



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Lucas Santos Barbosa de Lima

**Efeito do consumo crônico do adoçante natural stévia (*S. Rebaudiana*
Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do fígado
de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação**

Rio de Janeiro

2021

Lucas Santos Barbosa de Lima

Efeito do consumo crônico do adoçante natural stévia (*S. Rebaudiana* Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do fígado 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.

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

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Rio de Janeiro

2021

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

L732 Lima, Lucas Santos Barbosa de.
Efeito do consumo crônico do adoçante natural stévia (S. Rebaudiana Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do fígado de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação/ Lucas Santos Barbosa de Lima – 2020.
88f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Anibal Sanchez Moura

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

1. Obesidade - Teses. 2. Stevia. 3. Edulcorantes – Efeitos adversos. 4. Hiperfagia. I. Souza, Érica Patrícia Garcia de. II. Moura, Anibal Sanchez. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 582.998

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Lucas Santos Barbosa de Lima

Efeito do consumo crônico do adoçante natural stévia (*S. Rebaudiana* Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do fígado de camundogos 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 14 de Julho de 2021.

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Isis Hara Trevenzoli

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Sandra Regina Mariano dos Santos e Lucivaldo Barbosa de Lima, que são o motivo e meu combustível para levantar da cama todos os dias em busca do meu melhor. Dedico também a minha querida avó, Nilza Mariano dos Santos (*in memoriam*), que sempre que falava do seu neto para amigos e familiares, falava com muito orgulho, então vó essa conquista vai especialmente para a senhora, te amo para sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada é possível, e tenho certeza que durante esse período estava sempre me guiando para as melhores decisões possíveis.

Aos meus pais, por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza, que nunca me abandonou nesses dois anos, trabalhando ao meu lado para que nós pudéssemos obter o melhor resultado possível e, mais uma vez, confiou em mim e no meu trabalho, me dando a oportunidade de alcançar uma conquista importantíssima para a minha carreira profissional.

Ao meu coorientador, Aníbal Sanchez Moura, uma figura ímpar no meio acadêmico, ao qual tenho o maior respeito e admiração.

À minha parceira de pós-graduação, Bruna Gonçalves, que hoje tenho a felicidade de considerar como uma amiga. Passamos por momentos familiares difíceis no mesmo período e poder dividir com você as minhas angústias foi fundamental, sem contar que sempre estive à disposição para me ajudar, não só com conhecimento mas também na bancada desde o primeiro momento. Minha eterna gratidão.

À Tayanne Malafaia, também uma grande companheira de pós-graduação que me ajudou muito com seus conhecimentos.

À Anatália Kutuanski, que mesmo cheia de compromissos importantes e em meio a uma pandemia não pensou duas vezes em me ajudar não só na bancada como trazendo ideias para a geração de resultados desse trabalho. Você é o presente e o futuro do LFND, muito obrigado!

Ao bioterista, Nelcir Rodrigues, grande profissional que também se tornou um grande amigo, faz de tudo para que nós alunos tenhamos os animais nas melhores condições, sendo fundamental para os resultados das nossas pesquisas.

Ao técnico de laboratório, Nilton França, que facilita a nossa vida na bancada, cuidando dos materiais necessários para realizar nossos experimentos.

A todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório durante esses dois anos, Stephanie Silva, Mariana Marques e Hyan de Freitas Franco, vocês são peças fundamentais para o andamento de qualquer projeto, a vocês meu muito obrigado.

Aos laboratórios vizinhos, especialmente os laboratórios de Fisiologia Endócrina e de Farmacologia, que gentilmente abriram suas portas e nos acolheram muito bem.

Ao Cnpq por ter financiado esse projeto, graças a essa agência foi possível a minha manutenção da universidade durante esses dois anos para que essa pesquisa pudesse ser finalizada.

À minha namorada e grande companheira, Beatriz Cardoso de Oliveira, que me acompanhou, lutou, sofreu e me ensinou muito durante todo esse ciclo.

Ao meu irmão, Leonardo Santos Barbosa de Lima, meu maior ídolo e meu grande parceiro da vida que sempre me passa os melhores conselhos.

A todos vocês, meu muito obrigado de coração, pois no meio de uma situação jamais vivida por nós, a montanha ficou ainda mais íngreme e por isso todo apoio se tornou muito mais especial.

Até aqui o Senhor nos ajudou

1 Samuel 7:12

RESUMO

LIMA, Lucas Santos Barbosa de. **Efeito do consumo crônico do adoçante natural stévia (*S. Rebaudiana* Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do fígado de camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação.** 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A obesidade e o sobrepeso são definidos como um acúmulo excessivo de gordura corporal que pode ser prejudicial à saúde, estando diretamente relacionado ao aumento da prevalência e gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica. Um importante mecanismo que pode causar a obesidade é a programação metabólica, fenômeno que modula ajustes cruciais, que podem predispor à obesidade na vida adulta. Devido à necessidade de perda e controle do peso corporal, o consumo de adoçantes, aumentou em todo o mundo. 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 stévia. Estudos experimentais recentes *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a stévia tem propriedades antioxidantes e antiinflamatória. Nosso objetivo, portanto, foi avaliar o efeito do consumo do adoçante stévia sobre a resposta endócrino-metabólica e a função mitocondrial do fígado de camundongos adultos obesos submetidos à hiperalimentação na lactação. Para induzir a hiperalimentação, as ninhadas de camundongos *Swiss* foram reduzidas a 3 filhotes machos por lactante no 3º dia de vida pós-natal (grupo hiperalimentado-GH). As ninhadas controles foram ajustadas em 9 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 stévia (GC-ST e GH-ST) ou grupo controle e hiperalimentado que receberam água pura (GC-AG e GH-AG). Os animais foram eutanasiados 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 nuclear e verificamos o peso de alguns tecidos como fígado, tecido adiposo marrom e gordura retroperitoneal. Dosamos a concentração sérica de insulina e, por Western Blotting, quantificamos o conteúdo de GLUT-2, IRS-1 e PI3K. Analisamos a atividade da catalase e da formação de TBARS, para a análise de estresse oxidativo hepático. O metabolismo mitocondrial foi analisado por respirometria de alta resolução. Nossos dados mostram que a hiperalimentação durante a lactação induz aumento da gordura corporal e o peso de tecidos como fígado, gordura do coração, tecido adiposo marrom e gordura retroperitoneal, além de induzir a hiperinsulinemia. Observamos que ingestão de stévia foi capaz de diminuir o consumo alimentar e de provocar um efeito viciante nos animais GH-ST, além disso o GH-ST liberou maiores quantidades de insulina no sangue, gerando um efeito compensatório para poder captar uma maior quantidade de glicose e também apresentou aumento significativo na taxa respiratória máxima estimulada por ADP. Entretanto a stévia não causou alterações no equilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio, nem nas proteínas analisadas no Western Blotting. Concluímos que a hiperalimentação durante a lactação promove alterações morfológicas e metabólicas e que o consumo crônico do adoçante stévia promove alterações metabólicas distintas de acordo com o estado nutricional do animal, reduzindo a ingestão alimentar, aumentando a captação de glicose e a função mitocondrial em animais hiperalimentados. Porém sugerimos que mais estudos sejam realizados para esclarecer melhor os possíveis efeitos medicinais da stévia em tecidos periféricos, como o fígado.

