Sprague-Dawley. A radioatividade dos glicosídeos de esteviol aumentou lentamente no plasma ao longo de um período de horas, com um pico de 2 a 8 horas após a administração. O metabólito predominante no plasma do animal foi o esteviol indicando que o rato é um bom modelo para avaliação da segurança de glicosídeos de esteviol, pois o metabolismo de ratos também produz o metabólito comum, esteviol, após a administração de todos os glicosídeos de esteviol. A radioatividade excretada foi encontrada quase exclusivamente na bile de ratos canulados e nas fezes de ratos não canulados. Menos de 2% da radioatividade administrada para qualquer um dos compostos do estudo foi encontrada na urina. Os metabólitos predominantes encontrados na bile e nas fezes foram o glicuronídeo de esteviol e o esteviol, respectivamente. Os autores confirmaram que nenhum dos glicosídeos de esteviol foram metabolizados, ou absorvidos, no trato gastrointestinal superior, mas ambos foram absorvidos como esteviol após a degradação bacteriana no cólon. O esteviol foi, então, glucuronizado no fígado e transportado, via bile, de volta para o trato intestinal, onde foi novamente metabolizado por bactérias e depois excretado. Mais de 95% da radioatividade foi encontrada nas fezes, e nenhuma radioatividade residual significativa foi encontrada em qualquer órgão do corpo até 96 horas após a dosagem.

Segurança do uso do adoçante natural à base de Stevia

A preocupação com os efeitos teratogênicos e sobre a fertilidade promovidos pelo esteviosídeo foi levantada depois que Mazzei-Planas e Kuc (1968) observaram uma redução de até 79% da fertilidade de ratas adultas como efeito do consumo de uma decocção de Stevia. Posteriormente, dois estudos realizados com ratos machos trouxeram dados consistentes com a possibilidade de que o extrato de Stevia pode diminuir a fertilidade em ratos machos. A administração de um extrato aquoso de *S. rebaudiana* refletiu na redução do peso final dos testículos (MELIS, 1999), da cauda epididimária (MELIS, 1999) e da vesícula seminal (OLIVEIRA-FILHO et al., 1989; MELIS, 1999).

Em uma revisão de literatura com o objetivo de oferecer uma perspectiva sobre o possível risco genético associado com o consumo de glicosídeos de esteviol e de esteviosídeo, Brusick (2008) concluiu que essas substâncias não representam risco de dano genético após o consumo humano. Com base nos estudos analisados, nenhum dos compostos demonstrou reação direta com o DNA, evidenciando um baixo potencial mutagênico, geralmente limitado a ensaios *in vitro*.

Magnuson e colaboradores, em 2008, analisaram somente estudos conduzidos sob diretrizes de boas práticas e que foram submetidos a revisões por pares antes de serem aceitos para publicação, sobre o processo de avaliação da segurança do rebaudiosídeo-A para uso em alimentos e bebidas. Nesta revisão, os autores concluíram que os estudos sobre a toxicidade geral e reprodutiva de rebaudiosídeo-A corroboram com estudos realizados com glicosídeos de esteviol purificado, demonstrando segurança em altos níveis de consumo. Os autores ainda descrevem os resultados encontrados na literatura quanto à reprodução e fertilidade. No entanto, contestam alguns estudos (MAZZEI-PLANAS; KUC, 1968; OLIVEIRA-FILHO et al., 1989; MELIS, 1999) em relação aos efeitos da Stevia sobre a fertilidade de fêmeas e machos, questionando a natureza pura do material de teste administrado e as limitações nos delineamentos experimentais.

Curry, Roberts (2008) administraram rebaudiosídeo-A em diferentes concentrações através da dieta para duas gerações de ratos machos e fêmeas. Em seus resultados não observaram associação a quaisquer sinais de toxicidade clínica ou efeitos adversos relacionados aos parâmetros de desempenho reprodutivo, incluindo o desempenho do acasalamento, a fertilidade, o tempo de gestação e ciclos estrais, além de motilidade, concentração ou morfologia dos espermatozoides.

Gil e colaboradores, 2008, também concluíram que o consumo de extratos de diferentes concentrações de *S. rebaudiana* não afeta a fertilidade em ratos, porém está associado a uma acentuada diminuição do peso dos testículos, além do aumento das concentrações de testosterona e estrógeno.

Awney, Massoud e El-Maghrabi (2011) em um estudo exploratório experimental investigaram os efeitos de três doses de esteviosídeo (alta, baixa e baixa com inulina) em ratos e não observaram efeitos tóxicos sobre peso corporal, parâmetros hematológicos e bioquímicos ou sobre a atividade das enzimas investigadas. Park e Cha (2010) obtiveram resultados anti-obesogênicos com a suplementação de extrato de *Stevia* em ratos com obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura.

Lemus-Mondaca et al., (2012) reuniram uma seleção de dados básicos essenciais provenientes de diversas pesquisas científicas sobre a *Stevia*, enfatizando o potencial desta como um adoçante de alta intensidade juntamente com as suas propriedades funcionais e benefícios terapêuticos. Os autores destacaram a *S. rebaudiana* como uma boa opção de adoçante, sendo útil na dietoterapia daqueles que precisam restringir a ingestão de carboidratos. Além disso, reforçaram a sua inocuidade, mostrando-se não-mutagênica, não-teratogênica e não-cancerígena.

Estudos posteriores sobre avaliações toxicológicas dos esteviosídeo sugerem que é um composto relativamente seguro, alegando que o adoçante não seja tóxico, viciador, carcinogênico, mutagênico e teratogênico, ou genotóxicos (PARK; CHA, 2010). Outras pesquisas descrevem efeitos benéficos decorrentes do consumo de tal adoçante, tais como: antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, antiviral, antilevedura, cardiotônico e diurético (MELIS, 1994; SHARMA et al., 2015; CARRERA-LANESTOSA et al., 2017). Além disso, os efeitos hipotensivos; anti-hiperlipidêmicos, antiglicêmicos e insulinoatrópicos podem contribuir para o tratamento da DM2, estimulando a secreção de insulina pelas células do tipo β do pâncreas (MELIS, 1994; PARK; CHA, 2010; CARRERA-LANESTOSA et al., 2017), além do efeito anti-inflamatório, antitumoral, antidiarrêico, diurético e imunomodulador (GEUNS, 2002, 2003; JEPPESEN et al., 2002; GARDANA; SIMONETTI, 2018).

Recentemente, Shivanna e colaboradores (2013), publicaram resultados positivos sobre as propriedades antioxidantes de folhas de *Stevia* estudadas em ratos diabéticos. Os resultados sugerem que os polifenóis presentes nas folhas de *Stevia* são os principais responsáveis pelos múltiplos benefícios observados, como redução da glicose no sangue, incremento do nível de insulina; melhora da capacidade antioxidante; melhora da tolerância à

glicose e sensibilidade à insulina; redução dos danos hepáticos e nos rins induzidos pela estreptozotocina.

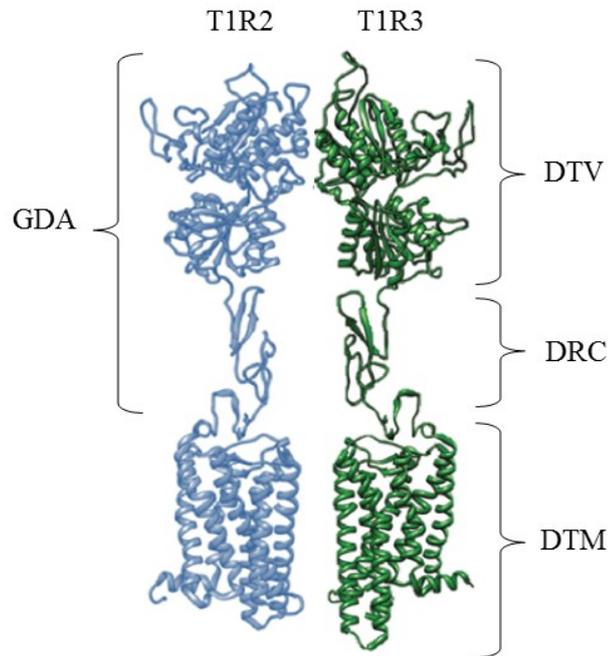
Receptores de sabor doce

O ser humano apresenta preferência inata ao sabor doce, sendo este um dos fatores determinantes para o consumo excessivo de açúcares. O paladar fornece a possibilidade de identificar os principais nutrientes antes mesmo da ingestão e, assim, evitar o consumo de moléculas com sabor amargo e potencialmente nocivas, como os alcaloides das plantas. Entre as cinco modalidades básicas de sabor (doce, salgado, amargo, azedo e umami), o gosto doce é um dos principais determinantes da escolha alimentar (LAFFITTE et al., 2014).

No início dos anos 2000, estudos identificaram o receptor capaz de detectar a doçura dos alimentos. Um receptor heterodímero, composto por dois receptores distintos, acoplados à proteína G (RAPGs): tipo 1, membro 2 (T1R2) e tipo 1, membro 3 (T1R3) (Figura 11). O receptor de sabor doce T1R2/T1R3 responde a diversos compostos quimicamente distintos, tais como açúcares naturais, adoçantes artificiais e naturais, alguns D-aminoácidos e proteínas de sabor adocicado. São expressos, principalmente, nas papilas gustativas da boca (NELSON et al., 2001; LAFFITTE et al., 2014). Já o sabor umami é percebido pelo receptor T1R1/T1R3 sensível a aminoácidos-L, tais como glutamato monossódico e aspartato (BEHRENS; MEYERHOF, 2011; LAFFITTE et al., 2014).

O receptor de sabor doce T1R2/T1R3, juntamente com várias moléculas de transdução de sinal de sabor, é expresso não apenas na cavidade oral, mas também em uma variedade de órgãos, incluindo o trato gastrointestinal, pâncreas, bexiga, tecido adiposo e cérebro (Figura 12) (NELSON et al., 2001; ZHANG et al., 2003; ZHAO et al., 2003; CHANDRASHEKAR et al., 2006; REN et al., 2009; WELLENDORPH et al., 2009; BEHRENS; MEYERHOF, 2011; Laffitte et al., 2014; BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; NUEMKET et al., 2017). Sua função nos tecidos extraorais ainda não está bem esclarecida, no entanto, foi demonstrado que o receptor de sabor doce expresso nos tecidos pancreáticos e gastrointestinais está envolvido na sinalização da glicose, na expressão dos transportadores de glicose e na manutenção da homeostase glicêmica (LAFFITTE et al., 2014).

Figura 11 – Estrutura do receptor heterodímero de sabor doce, tipo 1, membro 2 (T1R2) e tipo 1, membro 3 (T1R3)



Legenda: GDA – grande domínio aminoterminal; DTN – domínio do trapézio de Vênus; DRC – domínio curto rico em cisteína; DTM – domínio transmembrana;

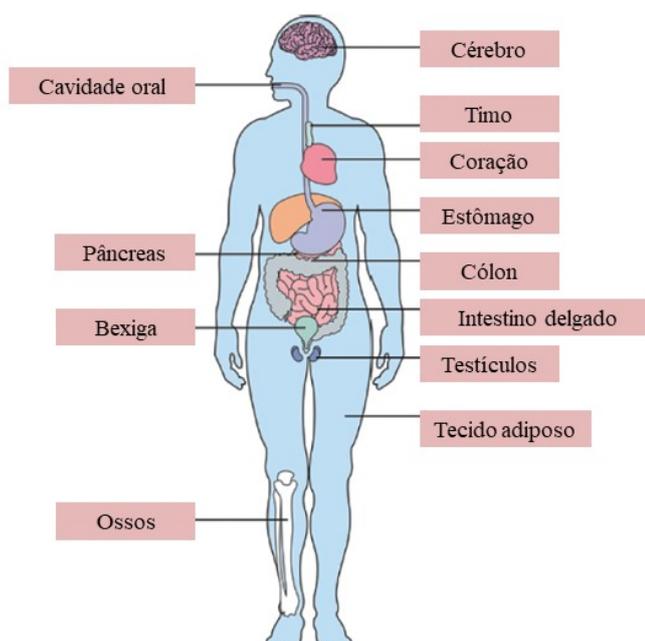
Nota: Receptores de sabor doce, T1R2 e T1R3, que são encontrados principalmente nas papilas gustativas da boca;

Fonte: Adaptado: LAFFITTE et al., 2014.

A expressão funcional isolada de T1R1 e T1R2 revelou que essas subunidades não são ativas por si mesmas. As subunidades T1R1, T1R2 e T1R3 são membros da pequena família de RAPGs de classe C. Os RAPGs de classe C mais estudados incluem os receptores de glutamato metabotrópico, o receptor sensível ao cálcio e o receptor do tipo metabotrópico do ácido aminobutírico B (GABA_B). Tais receptores compartilham uma arquitetura comum, incluindo um grande domínio aminoterminal (GDA). Este GDA contém um domínio do trapézio de Vênus (DTN) e um domínio curto rico em cisteína (DRC), que liga o GDA ao domínio transmembrana (DTM) α -helicoidal característico dos RAPGs (Figura 11) (TEMUSSI, 2011; LAFFITTE et al., 2014).

Ensaio celulares e estudos com camundongos nocaute estabeleceram que T1R2/T1R3 é o principal receptor de sabor doce. No entanto, estudos com camundongos nocaute, em que o gene T1R3 foi interrompido, sugeriram que mecanismos adicionais de detecção de açúcar poderiam existir (DAMAK et al., 2003).

Figura 12 – Órgãos extraorais em que os receptores de sabor doce (T1R2 e T1R3) são expressos



Nota: Principais órgãos em que os receptores de sabor doce, T1R2 e T1R3, são encontrados em humanos e em roedores;

Fonte: Adaptado: LAFFITTE et al., 2014.

Na cavidade oral, compostos doces interagem com os receptores de sabor doce expressos nas membranas apicais das células sensoriais presentes nos botões gustativos. A ativação do receptor de sabor doce, nos botões gustativos, pelos compostos doces, induz uma cascata de transdução intracelular, conduzindo à despolarização das células receptoras gustativas (Figura 13) (LAFFITTE et al., 2014). A língua é o órgão muscular que se projeta para dentro da cavidade oral a partir de superfície inferior, nela encontramos as papilas linguais que são projeções da mucosa oral que revestem o dorso lingual e que assumem diversas formas e funções. Existem quatro tipos: filiformes, fungiformes, foliadas e circunvaladas. Com exceção das papilas filiformes, as outras três papilas apresentam botões gustativos. Esses botões são estruturas ovais, com uma pequena abertura na superfície denominada poro gustativo. São encontrados três tipos principais de células nos botões gustativos: (1) as células sensoriais, apresentam microvilosidades na superfície apical e formam sinapses com neuronios sensoriais aferentes na sua base; (2) células de sustentação, que dão suporte estrutural às células sensoriais; (3) células basais, células-tronco para renovação dos outros dois tipos celulares (ROSS; PAWLINA, 2012).

Além dos botões gustativos associados às papilas linguais, encontram-se presentes também no arco glossopalatino, no palato mole e na parede posterior da faringe descendo até o nível da cartilagem cricóide (ROSS; PAWLINA, 2012).

Os principais eventos de transdução da sinalização consequente da percepção do sabor doce foram identificados. A ligação de compostos doces ao receptor T1R2/T1R3 resulta na dissociação da proteína G heterotrimérica (α -gustducina, Gb3 e Gg13), levando a um aumento na atividade da fosfolipase C- β 2 (PLC- β 2), que resulta na ativação do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e, em seguida, na liberação de Ca²⁺, mediada pelo receptor tipo 3, a partir de reservas intracelulares e abertura de um canal iônico potencialmente transitório, membro 5 da subfamília do canal catiônico do receptor transiente (TRPM5) (Figura 13) (IWATSUKI; UNEYAMA, 2012).

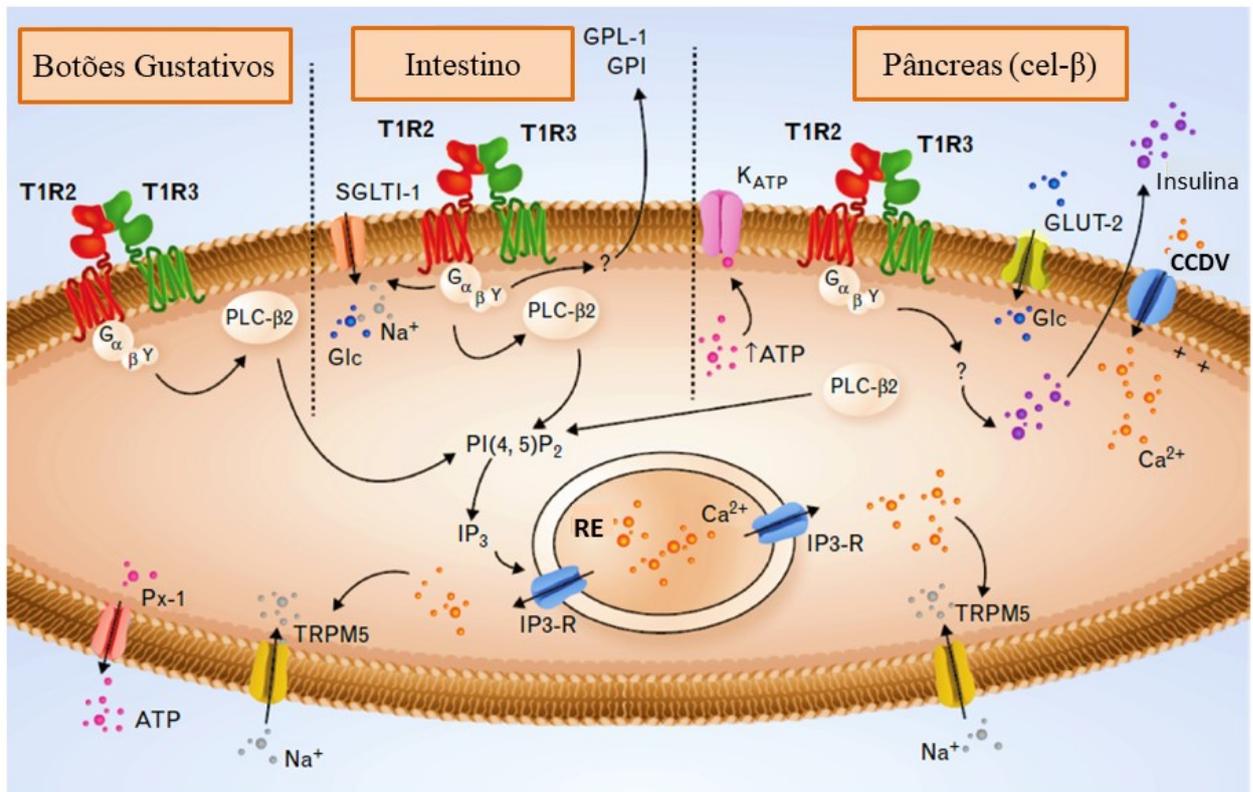
Esse mecanismo de transdução, comum à detecção de sabores doces, umami e amargos, leva à despolarização da membrana, gerando um potencial de ação e levando à liberação de trifosfato de adenosina (ATP) como um transmissor para ativar aferências gustativas (Figura 13). Experimentos comportamentais e eletrofisiológicos mostraram que camundongos nocaute para a α -gustducina (um membro da família Gai), apresentaram deficiência na detecção de compostos doces, umami e amargos (TOMONARI et al., 2012).

Alguns inibidores específicos do sabor doce foram usados como ferramentas farmacológicas nos estudos de cascata de transdução de sinal ou para investigar as funções fisiológicas do receptor de sabor doce em tecidos orais e extraorais. Os inibidores mais estudados incluem o lactisole, um inibidor competitivo seletivo da percepção do paladar doce humano e a gurmarina, um potente inibidor do receptor do sabor doce em roedores (SIGOILLO et al., 2012).

No estômago, T1R3 e α -gustducina são expressos nas células enteroendócrinas do tipo aberto. Sabe-se que as células enteroendócrinas secretam grelina, um hormônio gastrointestinal orexigênico, que atua como um ligante endógeno do receptor secretagogo do hormônio do crescimento do tipo 1a (GHS-R1a) e está envolvido, principalmente, em processos que impulsionam os animais a buscarem nutrientes mais energéticos. Depois de um aumento na concentração sanguínea de glicose ou aminoácidos, a liberação de grelina é suprimida. Como o T1R3 é expresso em células produtoras de grelina no estômago, foi proposto que o T1R3 está envolvido no ajuste da liberação de grelina após a ingestão de glicose (HASS; SCHWARZENBACHE, 2010; JANSSEN et al., 2011). Porém foi observado, em roedores obesos, que o consumo de ANC não afetou os níveis de NPY e POMC (MITSUTOMI et al., 2014).

Embora o efeito de moléculas doces na liberação de grelina ainda não tenha sido elucidado, experimentos conduzidos com camundongos nocaute, utilizando nuclucina, demonstraram que, após a administração de uma mistura de sabor amargo, não foi observada supressão da liberação de grelina, revelando um papel mais complexo da percepção do paladar na detecção de nutrientes (HASS; SCHWARZENBACHE, 2010; JANSSEN et al., 2011).

Figura 13 – Sinalização através de T1R2/T1R3 em células do tipo II de botões gustativos, no intestino e nas células β do pâncreas



Nota: Nos botões gustativos, o T1R2/T1R3 ativado interage com proteínas G heterotriméricas compreendendo α -gustducina, G $\beta 3$ e G $\gamma 13$. Após a dissociação das subunidades da proteína G, a subunidade G $\beta\gamma$ interage com a fosfolipase C- $\beta 2$ (PLC- $\beta 2$), que por sua vez cliva a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃), produzindo diacilglicerol (DAG). O IP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (RE) via ativação do receptor IP₃ tipo III (IP₃-R). O Ca²⁺ intracelular elevado ativa o canal TRPM5, levando à despolarização da membrana, que permite que o Pannexin-1 (PX1) do canal de ATP abra e libere o ATP, que estimula as fibras nervosas eferentes. No intestino, a via de transdução de sinal é semelhante ao descrito nas papilas gustativas. A estimulação da glicose (Glc) do receptor T1R2/T1R3 desencadeia a secreção de duas incretinas, GLP-1 e GIP, e aumenta a expressão do cotransportador sódio-glicose-1 (SGLT-1) para a membrana plasmática. Nas células β do pâncreas, o Glc é transportado pelo transportador de glicose-2 (GLUT-2). A glicólise leva a um aumento de ATP, levando ao fechamento do canal K_{ATP}, o que causa despolarização, por sua vez, ativa o canal de cálcio voltagem-dependente (CCVD), levando ao acúmulo de Ca²⁺ no citoplasma e à secreção de insulina. O receptor T1R2/T1R3 parece estar envolvido na regulação da secreção de insulina. ATP, trifosfato de adenosina; GIP, péptido insulínico dependente da glicose; GLP-1, péptido do tipo glucagon-1; TRPM5;

Fonte: Adaptado: LAFFITTE et al., 2014.

A função das células enteroendócrinas do tipo aberto ainda é pouco conhecida, embora haja alguma especulação sobre sua atuação como detectores quimiossensoriais, devido às suas semelhanças morfológicas com células gustativas tipo II das papilas e ao fato de expressarem moléculas gustativas de transdução, como TRPM5 e PLC- β 2 (IWATSUKI; UNEYAMA, 2012).

Os receptores T1R2 e T1R3 são expressos em todo o intestino delgado, em células enteroendócrinas (Figura 12) que secretam hormônios que promovem saciedade: peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e peptídeo insulínico dependente da glicose (GIP) (DYER et al., 2005; JANG et al., 2007; LAFFITTE et al., 2014). Jang e colaboradores, em 2010, demonstraram que camundongos nocaute para α -gustducina não secretaram GLP-1 em resposta à administração direta de glicose, confirmando, assim, o envolvimento do receptor de sabor doce na regulação da secreção dessas incretinas. Importante ressaltar, que camundongos nocaute para α -gustducina ou T1R3 demonstraram incapacidade de aumentar a expressão do cotransportador de sódio-glicose-1 (SGLT-1), após aumento da ingestão de carboidratos (MARGOLSKEE et al., 2007).

Finalmente, no duodeno, o nível de expressão do receptor de sabor doce mostrou ser regulado pelos níveis de glicose luminal e sistêmica. Em pacientes DM2 esta regulação ocorre de maneira desordenada (YOUN, 2013). Em conjunto, os dados relatados sugerem que tanto o receptor heterodímero de sabor doce, quanto a α -gustducina, desempenham papéis-chave no processo de detecção de carboidratos do intestino.