Palavras-chave: Obesidade; hiperalimentação; fígado; stévia

ABSTRACT

LIMA, Lucas Santos Barbosa de. **Effect of chronic consumption of stevia sweetener (*S. rebaudiana* Bertoni) on metabolic parameters and mitochondrial activity of liver of obese mice overfeeding during lactation.** 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Obesity and overweight are defined as an excessive accumulation of body fat that can be harmful to health, being directly related to the increased prevalence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. An important mechanism that can cause obesity is metabolic programming, a phenomenon that modulates crucial adjustments that can predispose to obesity in adulthood. Due to the need to lose and control body weight, the consumption of sweeteners, has increased worldwide. *Stevia rebaudiana* Bertoni is a plant native to South America that has a high sweetening power, which is why it is used in the production of the natural sweetener stevia. Recent experimental studies in vivo and in vitro have shown that stevia has antioxidant and anti-inflammatory properties. Our objective, therefore, was to evaluate the effect of the consumption of the sweetener stevia on the endocrine-metabolic response and the mitochondrial function of the liver of obese adult mice submitted to overfeeding during lactation. To induce overfeeding, Swiss mouse litters were reduced to 3 male pups per lactating woman on the 3rd day of postnatal life (overfed group - OG). Control litters were adjusted to 9 pups per infant (control group - CG). At 90 days of life, the control and overfed groups were divided into two subgroups, a control and overfed group that received water containing 0.3% stevia (CG-ST and OG-ST) or a control and overfed group that received pure water (CG-AG and OG-AG). The animals were euthanized at 180 days of life. We evaluated food and water consumption by the animals throughout the study. Body composition was measured by nuclear magnetic resonance and we verified the weight of some tissues such as liver, brown adipose tissue and retroperitoneal fat. We measured the serum insulin concentration and, by Western Blotting, we quantified the content of GLUT-2, IRS-1 and PI3K. We analyzed the catalase activity and the formation of TBARS, for the analysis of hepatic oxidative stress. Mitochondrial metabolism was analyzed by high-resolution respirometry. Our data show that overnutrition during lactation induces an increase in body fat and tissue weight such as liver, heart fat, brown adipose tissue and retroperitoneal fat, in addition to inducing hyperinsulinemia. We observed that stevia intake was able to decrease food consumption and cause an addictive effect in GH-ST animals, in addition, GH-ST released greater amounts of insulin into the blood, generating a compensatory effect to capture a greater amount of glucose and also showed a significant increase in the maximum respiratory rate stimulated by ADP. However, stevia did not alter the balance between antioxidants and reactive oxygen species, nor in the proteins analyzed in Western Blotting. We conclude that overnutrition during lactation promotes morphological and metabolic changes and that the chronic consumption of sweetener stevia promotes distinct metabolic changes according to the nutritional status of the animal, reducing food intake, increasing glucose uptake and mitochondrial function in overfed animals. However, we suggest that more studies be carried out to better clarify the possible medicinal effects of stevia in peripheral tissues, such as the liver.

Key-words: Obesity; overnutrition; liver; stevia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Prevalência da obesidade em 2016, entre adultos, maiores de 18 anos, de ambos os.....	20
Figura 2 –	Potenciais mecanismos na programação materna pós-natal.....	24
Figura 3 –	Efeitos fisiopatológicos da hiperalimentação durante a lactação em roedores.....	26
Figura 4 –	Fisiopatologia da DHGNA baseada na obesidade.....	29
Figura 5 –	Imagem e ilustração da planta Stevia Rebaudiana Bertoni.....	34
Figura 6 –	Estruturas químicas de glicosídeos de esteviol: esteviosídeo, rebaudiosídeo e seu núcleo metabólico semelhante, esteviol.....	35
Figura 7 –	Principais vias de absorção, digestão, metabolismo e excreção dos glicosídeos de esteviol.....	37
Figura 8 –	Esquema do modelo de redução de ninhada e formação dos grupos hiperalimentados e controle até os 180 dias de vida.....	42
Figura 9 –	Modelo de divisão dos grupos hiperalimentado e controle em subgrupos até os 180 dias de vida.....	43
Figura 10 –	Avaliação da ingestão alimentar semanal de ração dos camundongos controles e hiperalimentados a partir do desmame até os 180 dias de vida.....	52
Figura 11 –	Avaliação da ingestão de líquidos semanal de camundongos controles e hiperalimentados dos 90 até os 180 dias de vida.....	53
Figura 12 -	Massa corporal dos grupos controle e hiperalimentado aos 90 dias e aos 180 dias de vida.....	54
Figura 13 -	Porcentagem de gordura corporal dos grupos controle e hiperalimentado aos 90 dias e aos 180 dias de vida.....	55
Figura 14 -	Porcentagem de massa magra dos grupos controle e hiperalimentado aos 90 dias e aos 180 dias de vida.....	56
Tabela 1 -	Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	58
Figura 15 -	Dosagem do hormônio insulina nos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	59

Figura 16 -	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	60
Figura 17 -	Efeito do consumo do adoçante stévia sobre os níveis de TBARS no fígado dos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	61
Figura 18 -	Efeito do consumo do adoçante stévia sobre a atividade de catalase no fígado dos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	62
Figura 19 -	Conteúdo de GLUT-2 nos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	62
Figura 20 -	Conteúdo de IRS-1 nos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	63
Figura 21 -	Conteúdo de PI3K nos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	64
Figura 22 -	Respirometria de alta resolução no fígado de animais adultos tratados com stévia submetidos a oxidação de carboidratos.....	65
Figura 23 -	Respirometria de alta resolução no fígado de animais adultos tratados com stévia submetidos a oxidação de ácidos graxos.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Núcleo arqueado
ADP	Adenosina difosfato
AGS	Ácido graxo saturado
AKT/PKB	Proteína quinase B
AMA	<i>American Medical Association</i>
ANC	Adoçantes não calóricos
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Persulfato de amônio
AT2R	Receptor tipo 2 de angiotensina
ATP	Adenosina trifosfato
Ccl4	Tetracloroeto de carbono
CDC	Centros dos EUA para Controle e Prevenção de Doenças
CNA	Comprimento naso-anal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimento Animal
Covid-19	Coronavírus 2019
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDTA K3	Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico
EGTA	Ácido egtálico
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
EVA	Escalas analógica virtuais
FAZ	Ácido graxo sintase
FCCP	Carbonil cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona
FDA	<i>Food and drug administration</i>

GC	Grupo controle
GC-AG	Grupo controle água
GC-ST	Grupo controle stévia
GE	Gordura epididimal
GH	Grupo hiperalimentado
GH	Hormônio do crescimento
GH-AG	Grupo hiperalimentado água
GH-ST	Grupo hiperalimentado stévia
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUTs	Transportador de glicose
GLUT-1	Transportador de glicose tipo 1
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT-9	Transportador de glicose tipo 9
GLUT-10	Transportador de glicose tipo 10
GR	Gordura retroperitoneal
HEPES	Agente tamponante químico
HEPG2	Células de carcinoma hepatocelular hepático humano
HL-60	Células humanas de leucemia
HSCs	Células estreladas hepáticas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILs	Interleucinas
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade industrial
IRS-1	Substrato do receptor de insulina tipo 1
IRS-2	Substrato do receptor de insulina tipo 2
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
LHS	Lípase hormônio sensível
LPS	Lipoproteína lípase
MDA	Malondialdeído

ME	Músculo esquelético
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miRNA	Micro RNA
MIR05	Solução de respirometria mitocondrial 5
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₃ Vo ₄	Ortovanadato de sódio
Nf-KB	Nuclear Kappa B
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NPY	Neuropeptídeo Y
NP-40	Detergente comercial
NRF2	Fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2
OMS	Organização mundial da saúde
PAI-1	Inibidor de atividade de plasminogênio 1
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase tipo 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinase C
PNS	Pesquisa nacional de saúde
POMC	Pró-opiomelanocorticona
PPAR	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PYY	Peptídeo YY
RCR	Razão do controle respiratório
RI	Resistência à insulina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotação por minuto
SARS-Cov-2	Síndrome respiratória aguda de coronavírus 2
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1c	Proteínas ligadoras de elementos reguladores de esterol tipo 1
TBAR	Ácido tiobarbitúrico
TAB	Tecido adiposo marrom
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo branco
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletenodiamina
TITG	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TMP	Tetrametoxipropano
TNF-	Fator de necrose tumoral
TTBS	Mistura de solução salina tris-tamponada
T0	Tempo zero de infusão de glicose
T30	Tempo 30 de infusão de glicose
T60	Tempo 60 de infusão de glicose
T90	Tempo 90 de infusão de glicose
T120	Tempo 120 de infusão de glicose
UCP-1	Proteína desacopladora do tipo 1
VIGITEL	Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VM	Núcleo ventromedial

LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	Kilograma
m ²	Metros quadrados
Kg/ m ²	Kilograma por metros quadrados
%	Porcentagem
<	Menor
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
°c	Graus Celsius
mL	Mililitro
G	Gramas
mL/g	Mililitro por gramas
Pmol	Picomolar
Nmol	Nanomolar
mM	Milimolar
Cm	Centímetro
Mg	Miligramas
Dl	Decilitro
mg/dl	Miligramas por decilitros
±	Mais ou menos
H	Hora
N	Número de animais por grupo
P	Probabilidade significativa
~	Aproximadamente
g/Kg	Gramas por quilograma
mg/mL	Miligramas por mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
g/L	Gramas por litro
A	Significativo em relação ao GC-AG
B	Significativo em relação ao GC-ST
C	Significativo em relação ao GH-AG

Ng/ml	Nanograma por mililitro
Nmol/mg	Nanomolar por miligrama
-	Menos
♂	Macho
®	Registrado
Nm	Nanômetro
μM	Micromolar
μl	Micro litro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	JUSTIFICATIVA	39
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivo específico	40
3	MATERIAL e MÉTODOS	41
3.1	Animais e modelo experimental	41
3.2	Composição e obtenção do adoçante natural stévia	44
3.3	Consumo alimentar e hídrico	44
3.4	Ressonância magnética nuclear	44
3.5	Teste intraperitoneal de tolerância a glicose	45
3.6	Eutanásia e coleta de tecidos	45
3.7	Dosagem do hormônio insulina	46
3.8	Mensuração da gordura epididimal e fígado	46
3.9	comprimento naso-anal e tibia	46
3.10	Análise de proteínas através de Western Blotting	47
3.10.1	<u>Lise do fígado</u>	47
3.10.2	<u>Análise por Western Blotting</u>	47
3.11	Análise da função mitocondrial por respirometria de alta resolução	48
3.11.1	<u>obtenção do fígado permeabilizado</u>	48
3.11.2	<u>Respirometria de alta resolução</u>	48
3.12	Análise de estresse oxidativo	49
3.12.1	<u>Peroxidação lipídica</u>	50
3.12.2	<u>Medida de catalase</u>	50
3.13	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Avaliação da ingestão alimentar semanal dos animais controle e hiperalimentados	52
4.2	Avaliação da ingestão de líquidos semanal dos animais controle e hiperalimentado	53

4.3	Massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 de vida.....	54
4.4	Porcentagem de gordura corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 e 180 dias de vida.....	55
4.5	Porcentagem de massa magra dos grupos controle e hiperalimentados aos 90 e aos 180 dias de vida.....	55
4.6	Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	56
4.7	Dosagem do hormônio Insulina nos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.....	59
4.8	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	59
4.9	Análise de estresse oxidativo hepático.....	61
4.9.1	<u>Peroxidação lipídica.....</u>	61
4.9.2	<u>Medida de Catalase.....</u>	61
4.10	Efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre o conteúdo de GLUT-2 no fígado de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	62
4.11	Efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre o conteúdo de IRS-1 no fígado de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida.....	63
4.12	Efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre o conteúdo de PI3K no fígado de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida...	63
4.13	Efeito do consumo do adoçante stévia sobre o metabolismo de carboidratos no fígado de camundongos tratados aos 180 dias de vida.....	64
4.14	Efeito do consumo do adoçante stévia sobre o metabolismo de ácidos graxos no fígado de camundongos tratados aos 180 dias de vida.....	65
5	DISCUSSÃO.....	67
	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO – Protocolo de extração dos glicosídeos de esteviol.....	85