Desta maneira, os receptores T1R2/T1R3 apresentam funções sobre a secreção de incretinas (GLP-1), captação de glicose do lúmen intestinal para os enterócitos (por estimular a expressão do transportador de glicose dependente de sódio, SGLT-1 e o transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2), e secreção de insulina (NAKAGAWA et al., 2009).

Um estudo de coorte, com participantes de 20 anos ou mais, sugeriu uma correlação entre o uso crônico de adoçantes de baixa caloria e um risco crescente de obesidade (CHIA et al., 2016). Segundo Chão et al., (2016), a expressão da subunidade T1R3 é regulada negativamente nos neurônios hipotalâmicos de camundongos obesos em comparação a camundongos controle. Os receptores de sabor doce também são expressos no tecido adiposo branco de ratos, no entanto, o T1R3 apresenta expressão significativamente maior em comparação ao T1R2, sugerindo que uma alta porcentagem de T1R3 está presente como um homômero (YUN et al., 2016) provavelmente, em uma forma homodimérica (GHANAVATIAN et al., 2016).

Masubuchi e colaboradores (2013) demonstraram a presença do T1R3 em adipócitos, em processo de diferenciação e maduros, além disso, foi verificado que o homodímero T1R3 pode ativar a via de sinalização adenilato ciclase. Entretanto, outro estudo, realizado em 2013, demonstra que os receptores T1R2 e T1R3 estão presentes durante todo o processo de adipogênese (SIMON et al., 2013).

Curiosamente, um estudo recente revelou que camundongos nocautes para T1R2 têm gordura corporal reduzida em comparação com camundongos selvagens. Esta descoberta suporta a proposta de que o T1R2 tenha um papel fundamental na regulação da biologia do tecido adiposo (SMITH et al., 2016).

Em humanos, não foi observado efeito de adoçantes não calóricos sobre a secreção de GLP-1, PYY e supressão da secreção de grelina, sugerindo que a estimulação dos receptores T1R2/T1R3 do intestino por si só não seja suficiente para produzir respostas relevantes destes peptídeos reguladores do apetite (STEINERT et al., 2011).

1 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a hipernutrição no período da lactação pode alterar o balanço energético, levando ao desenvolvimento da obesidade e alterações metabólicas e morfológicas, como hiperinsulinemia, resistência à insulina e hipertrofia do tecido adiposo branco, que persistem até a idade adulta. Com o aumento da prevalência da obesidade, houve um maior consumo de adoçantes não calóricos pela população como uma alternativa para perda e manutenção do peso corporal e controle glicêmico, visto que estes adoçantes contribuem com o sabor doce sem acrescentar calorias.

Entretanto, dados da literatura sugerem que os adoçantes não calóricos não são compostos inertes, estando associados ao ganho de peso, intolerância à glicose, aumento da secreção de insulina, hiperfagia, alterações na adipogênese e lipólise do tecido adiposo branco, que podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade e suas complicações crônicas, como dislipidemias, doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2. Esses dados sugerem que os adoçantes artificiais amplamente vistos como uma forma de combater a obesidade e diabetes poderiam, em parte, contribuir para a epidemia global dessas doenças.

Contudo, pouquíssimos estudos apresentam a ação dos ANC sobre as alterações moleculares referentes ao metabolismo energético em tecidos periféricos, como por exemplo, o tecido adiposo branco, importante regulador da homeostase energética e de glicose, além disso, até o presente momento não há a investigação do efeito do consumo crônico do adoçante Stevia no modelo de estudo realizado. Os adoçantes são quimicamente diversos e, conseqüentemente, não acarretam os mesmos efeitos fisiológicos. Desta maneira, torna-se necessário a investigação do efeito do consumo do adoçante natural, produzido a partir da Stevia, com intuito de elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos pelos quais o adoçante possa estar envolvido na regulação da adiposidade corporal e do metabolismo energético.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre a resposta metabólica e a atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos adultos obesos que foram submetidos à hiperalimentação durante o período de lactação.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o peso corporal, consumo alimentar e hídrico do desmame (21 dias) até a idade adulta (180 dias);
- b) Avaliar a composição corporal (massa corporal, gordura visceral, porcentagem de massa magra e de gordura) antes (90 dias) e após o tratamento com Stevia (180 dias);
- c) Dosagem bioquímica (glicose, triglicerídeos e colesterol);
- d) Analisar a tolerância à glicose antes (90 dias) e após (180 dias) o consumo de Stevia;
- e) Analisar a morfologia do tecido adiposo branco;
- f) Analisar a função mitocondrial do TAB de animais controle e hiperalimentados, através do consumo de oxigênio frente a substratos energéticos relacionados à oxidação de ácidos graxos através da respirometria de alta resolução, e da produção de ATP por estes tecidos;
- g) Avaliar o conteúdo de marcadores envolvidos na regulação do metabolismo energético e sinalização de insulina no TAB: GLUT4, IR- β , IRS-1, PI3K, pAMPK;
- h) Analisar a expressão gênica de proteínas que estão envolvidas no metabolismo lipídico: FAS, LPL.

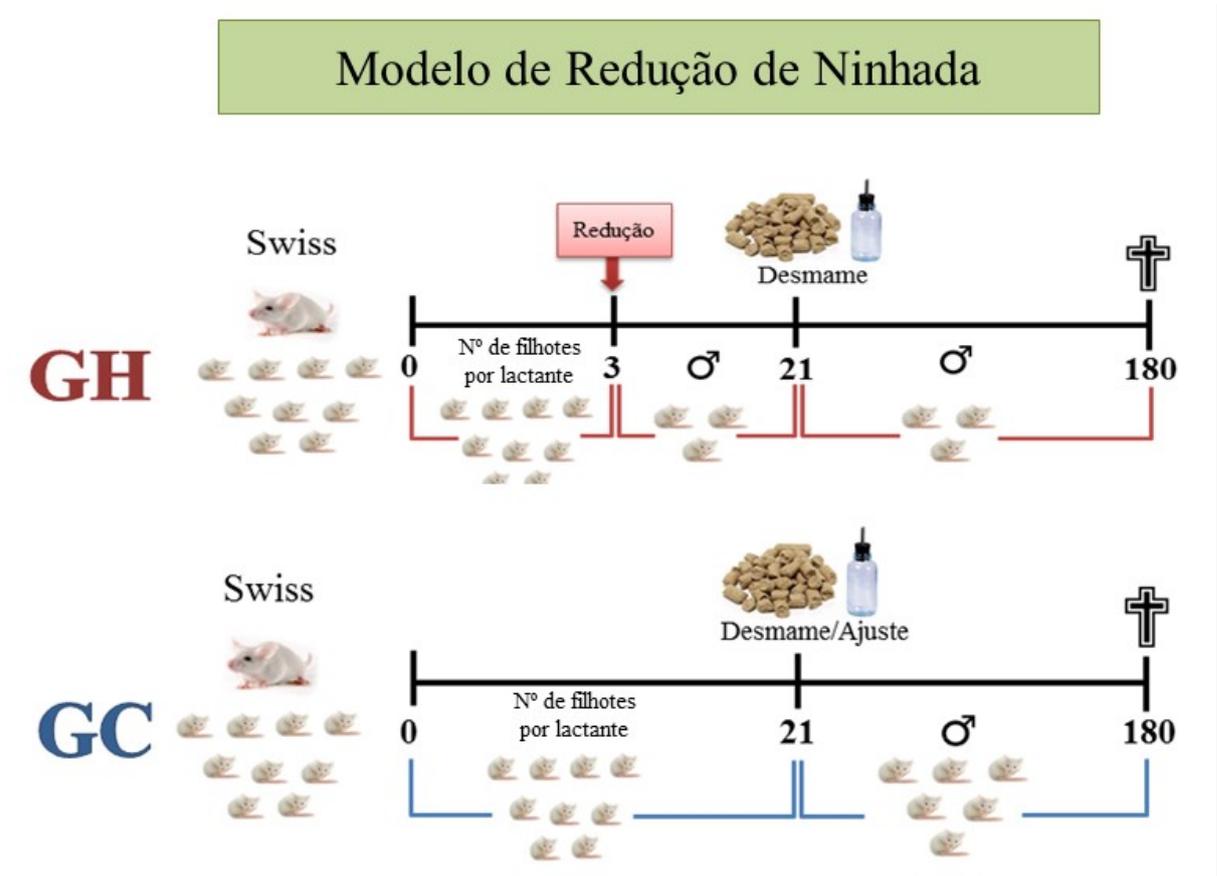
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e modelo experimental

Para o desenvolvimento do modelo experimental, utilizamos o método de hiperalimentação durante a lactação através da redução de ninhada (PLAGEMANN et al., 1992), já estabelecido em nosso laboratório. Camundongos fêmeas da espécie *Swiss* com 3 meses de idade, fornecidas pelo Instituto Vital Brasil ao biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento, foram acasaladas (3 fêmeas: 1 macho), ao terminar o período de acasalamento de camundongos *Swiss*, as fêmeas prenhas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais de polipropileno recebendo água e ração comercial padrão Nuvilab® *ad. Libtum*. No segundo dia após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram ajustadas para 9 filhotes por lactante e divididos em dois grupos:

- a) **Grupo Controle (GC):** ninhadas de lactantes que amamentaram 9 filhotes (6 machos e 3 fêmeas) com dieta normal (25% de proteína) até o 21º dia (final da lactação ou desmame). No desmame, o grupo controle foi ajustado para seis camundongos machos por gaiola, até completarem 180 dias de vida (Figura 14).
- b) **Grupo Hiperalimentado (GH):** ninhadas de lactantes que amamentaram 9 filhotes com dieta normal (25% de proteína) até o 3º dia, neste dia a ninhada foi reduzida somente à 3 filhotes machos por gaiola, onde estes permaneceram com a lactante até o 21º dia (final da lactação ou desmame) (Figura 14).

Figura 14 – Esquema do modelo de redução de ninhada e formação dos grupos hiperalimentado e controle até 180 dias de vida



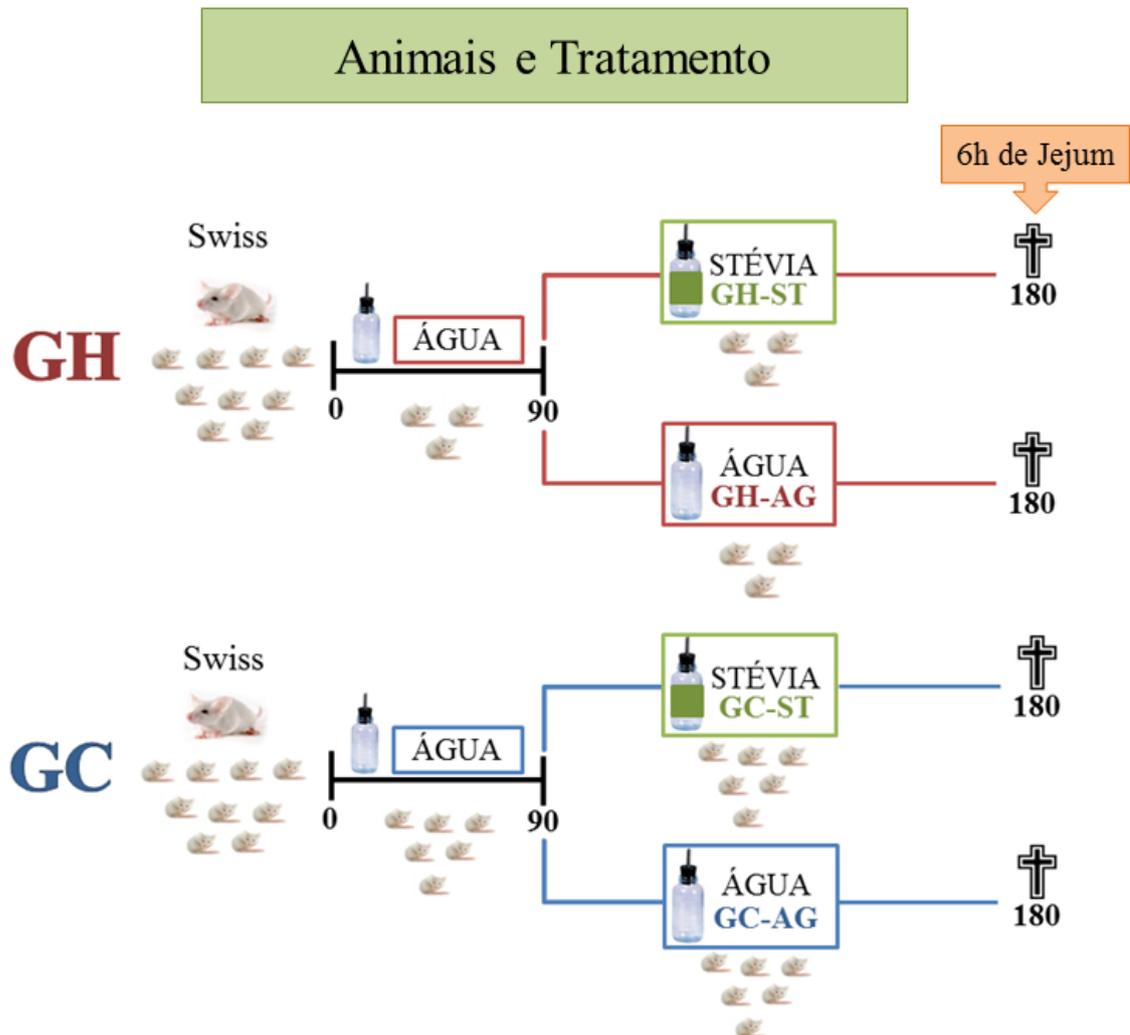
Legenda: GC – grupo controle; GH – grupo hiperalimentado; 0 – dia do nascimento; 3 – terceiro dia após o nascimento; 21 – vinte e um dias após o nascimento; 180 – dia da eutanásia; ♂ machos;

Nota: Modelo de redução de ninhada;

Fonte: A autora, 2018.

Aos 90 dias de vida, os grupos controle e hiperalimentado foram divididos em dois subgrupos, grupo controle e hiperalimentado que receberam água contendo 0,3% de Stevia (GC-ST e GH-ST) ou grupo controle e hiperalimentado que receberam água pura (GC-AG e GH-AG) (Figura 15). Os animais receberam dieta comercial padrão Nuvilab® e água pura ou água com Stevia *ad libitum* por 12 semanas (dos 90 até os 180 dias de vida). Foram mantidos em condições padrão de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($60\pm 10\%$), o ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro/escuro (07:00h às 19:00h) e o ciclo de exaustão do ar (15 min/hora).

Figura 15 – Modelo de divisão dos grupos hiperalimentado e controle em subgrupos até 180 dias de vida



Legenda: GC - grupo controle; GC-AG - grupo controle água; GC-ST - grupo controle Stevia; GH - grupo hiperalimentado; GH-AG - grupo hiperalimentado água; GH-ST - grupo hiperalimentado Stevia;
 Nota: Modelo de divisão de subgrupos e tratamento até os 180 dias de vida;
 Fonte: A autora, 2018.

Os camundongos foram eutanasiados em condições de jejum (6 horas). Para a realização de todos os experimentos foram utilizados 6 animais machos de cada ninhada totalizando um n de 8 a 15 animais por grupo. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, usados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os protocolos experimentais aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA|053|2017).

3.2 Composição e obtenção do adoçante natural Stevia

O critério de seleção para determinação do adoçante utilizado no presente estudo foi a composição do mesmo (Stevia como o único edulcorante da lista de ingredientes do adoçante). O adoçante a base de Stevia (Stevita Soul®) foi adquirido através de doação pela empresa produtora (Stevita Soul, Maringá, PR, Brasil).

O produto fornecido é descrito pelo fabricante como um pó de coloração branco a amarelo claro, inodoro ou com leve odor característico. Apresenta poder edulcorante de 200 a 300 vezes mais doce que a sacarose. Constituído por todos os nove glicosídeos de esteviol, sendo o esteviosídeo ($C_{38}H_{60}O_{18}$) e o rebaudiosídeo A ($C_{44}H_{70}O_{23}$) presentes em maiores quantidades. Possui mais de 99% de pureza (ANEXO).

3.3 Análise do ganho de peso corporal dos animais durante o crescimento

Para acompanhar o ganho de peso após o nascimento, os animais foram pesados semanalmente a partir do 10º dia de vida pós-natal até os 180 dias em mini balança digital (professional digital table scale MOD 1200). Os animais também foram pesados em dias específicos: aos 10, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 145, 160 e 180 dias de vida, pois tais dias de vida marcam períodos importantes durante o crescimento dos animais.

3.4 Consumo alimentar e hídrico

Após o desmame, o consumo alimentar e hídrico (água pura ou água com adição do adoçante natural) foram acompanhados a cada dois dias até que os animais completassem 180 dias de vida. Através da técnica de resto-ingesta, foi possível calcular o consumo alimentar dos animais, a quantidade de ração ingerida foi estimada pela diferença entre o peso da ração que restou na gaiola (R_f – ração final) e a quantidade total colocada dois dias antes (R_i – ração inicial), de acordo com a fórmula:

$$\text{Ingestão de ração (g)} = \frac{(\text{Ri} - \text{Rf}) \div 2}{n}$$

O “n” corresponde ao número de animais em cada gaiola (sendo 3 animais nas caixas dos grupos hiperalimentados e 6 animais nas caixas dos grupos controles), e “2” corresponde ao número de dias.

O consumo alimentar e hídrico foi corrigido pela massa corporal de acordo com as seguintes fórmulas:

(a) Consumo alimentar

$$\text{Consumo alimentar corrigido pela MC} = \frac{\text{somatório da ração ingerida (g)} \div 2}{\text{somatório da massa corporal (g)}}$$

(b) Consumo hídrico

$$\text{Consumo hídrico corrigido pela MC} = \frac{\text{somatório da ingestão hídrica(ml)} \div 2}{\text{somatório da massa corporal (g)}}$$

O somatório da ingestão alimentar e hídrica foi dividido por dois (referente ao intervalo de dias do resto-ingesta) para estimar o consumo diário de cada caixa. Tal valor foi dividido pelo somatório da massa corporal da caixa correspondente.

3.5 Ressonância magnética nuclear

A composição corporal dos animais controles e hiperalimentados foi verificada através da ressonância magnética nuclear (RMN) Em PN178. Aos 90 dias de vida (antes do tratamento ser iniciado) e aos 180 (ao final do tratamento), a massa total de gordura corporal e a massa magra (massa livre de gordura) foram analisadas utilizando RMN para pequenos animais vivos, sem a utilização de anestesia prévia. Os camundongos foram digitalizados pelos equipamentos (Whole Body Composition Analyzer, Bruker's Minispec LF90 TD-NMR, Rheinstetten, Alemanha). No dia do teste, uma verificação de controle de qualidade das tensões internas, temperatura, ímãs e parâmetros de RMN foi realizada usando um padrão

fornecido pelo fabricante. Os animais foram colocados em um cilindro de plástico transparente e imobilizados pela inserção de um êmbolo ajustado no cilindro. O tubo foi colocado na câmara de leitura do equipamento por aproximadamente 2 minutos, para a leitura. A avaliação foi cega porque o técnico de RMN não conhecia o protocolo experimental. Os dados foram expressos em % de massa gorda e % de massa magra.

3.6 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Após o jejum de 6 horas, realizamos o teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos camundongos de ambos os grupos ao final do período experimental (180 dias). Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (1g/Kg de peso) e a glicemia foi verificada através do sangue retirado da veia da cauda do animal com o auxílio de glicosímetro (Accu-Check Active®, Roche Diagnostics, Germany). As amostras de sangue foram coletadas antes da injeção de glicose (tempo 0) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose.

3.7 Eutanásia e coleta de tecidos

Após seis horas de jejum, a glicemia plasmática dos animais dos grupos controle e hiperalimentado foi determinada através do sangue caudal com auxílio de glicosímetro e fitas teste (Accu-Check Active®, Roche Diagnostic), os resultados foram expressos em mg/dl. Em seguida, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Avertin (2,2,2-tribromoethanol, 2-metil-2-butanol) – 0,02 ml/g de peso corporal. Com os animais sob o efeito da anestesia, o tórax foi aberto para a coleta de sangue e retirada dos tecidos. O tecido adiposo branco foi removido, pesado e armazenado em freezer -70°C para a realização de diversas técnicas. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

3.8 Análise dos parâmetros bioquímicos, plasmáticos e dosagem hormonal

As amostras de sangue dos animais foram coletadas na cavidade torácica e, posteriormente, vertidas em tubo de ensaio contendo EDTA K3 (concentração final de 1.735 mg/mL). Imediatamente, foram centrifugadas a 3000rpm durante 15 minutos a 4°C para a separação do plasma, em seguida o plasma foi alíquotado e mantido a -20°C para posterior quantificação das concentrações de triglicerídeos e colesterol que foram avaliadas por método colorimétrico utilizando kits comerciais específicos (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.9 Mensuração da gordura epididimal e fígado

A gordura epididimal (GE) dos animais inclui o tecido adiposo ao redor dos ureteres, bexiga e epidídimo, que foi completamente removida de ambos os lados do animal controle e hiperalimentado, foi pesada, assim como o fígado, em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N®).

3.10 Comprimento naso-anal e comprimento da tíbia

Mensurou-se o comprimento naso-anal dos animais dos grupos controles e hiperalimentados, com auxílio de paquímetro para análise do índice de Lee (raiz cúbica da massa corporal (g)/ comprimento naso-anal (cm) x 1000). A tíbia esquerda foi dissecada e o seu comprimento (CT) foi aferido com auxílio de paquímetro.

3.11 Análise histológica

Após a eutanásia, parte do tecido adiposo branco (aproximadamente 100 mg) dos grupos experimentais foi coletada e fixada em formol tamponado por 72 horas. Após este

período, o tecido foi desidratado em série crescente de álcool, diafinizado em xilol, infiltrado em banhos de parafina e, por último, incluído em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com secções de 5µm e os cortes corados com método de Hematoxilina e Eosina.

As imagens digitais foram capturadas com o sistema de câmera de vídeo Optronics CCD ao microscópio de luz Olympus BX 53, na objetiva de 40x. Foram utilizadas 5 lâminas por animal, dos quais foram selecionados 10 campos aleatórios.

3. 12 Análise das proteínas através de western Blotting

3.12.1 Lise do tecido adiposo branco

A gordura epididimal dos animais foi retirada, pesada e congelada imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise através da técnica de Western Blotting. Os materiais foram lisados em 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na₃Vo₄, 1% NP-40, 0.1% SDS, acrescentado com o inibidor de protease: Complete EDTA-Free (Roche Diagnostics, California, USA), por trituração manual com o homogeneizador e posteriormente deixado em repouso no gelo por 30 minutos. Após a lise, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8.000rpm a 4°C (Centrifuge 5430 R[®], Eppendorf) e o sobrenadante coletado e transferido para novos eppendorfs, sendo centrifugado novamente pelo mesmo tempo e na mesma velocidade e armazenado em freezer -70°C.

3.12.2 Análise por Western Blotting

A concentração de proteínas totais foi determinada através do método colorimétrico BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford U.S.A). Em seguida, o lisado foi desnaturado em solução tampão (SDS 0.1%, NaOH 10N, 2β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%) por 3 minutos a 100°C. O conteúdo das proteínas presentes

nos extratos celulares foi determinado através da utilização de eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por peso molecular.

As proteínas totais (15µg de proteína) foram separadas em gel de poliacrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, APS 10%, TEMED®, SDS 0,4%, Tris 1,5M) a 8, 10, 12 ou 15%, juntamente com o padrão de peso molecular para proteínas (GE-Healthcare Life Sciences®) e submetidas a eletroforese SDS-PAGE em cuba de eletroforese. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech®, Piscataway/ U.S.A). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS-Tween (1% de Tween 20) com 5% de leite em pó desnatado a 25°C por 1 hora de agitação constante. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anti-pAMPK α (sc-33524), anti-PI3K (sc-423), anti-IR β (sc-711), anti-IRS1 (sc-559), anti-GLUT4 (sc-53566) overnight. Foi utilizado anti-actina (A2066, 1:1000, Sigma-Aldrich) como controle endógeno.

Após o período overnight, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com biotina adequados anti-rabbit, anti-goat ou anti-mouse (SC-2040, SC-2042, SC-2039 – 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:5000 ou 1:8000, Santa Cruz Biotechnology), seguido por 1h de incubação com estreptavidina peroxidase conjugada na mesma proporção dos secundários. A imunorreatividade foi visualizada por quimioluminescência (ECL-Plus, Amersham Biosciences ou Thermo Scientific), e subsequentemente quantificados por densitometria utilizando o software Image J® (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.13 Análise da função mitocondrial por Respirimetria de Alta Resolução

3.13.1 Obtenção do tecido adiposo epididimal permeabilizado

O tecido adiposo branco epididimal foi retirado e rapidamente imerso em solução de relaxamento e preservação BIOPS (em mM: CaK₂EGTA 2.77, K₂EGTA 7.23, MgCl₂ 6.56, ditiotretitol 0.5, K-MES 50, imidazol 20, taurina 20, Na₂ATP 5.77, fosfocreatina 15, pH 7,1 ajustado a 25°C) contida em uma placa de petri, sobre gelo. Após imersão do tecido adiposo branco em BIOPS gelada, aproximadamente 50-70mg de peso úmido foram retirados. Usando

pinças microcirúrgicas, cuidadosamente, o tecido foi dissecado para retirada de vasos sanguíneos remanescentes. Após a dissecação, o tecido adiposo branco foi lavado por 10 minutos em meio de respiração mitocondrial MIR05 (em mM: EGTA 0.5, MgCl₂ 3.0, K-MES 60, taurina 20, K₂HPO₄ 10, HEPES 20, Sacarose 110 e BSA 1g/L, pH 7,1 ajustado a 25°C) no gelo. Em seguida, prosseguimos com o protocolo da respirometria descrito abaixo.

3.13.2 Respirometria de alta resolução

O tecido adiposo epididimal foi pesado em balança analítica e 5 a 7 mg de tecido foram adicionados às câmaras do oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2ml de MIR05 a 37°C. Todas as análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O₂.ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂.s⁻¹.mg de peso úmido⁻¹. Para permeabilização do tecido utilizamos digitonina 5mM. O estudo foi realizado utilizando os seguintes substratos (em mM): Palmitoil-L-carnitina 0.02, malato 2 e ADP 5, para avaliar a oxidação relacionada à ácidos graxos. Ao final da adição dos substratos na câmara referente ao protocolo de oxidação, foram realizadas titulações subsequentes de 0,5µM do desacoplador FCCP (carbonil cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona) até que fosse alcançado a respiração máxima no estado desacoplado. Logo, quando uma adição de seguimento do FCCP não resultava em aumento do fluxo respiratório, era considerada, então, como capacidade máxima da respiração. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: estado 1 - taxa respiratória basal, sem adição dos substratos; estado 2 - antes da adição de adenosina difosfato (ADP); estado 3 (Complexo I) - taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM); e estado 4 - taxa respiratória máxima após adição do desacoplador FCCP. Para examinar a integridade mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c.

A razão do controle de desacoplamento (RCD) foi calculada através da razão entre a respiração desacoplada máxima por FCCP (estado 4) e o estado 3 máximo (KRAUNS et al., 2010).

3.14 Determinação das concentrações de ATP

No momento do sacrifício foram retirados 50mg de tecido (gordura epididimal) para a análise de ATP, onde este foi imediatamente homogeneizado em 1ml de ácido tricloroacético (1%) para ocorrer a precipitação das proteínas e preservação do ATP conforme descrito previamente por Stanley (1969). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000rpm e a 4°C, o sobrenadante foi coletado e, em seguida, o pH foi ajustado para 7,0 e as amostras foram congeladas em freezer -70°C.

As concentrações de ATP foram determinadas por ensaio de bioluminescência baseado na reação luciferina/luciferase através do kit específico ATP Determination A22066® (Molecular Probes™, Invitrogen, EUA), foi utilizado o comprimento de onda de 535nm. Os valores estão expressos em milimol (mmol).

3.15 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

3.15.1 Extração do RNA total

O RNA foi isolado a partir de 200mg de tecido adiposo epididimal utilizando kit RNeasy de extração de tecidos de lipídios (QIAGEN, Valencia, CA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensão em 30µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

Quantidade e qualidade do RNA foi determinada utilizando um espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, EUA). Alíquotas do RNA total foram diluídas em água DEPC estéril. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 260nm para ácido nucléico e 280nm para contaminantes proteicos. A relação entre essas leituras demonstrou uma razão maior que 1,6, garantindo a qualidade do RNA obtido, segundo as exigências vigentes para a biologia molecular.

3.15.2 PCR em tempo real

O RNA total extraído (2,0 µg) foi reversamente transcrito em cDNA a 42°C, na presença da enzima transcriptase reversa e de Random primers. As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems) com volume de reação de 25 µl. Todas as reações foram realizadas em triplicatas com controle negativo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism 7500[®] (Applied Biosystems) nas seguintes condições de amplificação: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. A quantificação relativa de cDNA foi obtida pelo software do sistema 7500, que utiliza o método comparativo ($\Delta\Delta CT$). Primers e sondas específicas para TaqMan (LPL, FASn e GAPDH) foram obtidos a partir do catálogo de expressão gênica ABI TaqMan[®] (Foster City, CA, EUA). Este kit de ensaio contém uma mistura de reação mix 20x, de detecção de junções éxon-éxon otimizado para se obter aproximadamente 100% de eficiência.

3.16 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 8 a 15 animais por grupo. Todos os dados foram testados para a curva de distribuição normal e homogeneidade de variância através do teste Kolmogorov-Smirnov.

Foi utilizado para análise estatística do peso corporal, Two-way ANOVA de medidas repetidas (MR).

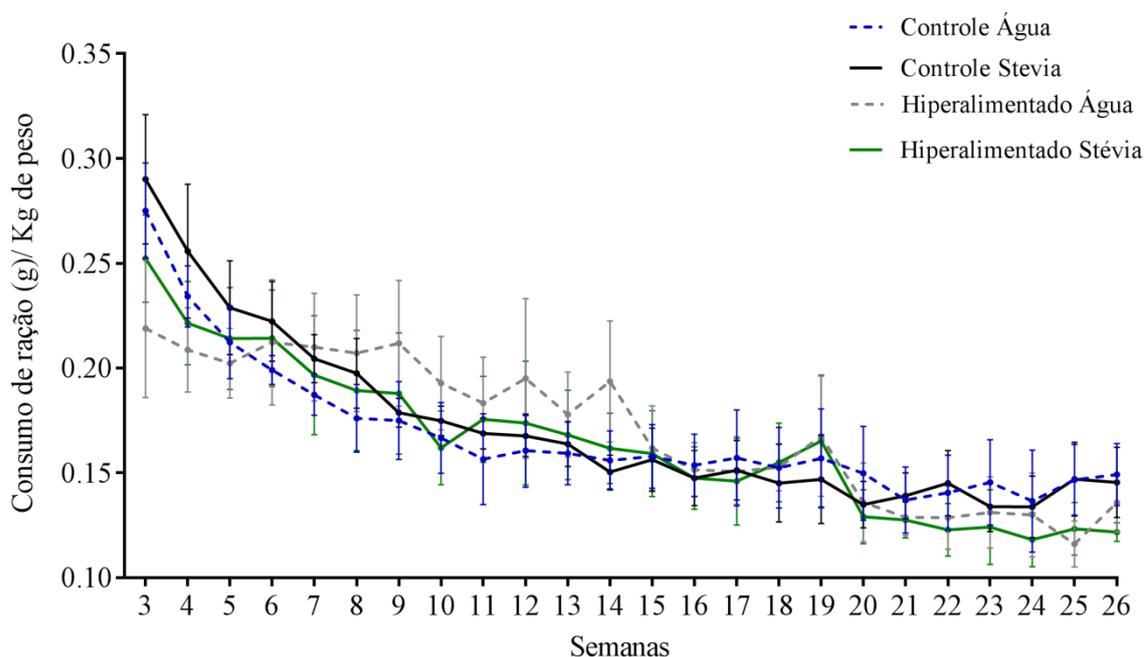
O efeito da hiperalimentação durante a lactação e o consumo de Stevia sob as variáveis estudadas foram analisados por *Two way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações, através do software *Graph Pad Prisma 7.00* (San Diego, CA, USA), considerando nível de significância de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Consumo alimentar semanal corrigido pela massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados até 180 dias de vida

Após o desmame, aos 21 dias de vida, a ingestão alimentar dos animais do presente estudo foi avaliada até que os mesmos completassem 180 dias de vida. Não houve diferença significativa na ingestão de ração ao longo do tempo entre os grupos estudados. O consumo alimentar dos animais foi corrigido pela massa corporal.

Figura 16 – Consumo alimentar semanal corrigido pela massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados até 180 dias de vida



Legenda: g – gramas; Kg – quilogramas;

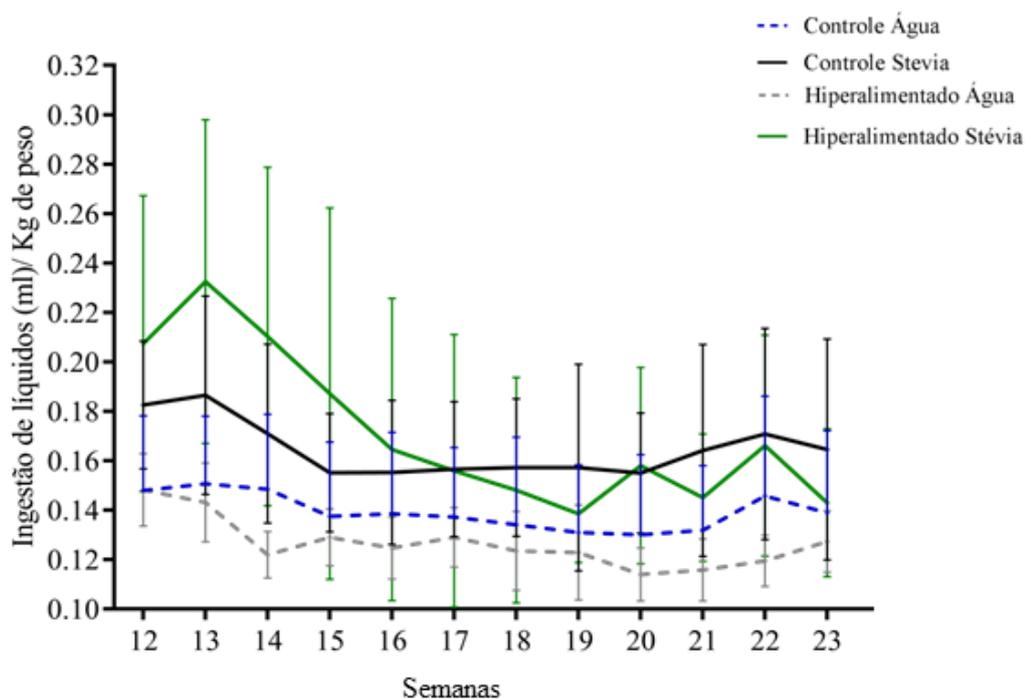
Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 7-15 animais por grupo. A figura representa a quantidade de ração (g) consumida, corrigida pela massa corporal (g);

Fonte: A autora, 2018.

4.2 Avaliação da ingestão semanal de líquidos corrigida pela massa corporal de camundongos controles e hiperalimentados dos 90 até 180 dias de vida

Ao completarem 12 semanas de vida (90 dias), a ingestão de líquidos (água pura ou água com Stevia) pelos animais foi avaliada até os 180 dias de vida. Não houve diferença significativa na ingestão hídrica ao longo do tempo entre os grupos estudados. O consumo hídrico dos animais foi corrigido pela massa corporal dos mesmos.

Figura 17 – Avaliação da ingestão hídrica semanal corrigida pela massa corporal de camundongos controles e hiperalimentados dos 90 até 180 dias de vida



Legenda: g – gramas; Kg – quilogramas; ml – mililitros

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 7-15 animais por grupo. A figura representa a quantidade de ração (g) consumida, corrigida pela massa corporal (g);

Fonte: A autora, 2018.

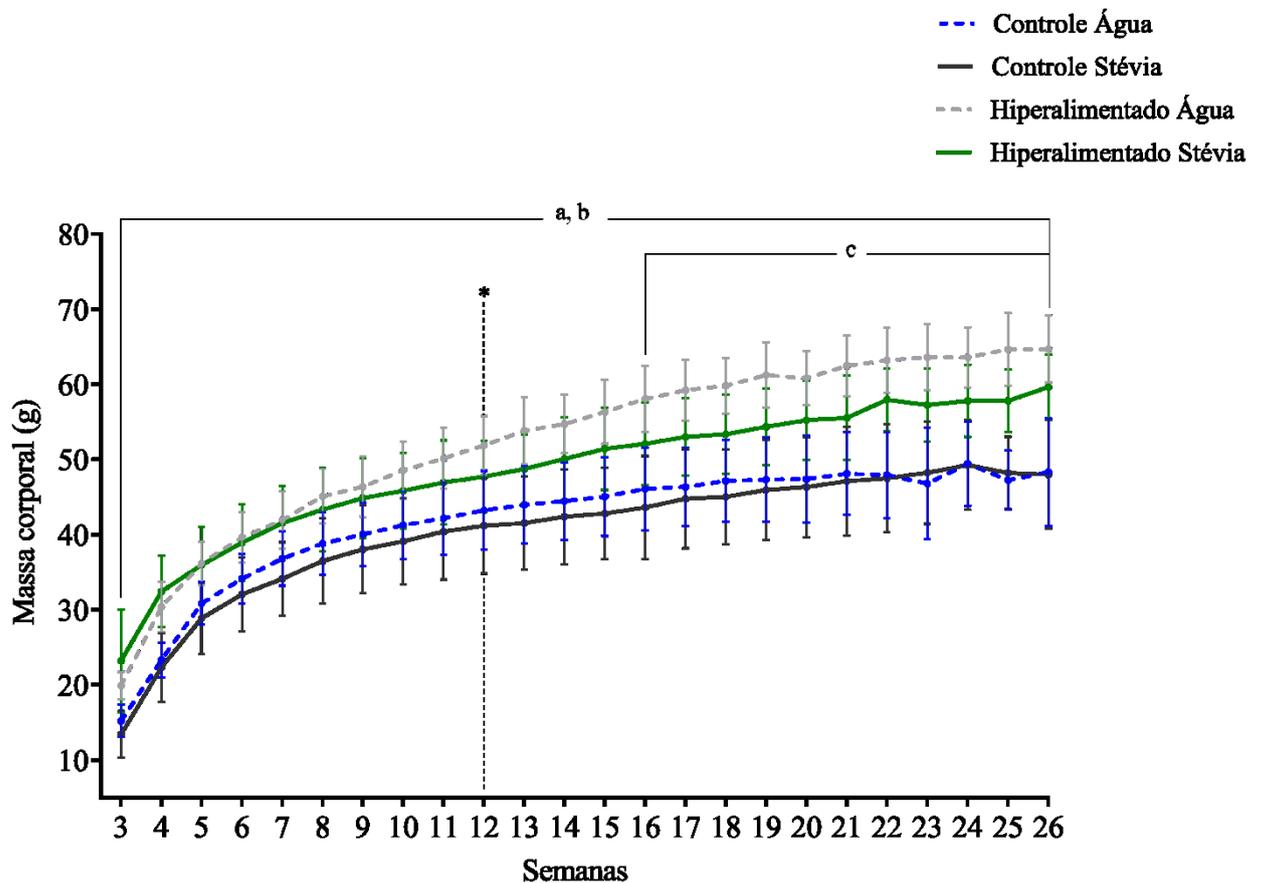
4.3 Efeitos da hiperalimentação durante a lactação e do consumo de adoçante natural Stevia sobre a massa corporal de camundongos até 180 dias de vida

Através da pesagem semanal dos animais foi possível avaliar a variação da massa corporal de todos os grupos estudados. Observamos que os animais hiperalimentados no início da lactação (GH-AG e GH-ST) apresentaram aumento significativo no ganho de massa corporal ($P < 0,005$) desde a terceira semana de vida (21 dias), e este permaneceu ao longo de todas as semanas de acompanhamento (180 dias de vida), quando comparados com seus respectivos grupos controles (GC-AG e GC-ST).

Quando comparamos os grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST), é possível observar um menor ganho de massa corporal significativa ($P < 0,005$), que ocorre a partir da 16ª semana que permanece até o final do tratamento. Apesar da diminuição da massa corporal encontrada no grupo hiperalimentado que recebeu o adoçante, tal redução não foi capaz de diminuir o percentual de gordura corporal nesse mesmo grupo (Figura 20).

Não houve diferença significativa entre os grupos controles (GC-AG e GC-ST), demonstrando que a Stevia promoveu efeitos distintos de acordo com o estado nutricional do animal.

Figura 18 – Avaliação da massa corporal (g) semanal de camundongos controles e hiperalimentados durante a lactação até os 180 dias de vida



Legenda: g – gramas; * - início do tratamento; a, significativo em comparação com GC-AG; b, significativo em comparação com GC-ST; c, significativo em comparação com GH-AG; g – gramas;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 10-15 animais por grupo. A figura representa o peso corporal semanal dos animais controles e hiperalimentados, que foi aferido a partir da terceira semana de vida dos animais até os 180 dias; Na 12ª semana de vida dos animais iniciamos o tratamento com Stevia nos grupos controle e hiperalimentado;

Fonte: A autora, 2018.

4.4 Massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 de vida

Através da técnica de ressonância magnética nuclear foi possível analisar a composição corporal dos animais. Aos 90 dias de vida, observamos que os animais já apresentavam uma diferença significativa de massa corporal, resultante da hiperalimentação durante a lactação. Os animais hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) apresentaram um aumento significativo de 22% no ganho de peso ($P < 0,0001$) quando comparados com os animais dos seus respectivos grupos controles (GC-AG e GC-ST).

Aos 180 dias de vida essa diferença ainda é observada, no entanto, torna-se maior entre os animais que somente receberam água (GC-AG e GH-AG) (32%, $P < 0,0001$) e menor entre os que receberam Stevia (GC-ST e GH-ST) (17%, $P < 0,0001$). Podemos observar, ainda, que após o tratamento com Stevia o grupo hiperalimentado que recebeu o adoçante natural (GH-ST) sofreu uma diminuição significativa de 14% ($P < 0,0001$) da massa corporal quando comparado com o grupo hiperalimentado que não recebeu Stevia (GH-AG).

Não ocorreu diferença significativa entre os grupos controles (GC-AG e GC-ST).

Figura 19 – Massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida



Legenda: a, significativo em comparação com GC-AG; b, significativo em comparação com GC-ST; c, significativo em comparação com GH-AG; g – gramas;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 7-11 animais por grupo. A figura representa a massa corporal (g) dos animais controles e hiperalimentados, aos 90 e 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2018.

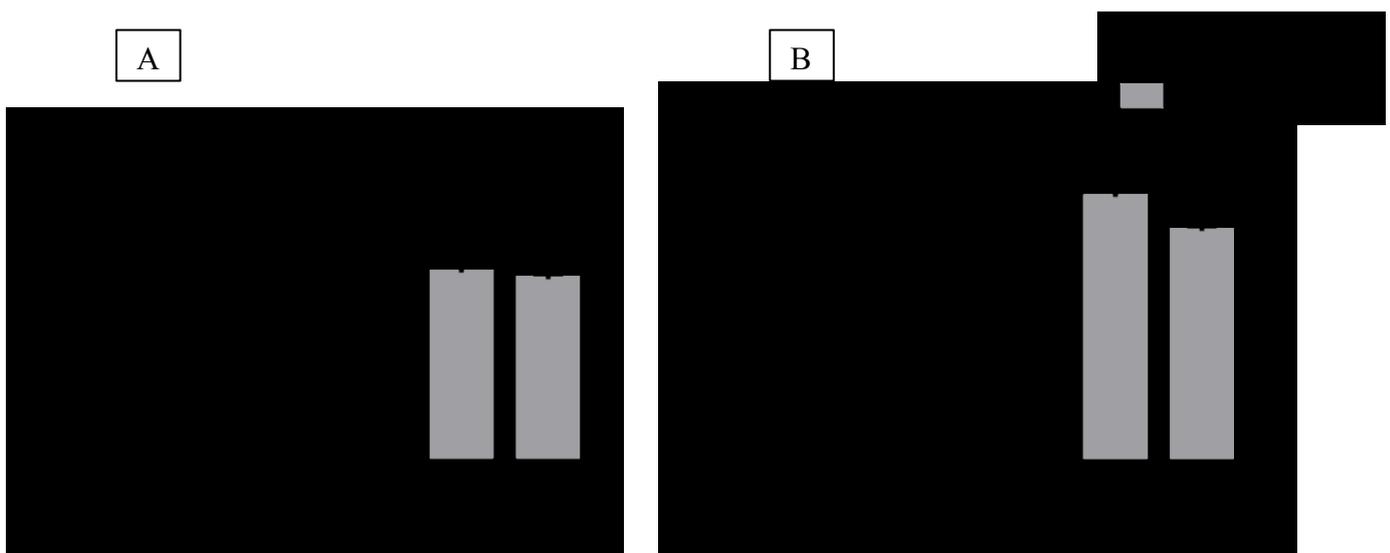
4.5 Porcentagem de gordura corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida

Podemos observar que aos 90 dias de vida, os animais apresentaram uma diferença significativa da porcentagem de gordura corporal devido à hipernutrição durante a lactação. Os animais hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) possuíram maior quantidade de gordura corporal, 25% e 29% ($P < 0,005$), quando comparados aos seus respectivos grupos controle (GC-AG e GC-ST).

Aos 180 dias de vida essa diferença passa a ser de 40% ($P < 0,0001$) entre os grupos que receberam apenas água (GC-AG e GH-AG) e de 39% ($P < 0,0001$) entre os grupos que receberam Stevia (GC-ST e GH-ST).

Podemos observar, ainda, que o grupo GC-ST apresentou um aumento significativo de 51% ($P < 0,0001$) da quantidade de gordura corporal quando comparado com o grupo GC-AG, no entanto, esse aumento de gordura corporal não foi capaz de aumentar significativamente a massa corporal deste grupo (GC-ST) (Figura 19).

Figura 20 – Porcentagem de gordura corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida



Legenda: a, significativo em comparação com GC-AG; b, significativo em comparação com GC-ST; c, significativo em comparação com GH-AG; % = porcentagem;

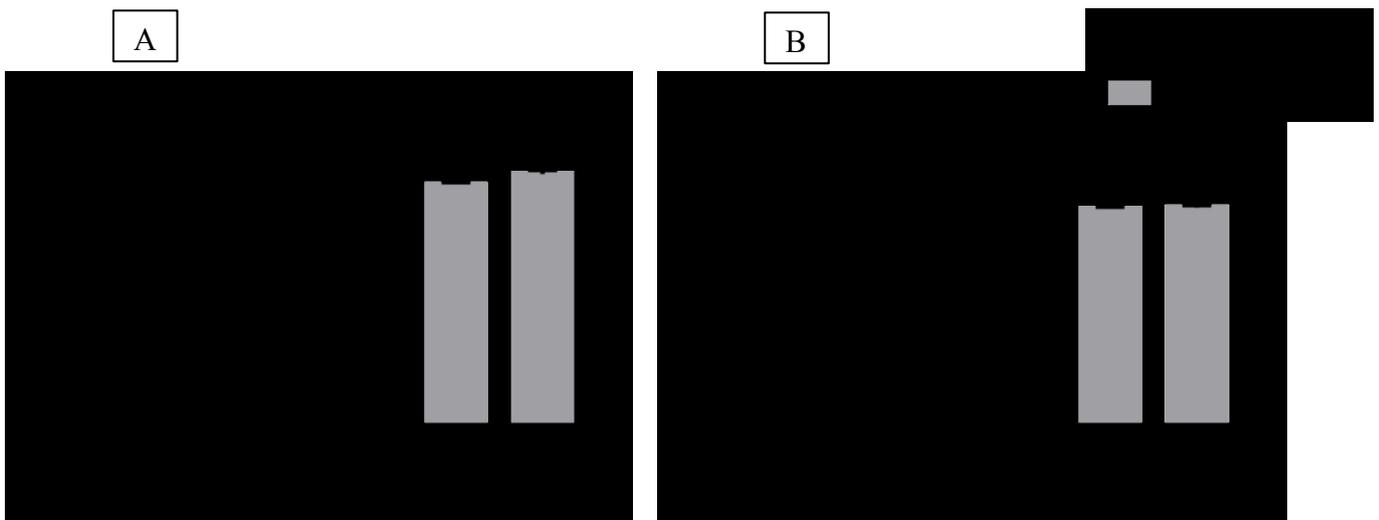
Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8-12 animais por grupo. A figura representa a quantidade de gordura corporal (%) dos animais controles e hiperalimentados, aos 90 e 180 dias de vida; Fonte: A autora, 2018.