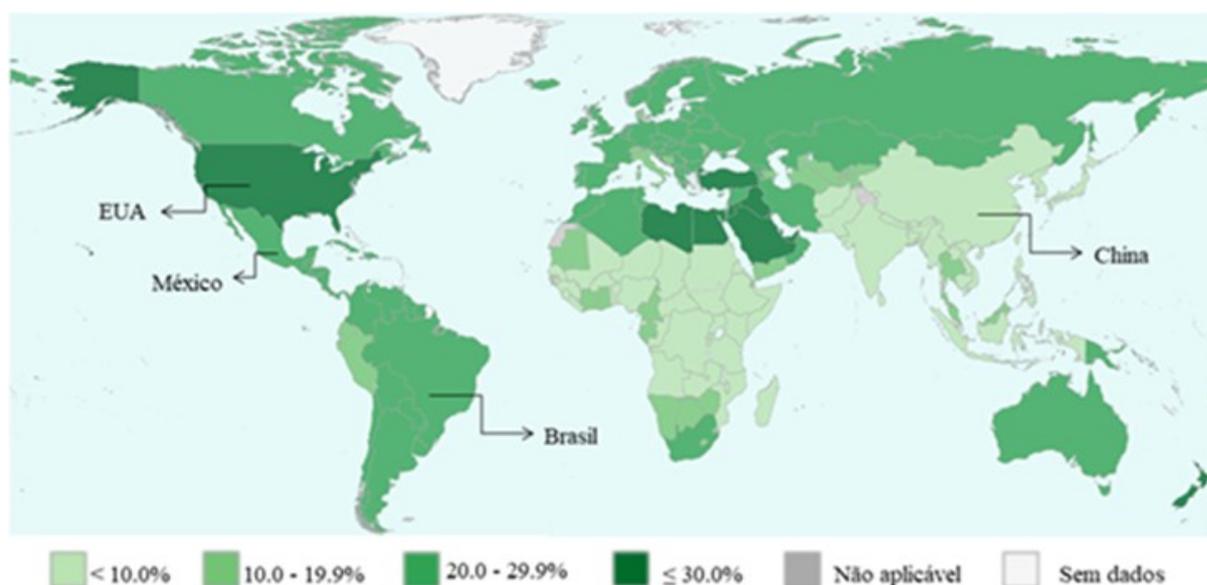
INTRODUÇÃO

Obesidade e o sobrepeso são definidos como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode ser prejudicial à saúde. Para classificar um indivíduo obeso ou com excesso de peso, o Índice de Massa Corporal (IMC), uma relação entre peso e altura (kg/m^2), é o método mais usado. Para adultos, os critérios atuais adotados pelos Centros dos EUA para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), definem uma faixa normal de IMC de 18,5 a 24,9 kg/m^2 , enquanto um $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ é considerado sobrepeso e um $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ classifica o indivíduo como obeso, já a obesidade grave é definida como $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$ (BLÜHER, 2019; CHOOI, DING, MAGKOS, 2018; DE LORENZO *et al.*, 2020 ; OMS, 2018 ; PINHEIRO, FREITAS, CORSO, 2004).

Com o aumento da prevalência da obesidade em todo mundo, alimentou-se um debate atual sobre sua classificação como doença, por isso declarações da *American Medical Association* (AMA) em 2013, e da *The Obesity Society*, em 2018, reconhecendo a obesidade como uma doença e superando as definições anteriores, aumentando o interesse político, social e científico pela temática e gerando um novo conceito, foram fundamentais, onde a obesidade passa a ser vista como uma doença social, com superação do estigma e da descriminalização (DE LORENZO *et al.*, 2020).

Dados recentes da prevalência global de obesidade, ajustados à idade, mostram que pelo menos 30% dos homens e 35% das mulheres são obesos em diversos países do mundo, inclusive na América do Norte, Europa Ocidental, Ásia e Austrália (ANDOLFI e FISICHELLA, 2018; PICHÉ *et al.*, 2018). As taxas de obesidade aumentaram em todas as idades e ambos os sexos, independentemente da localização geográfica, etnia ou *status* socioeconômico, embora a prevalência da obesidade seja geralmente maior em idosos e mulheres (CHOOI, DING, MAGKOS, 2018). Em 2020, as estimativas apontaram que mais de 60% da população estava com sobrepeso ou obesidade e dados futuros apontam que em 2030 a prevalência de obesidade grave será de 11%, aproximadamente o dobro da prevalência atual (ANDOLFI e FISICHELLA, 2018).

Figura 1 – Prevalência da obesidade em 2016, entre adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos



Legenda: EUA- Estado Unidos da América; < - menor; % - porcentagem; ≤ - menor ou igual;
 Nota: Prevalência da obesidade em 2016, no mundo, em indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos;
 Fonte: Adaptado: OMS, 2017.

No Brasil, dados coletados pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) e divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apontam que a prevalência de pessoas adultas obesas no Brasil mais do que dobrou em 17 anos, indo de 12,2% entre 2002 e 2003 para 26,8% em 2019. Neste mesmo período a população adulta brasileira com excesso de peso passou de 43,3% para 61,7%. Entre os adolescentes, na faixa de 15 a 17 anos, 1 a cada 5 estava com excesso de peso em 2019 e, entre os brasileiros com 18 anos ou mais, 41,2 milhões estavam obesos nesse mesmo ano (IBGE, 2020).

A causa fundamental da obesidade é um desequilíbrio energético a longo prazo entre o excesso de calorias consumidas e o baixo gasto energético ocasionando, assim, um acúmulo de energia no corpo (BLÜHER, 2019; DE LORENZO *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2017; HALL, 2018; MELLO *et al.*, 2018; WHO, 2015). Esse acúmulo de energia é convertido em triglicerídeos que, por sua vez, serão armazenados em depósitos de tecido adiposo, levando a um conseqüente ganho de peso (CHOOI, DING, MAGKOS, 2018). Tal desequilíbrio está cada vez mais comum por conta das novas formas de trabalho associadas à tecnologia e aos longos dias de trabalho, que acabam levando ao sedentarismo e redução da prática de atividades físicas (MOHAMMED *et al.*, 2018; WHO, 2015).

De acordo com o Guia Alimentar para a População Brasileira (2014), publicado pelo Ministério da Saúde (MS), os padrões de alimentação na maioria dos países, e principalmente naqueles que são emergentes economicamente, estão mudando, estas mudanças passam pela substituição de alimentos considerados *in natura*, minimamente processados de origem vegetal, ou culinária à base desses alimentos, por produtos industrializados prontos para consumo, causando o desequilíbrio na oferta de nutrientes e a ingestão excessiva de calorias (BRASIL, 2014).

Ainda de acordo com Blüher (2019), existem outros fatores responsáveis pela pandemia da obesidade, como uma preferência de tamanho de corpo, papel do status econômico, ambiente local, susceptibilidade à comercialização de comidas e a modulação da ingestão de alimentos. Em seu estudo, Blüher diz que até as primeiras décadas do século passado, a obesidade era considerada um símbolo de beleza, saúde e riqueza, visto que durante os períodos de fome, quando muitas pessoas morriam por tal motivo, o excesso de peso era um fator protetor. Em algumas culturas, o aumento do peso corporal foi, e ainda é usado intencionalmente para tornar uma pessoa atraente para o casamento. Da mesma forma, o status socioeconômico, onde o aumento da prevalência da obesidade começou nos países de alta renda na década de 1970 e foi seguido pela maioria dos países de renda média e, mais recentemente, por alguns países de baixa renda, demonstrando que esse padrão sugere que o aumento dos níveis de obesidade coincide com a melhoria da economia e da riqueza (BLÜHER, 2019).