4.6 Porcentagem de massa magra dos grupos controle e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida

Aos 90 dias de vida, os animais não apresentaram diferença significativa na quantidade de massa magra corporal. Entretanto, aos 180 dias de vida podemos observar uma diminuição significativa de massa magra devido ao efeito da hiperalimentação durante a lactação, onde os animais hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) apresentaram uma diminuição significativa de 17 e 12% ($P < 0,0001$) de massa magra, quando comparados com seus respectivos controles (GC-AG e GC-ST).

Não ocorreu diferença significativa entre os grupos controles (GC-AG e GC-ST).

Figura 21 – Porcentagem de massa magra dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida



Legenda: a, significativo em comparação com GC-AG; b, significativo em comparação com GC-ST; c, significativo em comparação com GH-AG; % = porcentagem;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8-12 animais por grupo. A figura representa a quantidade de massa magra (%) dos animais controles e hiperalimentados, aferidas aos 90 e 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2018.

4.7 Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Observamos que a hiperalimentação durante a lactação foi capaz de promover um aumento significativo de 34% ($P < 0,0001$) na massa corporal dos animais do grupo GH-AG, quando comparados com seu respectivo grupo controle (GC-AG). Quando comparamos os animais suplementados com Stevia (GH-ST e GC-ST), o aumento foi de 21% ($P < 0,005$). Foi possível observar, ainda, uma diminuição significativa de 13% ($P < 0,005$) da massa corporal do grupo GH-ST quando comparado com o grupo GH-AG (Tabela 1).

Como resultado das alterações observadas na massa corporal dos animais, os grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) apresentaram um aumento significativo do Índice de Lee ($P < 0,01$) quando comparados com os seus respectivos grupos controles (GC-AH e GC-ST) (Tabela 1).

A gordura epididimal dos animais GH-AG apresentou um aumento significativo de 211% ($P < 0,0001$) quando comparados com o grupo GC-AG. O grupo GC-ST apresentou um aumento significativo de 324% ($P < 0,0001$), quando comparado com o grupo GC-AG, tal aumento não foi capaz de refletir em acréscimo de peso corporal pelo mesmo grupo (Figura 20). No entanto a Stevia apresentou efeito contrário no grupo hiperalimentado (GH-ST), tendo em vista uma diminuição significativa ($P < 0,01$) no peso do GE quando comparado com o grupo hiperalimentado que não recebeu o adoçante (GH-AG) (Tabela 1).

A hipernutrição, durante a lactação, foi capaz de promover um aumento significativo ($P < 0,0001$) do peso do fígado nos grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) quando comparados aos seus respectivos controles (GC-AG e GC-ST).

Não foi observada diferença significativa, entre os grupos, no comprimento naso-anal corrigido pelo comprimento da tíbia e no peso do fígado corrigido pela massa corporal.

Tabela 1 – Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controles e hiperalimentado aos 180 dias de vida

Parâmetros	Grupo controle água (GC-AG)	Grupo controle Stevia (GC-ST)	Grupo hiperalimentado água (GH-AG)	Grupo hiperalimentado Stevia (GH-ST)
Massa corporal (g)	48,97 ± 0,81	47,45 ± 0,95	66,10 ± 1,33 ^a	57,79 ± 1,37 ^{b,c}
Comprimento naso anal (cm) / comprimento da tíbia (cm)	4,35 ± 0,04	4,51 ± 0,04	4,54 ± 0,046	4,69 ± 0,07
Índice de Lee	356,80 ± 2,42	351,63 ± 1,80	371,09 ± 3,03 ^a	365,43 ± 3,28 ^b
Gordura epididimal (g)	0,87 ± 0,06	1,84 ± 0,08 ^a	2,82 ± 0,09 ^a	2,20 ± 0,16 ^c
Peso do fígado (g)	1,85 ± 0,03	1,85 ± 0,04	2,42 ± 0,07 ^a	2,45 ± 0,09 ^b
Razão peso do fígado(g)/ massa corporal (g)	0,0395 ± 0,0005	0,0386 ± 0,0006	0,0381 ± 0,0009	0,0392 ± 0,0009

Legenda: GC-AG – grupo controle água; GC-ST – grupo controle Stevia; GH-AG – grupo hiperalimentado água; GH-ST – grupo hiperalimentado Stevia. a, significativo em comparação com GC-AG; b, significativo em comparação ao GC-ST; c, significativo em comparação ao GH-AG; g – gramas; cm – centímetros;

Nota: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 16 -69 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

4.8 Efeitos do consumo do adoçante natural Stevia sobre parâmetros metabólicos de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação aos 180 dias de vida

Foram analisados os efeitos da hiperalimentação, durante a lactação, sobre os parâmetros metabólicos de camundongos aos 180 dias de vida. Os animais hiperalimentados (GH-AG) apresentaram maiores índices de glicemia (37%, $P < 0,0001$), quando comparados aos animais controle (GC-AG). A suplementação com o adoçante natural foi capaz de reduzir significativamente (31%, $P < 0,0001$) a glicemia nos animais hiperalimentados (GH-ST) quando comparados com o grupo hiperalimentado que não recebeu Stevia (GH-AG) (Tabela 2).

Observamos que o consumo de Stevia induziu um aumento significado de 40% ($P < 0,05$) na concentração de colesterol total no grupo hiperalimentado (GH-ST) quando comparado, com o grupo hiperalimentado que não ingeriu o adoçante natural (GH-AG).

O consumo do adoçante foi capaz, ainda, de promover um aumento significativo de 50% ($P < 0,01$) e de 90% ($P < 0,0001$) na concentração de triglicerídeos do grupo hiperalimentado (GH-ST) quando comparado, respectivamente, com o grupo controle Stevia (GC-ST) e o grupo hiperalimentado água (GH-AG) (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Parâmetros	Grupo controle água (GC-AG)	Grupo controle Stevia (GC-ST)	Grupo hiperalimentado água (GH-AG)	Grupo hiperalimentado Stevia (GH-ST)
Glicemia (mg/dL)	138,38 ± 4,85	131,92 ± 3,38	189,65 ± 7,51 ^a	144,72 ± 10,82 ^c
Colesterol total (mg/dL)	38,45 ± 3,47	54,54 ± 4,32	46,42 ± 1,26	65,33 ± 5,86 ^c
Triglicerídeos (mg/dL)	39,22 ± 3,03	42,87 ± 3,95	33,71 ± 3,20	64,54 ± 6,65 ^{b,c}

Legenda: **GC-AG** – grupo controle água; **GC-ST** – grupo controle Stevia; **GH-AG** – grupo hiperalimentado água; **GH-ST** – grupo hiperalimentado Stevia. **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**; mg – miligrama; dL – decilitro; g tec – gramas de tecido;

Nota: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 7-11 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

4.9 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

O teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG) foi realizado após jejum matinal prévio de seis horas. Todos os animais foram submetidos às mesmas condições.

A glicemia foi avaliada antes da infusão intraperitoneal de glicose (glicemia de jejum - T0) e 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 120 (T120) minutos após a administração de glicose.

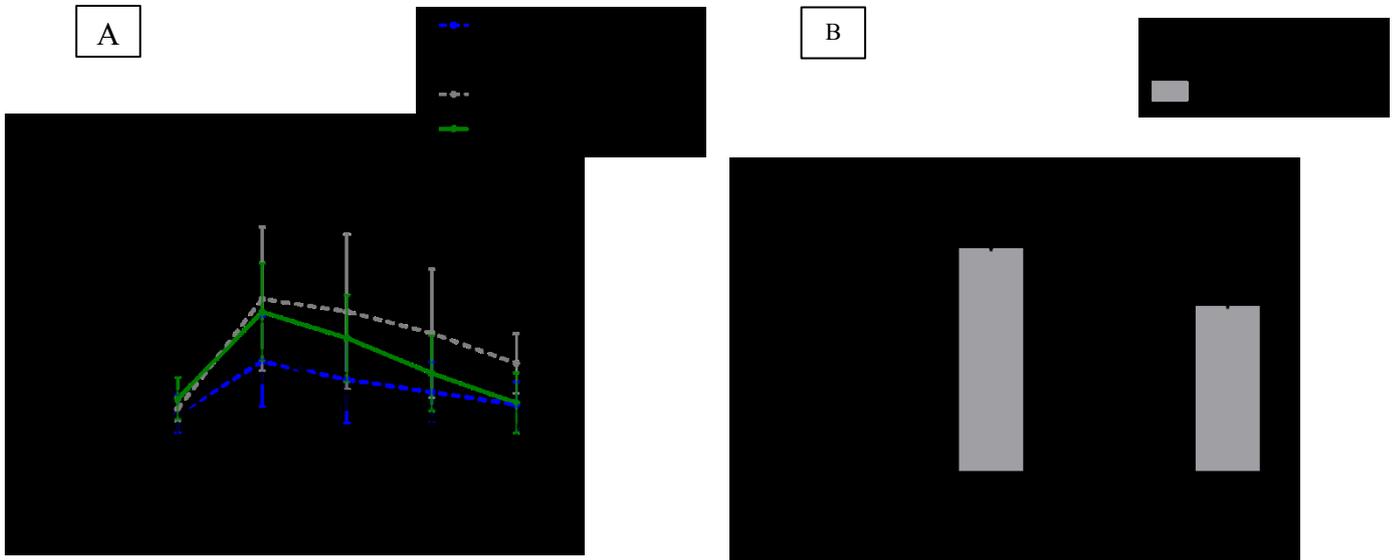
Não foi observada diferença significativa na glicemia basal dos animais (T0). Após a infusão de glicose, podemos observar que a hiperalimentação durante a lactação foi capaz de promover um aumento significativo ($P < 0,0001$) da glicemia entre os grupos controle e hiperalimentados que receberam somente água (GC-AG e GH-AG), em todos os tempos pós-infusão (T30, T60, T90 e T120). No entanto, quando comparamos os grupos controle e hiperalimentado que receberam Stevia (GC-ST e GH-ST), essa diferença significativa ($P < 0,01$) ocorre somente até noventa minutos pós-infusão (T30, T60, T90), sugerindo que a Stevia foi capaz de influenciar na resposta ao teste, reduzindo a glicemia do grupo hiperalimentado (GH-ST) aos cento e vinte minutos pós-infusão (T120). A glicemia do GH-ST se iguala à glicemia dos animais controle (GC-AG e GC-ST).

Quando comparamos somente os grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) podemos observar uma diminuição significativa (29% e 37%, $P < 0,01$), noventa e cento e vinte minutos após a infusão (T90 e T120), da resposta à glicose no grupo hiperalimentado que recebeu Stevia (GH-ST).

Não ocorreu diferença significativa entre os grupos controles (GC-AG e GC-ST) em nenhum tempo pós-infusão de glicose. A diferença entre as curvas foi representada através de gráfico (Figura 22 / A).

A área sob a curva, obtida através do TITG, foi maior no grupo hiperalimentado que recebeu água (GH-AG) ($P < 0,0001$). Foi possível observar, ainda, uma diminuição significativa ($P < 0,0095$) da área sob a curva nos animais hiperalimentado que foram tratados com o adoçante natural (GH-ST) quando comparados aos animais hiperalimentados não tratados.

Figura 22 – Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida



Legenda: **GC-AG** – grupo controle água; **GC-ST** – grupo controle Stevia; **GH-AG** – grupo hiperalimentado água; **GH-ST** – grupo hiperalimentado Stevia; **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**; mg – miligrama; dl – decilitro; T0 – tempo zero; T30 – tempo trinta (após 30 minutos da infusão de glicose); T60 – tempo sessenta (após 60 minutos da infusão de glicose); T90 – tempo noventa (após 90 minutos da infusão de glicose); T120 – tempo cento e vinte (após 120 minutos da infusão de glicose);

Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 8 animais por grupo; os valores foram representados como média da área da curva \pm desvio padrão. As diferenças foram testadas com *Tow-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações.

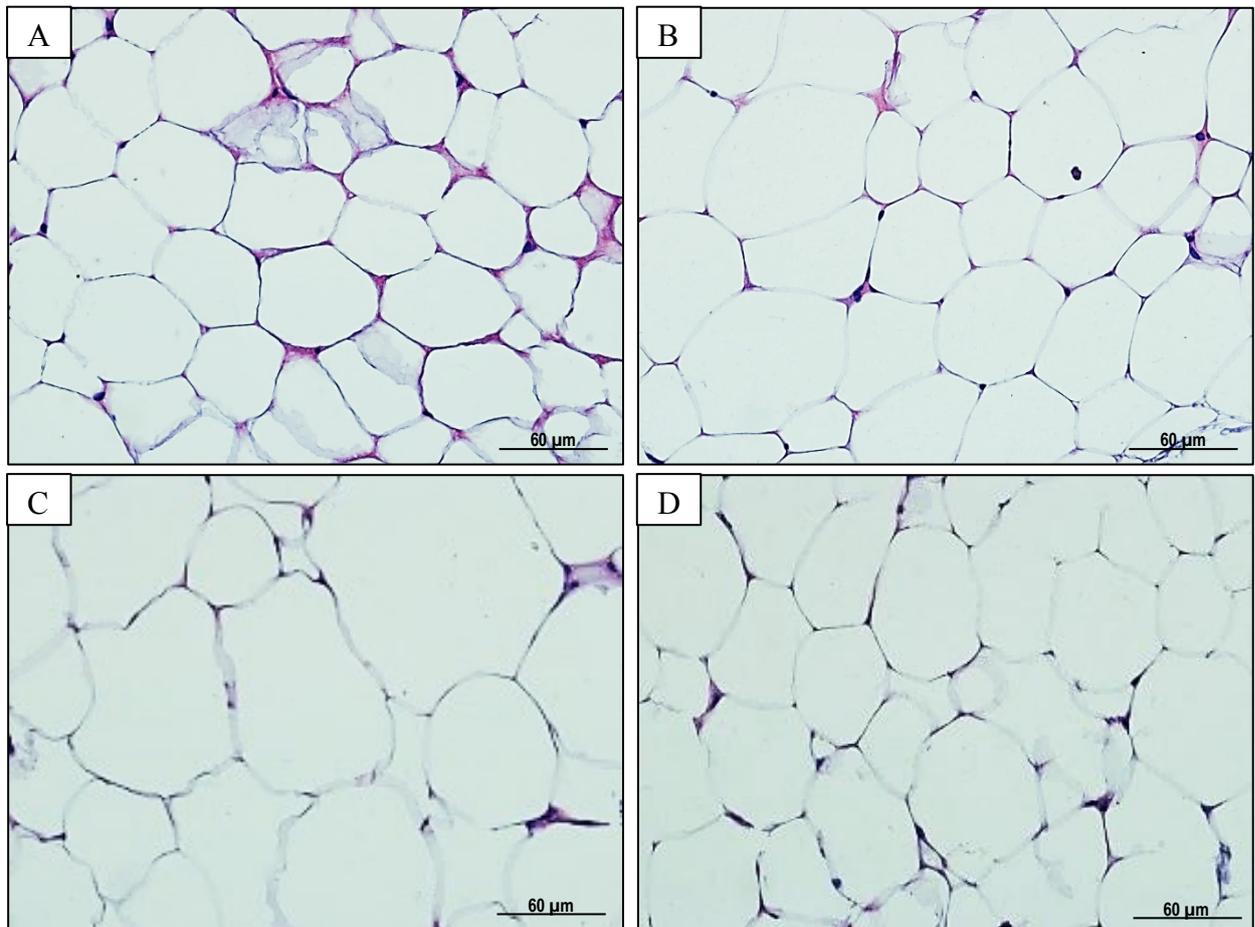
Fonte: Á autora, 2018.

4.10 Análise histológica do tecido adiposo branco de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida

Os resultados demonstraram uma morfologia típica do tecido adiposo branco, com gotículas lipídicas uniloculares nos animais controle que ingeriram água (GC-AG) (A). Foi possível verificar o efeito da hiperalimentação sobre o TAB de camundongos hiperalimentados que não receberam o adoçante (GH-AG) (C), uma vez que os dados demonstram presença de gotículas de gordura aumentadas em comparação ao grupo controle (GC-AG).

O consumo do adoçante natural promoveu efeitos distintos sobre o TAB dos animais. Os animais GC-ST (B) apresentaram gotículas de gordura aumentadas em comparação aos do GC-AG (A). No entanto, os animais do grupo GH-ST (D) apresentaram gotículas de gordura aparentemente menores em comparação aos animais do grupo GH-AG (C).

Figura 23 – Análise histológica do tecido adiposo branco de camundongos adultos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida



Legenda: (A) GC-AG com aumento de 40x; (B) GC-ST com aumento de 40x; (C) GH-AG com aumento de 40x; (D) Gh-ST com aumento de 40x

Nota: Análise histológica do TAB de camundongos adultos dos GC e GH que receberam ou não o adoçante natural *Stevia* até 180 dias de vida corados com hematoxilina e eosina (HE). N=5 animais/grupo, não irmãos.

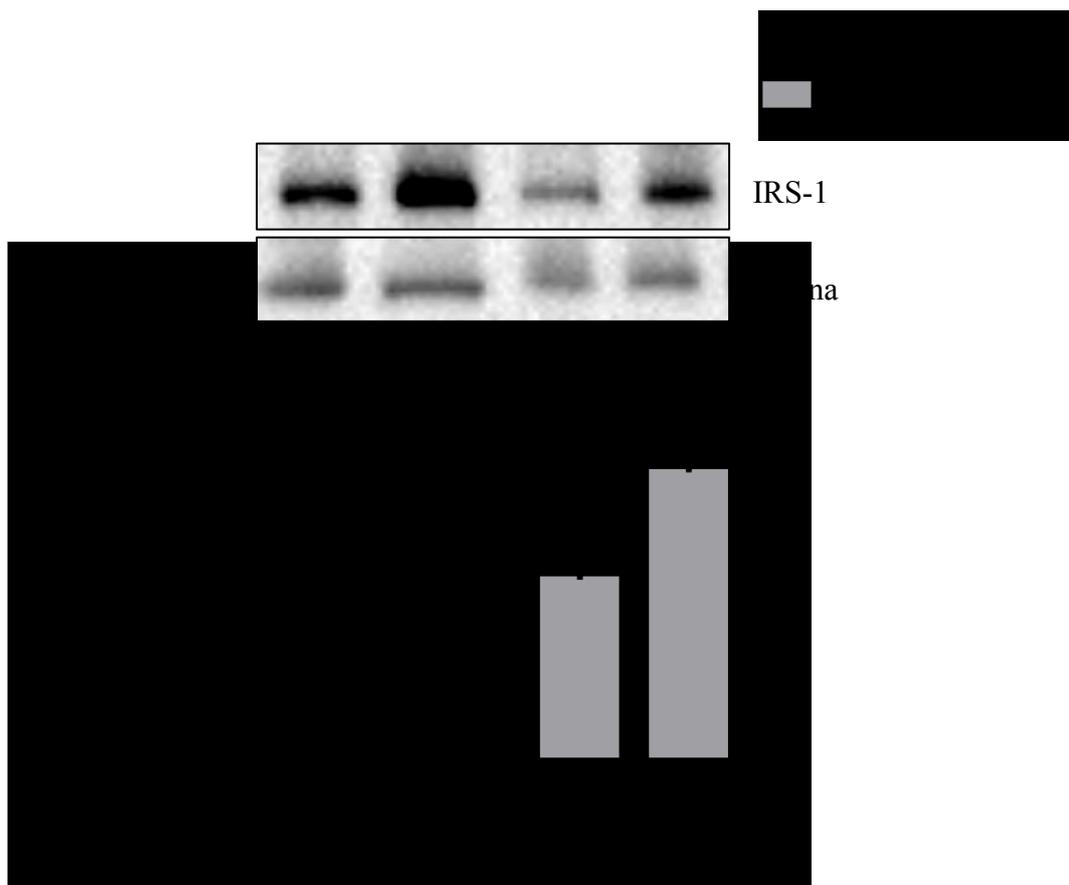
Fonte: A autora, 2019.

4.11 Efeito do consumo do adoçante natural *Stevia* sobre o conteúdo de IRS-1 no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Através dos resultados podemos observar que o conteúdo de IRS-1 não sofreu efeito da hiperalimentação nos grupos controle e hiperalimentado. No entanto, o consumo de *Stevia* foi capaz de alterar o conteúdo dessa proteína.

O grupo GC-ST, apresentaram um aumento significativo de 43% ($P < 0,0001$) em comparação ao grupo controle que não recebeu *Stevia* (GC-AG). Os animais hiperalimentados (GH-ST), também apresentaram um aumento significativo do conteúdo dessa proteína (59%, $P < 0,0001$), quando comparados com os animais hiperalimentados que não consumiram o adoçante (GH-AG).

Figura 24 – Conteúdo de IRS-1 no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida



Legenda: IRS-1 - substrato do receptor de insulina 1; **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**;

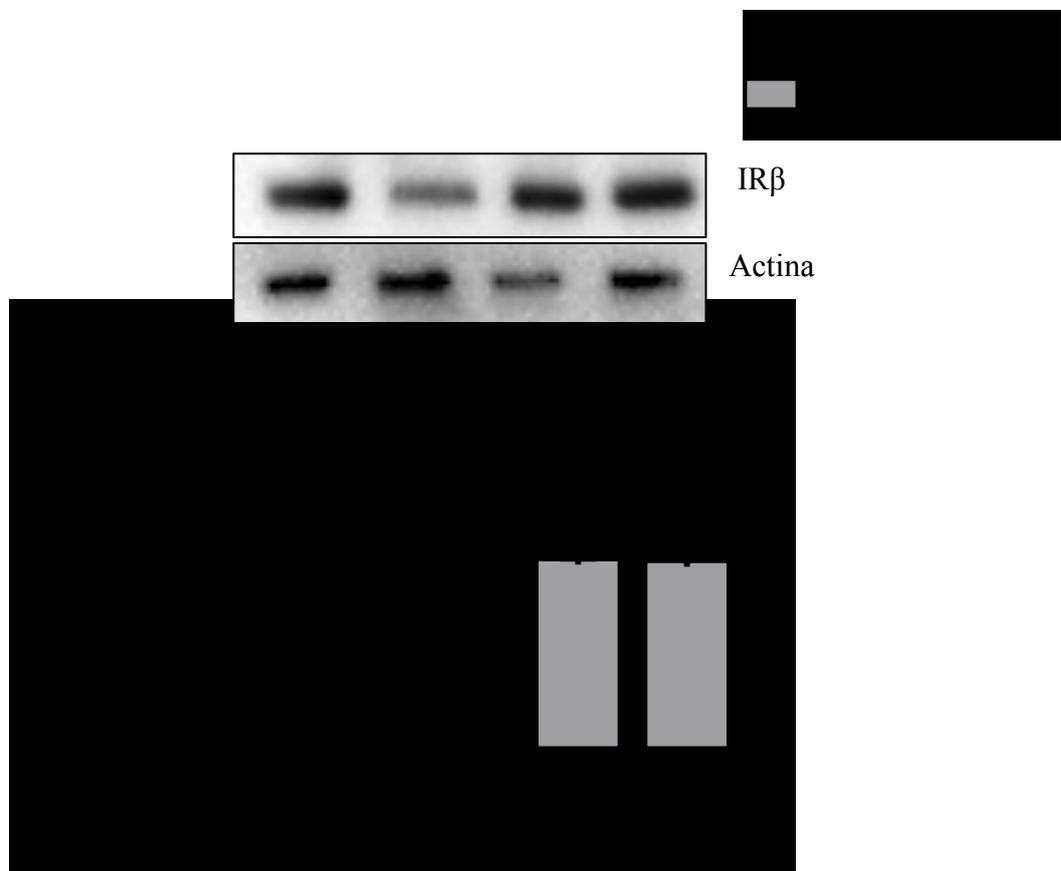
Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 6-8 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

4.12 Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de IR- β no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não houve diferença significativa no conteúdo de IR- β em todos os grupos observados.

Figura 25 – Conteúdo de IRS- β no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

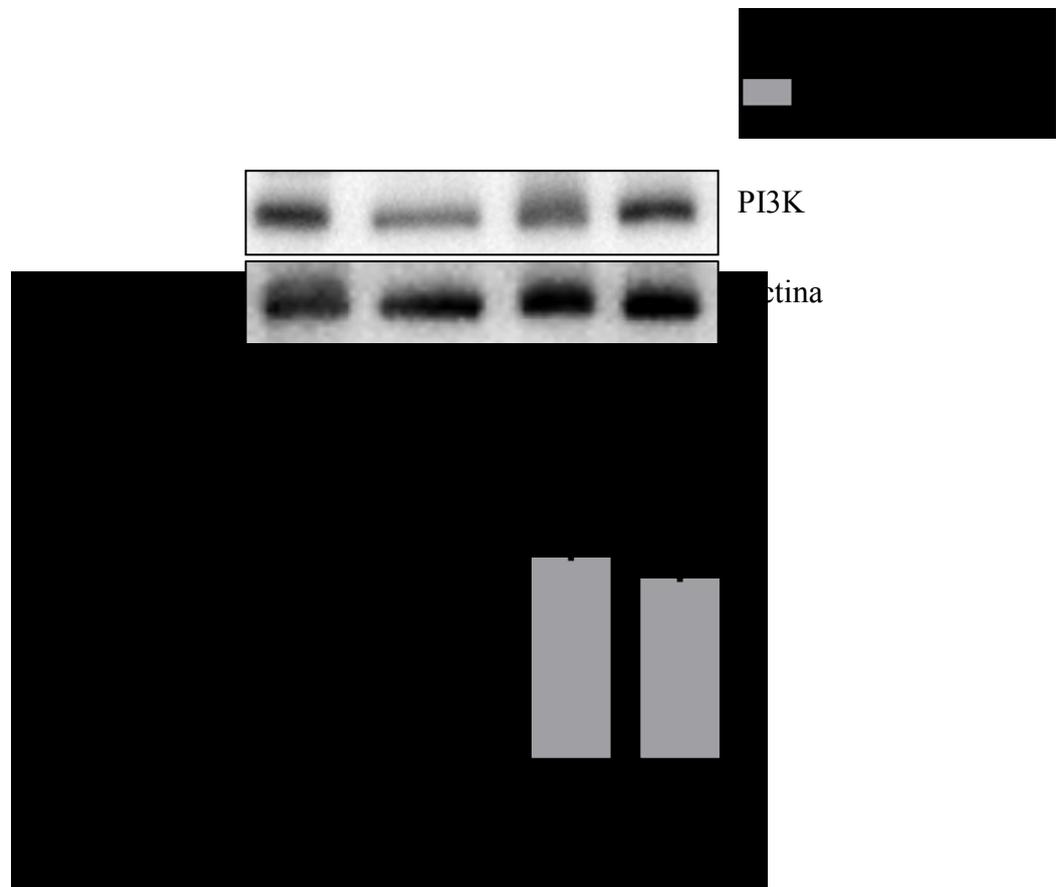


Legenda: Ir β - receptor de insulina beta; **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**;
 Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 6-8 animais por grupo;
 Fonte: A autora, 2018.

4.13 Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de PI3K no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no conteúdo de PI3K.

Figura 26 – Conteúdo de PI3K no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida



Legenda: PI3K - enzima fosfatidilinositol-3-cinase; **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**;

Nota: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 6-8 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

4.14 Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no conteúdo de GLUT4.

Figura 27 – Conteúdo de GLUT4 no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias



Legenda: GLUT4 - transportador de glicose tipo 4; **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**;

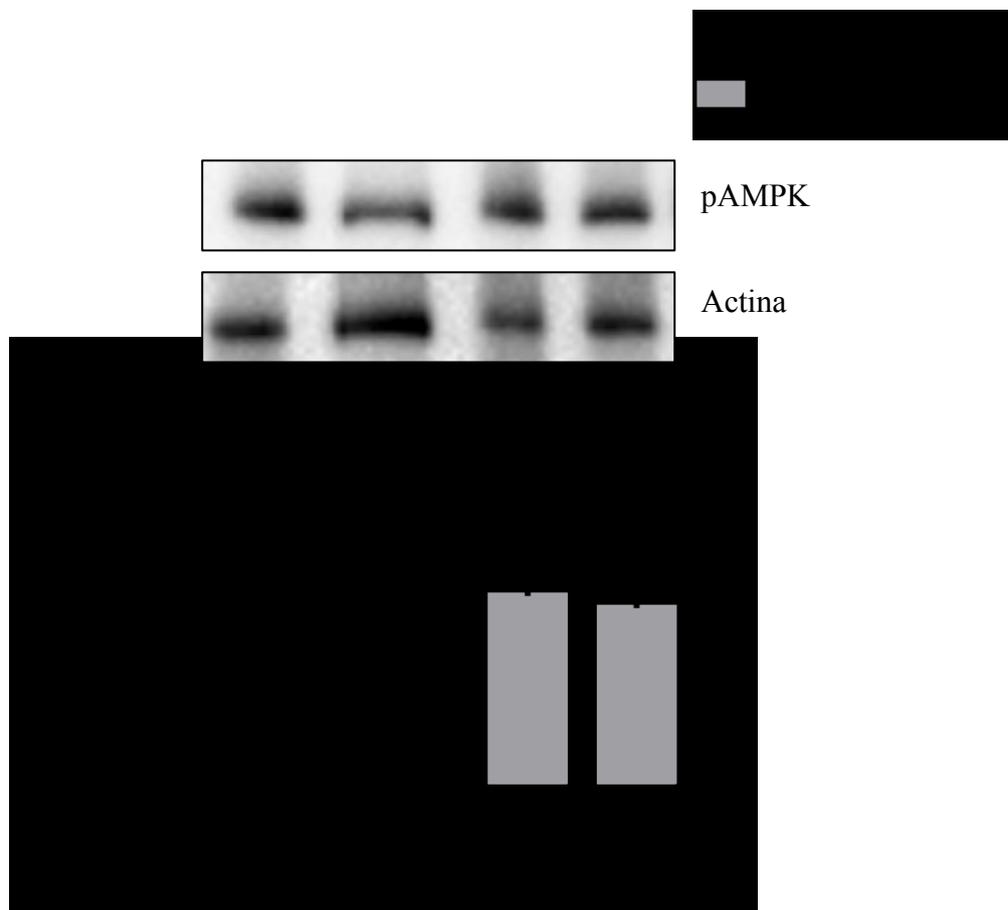
Nota: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 6-8 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

4.15 Efeito do consumo do adoçante natural Stevia sobre o conteúdo de pAMPK no tecido adiposo branco de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no conteúdo de AMPK na forma fosforilada.

Figura 28 – Conteúdo de pAMPK no TAB de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias

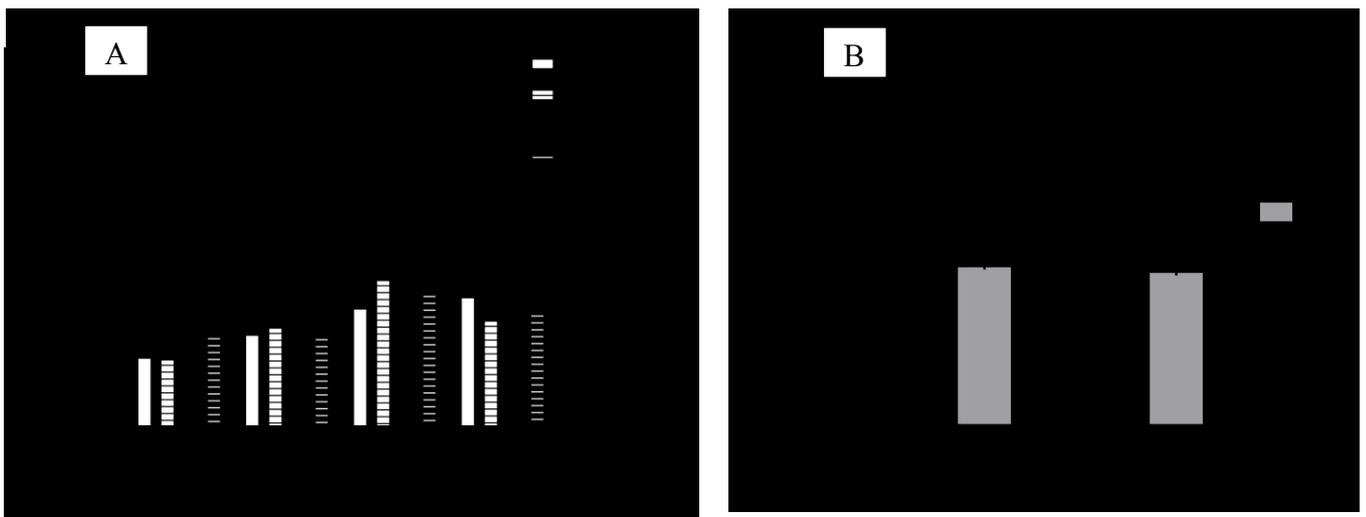


Legenda: pAMPK - Proteína quinase ativada por AMP fosforilada **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação ao **GC-ST**; **c**, significativo em comparação ao **GH-AG**;
 Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 6-8 animais por grupo;
 Fonte: A autora, 2018.

4. 16 Efeito do consumo do adoçante Stevia sobre o metabolismo de ácidos graxos no tecido adiposo branco de camundongos aos 180 dias de vida hiperalimentados durante a lactação

Não houve diferença significativa entre os grupos na oxidação de ácidos graxos e na razão do controle de desacoplamento (RCD) (Figura 29).

Figura 29 – Respirometria de alta resolução do tecido adiposo branco de animais adultos



Legenda: **a**, significativo em comparação com CG-AG, **b**, significativo em comparação com GC-ST; **c**, significativo em comparação com GH-AG;

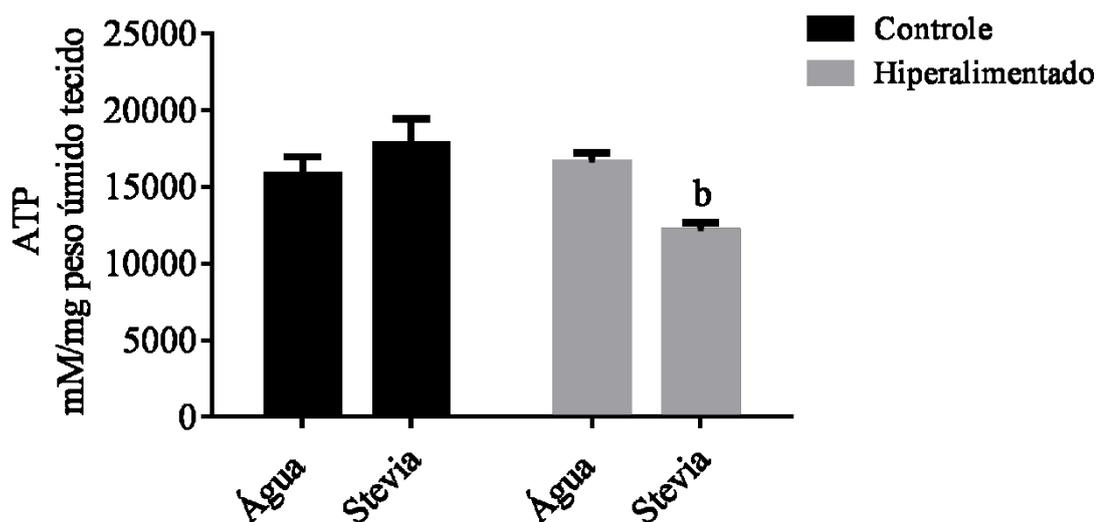
Nota: Respirometria de alta resolução do tecido adiposo branco de animais adultos, após tratamento com Stevia. (A) O gráfico mostra o estado 3 (estimulado por ADP) durante a oxidação dos substratos palmitoil-L-carnitina e malato na câmara B – Protocolo de ácidos graxos. A razão do controle de desacoplamento (RCD) foi calculada com a razão das taxas respiratórias dos estados 3 e 4. Os resultados são expressos como média \pm EPM, n = 6 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

4.17 Efeito do consumo de Stevia sobre produção de ATP no tecido adiposo branco de camundongos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Analizamos os efeitos do consumo de Stevia sobre os níveis de ATP no tecido adiposo branco dos animais. Os resultados mostraram que o GH-ST apresentou redução de 46,6% ($P < 0,05$) da produção de ATP no TAB, quando comparado com o seu respectivo grupo controle (GC-ST).

Figura 30 – Produção de ATP do tecido adiposo branco de camundongos adultos dos grupos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida



Legenda: ATP - adenosina trifosfato; mM - milimolar; mg – miligramas; **a**, significativo em comparação com GC-AG; **b**, significativo em comparação com GC-ST; **c**, significativo em comparação com GH-AG;
 Nota: O gráfico representa os níveis de ATP no tecido adiposo branco de animais controles e hiperalimentados. Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 7-11 animais por grupo;
 Fonte: A autora, 2018.

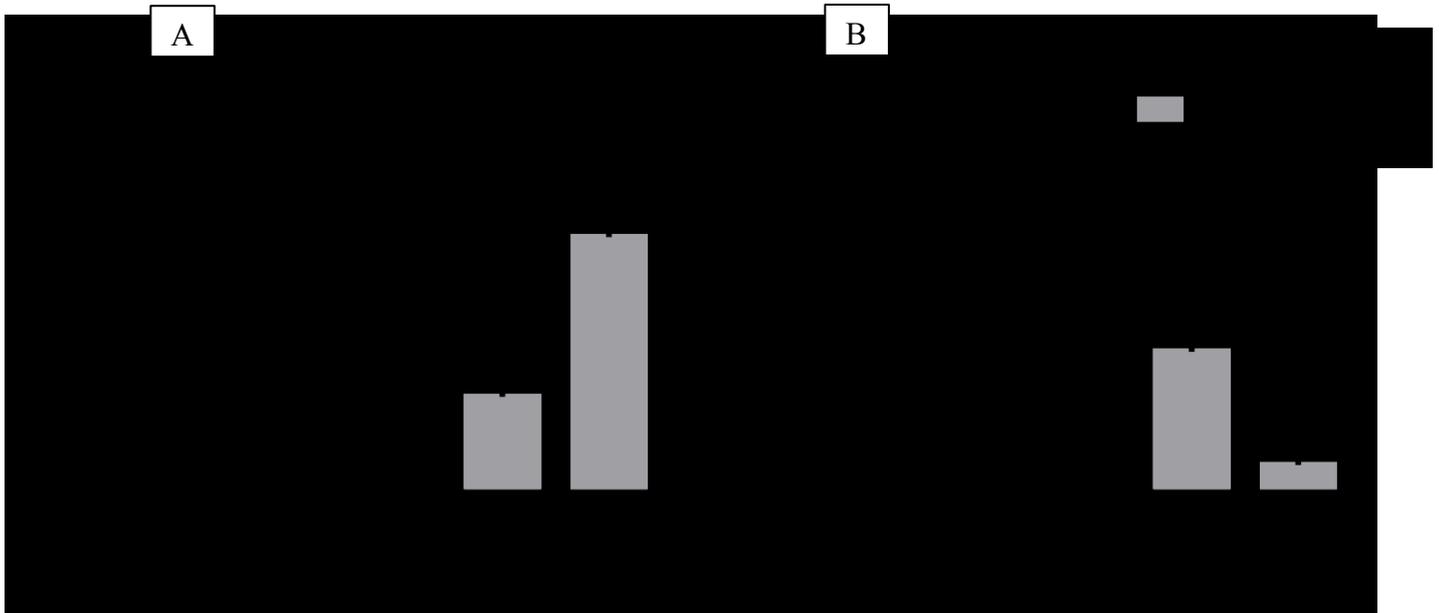
4.18 Efeitos do consumo do adoçante natural Stevia sobre a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo energético

Analizamos o efeito do consumo do adoçante Stevia sobre a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (LPL e FAS).

Através dos resultados podemos observar que a hiperalimentação promoveu uma diminuição significativa de 60,7% na expressão gênica de LPL em tecido adiposo branco de camundongos obesos que receberam somente água (GH-AG). No entanto, o consumo de Stevia pelos animais foi capaz de promover diminuição de 77,01% no grupo controle e aumento de 268,56% no grupo hiperalimentado após tratamento.

Podemos observar, ainda, que tanto a redução de ninhada no início da vida, quanto o consumo de Stevia foram capazes de modificar a expressão gênica de FAS no TAB dos animais estudados.

Figura 31 – Expressão dos genes das enzimas LPL e FAS no tecido adiposo branco de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida



Legenda: LPL – lipoproteína lipase; FAS – ácido graxo sintase; (A) – LPL; (B) – FAS;

Nota: O gráfico representa a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo energético do tecido adiposo branco de animais adultos controles e hiperalimentados. Os resultados são expressos como Média ± EPM, n = 7-11 animais por grupo;

Fonte: A autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

Diante dos resultados apresentados podemos observar que camundongos adultos hiperalimentados durante período de lactação, através da metodologia de redução de ninhada, tornaram-se obesos, uma vez que adquiriram um aumento significativo da massa corporal, da porcentagem de gordura corporal e, conseqüentemente, maior Índice de Lee. O aumento do peso corporal nos grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST), em relação aos grupos controles (GH-AG e GH-ST), foi observado desde o desmame até os 180 dias de vida. Plagemann, em 1992, mostrou em um estudo com ratos, que a programação metabólica, através da redução de ninhada após o nascimento, levou a um aumento significativo do consumo alimentar por esses animais e, conseqüentemente, aumento da massa corporal. No entanto, nossos animais que foram hiperalimentados, não apresentaram hiperfagia, após cálculo de correção do consumo pela massa corpórea dos mesmos. Segundo a literatura, a hiperalimentação durante o período perinatal tem sido associada com maior suscetibilidade ao excesso de peso, obesidade e doenças metabólicas na idade adulta (PLAGEMANN et al., 1992; WATERLAND, 1999; HABBOUT et al., 2013).

Nós observamos, ainda, aumento da porcentagem de gordura corporal nos animais hiperalimentados que ocorreu, principalmente, em decorrência do aumento de gordura epididimal (RODRIGUES et al., 2011). Tais dados corroboram com a literatura, visto que Habbout e colaboradores (2013) mostraram que camundongos C57BL, hiperalimentados durante a lactação, tiveram acréscimo de gordura corporal aos 180 dias de vida.

Dentre os diversos aspectos que determinam a etiologia da obesidade, podemos destacar a importância de períodos críticos da vida, como o período pré e pós-natal. Barker, em 1995, já demonstrava em seus estudos que insultos durante esses períodos poderiam acarretar no surgimento do excesso de peso e de doenças durante a idade adulta. O período pós-natal é uma “janela” crítica para a programação metabólica, pois o desenvolvimento da prole se caracteriza como um período de contínuo crescimento. Sendo assim, alterações neste momento podem influenciar a expressão gênica dessa prole, visto que a plasticidade genômica ainda permanece. No entanto, as conseqüências desses insultos podem ser deletérias, principalmente na idade adulta (PLAGEMANN et al., 1992; BARKER, 1995; WATERLAND, 1999; HABBOUT, 2013).

Nossos resultados indicam que a hipernutrição durante o período de lactação induziu alterações metabólicas nos animais adultos, como hiperglicemia, corroborando com diversos

estudos que demonstraram aumento dos níveis basais de glicose e desregulação da homeostase da glicose/insulina em animais hiperalimentados no início da vida (PLAGEMANN, 1992; BALONAN; SHENG, 2000; BOULLU-CIOCCA et al., 2005; BOULLU- BOULLU-CIOCCA et al., 2008; CUNHA et al., 2009; KAPPELER et al., 2009 HABBOUT et al., 2013). Plagemann (1992) observou que ratos hiperalimentados apresentam resistência à ação da insulina (RI). Através do teste de tolerância à glicose verificamos uma diminuição da resposta secretora pancreática à glicose nos animais hiperalimentados (GH-AG), o mesmo resultado foi encontrado em diversos estudos (PLAGEMANN et al., 1992; BALONAN, SHENG, 2000; PEREIRA et al., 2006; BOULLU-CIOCCA et al., 2008; CUNHA et al., 2009; KAPPERLER et al., 2009; HOU et al., 2011).

Segundo a literatura, ninhadas que foram hiperalimentadas durante períodos críticos da vida, apresentam distúrbios nas concentrações plasmáticas de lipídios, principalmente aumento de triglicerídeos (PLAGEMANN, 1992; BOULLU-CIOCCA et al., 2005; MOREIRA et al., 2009; KAPPELER et al., 2009), ácidos graxos livres, (BOULLU-BOULLU-CIOCCA et al., 2005; BOULLU-CIOCCA et al., 2008; KAPPELER et al., 2009), colesterol total e HDL (BOULLU-CIOCCA et al., 2005; MOREIRA et al., 2009; KAPPELER et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). Em nosso trabalho, entretanto, a hiperalimentação não foi capaz de aumentar os níveis de triglicerídeos e colesterol plasmático nos animais. Estudos descrevem que essas alterações no perfil lipídico podem não ser sistematicamente encontradas, pois dependem muitas vezes da espécie, idade, tamanho da ninhada e origem geográfica do animal (RODRIGUES et al., 2007; XIAO et al., 2007; RAJIA et al., 2010; HOU et al., 2011; TAPIA-GONZALEZ et al., 2011). Cunha e colaboradores (2009) verificaram que o grupo com ninhada reduzida teve um maior consumo de leite materno aos 10 e 21 dias, e a análise do leite de mães que tiveram suas ninhadas reduzidas, no terceiro dia pós-natal, apresentou um aumento no conteúdo de TAG, sugerindo que essas alterações podem contribuir para o estabelecimento de efeitos prejudiciais na idade adulta.

Observamos, ainda, um aumento significativo da gordura epididimal no grupo hiperalimentado (GH-AG). Através da análise histológica do tecido adiposo branco de camundongos obesos, foi possível observar alterações morfológicas na arquitetura do TAB nesses animais, visto que demonstram a presença de gotículas de gordura aumentadas em comparação ao grupo controle. Soares e colaboradores, em 2012, descreveram, através de uma análise morfométrica, que animais com ninhada reduzida durante a lactação apresentaram um aumento significativo de 262% na área dos adipócitos da gordura epididimal de camundongos aos 180 dias de vida. De modo geral, estes dados reforçam a hipótese de que

a hiperalimentação no início da vida é um importante fator para o desenvolvimento de obesidade.

Além de observar o efeito da hiperalimentação durante a lactação, nosso estudo também investigou a ação do consumo do adoçante natural Stevia sobre alguns parâmetros metabólicos nestes animais.

A ingestão de Stevia, pelos animais, foi acompanhada durante todo o tratamento (12 semanas). Diversos estudos demonstraram uma maior ingestão de adoçantes artificiais pelos animais, sugerindo que alguns adoçantes possuem um efeito viciante (SWITHERS; DAVIDSON, 2008). Entretanto, nossos resultados não demonstraram diferença significativa no consumo do adoçante entre todos os grupos. Sugerimos que a Stevia, por ser um adoçante natural, atue de maneira distinta de outros adoçantes não calóricos (ANC), sugerindo que não é capaz de promover efeito viciante nos animais.

Swithers e Davidson (2008) documentaram um aumento da ingestão alimentar, ganho de peso e maior adiposidade em ratos suplementados com adoçante artificial (sacarina). Entretanto, nossos resultados demonstraram ainda, que o consumo de Stevia não favoreceu ao aumento da ingestão alimentar pelos animais, uma vez que os camundongos que consumiram o adoçante não apresentaram hiperfagia. Tal resultado corrobora com alguns estudos da literatura. Bissonnette et al., (2017) investigaram o efeito da ingestão de Stevia, sacarina e sacarose sobre o consumo alimentar, nesse estudo, camundongos *Wistar* receberam dieta líquida adoçada com Stevia, sacarina ou sacarose (1% da dieta líquida), durante seis semanas. Os resultados demonstraram que os animais que consumiram Stevia não apresentaram aumento de massa corporal e de consumo de calorias. Anton et al., (2010) em um estudo com humanos, avaliaram os efeitos da Stevia sobre a ingestão alimentar, saciedade, níveis de glicose e insulina em comparação com o adoçante artificial aspartame e a sacarose, durante 3 dias, aplicaram uma pré-carga de cada adoçante (Stevia 290 kcal, Aspartame 290 kcal, sacarose 493 kcal) 20 minutos antes de cada refeição (café da manhã, almoço e jantar) para 40 pessoas (19 eutróficas e 12 obesas, entre 18 e 50 anos), também avaliaram a glicemia 20 minutos antes e depois de cada pré-carga. Os resultados deste experimento revelaram que as pessoas que receberam Stevia e aspartame consumiram a mesma quantidade de comida que aqueles que receberam sacarose, demonstrando que a saciedade foi a mesma em todos os grupos. Os participantes que consumiram Stevia apresentaram redução nos níveis de glicose e insulina pós-prandial, além de uma redução média de 1 kg de peso corporal. Há, no entanto, evidências crescentes de estudos tanto com humanos, quanto experimentais, que mostram a associação entre ingestão de adoçantes artificiais não calóricos, principalmente em bebidas

como refrigerante, ganho de peso e desenvolvimento de obesidade a longo prazo (FOWLER et al., 2008; YANG, 2010). A literatura sugere que a fome pode ser impulsionada pelo centro hedônico, não sendo totalmente satisfeita pelo adoçante não calórico (YANG, 2010). Swithers et al., (2008), demonstraram que a exposição prévia ao adoçante artificial sacarina causou uma incapacidade de autorregular as calorias ingeridas. Além disso, um aumento similar na ingestão calórica foi observado.