Diversas outras doenças ou condições crônicas estão diretamente ligadas pela obesidade, como por exemplo: diabetes mellitus (DM), vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão, osteoartrite, síndrome metabólica (SM), dislipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a resistência à insulina (RI). Essas e outras comorbidades reduzem a longevidade e a qualidade de vida (KARCZEWSKI *et al.*, 2018; MELDRUM *et al.*, 2017). Acredita-se que uma inflamação crônica de baixo grau e a ativação inespecífica do sistema imunológico contribua em grande medida para o desenvolvimento dessas patologias (KARCZEWSKI *et al.*, 2018). Além disso, o excesso de gordura pode alterar a dinâmica mitocondrial levando a uma possível fissão e fragmentação mitocondrial com consequente disfunção da organela. Tal disfunção provoca uma sinalização pró-inflamatória e estresse oxidativo, ambos caracterizando obesidade metabolicamente complicada. Os distúrbios mitocondriais têm, no entanto, potencial substancial para piorar sinergicamente o estresse oxidativo, a inflamação e a resistência à insulina, promovendo

aumentos adicionais na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BARAZZONI *et al.*, 2018).

Mais recentemente, a obesidade e a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) entraram na lista de fatores de risco para o novo coronavírus (COVID-19), uma doença respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2, que no ano de 2020 atingiu o *status* de pandemia. Visto que, na maioria dos países, a obesidade e DM2 são causadas por uma dieta ocidental, rica em ácidos graxos saturados (AGS), um consumo excessivo de AGS pode levar a uma ativação crônica do sistema imune inato e uma inibição do sistema imune adaptativo. Além disso, os ácidos graxos saturados podem induzir um estado lipotóxico e ativar o sistema imune inato através do receptor toll-like4 expresso em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Esse processo encaminha a ativação de vias de sinalização inflamatória que produzem mediadores pró-inflamatórios e outros efetores do sistema imunológico inato. Estudos com camundongos que consumiram dieta hipercalórica demonstraram aumento da infiltração de macrófagos no tecido pulmonar, especificamente nos alvéolos. Tal dado é de extrema relevância para pacientes com COVID-19, dada a alta taxa de infecção entre células epiteliais alveolares do pulmão e o envolvimento de inflamação do tecido pulmonar e dano alveolar na patologia por COVID-19 (BUTLER e BARRIENTOS, 2020).

Programação metabólica

Durante muitos anos ficou definido que o desenvolvimento de características morfológicas e funcionais era determinado pelo seu material genético, cuja modulação era possível apenas por alterações na sequência de genes. Porém, estudos recentes em animais e humanos demonstraram que a regulação genômica pode ser modulada por alterações ambientais, especialmente as que ocorrem em períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e a lactação. Tais períodos críticos, são períodos de maior vulnerabilidade do organismo, caracterizados por intensa proliferação celular, diferenciação e rápida expansão tecidual, sendo definidos como “janelas críticas do desenvolvimento”. Nestas fases, insultos nutricionais, como desnutrição ou hipernutrição e alterações hormonais, promovem marcações no funcionamento do organismo que levam a alterações morfológicas e/ou fisiológicas imediatas com reflexos para o estado de saúde na vida adulta. O estudo de Barker e colaboradores, que ficou conhecido como “Origens do desenvolvimento da doença no

adulto” afirma que influências adversas no início do desenvolvimento, e particularmente durante a vida intrauterina, podem resultar em mudanças permanentes na fisiologia e no metabolismo, que resultam no aumento do risco de doença na idade adulta (DE BOO e HARDING, 2006). A partir daí, foram realizados diversos estudos mostrando que exposições e eventos pré-gestacionais, pré-natais e infantis afetam os sistemas regulatórios cardiovascular, endócrino e metabólico, e que esses efeitos podem ser transgeracionais (CARPINELLO, DeCHERNEY, HILL, 2018). Estes eventos têm sido reunidos no conceito de programação metabólica, um evento importante para explicar o grande número de doenças crônicas atuais, em especial obesidade e suas comorbidades, como o DM2 e doenças cardiovasculares (DCVs) (BARKER, 1995; XAVIER *et al.*, 2015).

O objetivo principal da programação metabólica é dar melhores condições de sobrevivência para a prole através da regulação do balanço energético, aproveitando todos os nutrientes ofertados da melhor maneira possível. Entretanto, a longo prazo, essas alterações funcionais terão impacto no metabolismo energético e hormonal na vida adulta. Desta maneira, o conceito de programação metabólica torna-se peça-chave para entendermos a progressão da obesidade em todo mundo, visto que alterações na sequência dos genes, tais como aquelas induzidas por mutações, não podem explicar a atual pandemia de obesidade e suas comorbidades (SULLIVAN, SMITH, GROVE, 2011).

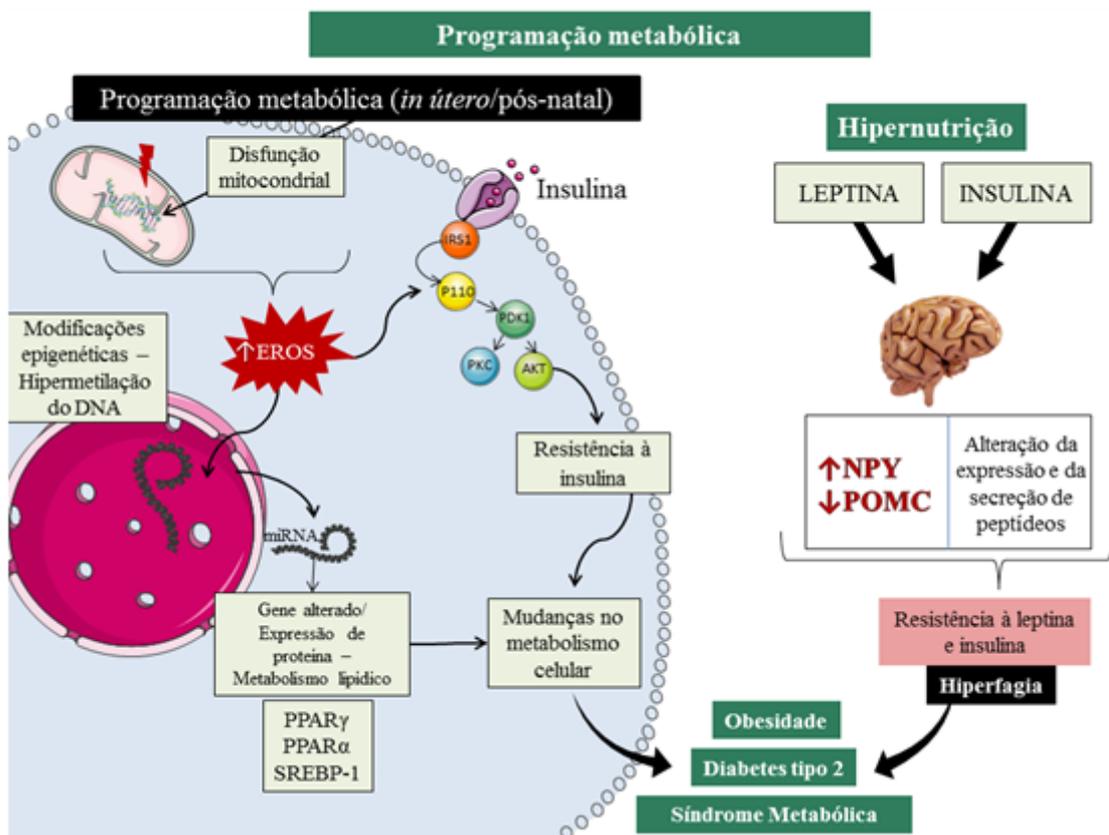
Diversos modelos experimentais são usados para elucidar os elementos moleculares e fisiológicos que caracterizam a programação metabólica, por exemplo, os modelos de desnutrição proteica ou hiperalimentação que atingem os períodos de gestação e lactação. Um modelo experimental de programação metabólica muito utilizado é a técnica de redução do número de filhotes da prole, ocasionando a hiperalimentação durante o período de lactação. Os animais adultos submetidos a esse modelo apresentam aumento do tecido adiposo corporal, dislipidemia, intolerância à glicose, resistência à insulina e alterações cardiovasculares (CRUZ, GORAN, 2004; XAVIER *et al.*, 2015).