No entanto, foi possível observar, através dos nossos resultados, que o adoçante natural foi capaz de promover diminuição do peso corporal nos animais hiperalimentados (GH-ST), visto que apresentaram redução significativa da massa corporal durante todo o tratamento (12 semanas), bem como diminuição da quantidade de gordura epididimal aos 180 dias. Nossos resultados corroboram com a literatura, onde diversos outros estudos demonstraram que o uso prolongado de glicosídeos de esteviol promoveu perda de peso nos animais (DUTTA et al., 2010; CURRY; ROBERTS, 2008; NORDENTOF et al., 2008; ASSAEI et al., 2016; AHMAD et al., 2018). Porikos, em 1988, já demonstrava que ratos que receberam adoçantes não calóricos ganharam a mesma quantidade de peso que animais alimentados com dieta controle. No entanto, eles ganharam significativamente menos peso do que os ratos que ingeriram a solução de sacarose, e demonstraram, também, que ratos obesos começaram a perder peso quando passaram a consumir ANC. St-Onge e Heymsfield (2003) chegaram a mesma conclusão em um estudo em humanos, mostrando que a perda de peso é possível com o uso de ANC. Segundo El-Razek e Massoud (2012) e Assaei et al., (2016) há uma associação positiva entre a diminuição do ganho de peso corporal e dose de steviosídeo oferecida aos ratos, uma vez que o peso dos animais diminuía de acordo com a quantidade de Stevia adicionada à dieta. Park et al., (2010) demonstrou que camundongos C57BL com obesidade induzida por dieta, suplementados com extrato de Stevia (1ml/kg/dia) apresentaram menor ganho de peso corporal total, menor quantidade de gordura visceral e epididimal. Estes dados confirmam a hipótese de que os adoçantes naturais e artificiais, por serem quimicamente diferentes, promovem efeitos metabólicos distintos após seu consumo.

Nossos resultados demonstram que os animais do grupo controle, que ingeriram o adoçante Stevia (GC-ST), não apresentaram alteração no peso corporal, mas em contrapartida foi possível observar um aumento significativo na quantidade de gordura epididimal e da porcentagem total de gordura corporal por RMN. Atteh e colaboradores, em 2008, investigaram o efeito do consumo de extratos da folha da Stevia (2%) e steviosídeo (130ppm) em frangos. Eles observaram que as aves que consumiram o adoçante apresentaram um aumento significativo da gordura abdominal. Apesar da ausência de estudos na literatura que

investigaram o efeito da Stevia em roedores alimentados com dieta controle, acreditamos que estes resultados sugerem um possível efeito seletivo deste adoçante no tecido adiposo branco, que varia de acordo com o estado nutricional do animal.

Os animais hiperalimentados (GH-ST) apresentaram uma redução significativa da glicemia de jejum após tratamento com Stevia, levando os mesmos à normoglicemia. Através do teste intraperitoneal de tolerância à glicose observamos melhora da resposta à glicose, bem como diminuição da curva glicêmica nesses animais, quando comparados aos animais obesos não tratados. Tal resultado corrobora com diversos dados da literatura que relatam o poder anti-hiperglicêmico da Stevia em ratos e humanos (JEPPESEN et al., 2003; GREGERSEN et al., 2004; FERREIRA et al., 2006; SUMON et al., 2008; KUJUR et al., 2010; HOSSAIN et al., 2011; MISHRA, 2011; SINGH; GARG; YADAV, 2013; ARANDA-GONZÁLEZ et al., 2014; SHARMA; RAJESH; ELANGVAM, 2012). Lailerd e colaboradores (2004) avaliaram o efeito da administração de esteviosídeos (500mg/kg) sobre o teste de tolerância oral à glicose em ratos obesos, e relatam que a administração oral aguda de esteviosídeos aumentou a sensibilidade à insulina nesses animais. Tais resultados também foram observados em pacientes submetidos ao TOTG, onde 16 pacientes ingeriram extrato aquoso de folhas da *Stevia rebaudiana* (5g a cada seis horas), durante três dias antecedentes ao dia do teste. O extrato da *Stevia rebaudiana* aumentou a tolerância à glicose, reduziu significativamente os níveis de glicose plasmática durante o teste e após jejum noturno em todos os pacientes (CURI et al., 1986). Ilić et al., (2017) analisou o potencial terapêutico da Stevia em camundongos diabéticos, neste trabalho foi administrado 20mg/kg de esteviosídeo, via oral, em animais com DM e esta quantidade foi suficiente para prevenir o aumento da glicemia nestes animais. Segundo Chang et al., (2005) a administração oral de steviosídeo adiou o desenvolvimento de resistência à insulina em ratos que receberam dieta rica em frutose e, ainda, foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina nesses animais.

O fígado é um importante órgão na regulação da homeostase energética, além de ser responsável pelos processos de glicogenólise, glicogênese e gliconeogênese, que são regulados pela glicose e hormônios como a leptina e insulina, além de ser responsável pela síntese de colesterol. (TREVENZOLI et al., 2010; CONCEIÇÃO et al., 2013). Em nosso estudo, a análise do nível do colesterol total e de triglicerídeos não foi modificada nos animais que receberam água de ambos os grupos (GC-AG e GH-AG), no entanto o tratamento com Stevia promoveu um aumento significativo na concentração do colesterol total e de triglicerídeos nos animais hiperalimentados (GH-ST). Cavalcante e colaboradores em 2006, investigaram a tolerabilidade do esteviosídeo (2,75 mg/kg/dia), obtido a partir de folhas

de *Stevia rebaudiana* Bertoni, em pacientes hiperlipidêmicos. Os pacientes foram randomizados em 2 grupos: o primeiro recebeu cápsulas contendo placebo e o segundo recebeu cápsulas contendo esteviosídeo (50 mg). Foram ingeridas duas cápsulas antes do almoço e duas cápsulas antes do jantar durante 90 dias. Após a seleção dos pacientes e a cada 30 dias o índice de massa corporal e exames laboratoriais (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama-glutamilttransferase, colesterol total, lipoproteína de alta densidade, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de muito baixa densidade, trigliceridemia e glicemia) foram realizados. O esteviosídeo não acarretou qualquer alteração clinicamente relevante nos parâmetros investigados. Além disso, os pacientes não relataram efeitos adversos severos. Diante dos resultados, os autores concluíram que o esteviosídeo, na dose empregada neste estudo, pode ser considerado seguro, embora não tenha apresentado efeito hipolipemiante. Entretanto, diversos estudos relatam o efeito anti-hiperlipidêmico da *Stevia rebaudiana* tanto em humanos quanto em animais (SHARMA; MOGRA, 2009; HOSSAIN; ALAM; 2011; DÍAZ et al., 2013; SINGH; GARG; YADAV, 2013; Assaei et al., 2016; AHMAD et al., 2018). Segundo Ahmad et al., (2018) a diminuição dos níveis de colesterol ocorre porque o esteviosídeo apresenta capacidade de aumentar a excreção de ácido biliar, impedindo a reabsorção no intestino delgado através da ruptura da formação de micelas do ácido biliar. O aumento na excreção do ácido biliar e do colesterol ativa a colesterol 7 α -hidroxilase, que aumenta a conversão do colesterol do fígado em ácidos biliares, resultando na redução do colesterol.

Vários estudos demonstram que a hipernutrição no início da vida pode influenciar a homeostase energética. Especificamente no adipócito, a hipernutrição causa alterações no metabolismo lipídico e glicêmico, promovendo acúmulo de TG e hipertrofia das células adiposas (HABBOUT et al., 2013). Diante do exposto, investigamos o efeito do consumo do adoçante *Stevia* e da hiperalimentação no início da vida sobre algumas proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina, IRS-1, Irf β , PI3K, GLUT4, e um biomarcador lipogênico, pAMPK, no TAB de camundongos adultos, através da técnica de western blotting. Não observamos efeito da hiperalimentação em nenhuma das proteínas estudadas.

A hipertrofia dos adipócitos intra-abdominais é caracterizada por um estado hiperlipolítico devido à resistência a ação da insulina (MITTELMAN et al., 2002). A ação antilipolítica da insulina é atenuada pelo TNF- α , que reduz a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), e além disso também aumenta os níveis de adenosina monofostato cíclico (AMPc) que ativa a lipase hormônio sensível (LHS) (ARNER, 1995).

O substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) desempenha função importante na conexão entre os receptores de insulina (IR) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) e, ainda, as moléculas que participam das etapas subsequentes da transdução dos sinais gerados pelos respectivos ligantes. Desta forma, a proteína IRS-1 desempenha função essencial na transmissão do sinal insulínico e a fosforilação desses substratos permite a interação com diversas proteínas adaptadoras ou com atividade enzimática, caracterizando o efeito pleiotrópico da insulina (HABER et al., 2001). Os nossos resultados mostraram que o tratamento com Stevia foi capaz de promover um aumento no conteúdo de IRS-1 do TAB em ambos os grupos (GC-ST e GH-ST), melhorando o metabolismo glicídico nestes animais, o que pode ter favorecido a diminuição da glicemia encontrada no grupo obeso tratado.

Mohd-Radzman et al., (2013) em um estudo *in vitro*, utilizando células 3T3-L1, demonstrou que o tratamento com esteviosídeo aumentou a expressão do IRS-1 nessas células, e foi, ainda, capaz de aumentar a atividade de captação de glicose em 2,1 vezes, em condições normais, e até 4,4 vezes, nos estados resistentes à insulina. Por vezes, tal aumento foi maior que no grupo controle tratado com um agente antidiabético. Sugerindo, assim, que o esteviosídeo apresenta efeitos diretos sobre a sensibilidade à insulina nas células 3T3-L1, por aumentar a captação de glicose e a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina.

O consumo de Stevia não foi capaz de alterar o conteúdo de Ir β , PI3K e GLUT4 no TAB de animais hiperalimentados durante a lactação. Rizzo et al., (2013), em um estudo *in vitro*, avaliaram os efeitos dos glicosídeos de esteviol, extraídos de folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, sobre a atividade de transporte de glicose em duas linhas celulares humanas (neuroblastoma SHSY5Y e HL-60 leucemia mielóide). Os resultados, obtidos nesse estudo, demonstraram que rebaudiosídeo A e esteviosídeo, são capazes de aumentar a captação de glicose em ambas as linhagens celulares, tal aumento foi semelhante ao induzido pela insulina. Sugerindo, assim, que os glicosídeos de esteviol atuam modulando a translocação de GLUT através da via PI3K e Akt, uma vez que os tratamentos (insulina e Stevia) aumentaram a fosforilação de PI3K e Akt. Além disso, o extrato de Stevia foi capaz de reverter o efeito da redução da captação de glicose causada pelo metilglioxal, um inibidor da via do receptor de insulina / PI3K / Akt. Prata e colaboradores (2017), em um estudo *in vitro*, demonstraram que os glicosídeos de esteviol causaram um aumento da captação de glicose em fibroblastos de rato, ativando a via PI3K / Akt, induzindo assim a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática.

Nossos resultados não demonstraram diferença significativa no conteúdo de GLUT 4 entre todos os grupos estudados. Soares e colaboradores (2012) em um estudo experimental com animais jovens (21 dias de vida) e adultos (180 dias), hiperalimentados durante a lactação, demonstraram que a hiperalimentação durante a lactação foi capaz de promover aumento do conteúdo de GLUT4 no TAB de animais jovens, no entanto, o mesmo não foi visto nos animais adultos. Entretanto, Bhasker e colaboradores (2015), demonstraram em estudo *in vitro*, que linhagens celulares de músculo esquelético e adipócitos de ratos em cultura aumentaram o conteúdo e a expressão gênica de GLUT 4 quando incubados com resíduos de Stevia (esteviol e esteviosídeo), evidenciando a capacidade insulinomimética destes glicosídeos de esteviol. Nós sugerimos que a não concordância com os estudos anteriores seja decorrente aos diferentes tempos de jejum utilizados no protocolo experimental e por se tratar de um estudo feito *in vitro*, respectivamente.

A AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta à mudança da carga energética celular (SANTOMAURO et al., 2008) e estimula caminhos que aumentam a produção de energia (transporte de glicose, oxidação de ácidos graxos) e inibe caminhos que consomem energia (lipogênese, síntese de proteína, gliconeogênese), tendo um importante papel na manutenção da homeostase energética (RUTTER et al., 2003). Também, está diretamente envolvida com o processo de sinalização da grelina e insulina. Basicamente, a AMPK fosforila e inibe ACC, diminuindo o fluxo de substratos na via anabólica. Em consequência, a redução dos níveis de malonil - CoA conduzem a um aumento na atividade da CPT-1 e fosforilação oxidativa (FAO).

Nossos resultados demonstraram que tanto a hiperalimentação, quanto o tratamento com Stevia não foram capazes de alterar o conteúdo de pAMPK em nenhum dos grupos estudados. Soares et al., (2012) demonstrou que camundongos de ninhadas reduzidas, não apresentaram diferença significativa no conteúdo de AMPK e de pAMPK no TAB aos 180 dias de vida. Sugerimos, em concordância com Sangiao-Alvarellos (2009), que a fosforilação da AMPK pode ser dependente de muitos fatores como jejum, idade e tempo de tratamento.

Atualmente, diversos estudos demonstram a presença do receptor de sabor doce, T1R2/T1R3, no tecido adiposo branco (NELSON et al., 2001; ZHANG et al., 2003; ZHAO et al., 2003; CHANDRASHEKAR et al., 2006; REN et al., 2009; WELLENDORPH et al., 2009; BEHRENS; MEYERHOF, 2011; Laffitte et al., 2014; BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; NUEMKET et al., 2017). Sua função nos tecidos extraorais ainda não está bem esclarecida, no entanto, os receptores T1R2/T1R3 apresentam funções sobre a secreção de incretinas (GLP-1), captação de glicose do lúmen intestinal para os enterócitos (por estimular

a expressão do transportador de glicose dependente de sódio, SGLT-1 e o transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2), e secreção de insulina, desta maneira está envolvido na homeostase glicêmica (NAKAGAWA et al., 2009 LAFFITTE et al., 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que o TAB é responsivo aos glicosídeos de esteviol (MOHD-RADZMAN et al., 2013; BHASKER, 2015), confirmando a hipótese que este tecido possui receptores de sabor doce e, ainda, são ativados pelos glicosídeos de maneira que modulam a captação de glicose por esse tecido.

As mitocôndrias desempenham um papel central no metabolismo energético. A principal função da mitocôndria é produzir energia para as células, através do consumo de oxigênio por fosforilação oxidativa (FO), na forma de adenosina trifosfato (ATP) a partir de substratos alimentares (carboidratos, lipídios e proteínas) (ROGGE, et al; 2009; OSELLAME et al., 2012; KUSMINSKI et al., 2012; SCHÖTTL et al., 2015). No TAB, as mitocôndrias são cruciais para o metabolismo energético, sendo a β -oxidação de ácidos graxos um importante processo realizado pelas células adiposas para produção de energia (WILSON-FRITCH et al., 2004). Para uma melhor compreensão do papel regulador que as mitocôndrias dos adipócitos brancos desempenham no controle da homeostase energética sistêmica, em nosso estudo, investigamos os efeitos da hiperalimentação e do tratamento com Stevia sobre a respiração mitocondrial do TAB.

Yin e colaboradores (2014) descrevem que, em indivíduos obesos, há uma redução da capacidade oxidativa mitocondrial do adipócito em comparação com os indivíduos não obesos. Em contraste com indivíduos magros, as mitocôndrias em indivíduos obesos têm menor capacidade de geração de energia, membranas internas menos definidas e menor oxidação de ácidos graxos (HERNÁNDEZ-AGUILERA, 2013). Nossos resultados demonstraram que aos 180 dias de vida os animais hiperalimentados durante a lactação não apresentaram diferença significativa na utilização dos substratos energéticos relacionados à oxidação de ácidos graxos e também na produção de ATP. Sabe-se que os adipócitos podem apresentar um conteúdo mitocondrial reduzido, devido à idade, à obesidade e diabetes. Além disso, os adipócitos maduros que sofrem hipertrofia podem perder grande parte do seu potencial metabólico (CHOO et al., 2006).

A produção de ATP, via fosforilação oxidativa, é dependente do acoplamento existente entre a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, e inúmeras substâncias denominadas, de maneira geral, como inibidores e desacopladores diminuem ou impedem a fosforilação do ADP realizada pela ATP sintase. Os desacopladores são substâncias hidrofóbicas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna

transportando prótons provenientes do espaço intermembranas até a matriz mitocondrial. Dessa maneira, impedem a formação do gradiente de prótons com dissipação da energia, na forma de calor, que seria empregada na síntese de ATP. O transporte dos elétrons na cadeia torna-se energeticamente mais favorável (pela falta de transporte de prótons contra este gradiente) e sua velocidade aumenta, elevando a velocidade de consumo de oxigênio (MARZZOCO; TORRES, 2007). Os representantes desta classe incluem o 2,4-dinitrofenol (DNP), o carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) e carbonilcianeto -m- clorofenilhidrazona (CCCP) e todos os ácidos lipofílicos fracos, capazes de transportar prótons através da membrana mitocondrial interna e desfazer o gradiente necessário à síntese de ATP (KADENBACH, 2003; WALLACE; STARKOV, 2000).

Ao avaliarmos o efeito do tratamento com Stevia nos grupos estudados, observamos que este adoçante não foi capaz de alterar significativamente a utilização de ácidos graxos pela mitocôndria do TAB. Ainda existe uma limitada compreensão do efeito dos adoçantes naturais (como a Stevia) sobre o metabolismo mitocondrial e utilização de substratos energéticos. Um estudo anterior realizado em hepatócitos demonstrou que a Stevia foi capaz de melhorar o desacoplamento da fosforilação oxidativa, assim como aumentar a oxidação de glutamato e malato (BRACHT, 1984).

A taxa de controle de desacoplamento (RCD), calculada como respiração desacoplada máxima por FCCP em relação ao estado ativado por ADP no fluxo máximo de oxigênio, é uma razão de controle do desacoplamento mitocondrial. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Nossos dados demonstraram ainda que após o tratamento com Stevia houve uma redução na produção de ATP no grupo hiperalimentado, quando comparado ao seu respectivo grupo controle (GC-ST x GH-ST), mas não foi capaz de alterar a oxidação de ácidos graxos entre os grupos. Enquanto o rearranjo mitocondrial mediado por hormônios é bem conhecido, o impacto dos nutrientes e dos adoçantes não calóricos nas respostas mitocondriais no TAB ainda não é claro. Uma adaptação específica do tecido a um excesso de calorias ambientais pode interferir com a dinâmica mitocondrial e funcionar em uma magnitude que reflete a duração a que o organismo foi exposto à sobrecarga de nutrientes (BARBATO et al., 2015). Dessa maneira, nós sugerimos que a redução na produção de ATP encontrada no grupo hiperalimentado possa ser decorrente de uma adaptação específica do tecido diante da condição nutricional no qual ele se encontra (obesidade) e do tratamento utilizado (Stevia), diminuindo sua capacidade de produzir ATP através da cadeia transportadora de elétrons.

A enzima LPL é de grande importância no desenvolvimento da obesidade, uma vez que fornece a maior parte dos ácidos graxos livres requeridos no processo de lipogênese, e, portanto é essencial para o acúmulo excessivo de TAGs, característico da obesidade (SCHWARTZ; BRUNZELL, 1981; GREENWOOD et al., 1982; SADUR et al., 1984; ECKEL; YOST, 1987; BESSESEN et al., 1991; HOLLENBERG, 1966). A LPL assume diversas funções, dentre as quais a mais importante para o tecido adiposo é a hidrólise de TAG de quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), produzindo respectivamente, os remanescentes de quilomícrons e lipoproteínas de densidade intermediária (IDLs) (ECKEL, 1989; GOLDBERG; MERKEL, 2001). A enzima é encontrada principalmente no tecido adiposo, nos músculos cardíacos e esqueléticos. (SEMENKOVICH et al., 1989; YACOUB et al., 1990; MERKEL et al., 1998). O estímulo da LPL ocorre em resposta ao alimento, à infusão de glicose (estimula atividade enzimática) e insulina (estimula atividade enzimática e expressão gênica). A LPL é um importante marcador da diferenciação adipocitária (BJÖRNTORP et al., 1978), e a expressão de LPL aumenta em função do acúmulo de TAG em pré-adipócitos diferenciados (SEMENKOVICH et al., 1989). Tal enzima é considerada um importante fator que regula o metabolismo de lipídeos, o qual influencia na ação da insulina, no balanço energético e na regulação do peso e composição corporal. Estudos, com humanos, sugerem fortes evidências de que o gene LPL seja um gene da obesidade, sendo relacionado com os processos de iniciação e/ou desenvolvimento desta doença (WANG; ECKEL, 2009).

Entretanto, a literatura tem relatado diminuição da lipogênese em indivíduos obesos, (DIRAISON et al., 2002; LETEXIER et al., 2003; SWIERCZYNSKI et al., 2003; MINEHIRA et al., 2004; RANGANATHAN et al., 2006), sugerindo diminuição na expressão gênica, proteica e/ou na atividade enzimática da ACC e da LPL. Outros estudos sugerem ainda uma ressintetização de TAG a partir dos produtos liberados na lipólise pelo aumento da atividade da enzima glicerol-quinase (GK), no tecido adiposo de obesos (GUAN et al., 2002). O aumento da GK estaria relacionado à maior capacidade de retenção de TAGs, e conseqüentemente ao desenvolvimento da obesidade, já que tenderiam a reutilizar o glicerol liberado na lipólise. Esta via de ressintetização de TAGs explicaria a manutenção de grandes estoques de gordura na obesidade, apesar da elevada lipólise e supressão da lipogênese.

Diante do exposto, avaliamos a expressão gênica de enzimas envolvidas em vias lipogênicas como LPL e FAS, através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Nossos resultados demonstraram que a hiperalimentação foi capaz de promover uma diminuição na expressão de LPL no TAB de animais obesos (GH-AG). Em

contraste, a Stevia promoveu aumento do LPL no grupo obeso (GH-ST) e diminuição do grupo controle (GC-ST). Segundo a literatura, a obesidade promove supressão das vias lipogênicas e, conseqüentemente, diminuição da expressão da LPL (VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010; PONTIGO et al., 2011). Estudos com humanos e roedores obesos demonstraram aumento da expressão de LPL em tecido adiposo (SCHWARTZ; BRUNZELL, 1981; GREENWOOD et al., 1982; SADUR et al., 1984; ECKEL; YOST, 1987; BESSESEN et al., 1991); porém a resposta da LPL à insulina e ao alimento pareceu estar diminuída na obesidade (HARTMAN, 1981; SADUR et al., 1984; TERRETTAZ et al., 1994). Por outro lado, a expressão e atividade de LPL não apresentaram redução, ou alguns estudos apresentam aumento em TAB de humanos e roedores obesos, que sofreram uma redução de peso (HARTMAN, 1981; ECKEL; YOST, 1987; KERN et al., 1990; BESSESEN et al., 1991; TERRETTAZ et al., 1994), provavelmente devido ao aumento de sensibilidade à insulina (KERN, 1997). Pontigo et al., (2011) demonstrou uma diminuição da expressão da LPL em tecido adiposo subcutâneo e visceral em obesos; a intensidade desta diminuição esteve relacionada ao grau de obesidade, relação mais evidente no depósito visceral. Esta diminuição está mais relacionada à hipertrofia e à hiperplasia dos adipócitos, do que à resistência à insulina.

A diversidade nos resultados sobre expressão gênica da LPL em tecido adiposo pode ser explicada pela fase em que a obesidade é analisada. Em condições normais, o excedente de calorias é estocado no tecido adiposo, o qual, por sua vez, aumenta de tamanho, devido aos processos de hipertrofia e hiperplasia. A partir de certo ponto, o tecido adiposo parece alcançar um limite de estocagem de gordura, perdendo a sensibilidade à insulina, e suprimindo as vias lipogênicas, das quais a LPL faz parte (VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010; PONTIGO et al., 2011).