A condição metabólica materna e a dieta na gestação e lactação influenciam o ambiente perinatal, refletindo a longo prazo no balanço energético da prole, levando ao risco de doenças metabólicas na vida adulta e uma consequente redução da expectativa de vida (SULLIVAN, SMITH, GROVE, 2011). O ganho de peso da mãe está relacionado a um elevado consumo de calorias, principalmente na forma de lipídeos e carboidratos.

Assim, estudos com ratos têm demonstrado que a administração de dieta materna rica em lipídeos durante o período lactacional pode provocar mudanças no controle do sistema

endócrino da prole, promovendo alterações da secreção e ação de hormônios importantes para a homeostase energética, particularmente insulina, leptina e cortisol (XAVIER *et al.*, 2015).

Figura 2 - Potenciais mecanismos envolvidos na programação materna pós-natal



Legenda: EROS – espécies reativas de oxigênio; miRNA – microRNA; NPY – neuropeptídeo Y; POMC – gene próopiomelanocortina; 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 estero; 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.

Dessa forma, a dieta materna rica em lipídeos provoca alterações no sistema endócrino e no sistema nervoso central (SNC). No sistema endócrino é possível observar alterações na composição do leite materno, resultando em variações calóricas, bem como, modulando os principais nutrientes do leite, aumentando o teor de lipídeos, carboidratos e proteínas (XAVIER *et al.*, 2015). Por fim o SNC passa por importantes mudanças durante a gestação e lactação, sendo um potencial alvo de eventos de programação metabólica. O hipotálamo é uma região fundamental para o controle da ingestão alimentar e do peso corporal, sendo muito

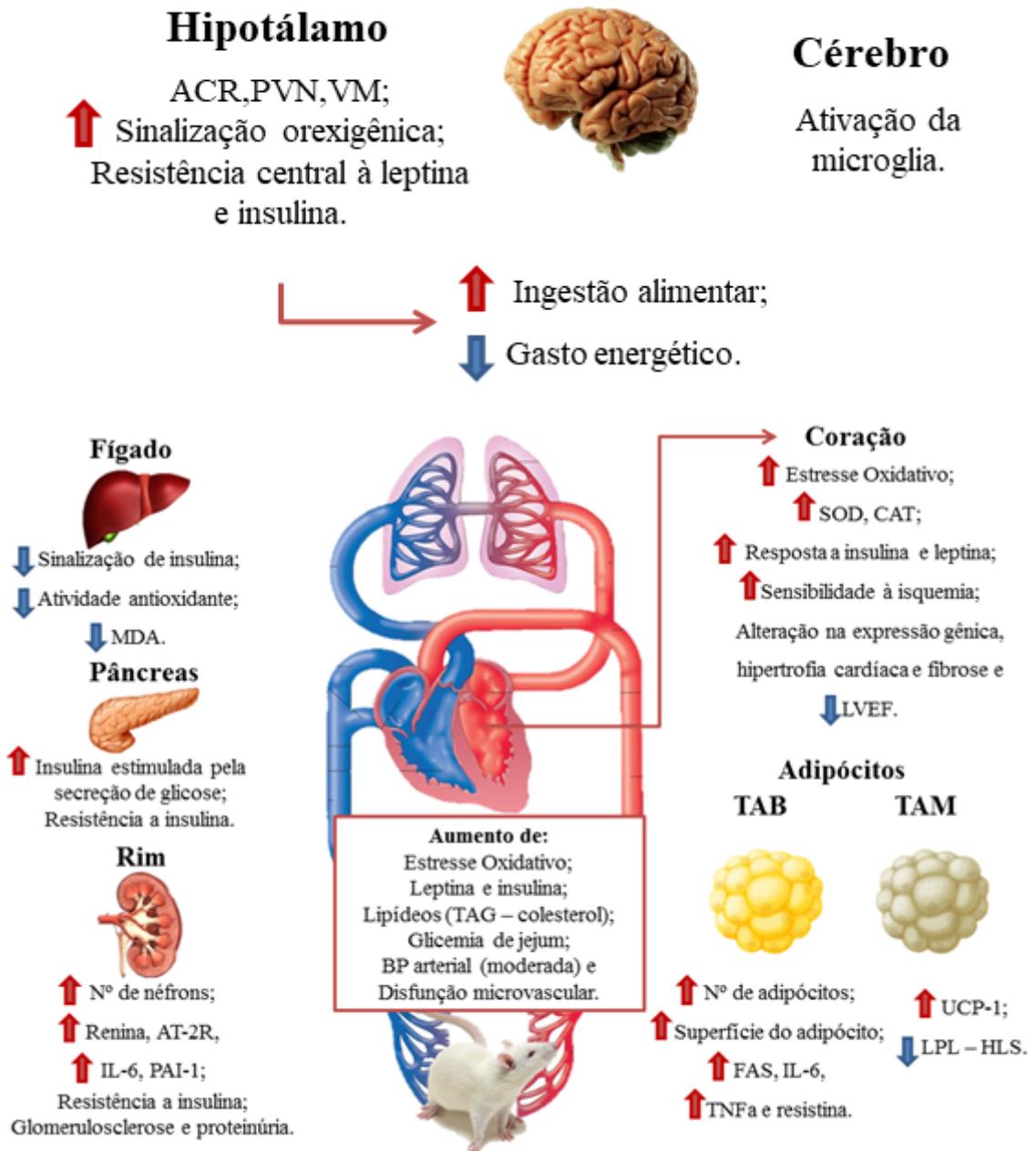
propenso à remodelação por sensibilização hormonal. A diferenciação dos núcleos hipotalâmicos da prole podem sofrer alterações de fatores externos durante a gestação e a lactação, podendo refletir em futuros distúrbios metabólicos e nutricionais. Assim, frequentemente animais programados apresentam hiperfagia, aumento do consumo alimentar, como fator envolvido no ganho de peso da prole (XAVIER *et al.*, 2015).

A programação metabólica pode ocorrer por diversos mecanismos, como indução de variações na estrutura de alguns órgãos, com alterações na vascularização, na inervação ou na justaposição das diferentes células do órgão, alterações no número de células e diferenciação metabólica, modificações na expressão de certos genes, acarretando variações na síntese de enzimas, hormônios, receptores hormonais e transportadores (WATERLAND e GARZA, 1999).

Na gestação, na fase de desenvolvimento do embrião, aumentos e reduções nas concentrações hormonais e o estado nutricional materno, interferem na formação do eixo hipotálamo-hipófise, podendo levar a alterações na expressão gênica de receptores, enzimas, canais e transportadores. Essas mudanças podem afetar hormônios, como a insulina e o hormônio do crescimento (GH), hormônios fundamentais no desenvolvimento de SM, DM2 e alterações alimentares na vida adulta (XAVIER *et al.*, 2015).

No fígado, a programação metabólica pode agir reduzindo a sensibilidade a hormônios no tecido (BATSON *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2015). Além disso, a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia, mudanças comuns que ocorrem na programação metabólica, afetam vias bioquímicas, como a glicogenólise, gliconeogênese e a lipogênese hepática, contribuindo para um desequilíbrio metabólico. Dessa maneira, regularmente é possível notar em prole de animais programados na gestação ou lactação, hiperglicemia e dislipidemia associadas à esteatose hepática (XAVIER *et al.*, 2015).

Figura 3 – Efeitos fisiopatológicos da hiperalimentação durante a lactação em roedores



Legenda: ACR - Núcleo arqueado; TAG –triglicerídeos;; PVN – Núcleo paraventricular; VM – Núcleo ventricular;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.

Fígado

O fígado é organizado em lóbulos, suas unidades estruturais, formados por cordões de hepatócitos delimitados por capilares sinusoidais dispostos radialmente em direção à veia centro-lobular. As células parenquimatosas englobam as células do ducto biliar e, primordialmente, os hepatócitos, que constituem a unidade funcional do fígado, ocupando 80% do volume do órgão. As células endoteliais sinusoidais e as células de Kupffer estão no grupo das células não-parenquimatosas. Apesar de algumas diferenças nas proteínas expressas nesses tipos celulares, em geral, as proteínas do fígado são expressas em todas as suas células, porém os hepatócitos são responsáveis por grande parte do proteoma total do fígado, sendo assim o tipo celular mais importante para secreção de proteínas do tecido uma vez que, até o momento, a expressão de GLUT-1, GLUT-2, GLUT-9 e GLUT-10 foi documentada em hepatócitos (BECKWITT *et al.*, 2018; BERNE, LEVI. Fisiologia. 6° Ed. Elsevier, 2009; KARIM, ADAMS, LALOR, 2012 ; WATT *et al.*, 2019).

As características anatômicas, estruturais e funcionais, mostram a importância de um órgão como o fígado. Maior glândula do corpo humano (~1,5 Kg), recebe em torno de 25% do débito cardíaco, possuindo o importante papel de redistribuição de sangue para os outros tecidos. Nesse cenário, o fígado apresenta arquitetura e regulação única de fluxo sanguíneo, onde os hepatócitos e as células não-parenquimatosas secretam produtos nos sinusóides hepáticos, que seguem pelas veias centrais para a veia cava inferior e, possivelmente, para o coração para redistribuição nos tecidos periféricos (WATT *et al.*, 2019).

No desenvolvimento, esse órgão é o resultado de um complexo programa de diferenciação iniciado por gradientes de sinais exógenos, sinais de localização celular e uma hierarquia de fatores de transcrição. Esses processos que são completamente desenvolvidos no fígado maduro são essenciais para a vida. A insuficiência hepática causada por diversos motivos, como infecção viral, obesidade ou carga oncológica é um problema de saúde global (TREFTS, GANNON, WARSSEMAN, 2018).

O fígado é o primeiro local de processamento da maior parte dos nutrientes absorvidos, sendo considerado uma usina energética metabólica fundamental para a retirada de vários produtos metabólicos residuais e xenobióticos do corpo, através da conversão dessas substâncias em formas capazes de serem excretadas. Além disso, esse órgão secreta ácidos biliares e armazena inúmeras substâncias essenciais para o corpo, como glicose, aminoácidos e proteínas do plasma. Dessa forma, as funções do fígado podem ser divididas em três áreas:

contribuição para o metabolismo corporal, destoxificação do organismo e excreção de produtos lipossolúveis (BECKWITT *et al.*, 2018; BERNE, LEVI. Fisiologia. 6º Ed. Elsevier, 2009; KARIM, ADAMS, LALOR, 2012; TREFTS, GANNON, WASSERMAN, 2018).

O fígado contribui para a homeostase metabólica dos carboidratos e é um importante local para a síntese, armazenamento e redistribuição dos carboidratos. Na sua forma mais simples, após uma refeição, os GLUTs dos hepatócitos absorvem a glicose da corrente sanguínea portal que, na sequência, é convertida em glicogênio para armazenamento. Em um estado de hipoglicemia, esse glicogênio pode, então, ser convertido de volta em glicose para combustível, onde até 70% da produção total de glicose hepática pode surgir por meio dessa rota. Situações em que o equilíbrio da homeostase da glicose é prejudicado, como diabetes ou síndrome metabólica, podem levar a distúrbios metabólicos que acarretam em danos e falências crônicas de órgãos, o que confirma a importância do entendimento da regulação molecular da homeostase da glicose (KARIM, ADAMS, LALOR, 2012).