Em nosso trabalho, os animais obesos que foram tratados com Stevia (GH-ST) não apresentavam resistência à insulina, e o ponto máximo de estocagem de lipídeos talvez ainda não tivesse sido alcançado, o que pode explicar um aumento na expressão gênica de LPL. O mesmo grupo apresentou elevada trigliceridemia, favorecendo a disponibilidade de ácidos graxos livres (AGL), provavelmente, pela ação da lipoproteína lipase (LPL), resultando em maior oxidação de lipídios.

A enzima ácido graxo sintase (FAS) catalisa a síntese de ácidos graxos (AG) a partir de malonil-CoA. O Malonil-CoA entra em uma via catalisada pela FAS que culmina na formação de acilCoA, que é utilizado para a esterificação com glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG que, finalmente, é incorporado à gotícula citoplasmática de gordura

(FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Sendo assim, o acúmulo de gordura no TAB é associado a um aumento na FAS, que além de catalisar a síntese de novo de ácidos graxos, regula a atividade lipogênica no tecido adiposo. No entanto, o presente estudo demonstrou que os animais hiperalimentados, aos 180 dias de vida, não apresentam aumento do conteúdo de FAS no TAB. O tratamento com Stevia também não promoveu modificações na expressão de FAS no tecido adiposo dos animais.

CONCLUSÃO

O presente estudo contribui para a melhor compressão dos efeitos do consumo crônico do adoçante natural, produzido a partir de folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, em animais adultos que foram hiperalimentados durante o período de lactação.

Nossos resultados demonstraram que o consumo crônico do adoçante Stevia, está associado ao aumento da adiposidade corporal nos animais controles. Entretanto, atua de maneira benéfica nos animais hiperalimentados agindo sobre a homeostase glicêmica, promovendo aumento da tolerância à glicose, além de induzir a redução da massa corporal e gordura epididimal, apesar de ocasionar um aumento dos níveis de triglicérides e colesterol nestes animais.

Deste modo, nossos dados indicam que a Stevia é um importante modulador do metabolismo energético do tecido adiposo branco e está envolvida na regulação do controle glicêmico atuando de maneira diferente dependendo do estado nutricional do animal.

Sendo assim, outros estudos experimentais devem ser concebidos a fim de elucidar se o adoçante natural Stevia pode ser usado como uma estratégia para o tratamento de distúrbios metabólicos envolvidos na obesidade.

REFERÊNCIAS

- ABENTE, E. J. et al. MicroRNAs in obesity-associated disorders. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 589, p. 108-119, 2016.
- AGÜERO, et al. Consumo de *stevia* en estudiantes universitarios chilenos y su asociación con el estado nutricional. *Nutr Hosp*, v. 32, p. 362-366, 2015.
- AHMAD, U; et al. Antihyperlipidemic efficacy of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni in albino rats. *Lipids in Health and Disease*, v. 17, p. 1-8, 2018.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Frontiers in genetics*, v. 2, p. 1-13, 2011.
- ANTON, S. et al. Effects of Stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. p. 37-43, 2010.
- ARANDA-GONZALEZ, I. et al. Safety assessment of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southeastern Mexico as food sweetener. *Nutr Hosp*, Spanish, v. 30, p. 594-601, 2014.
- ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol*. v. 15, p. 3-8, 2005.
- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and mental adipose tissues. *Ann med*, v. 27, n. 4, p. 435-438, 1995.
- ASSAEI, R. et al. Hypoglycemic effect of aquatic extract of *Stevia* in pancreas of diabetic rats: PPAR γ -dependent regulation or antioxidant potential. *Avicenna J Med Biotech*, v. 8 (2), p. 65-74, 2016.
- ATELLA, V. et al. Excess body weight increases the burden of age-associated chronic diseases and their associated health care expenditures. *Aging*, v. 7, n. 10, p. 882-892, 2015.
- ATHERTON, H. J. et al. "Metabolomics of the interaction between PPAR- α and age in the PPAR- α -null mouse," *Molecular Systems Biology*, v. 5, p. 259, 2009.
- ATTEH, J. O. et al. Evaluation of supplementary *stevia* (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, v. 92 (6), p. 640-649, 2008.
- AWNEY, H. A.; MASSOUD, M. I.; EL-MAGHRABI, S. Long-term feeding effects of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats. *Journal of Applied Toxicology*, v. 31, p. 431-438, 2011.
- BALONAN, L. C.; SHENG, H. P. Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. *Pediatr Res*, 48: 668-673, 2000.

BARKER, D. J. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest*, v. 25 (7), p. 457-463, 1995.

BARREIROS, R. C. Adoçantes nutritivos e não-nutritivos. *Revista Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba*, v. 14, p. 5-7, 2012.

BARRETO, S. et al. Análise da estratégia global para alimentação, atividade física e saúde, da Organização Mundial de Saúde. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 14 (1), p. 41-68, 2005.

BEHRENS, M.; MEYERHOF, W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav*, v. 105, p. 4-13, 2011.

BELLOIR, C.; NEIERS, F.; BRIAND, L. Sweeteners and sweetness enhancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 20, p. 1363-1950, 2017.

BELLOIR, C.; NEIERS, F.; BRIAND, P. L. Sweeteners and sweetness enhancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 20 (4), p. 279-285, 2017.

BERNARDO, A. F. et al. Overnutrition during lactation leads to impairment in insulin signaling, up-regulation of GLUT1 and increased mitochondrial carbohydrate oxidation in heart of weaned mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 29, p. 124-132, 2016.

BESSESEN, D. H.; ROBERTSON, A. D.; ECKEL, R. H. Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v. 261, p. 246-251, 1991.

BISSONNETTE, D. J. The Effect of Nonnutritive Sweeteners Added to a Liquid Diet on Volume and Caloric Intake and Weight Gain in Rats. *Obesity*, v. 25, n. 9, p. 1556 - 1563, 2017.

BJÖRNTORP, P. et al. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J. Lipid. Res*, v. 19, p. 316-324, 1978.

BÓDIS, K.; RODEN, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *Eur J Clin Invest*, v. 48, p. 13017, 2018.

BOEHM, B. O.; CLAUDI-BOEHM, S. The metabolic syndrome. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, v. 240, p. 3-13, 2005.

BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*, v. 54, n. 1, p. 197-203, 2005.

BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. *Diabetes*, v. 57 (3), p. 669-677, 2008.

BRANDLE, J. E.; STARRATT, A. N.; GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can J Plant Sci*, v. 78, p. 527-536, 1998.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resolução RDC nº18 de 24 de março de 2008 - Regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BROWN, R. J.; DE BANATE, M. A.; ROTHER, K. I. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes*, v. 5 (4), p. 305-312, 2010.
- BRUSICK, D. J. A. critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 83-91, 2008.
- CARRERA-LANESTOSA, A.; MOGUEL-ORDÓÑEZ, Y.; SEGURA-CAMPOS, M. *Stevia rebaudiana* Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *Journal of medicinal food j med food*, v. 20 (10), p. 933-943, 2017.
- CASTAÑEDA, J. C. R. et al. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces morphological alterations in suprachiasmatic núcleos of adult rat. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 97, p. 18-26, 2016.
- CAVALVANTE, E. G, et al. Investigation of the tolerability of oral stevioside in Brazilian hyperlipidemic patients. *Braz. arch. biol. technol.* v. 49 n. 4, 2006.
- CEDIKOVA, M., KRIPNEROVÁ, M., DVORAKOVA, J., et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* v. 2016, n. 6067349, p. 1-11, 2016.
- CHANDRASHEKAR, J. et al. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, v. 444, p. 288-294, 2006.
- CHANG, J. C. et al. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res*, v. 37 (10), p. 610-616, 2005.
- CHAO, D. H. M. et al. Impact of obesity on taste receptor expression in extraoral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem. *Sci Rep*, v. 6, p. 290- 294, 2016.
- CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 121, p. 41-54, 2009.
- CHIA, C. W. et al. Chronic low-calorie sweetener use and risk of abdominal obesity among older adults: a cohort study. *PLoS One*, v. 11, p. 167-241, 2016.
- CID10. Busca de CID.1992. Disponível em: <<https://www.cid10.com.br/>>. Acessado em: Agosto de 2018.
- COLLINS, J.; MENG, C.; ENG, A. Psychological Impact of Severe Obesity. *Current Obesity Reports*, v. 5, p. 435-440, 2016.
- COMPARE, D. et al. The Gut Bacteria-Driven Obesity Development. *Karger, Digestive diseases*, v. 34 (3), p. 221-229, 2016.

- CUNHA, A. C. et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion- the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem*, v.20, n.6, p.435-42, 2009.
- CURI, R. et al. Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. *Braz J Med Biol Res*, v. 19 (6), p. 771-774, 1986.
- CURRY, L. L.; ROBERTS, A. Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food Chem Toxicol*, v. 46, p. S11-S20, 2008.
- DAMAK, S. et al. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, v. 301, p. 850-853, 2003.
- DAVAL, M. et al. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem*, v. 1, p. 25250-25257, 2005.
- DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport*, v. 18, n. 5, p. 521-524, 2007.
- DE ANDRADE, R. G.; PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R. TEM. Year increase in the prevalence of Obesity and reduction of fat intake in Brazilian women 35 years and older. *Journal of epidemiology and Community*, v. 64, n: 3, p. 252-254, 2010.
- DE KONING, L. et al. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. *Am J Clin Nutr*, v. 93 (6), p. 1321-1327, 2011.
- DE PAUW, A., TEJERINA, S., RAES, M., et al. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol*. v. 175, p. 927-939, Sep. 2009.
- DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestacional programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes*, v. 39 (4), p. 633-641, 2015.
- DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 2006.
- DHINGRA, R., et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation*, v. 116 (5), p. 480-488, 2007.
- DIAS, P. C., et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. *Cad. Saúde Pública*, v. 33 (7), p. 1-12, 2017.
- DIAZ, A., et al.: Hypoglycemic and antihyperlipidemic activity of TiO₂ nanostructured-conjugated *Stevia rebaudiana* Bertoni in a model of diabetes mellitus in rats. *Rev Mex Cienc Farm*, v.44, p. 36-42, 2013.
- DIRAISON, F., et al. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v. 282, p. 46-51, 2002.

- DUTTA, P. K., et al. Comparative efficacy of aqueous extract of *Stevia* (*S. rebaudiana* Bertoni) leaves and metformin hydrochloride (Comet) in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. *Int J Biol Res*, v. 2, p. 17-22, 2010.
- DYER, J., et al. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans*, v. 33, p. 302-305, 2005.
- DZAMKO, N. L.; STEINBERG, G. R. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiol*, v. 196 (1), p. 115-127, 2009.
- ECKEL, R. H. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med*, v. 320, p. 1060-1068, 1989.
- ECKEL, R. H; YOST, T. J. Weight reduction increases adipose tissue lipoprotein lipase responsiveness in obese women. *J. Clin. Invest*, v. 80, p. 992-997, 1987.
- EGUCHI, R. et al. Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. *Rev Bras Med Esporte*, v. 14, n. 3, p. 182-187, 2008.
- ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res*, v. 49, p. 1894-1903, 2008.
- ELLSWORTH, L. et al. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Society for Reproduction and Fertility*, p. 1-50, 2018.
- EL-RAZEK, A. M.; MASSOUD, M. I. Biological evaluation of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* leaves. *Egypt J Food Sci*, v. 40, p. 47-61, 2012.
- FAGHERAZZI, G. et al. Consumption of artificially and sugarsweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidemiologique aupres des femmes de la Mutuelle Generale de l'Education Nationale-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin. Nutr*, v. 97 (3), p. 517-523, 2013.
- FAUSTO, L. S. L. et al. Efeito do adoçante à base de estévia (*s. Rebaudiana*) durante a gestação de ratas *wistar* e o reflexo do tratamento nos fetos. 2013. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Florianópolis – SC.
- FERNSTROM, J. D. Non-Nutritive Sweeteners and Obesity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, v. 6, p. 119-36, 2015.
- FERRAZZANO, G. F. et al. Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? *A Review. Molecules*, v. 21, p. 3-12, 2016.
- FERREIRA, E. et al. Comparative effects of *S. rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. *Plant Med*, v. 72, p. 691-696, 2006.
- FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate–low physical training. *Br J Nutr*, v. 109, n. 3, p. 449-456, 2013.

FIGLEWICZ, D. P. et al. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav*, v. 98 p. 618-624, 2009.

FINUCANE, M. M. et al. National, regional and global trends in body mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country years and 9.1 million participants. *Lancet*, v. 12, n. 377, p. 557-567, 2011.

FISCHER-POSOVSZKY, P.; WABITSCH, M.; HOCHBERG, Z. Endocrinology of adipose tissue – an update. *Horm metab res*, v. 39, p. 314-321, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr*, v. 83, p. 192-203, 2007.

Food and Drug Administration (FDA). Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/fooda>

[dditivesingredients/ucm397725.htm](http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397725.htm) Acessado em: 18 de abril de 2016.

FOWLER, S. P. et al. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1894-1900.

FOWLER, S. P. et al. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring)*, v. 16 (8), p. 1894-1900, 2008.

Fowler, S. P. et al. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. v. 16, p. 1894-1900, 2008.

GALLAGHER, E. J.; LEROITH, D. Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiol Rev*, v. 95, p. 727-748, 2015.

GARCIA-SOUZA, E. P. D. et al. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 295, n. 3, p. E626-E636, 2008.

GARDANA, C. et al. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem*, v. 51, p. 6618-6622, 2003.

GARDANA, C.; SIMONETTI, P. Determination of steviol glycosides in commercial extracts of *Stevia rebaudiana* and sweeteners by ultra-high performance liquid chromatography Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 2, p. 20-133, 2018.

GEUNS, J. M. C. et al. Review: the safety of stevioside used as a sweetener, in Proceedings of 1st Symposium: The safety of Stevioside, *Hervelee*, p. 85-127, 2004.

GEUNS, J. M. *Stevioside. Phytochemistry*, v. 64, p. 913-921, 2003.

GHANAVATIAN, P.; KHALIFEH, K.; JAFARIAN, V. Structural features and activity of Brazzein and its mutants upon substitution of a surfaced exposed alanine. *Biochimie*, v. 131, p. 20-28, 2016.

- GIL, J. C. et al. Long-term effects of the consumption of *Stevia rebaudiana* (Magnoliopsida, Asteraceae) on fertility mice's. *Rev Peru Biol*, v. 15, p. 85-90, 2008.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med*, v. 261, n. 5, p. 461-71, 2007.
- GOLDBERG, I. J; MERKEL, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front. Biosci*, v. 6, p. 388-405, 2001.
- GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol behav*, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.
- GRAHAM, C.; MULLEN, A.; WHELAN, K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutrition Reviews*, v. 73 (6), p. 376-385, 2015.
- GREENWOOD, M. R. The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int. J. Obes*, v. 9, p. 67-70, 1985.
- GREGERSEN, S.; JEPPESEN, P. B.; HOLST, J. J. HERMANSEN K. Antihyperglycemic effects of Stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, v. 53, p. 73-76, 2004.
- GROVE, K. L.; COWLEY, M. A. Is ghrelin a signal for the development of metabolic systems? *J Clin Invest*, v. 115, n. 12, p. 3393-3397, 2005.
- GSI – GLOBAL *STEVIA* INSTITUTE. A dose diária aceitável para a estévia. Tendências *Stevia*. Boletim de Agosto de 2011. Datamonitor, janeiro – julho de 2011. Disponível em: <<http://globalstevia.institute.com/pt/default/ResourceLibrary/Newsletters/NewsletterAugust2011.aspx>>. Acesso em: 10 jun 2012.
- GUAN, H.P., et al. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nature*, v. 8, p. 1122-1128, 2002.
- HABBOUT, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *The Journal of Nutrition*, v. 143 (5), p. 553-562, 2013.
- HALL, K. D. Did the food environment cause the obesity epidemic? *Obesity* (Spring). *Author manuscript*, v. 26 (1), p. 11-13, 2018.
- HARPER, J. W; ZISMAN, T. L. Interaction of obesity and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, v. 21; 22 (35), p. 7868-7881, 2016.
- HARTMAN, A. D. Lipoprotein lipase activities in adipose tissues and muscle in the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v. 241, p. 108-115, 1981.
- HASS, N.; SCHWARZENBACHER, K.; BREER, H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res*, v. 339, p. 493-504, 2010.

- HILLIER, T. A. et al. Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care*, v. 30, n. 9, p. 2287-2292, 2007.
- HINNEY, A.; VOGEL, C. I.; HEBEBRAND, J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, v. 19, p. 297-310, 2010.
- HOLLENBERG, C. H. The origin and glyceride distribution of fatty acids in rat adipose tissue. *J. Clin. Invest*, v. 45, p. 205-216, 1966.
- HOLVOET, et al. *Stevia*-derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 77, p. 22-33, 2015.
- HOSSAIN, M. S. et al. Antihyperglycemic and antyperlipidemic effects of different fractions of *S. rebaudiana* leaves in alloxan induced diabetics rats. *Int J Pharm Sci Res*, v. 2, p. 1722-1729, 2011.
- HOU, M. et al. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *Plos One*, v. 6, 2011.
- HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, v. 33 (7), p. 673-689, 2015.
- HUTAPEA, A. M. et al. Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. *J Clin Biochem Nutr*, v. 23, p. 177-186, 1997.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF). Rio de Janeiro: IBGE, 2010.
- ILIĆ, V. et al. Insight into anti-diabetic effect of low dose of stevioside. *Biomed Pharmacother*, v. 90, p. 216-221, 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER INCA (Brasil). José Alencar Gomes da Silva. Alerta para impacto da epidemia de obesidade na incidência de câncer no Brasil. Estimativa 2016. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2016/inca_alerta_impacto_epidemia_obesidade_incidencia_cancer>. Acessado em: 02 nov, 2016.
- IWATSUKI, K.; UNEYAMA, H. Sense of taste in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci*, v. 118, p. 123-128, 2012.
- JAMES, P. T. Obesity: the worldwide epidemic. *Clin Dermatol*, v. 22, p. 276-280, 2004.
- JANG, H. J. et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 104, p. 15069-15074, 2007.
- JANSSEN, S. et al. Bitter taste receptors and alphasgustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 108, p. 2094-2099, 2011.
- JENSEN, M. D. Health consequences of fat distribution. *Horm res*, v. 48, p. 88-92, 1997.

- JEPPESEN, P. B. et al. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism*, v. 52, p. 372-378, 2003.
- KAHN, B. B.; FLIER J. S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000.
- KAPPELER, L. et al. Early postnatal nutrition determines somatotropic function in mice. *Endocrinology*, v. 150, p. 314-323, 2009.
- KERN, P. A; ONG, J. M; SAFFARI, B; CARTY, J. The effects of weight loss on the activity and expression of adipose-tissue lipoprotein lipase in very obese humans. *N. Engl. J. Med*, v.322, p. 1053-1059, 1990.
- KERNER, J.; HOPPEL, C. L. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim biophys acta*, v. 1486, n. 1, p. 1-7, 2000.
- KERSHAW, E. E.; FLIR, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J clin endocrinol metab*. v. 89, p. 2548-2256, 2004.
- KILOV, D.; KILOV, G. Philosophical determinants of obesity as a disease. *Obesity Reviews*, Australia, v. 19, p. 41-48, 2018.
- KIM, J.; CHOI, C. H. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea, in *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*, ed. by Kinghorn AD. *Taylor & Francis*, London, p. 196-202, 2002.
- KOYAMA, E. et al. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of *stevia* mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol*, v. 41, p. 875-883, 2003.
- KOYAMA, E. et al. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, *stevia* mixture and enzymatically modified *stevia* in human intestinal microflora. *Food Chem Toxicol*, v. 41, p. 359-374, 2003.
- KRAUNS, E. R. et al. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *The Journal of Physiology*, v. 588, n.12, p. 2023-2032, 2010.
- KUJUR, R. S. et al. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetiis rats. *J Pharmacogn*, v. 2, p. 27-32, 2010.
- KUSHNER, R. F.; SCOTT KAHAN. Introduction: The State of Obesity in 2017. *Med Clin N Am*, v. 102, p. 1-11, 2018.
- LACERDA-MIRANDA, G. et al. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. *Peptides*, v.35, n.1, p.65-73, 2012.
- LAFFITTE, A.; NEIERS, F.; BRIAND, C. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 17, p. 379-385, 2014.
- LAILERD, N. et al. Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism*, v. 53 (1), p. 101-107, 2004.

- LEMUS-MONDACA, R.; VEGA-GÁLVEZ, A.; ZURA-BRAVO, L.; AH-HEN, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, v. 132, p. 1121-1132, 2012.
- LETEXIER, D. et al. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J. Lipid. Res*, v. 44, p. 2127-2134, 2003.
- LI, J. et al. Folate treatment of pregnant rat dams abolishes metabolic effects in female offspring induced by a paternal pre-conception unhealthy diet. *Diabetologia*, v. 61 (8), p.1862-1876, 2018.
- LILLYCROP, K. A.; BURDGE, G. C. Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. *Int J Obes*, v. 35, n. 1, p. 72-83, 2011.
- LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. Estévia. Sistema de Produção. *Embrapa Agropecuária Oeste*, v. 5, p. 55, 2004.
- LISBOA, P. C. et al. Postnatal Low Protein Diet Programs Leptin Signaling in the Hypothalamic- Pituitary-Thyroid Axis and Pituitary TSH Response to Leptin in Adult Male Rats. *Horm Metab Res*, v. 44, p. 114-122, 2012.
- LOHNER, S.; TOEWS. I.; JOERG, MEERPOHL, J. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. *Nutrition Journal*, v. 16 (55), p. 1-21, 2017.
- LÓPEZ-ALARCÓN, M. G.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. Epidemiología y genética del sobrepeso y la obesidad. Perspectiva de México en el contexto mundial. *Medigraphic Artemeni Isína*, v. 65, p. 421-430, 2008.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. v. 156, n. 50-5, p. 38-50, 1991.
- LUDWIG, D. S.; PETERSON, K. E.; GORTMAKER, S. L. Relation between consumption of sugarsweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet*, v. 357, p. 505-508, 2001.
- MAGNUSON, M. C. et al. Renwick. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*, v. 74 (11), p. 670-689, 2018.
- MARGOLSKEE, R. F. et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Nap-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 104, p. 15075-15080, 2007.
- MARRA, C.; BARBOSA, F. D. S.; SICHIERI, R. Changes of body mass index among Young men in Brazil over two decades. *Annals of Nutrition & Metabolism (Online)*, v. 59, p. 79-83, 2011.
- MARTINS, M. R.; VIEIRA, A. K.; DE SOUZA, E. P.; MOURA A. S. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol*, v.198, n.3, p. 591-598, 2008.
- MASUBUCHI, Y. et al. A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *PLoS One*, v. 8 (1), 2013.

MAZZEI-PLANAS, G.; KUC, J. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science*, v. 162, p. 1007, 1968.

MEDINA-GÓMEZ, G. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* v. 26, p. 791-804, 2012.

MELIS, M. S. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *J Ethnopharmacol*, v. 47, p.129-134, 1994.

MELIS, M. S. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *J Ethnopharmacol*, v. 167, p. 157-161, 1999.

MELLO, A. H. et al. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences*, v. 192, p. 26-32, 2018.

MELO, M. E.; PINHO, A. N. Câncer e obesidade: um alerta do INCA. *Rede câncer*, edição: 38, 2017.

MERKEL, M.; ECKEL, R. H.; GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *Journal of Lipid Research*, v. 43 (12), p. 1197-2006, 2002.

MERKEL, M; et al. Lipoprotein lipase expression exclusively in liver. A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J. Clin. Invest*, v. 102, p. 893-901, 1998.

MILLIKEN-SMITHA, B.; CAROLINE, M. Pottercd Paternal origins of obesity: Emerging evidence for incorporating epigenetic pathways into the social determinants of health framework. *Social Science & Medicine*, v. p. 1-9, 2018.

MINEHIRA, K., et al. Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, v. 28, p. 1291-1298, 2004.

MISHRA, N. An Analysis of antidiabetic activity of *S. rebaudiana* extract on diabetic patient. *J Nat Sci Res*, v. 1, p. 1-9, 2011.

MITTELMAN, S. D. et al. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes*, v. 51, n. 3, p. 755-761, 2002.

MOREIRA, A. S. et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v. 19, p. 805-10, 2009.

MOURA, A. S. et al. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, v. 96, n. 2, p. 179-92, 1997.

MUOIO, D. M; NEWGARD, C. B. Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem*, v. 75, p. 367-401, 2006.

NAKAGAWA. et al. Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*, v. 4 (4), p. 5106, 2009.

NAKAYAMA, K.; KASAHARA, D.; YAMAMOTO, F. Absorption, distribution, metabolism and excretion of stevioside in rats. *Food Hyg Saf Sci (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, v. 27, p. 1-8, 1986.

NASCIMENTO, I. B. et al. Dyslipidemia and maternal obesity: Prematurity and neonatal prognosis. *Rev Assoc Med Bras*, v. 64 (3), p.264-271, 2018.

NELSON, G. et al. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, v. 106, p. 381-390, 2001.

NETTLETON, J. A. et al. Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*, v. 32 (4), p. 688-694, 2009.

NIKIFOROV, A. I. et al. Metabolism and toxicity studies supporting the safety of rebaudioside D. *Int J Toxicol*, v. 32, p. 261-273, 2013.

NISHIKAWA, T. et al. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* v. 77, Suppl. 1, p. S161-S164, 2007.

NORDENTOFT, I. et al. Isoesteviol increases insulin sensitivity and changes gene expression. of key insulin regulatory genes and transcription factors in islets of the diabetic KKAY mouse. *Diabetes Obes Metab*, v. 10, p. 939-949, 2008.

NUEMKET, N. Y. et al. Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors. *Nature Communications*, v. 8, p. 1-10, 2017.

OHKUMA, T. et al. Association between eating rate and obesity: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Obesity*, v. 39, p. 1589-1596, 2015.

OLIVEIRA, P. B.; FRANCO, L. J. Consumo de adoçantes e produtos dietéticos por indivíduos com diabetes melito tipo 2, atendidos pelo Sistema Único de Saúde em Ribeirão Preto, SP. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 54, p. 54-55, 2010.

OMS, Global Health Observatory (GHO) data, 2017. Overweight and obesity. Prevalence of obesity among adults. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adults/en/> . Acessado em: novembro de 2018.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Obesidade: Prevenção e gestão da epidemia global. *Relatório de uma consulta da OMS sobre Obesidade*. Geneva, 2015.

OMS. Obesidade e Sobrepeso. Out, 2017 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>> . Acesso em: 13 de abril 2018.

OMS. Só o IMC não diz como você está. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/component/content/article/804-imc/40508-so-o-imc-nao-diz-como-voce-esta>>. Acessado em: 30 de janeiro de 2019.

ORTEGA, F. B.; LAVIE, C. J.; BLAIR, S. N. Obesity and Cardiovascular Disease. *Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Diseases Compendium*, v. 118, p.1752-1770, 2016.

- PACKER, J. F. Modificações enzimáticas de glicosídeos de *Stevia Rebaudiana* por *Gibberella fujikuroi*. 2006. 102f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2006.
- PARK, J.; CHA. *Stevia rebaudiana* Bertoni extract supplementation improves lipid and carnitine profiles in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Sci Food Agric*, v. 90, p. 1099-1105, 2010.
- PEPINO, M.; BOURNE, C. Nonnutritive sweeteners, energy balance and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 14 (4), p. 391-395, 2011.
- PEREIRA, R. P.; FRANCISCHI, A. H.; LANCHI, Jr. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. Luciana O. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.
- PEREIRA, R. O. et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul Pept*, v.136, n.1-3, p.117-121, 2006.
- PERRIER, J. D. et al. FDA regulatory approach to steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, v. 122, p. 132-142, 2018.
- PINHEIRO, A. R. O.; FREITAS, S. F. T.; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17(4), p. 523-533, 2004.
- PINTO, W. J. A função endócrina do tecido adiposo. *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba*, v. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.
- PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol*, v. 587, n. Pt 20, p. 4963-4976, 2009.
- PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adults due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol*, v. 99, n.3, p.154-158, 1992.
- PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.*, 836:146–55, 1999.
- POPKIN, B. M.; NIELSEN, S. J. The sweetening of the world's diet. *Obesity*, v. 11, p. 1325-1332, 2003.
- PORIKOS, K. P., KOOPMANS, H. S. The effect of nonnutritive sweeteners on body weight in rats. *Appetite*; v. 11, p. 12-15, 1988.
- PRATA, C. et al. Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni Possess Insulin-Mimetic and Antioxidant Activities in Rat Cardiac Fibroblasts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 1-13, 2017.
- PURKAYASTHA, S. et al. In vitro metabolism of rebaudioside B, D, and M under anaerobic conditions: comparison with rebaudioside A. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 68, p. 259-268, 2014.

- PURKAYASTHA, S. et al. In vitro metabolism of rebaudioside E under anaerobic conditions: comparison with rebaudioside A. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 76, p. 642-657, 2015.
- QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.
- QURRAT-UL-AIN.; KHAN, S, A. Artificial sweeteners: safe or unsafe? *Recent advances in endocrinology*, v. 65, n2, p. 225-227, 2015.
- RADAELLI, T. et al. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*, v. 52, p. 2951-2958, 2003.
- RAJIA, S.; CHEN, H.; MORRIS, M. J. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol*, v. 22, p. 905-914, 2010.
- RANGANATHAN, G., et al. The lipogenic enzymes DGAT1, FAS, and LPL in adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and TZD treatment. *J. Lipid. Res.*, v. 47, p. 2444-2450, 2006.
- REILLY, J. J. et al. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *BMJ*, v. 330, p. 1357, 2005.
- REN, X. et al. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, v. 3, p. 1-15, 2009.
- RIBEIRO FILHO, F. F. et al. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 50 (2), p. 230-238, 2006.
- RIZWAN, A, F. et al. Preliminary analysis of the effect of *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) in patients with chronic kidney disease (stage I to stage III). *Contemporary Clinical Trials Communications*, v. 12, p. 17-25, 2018.
- RIZZO, B. et al. Steviol glycosides modulate glucose transport in different cell types. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- ROBERTS, A.; RENWICK, A.; G. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food Chem Toxicol*, v. 46, p. 31-39, 2008.
- RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol*, v.195, n.3, p. 485-94, 2007.
- RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem*, v. 22, p. 109-117, 2011.
- ROSS, M. H. *Histologia: Texto e Atlas. Em correlação com biologia celular e molecular/ Michael H. Ross, Wojciech Pawlina; [Revisão técnica Jorge Mamed de Almeida; tradução Antonio Francisco Dieb Paulo]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Ed 6º, 2012.*
- RYAN, D. H.; SCOTT KAHAN. Guideline Recommendations for Obesity Management. *Med Clin N Am*, v.102, p. 49-63, 2018.

SADUR, C. N.; YOST, T. J.; ECKEL, R. H. Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, v. 59, p.1176-1182, 1984.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SAMUELSSON, A. M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*. v. 51, p. 383-392, 2008.

SCHULZE, M. B. et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA*, v. 292 (8), p. 927-934, 2004.

SCHWARTZ, R. S.; BRUNZELL, J. D. Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity with weight loss. *J. Clin. Invest*, v. 67, p. 1425-1430, 1981.

SEHAR, A. I. et al. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chemico-Biological Interactions*, v. 173, p. 115-121, 2008.

SEIDELL, J. C.; HALBERSTADT, J. The Global Burden of Obesity and the Challenges of Prevention. *Ann Nutr Metab*, v: 66, p: 7-12, 2015.

SEKI, H.; TAMURA, K.; MURANAKA, T. Plant-derived isoprenoid sweeteners: recent progress in biosynthetic gene discovery and perspectives on microbial production. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, v. 82, p. 927-934, 2017.

SEMENKOVICH, C. F; et al. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J. Lipid. Res*, v. 30, p. 423-431, 1989.

SHANKAR, K., et al. Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology*. v. 151, p. 2577-2589, 2010.

SHARMA, N. MOGRA, R. Effect of *Stevia* extract intervention on lipid profile. *Ethno Med* v. 3, p. 137-140, 2009.

SHARMA, R.; RAJESH, Y.; ELANGVAM, M. Study of effect of *S. rebaudiana* Bertoni on oxidative stress in type-2 diabetic rat models. *Biomed Aging Pathol*, v. 2, p. 126-131, 2012.

SHARMA, S. et al. Comprehensive review on a grotechnologies of low-calorie natural sweetener *stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni): aboon to diabetic patients. *J Sci Food Agric*, v. 96, p. 1867-1879, 2015.

SHIVANNA, N. et al. Antioxidant, antidiabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *J Diabetes Complications*. v. 27, p. 103-113, 2012.

SICHERI, R. Epidemiologia da Obesidade. Rio de Janeiro. EDUERJ, 1998.

SIGOILLOT, M. et al. Sweet-taste-suppressing compounds: current knowledge and perspectives of application. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 96, p. 619-630, 2012.

SIMEONI, U. et al. Epigenetics and neonatal nutrition Umberto Simeoni. *Early Human Development*, v. 90S2, p. S23-S24, 2014.

SIMON, B. R. et al. MacDougald1. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independent of sweet taste receptors. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, v. 288(45), p. 32475-32489, 2013.

SINGH, S.; GARG, V.; YADAV, D. Antihyperglycemic and antioxidative ability of *S. rebaudiana* (Bertoni) leaves in diabetes induced mice. *Int J Pharm Pharm Sci*, v. 5, p. 297-302, 2013.

SMITH, K. R. et al. Disruption of the sugar-sensing receptor T1R2 attenuates metabolic derangements associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 310, p. E688-E698, 2016.

SOARES, V. M. et al. Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. *Regul. Pept.* v.174, p. 6-11, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA (SBEM). Obesidade. Disponível em: < <http://www.endocrino.org.br/obesidade/>>. Acessado em: 02 nov, 2016.

SONG, X. et al. Cardiovascular and all-cause mortality in relation to various anthropometric measures of obesity in Europeans. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 25, p. 295-304, 2015.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, v. 453, n. 7196, p. 783-787, 2008.

SRINIVASAN, M. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Experimental Biology and Medicine*, v. 228, n. 1, p. 15-23, 2003.

STEINERT, R. E. et al. The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clin Nutr*, v. 30 (4), p. 524-532, 2011.

ST-ONGE, M. P; HEYMSFIELD, S. B. Usefulness of artificial sweeteners for body weight control. *Nutr Rev*, v. 61, p. 219-221, 2003.

STRYJECKI, C.; ALYASS, A.; MEYRE, D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obesity Reviews*, v. 19, p. 62-80, 2018.

STRYJECKI, A. C.; ALYASS, A. N. D.; MEYRE, D. Ethnic and population differences in the genetic predisposition to human obesity. *Obesity Reviews*, v. 19, p. 62-80, 2018.

SUMON, M. H. et al. Comparative efficacy of powdered form of *Stevia* (*S. rebaudiana* Bertoni) leaves and glimepiride in induced diabetic rats. *Bangl J Vet Med*, v. 6, p. 211-215, 2008.

SUN, Y.; AHMED, S.; SMITH, R. G. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol*, v. 23, n. 22, p. 7973-7981, 2003.

SWIERCZYNSKI, J. et al. Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. *Mol. Cell Biochem*, v. 254, p. 55-59, 2003.

SWITHERS, S. E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrin Metab: TEM*, v. 24 (9), p. 431-441, 2013.

SWITHERS, S. E. et al. Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. *Behav Brain Res*, v. 233 (1), p. 1-14, 2012.

SWITHERS, S. E.; DAVIDSON, T. L. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav Neurosci*, v. 122, p. 161-167, 2008.

SWITHERS, S. E.; MARTIN, A. A.; DAVIDSON, T. L. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol Behav*, v. 100 (1), p. 55-62, 2010.

SWITHERS, S. et al. Body weight gain in rats consuming sweetened liquids: effects of caffeine and diet composition. *Appetite*, v. 55, p. 528-33, 2010.

SYLVETSKY C. A. et al. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *Am J Clin Nutr*, v. 96, p. 640-646, 2012.

TAPIA-GONZALEZ, S, et al. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. *J Neuroendocrinol*, v. 23, p. 365-370, 2011.

TAYLOR, P.; POSTON, L. Development programming of obesity in mammals. *Experimental Physiology*, v. 92, n. 2, p. 287-298, 2007.

TEMUSSI, P. A. Determinants of sweetness in proteins: A topological approach. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, v. 24, p. 1033-1042, 2011.

TERRETTAZ, J; CUSIN, I; ETIENNE, J; JEANRENAUD, B. In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically obese (fa/fa) rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, v. 18, p. 9-15, 1994.

THEORELL-HAGLÖW, J; LINDBERG, E. Sleep Duration and Obesity in Adults: What Are the Connections? *Curr Obes Rep*, v. 5, p. 333-343, 2016.

TOMONARI, H. et al. Galpha-gustducin is extensively coexpressed with sweet and bitter taste receptors in both the soft palate and fungiform papillae but has a different functional significance. *Chem Senses*, v. 37, p. 241-251, 2012.

TREVENZOLI, I. H. et al. Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 298, n. 5, p. 941-949, 2010.

TSAI, A. G. et al. Treatment of Obesity in Primary Care. *Med Clin N Am*, v. 102, p. 35-47, 2018.

UPADHYAY, J. et al. Obesity as a Disease. *Med Clin N Am*, v. 102, p. 13-33, 2018.

URAKAWA, H., et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 88, p. 4673-4676, 2003.

VIEIRA, A. K. G. et al. Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 25, p. 1062-1069, 2015.

VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. Abril, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel_17-4-17-final.pdf>. Acesso em: 13 abril 2018.

VIRTUE, S; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome—an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1801, p. 338-49, 2010.

WANG, H; ECKEL R.H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, v. 297, p. 271-288, 2009.

WATERLAND, R. A.; GARZA C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*, v. 69, n. 2, p. 179-97, 1999.

WELLENDORPH, P.; JOHANSEN, L. D.; BRAUNER-OSBORNE, H. Molecular Pharmacology of Promiscuous Seven Transmembrane Receptors Sensing Organic Nutrients. *Mol Pharmacol*, v. 76, p. 453-465, 2009.

WIEBE, N. et al. A systematic review on the effect of sweeteners on glycemic response and clinically relevant outcomes. *BMC Medicine*, v. 9, e. 123, p.1-18, 2011.

WINGARD, R. E. J. R. et al. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia*, v. 36, p. 519-520, 1980.

WORTLEY, K. E. et al. Absence of ghrelin protects against early- onset obesity. *J Clin Invest.* v. 115, n. 12, p. 3573-3578, 2005.

WORTLEY, K. E. et al. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, n. 21, p. 8227-8232, 2004.

XIAO, X. Q. et al. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanente reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, v. 148, p. 4150-4159, 2007.

YACOUB, L. K., VANNI, T. M., GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase mRNA in neonatal and adult mouse tissues: comparison of normal and combined lipase deficiency (cld) mice assessed by in situ hybridization. *J. Lipid. Res*, v. 31, p. 1845-1852, 1990.

YAMUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat med*, v. 7, n. 8, p. 941-946, 2001.

YANG, Q. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: *Neuroscience*. YALE J BIOL MED, v.83, p. 101-108, 2010.

YANG, Y. R. et al. Obesity resistance and increased energy expenditure by white adipose tissue browning in Oga^{+/-} mice. *Diabetologia*, v. 58, n. 12, p. 2867–2876, 2015.

YOUNG, R. L. et al. Disordered control of intestinal sweet taste receptor expression and glucose absorption in type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 62, p. 3532-3541, 2013.

YUN, C. R. et al. Improved secretory production of the sweet-tasting protein, brazzein, in *Kluyveromyces lactis*. *J Agric Food Chem*, v. 64, p. 6312-6316, 2016.

ZAIYOU, M.; EL AMRI, H.; BAKILLAH, A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 28, p. 91-111, 2018.

ZANINI, R.V.; ARAÚJO, C. L.; MARTÍNEZ-MESA, J. Utilização de adoçantes dietéticos entre adultos em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil: um estudo de base populacional. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 27, p. 924-934, 2011.

ZHANG, Y. et al. Coding of sweet bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, v. 112, p. 293-301, 2003.

ZHAO, G. Q. et al. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, v. 115, p. 255-266, 2003.

ZIGMAN, J. M. et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest*, v. 115, n. 12, p. 3564-3572, 2005.

ANEXO – Protocolo de extração dos glicosídeos de esteviol

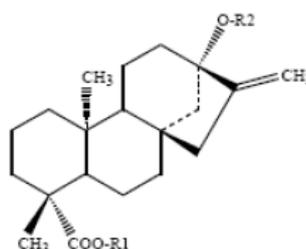
STEVIOLE GLYCOSIDES

Prepared at the 73rd JECFA (2010) and published in FAO JECFA Monographs 10 (2010), superseding specifications prepared at the 69th JECFA (2008) and published in FAO JECFA Monographs 5 (2008). An ADI of 0 - 4 mg/kg bw (expressed as steviol) was established at the 69th JECFA (2008).

SYNONYMS	INS no. 960
DEFINITION	<p>The product is obtained from the leaves of <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. The leaves are extracted with hot water and the aqueous extract is passed through an adsorption resin to trap and concentrate the component steviol glycosides. The resin is washed with a solvent alcohol to release the glycosides and the product is recrystallized from methanol or aqueous ethanol. Ion exchange resins may be used in the purification process. The final product may be spray-dried.</p> <p>Stevioside and rebaudioside A are the component glycosides of principal interest for their sweetening property. Associated glycosides include rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D, rebaudioside F, dulcoside A, rubusoside and steviolbioside which are generally present in preparations of steviol glycosides at levels lower than stevioside or rebaudioside A.</p>
Chemical name	<p><u>Stevioside</u>: 13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid, β-D-glucopyranosyl ester</p> <p><u>Rebaudioside A</u>: 13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid, β-D-glucopyranosyl ester</p>
C.A.S. number	<p>Stevioside: 57817-89-7</p> <p>Rebaudioside A: 58543-16-1</p>
Chemical formula	<p>Stevioside: C₃₈H₆₀O₁₈</p> <p>Rebaudioside A: C₄₄H₇₀O₂₃</p>

Structural Formula

The nine named steviol glycosides:



<u>Compound name</u>	<u>R1</u>	<u>R2</u>
Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)
Rubusoside	β -Glc	β -Glc
Steviolbioside	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)

Steviol (R1 = R2 = H) is the aglycone of the steviol glycosides. Glc, Rha and Xyl represent, respectively, glucose, rhamnose and xylose sugar moieties.

Formula weight
Stevioside: 804.88
Rebaudioside A: 967.03

Assay
Not less than 95% of the total of the nine named steviol glycosides on the dried basis.

DESCRIPTION
White to light yellow powder, odourless or having a slight characteristic odour. About 200 - 300 times sweeter than sucrose.

FUNCTIONAL USES
Sweetener

CHARACTERISTICS

IDENTIFICATION

Solubility (Vol. 4)
Freely soluble in water

Stevioside and rebaudioside A
The main peak in the chromatogram obtained by following the procedure in Method of Assay corresponds to either stevioside or rebaudioside A.

pH (Vol. 4)
Between 4.5 and 7.0 (1 in 100 solution)

PURITY

Total ash (Vol. 4)
Not more than 1%

Loss on drying (Vol. 4)
Not more than 6% (105°, 2h)

Residual solvents (Vol. 4) Not more than 200 mg/kg methanol and not more than 5000 mg/kg ethanol (Method I in Vol. 4, General Methods, Organic Components, Residual Solvents)

Arsenic (Vol. 4) Not more than 1 mg/kg
Determine by the atomic absorption hydride technique (Use Method II to prepare the test (sample) solution)

Lead (Vol. 4) Not more than 1 mg/kg
Determine using an AAS/ICP-AES technique appropriate to the specified level. The selection of sample size and method of sample preparation may be based on the principles of the methods described in Vol. 4 (under "General Methods, Metallic Impurities").

METHOD OF ASSAY Determine the percentages of the individual steviol glycosides by HPLC (Vol. 4) under the following conditions.

Reagents

Acetonitrile: more than 95% transmittance at 210 nm.

Standards

Stevioside: more than 99.0% purity on the dried basis.
Rebaudioside A: more than 99.0% purity on the dried basis.
Mixture of nine steviol glycosides standard solution: Containing stevioside, rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C,

steviolbioside. This solution is diluted with water-acetonitrile (7:3) accordingly and is used for the confirmation of retention times. Standards are available from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Japan and ChromaDex, USA.

Standard solution

Accurately weigh 50 mg of stevioside and rebaudioside A standard into each of two 50-ml volumetric flasks. Dissolve and make up to volume with water-acetonitrile (7:3).

Sample solution

Accurately weigh 50-100 mg of sample into a 50-ml volumetric flask. Dissolve and make up to volume with water-acetonitrile (7:3).

Procedure

Inject 5 µl of sample solution under the following conditions.
Column: Capcell pak C₁₈ MG II (Shiseido Co.Ltd) or Luna 5µ C18(2) 100A (Phenomenex) or equivalent (length: 250 mm; inner diameter: 4.6 mm, particle size: 5µm)
Mobile phase: 32:68 mixture of acetonitrile and 10 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 2.6)
Flow rate: 1.0 ml/min
Detector: UV at 210 nm
Column temperature: 40°
Record the chromatogram for about 30 min.

Identification of the peaks and Calculation

Identify the peaks from the sample solution by comparing the retention time with the peaks from the mixture of nine steviol glycosides standard solution (see under figure). Measure the peak areas for the nine steviol glycosides from the sample solution. Measure the peak area for stevioside and rebaudioside A from their standard solutions. Calculate the percentage of each of the eight steviol glycosides except rebaudioside A in the sample from the formula:

$$\%X = [W_s/W] \times [f_x A_x / A_s] \times 100$$

Calculate the percentage of rebaudioside A in the sample from the formula:

$$\%Rebaudioside\ A = [W_R/W] \times [A_X/A_R] \times 100$$

where

X is each steviol glycoside;
 W_S is the amount (mg) calculated on the dried basis of stevioside in the standard solution;
 W_R is the amount (mg) calculated on the dried basis of rebaudioside A in the standard solution;
 W is the amount (mg) calculated on the dried basis of sample in the sample solution;
 A_S is the peak area for stevioside from the standard solution;
 A_R is the peak area for rebaudioside from the standard solution;

A_X is the peak area of X for the sample solution; and
 f_X is the ratio of the formula weight of X to the formula weight of stevioside: 1.00 (stevioside), 1.20 (rebaudioside A), 1.00 (rebaudioside B), 1.18 (rebaudioside C), 1.40 (rebaudioside D), 1.16 (rebaudioside F), 0.98 (dulcoside A), 0.80 (rubusoside) and 0.80 (steviolbioside).

Calculate the percentage of total steviol glycosides (sum the nine percentages).

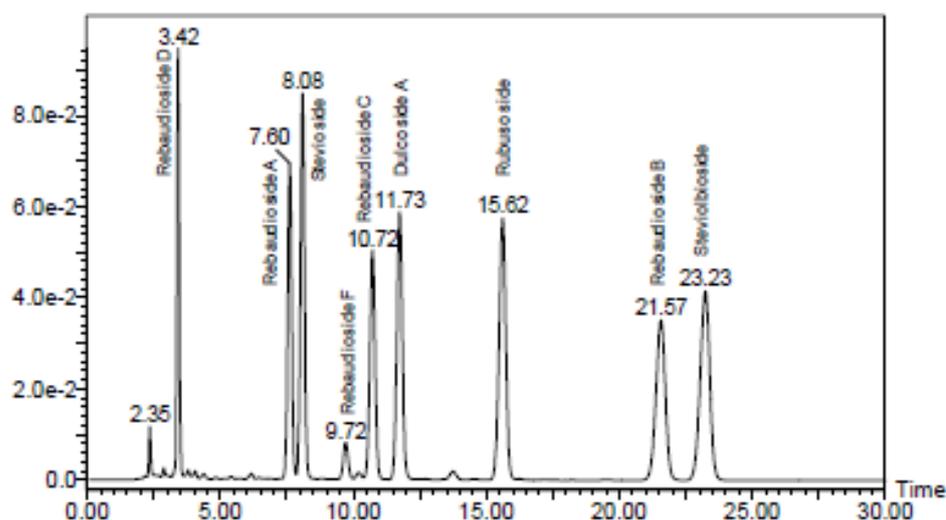


Figure. Chromatogram of mixture of nine steviol glycosides standard solution

Column: Capcell pak C₁₈ MG II

Concentration: 0.5 mg/ml each except rebaudioside F (about 0.1 mg/ml)