Obesidade e Doença hepática gordurosa não alcoólica

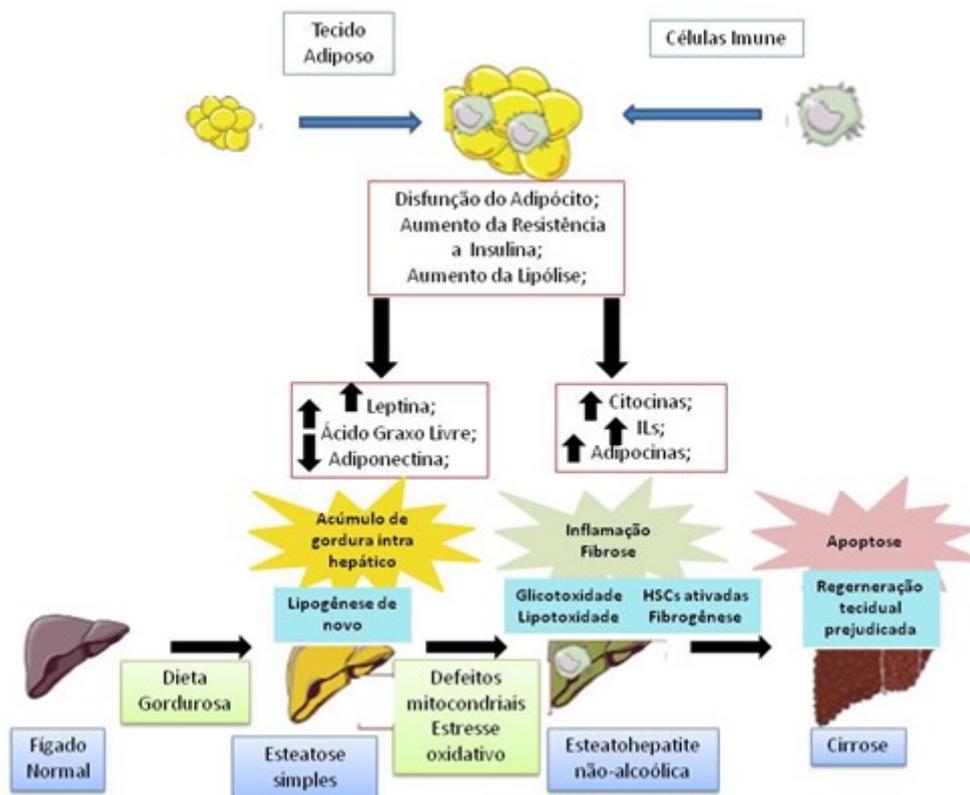
A epidemia da obesidade está diretamente relacionada ao aumento da prevalência e gravidade da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (POLYZOS, KOUNTOURAS, MANTZOROS.,2019). A DHGNA é uma doença hepática crônica caracterizada pelo excesso de gordura depositada no fígado, podendo variar de infiltração de gordura no fígado com inflamação mínima, conhecida como esteatose simples, para esteato-hepatite não alcoólica, marcada por infiltrado de células inflamatórias com balão de hepatócitos com ou sem fibrose e, para encerrar, a cirrose no estágio final (BRUNNER *et al.*, 2019; POLYZOS, KOUNTOURAS, MANTZOROS, 2019; WATT *et al.*, 2019).

Atualmente, a DHGNA se tornou uma das principais causas de doenças hepáticas crônicas no mundo industrializado, com uma prevalência global estimada de 25 a 30% em todo o mundo, chegando a 90% em pacientes obesos mórbidos (BRUNNER *et al.*, 2019; POLYZOS, KOUNTOURAS, MANTZOROS, 2019; WATT *et al.*, 2019). E, segundo o estudo de 2019 de Watt e colaboradores, as previsões apontam para um aumento de 21% nos próximos 15 anos, passando de 83,1 para 100,9 milhões de pessoas em todo mundo (WATT *et al.*, 2019). Além disso, como os estágios iniciais da DHGNA não apresentam sintomas óbvios, a prevalência de DHGNA induzida pela obesidade e a morbidade subsequente podem

ser consideradas uma das principais crises de saúde da próxima década (POLYZOS, KOUNTOURAS, MANTZOROS, 2019).

A fisiopatologia da DHGNA e sua progressão são induzidas por diversos fatores ambientais e genéticos, onde cada indivíduo diagnosticado com essa comorbidade foi afetado por uma combinação patogênica diferente ao longo da vida. Alguns desses fatores podem ser: polimorfismos genéticos específicos e modificações epigenéticas, como uma dieta rica em gordura e açúcar associada à falta de atividade física. Sob o efeito combinado de alguns desses fatores, que também se interpõem de maneira dinâmica, os lipídios são inicialmente acumulados nos hepatócitos que levam à esteatose simples. Se a esteatose não for gerenciada dentro de um determinado tempo, o fígado é infiltrado por células imunológicas, adicionando-se um processo inflamatório, uma condição caracterizada como esteatohepatite não-alcoólica. Novamente, se a inflamação não for gerenciada em tempo hábil, a doença é complicada por fibrose hepática (POLYZOS, KOUNTOURAS, MANTZOROS., 2019).

Figura 4 – Fisiopatologia da DHGNA baseada na obesidade



Legenda: HSCs – Células estreladas hepáticas - ILs–Interleucinas;

Nota: Fisiopatologia da DHGNA baseada na obesidade;

Fonte: Adaptado: POLYZOS, A,S; KOUNTOURAS, J; MANTZOROS, S, C, 2019.

DHGNA e resistência a insulina

A esteatose hepática está epidemiologicamente relacionada com a resistência à insulina. Foi possível observar através de pequenos estudos transversais que utilizaram medida padrão da ação da insulina, que a esteatose hepática independente de adiposidade, está associada à ação prejudicada da insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em indivíduos magros e não-diabéticos com obesidade. Além disso, aumentos relativamente pequenos na gordura hepática estão associados à resistência à insulina hepática, e muscular esquelética. A esteatose hepática precede o desenvolvimento de acúmulo de lipídios no músculo esquelético, inflamação com a presença de macrófagos e hiperglicemia e hiperinsulinemia em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura. O somatório dessas observações corrobora com a teoria de que alterações que ocorrem em um fígado com elevada quantidade de gotículas lipídicas modificam as funções parácrinas e endócrinas causando resistência à insulina nos principais tecidos glicorregulatórios. Dessa forma, em discordância da ideia extensamente difundida de que a esteatose hepática é uma condição benigna, agora está claro que a esteatose está intimamente ligada à ação prejudicada da insulina e ao DM2, e é um preditor precoce de distúrbios metabólicos (WATT *et al.*, 2019).

Porém, também é importante destacar que a resistência à insulina também antecede o desenvolvimento de DHGNA. Isso ocorre principalmente por conta da capacidade prejudicada da insulina de suprimir a lipólise do tecido adiposo, levando ao aumento da liberação de ácidos graxos livres no fígado e ao aumento da lipogênese *de novo* resultante da estimulação de enzimas lipogênicas por meio da proteína 1c de ligação ao receptor do esterol (SREBP-1c), mesmo em estado resistente à insulina (WATT *et al.*, 2019). A resistência à insulina no fígado contribui muito para o desenvolvimento de DM2. A diminuição da sensibilidade à insulina hepática leva à hiperglicemia pós-prandial e ao aumento da produção hepática de glicose, o que agrava um quadro já deletério de hiperglicemia e hiperinsulinemia crônica em diabéticos. Além de afetar os níveis de glicose, a resistência à insulina hepática também pode levar à síntese lipídica desregulada, o que pode levar à esteatose hepática e maior resistência à insulina sistêmica (TANIGUCHI, UEKI, KAHN, 2016).

A DHGNA e a esteatose não-alcoolica são condições patológicas reversíveis, porém ainda são necessários o desenvolvimento de terapias para combatê-las. A chave para a terapia é a perda de peso, uma vez que, a redução de 5% do IMC está associada a uma redução

relativa de 25% da gordura hepática medida por ressonância magnética (BRUNNER *et al.*, 2019).

Adoçantes

A preferência pelo sabor doce é inerente ao ser humano, que sempre utilizou uma forma de adoçar a sua alimentação. Relatos nas culturas milenares chinesa e grega mostram que o primeiro adoçante a ser utilizado foi o mel, que depois foi substituído pela sacarose, originada da cana-de-açúcar, utilizada primeiramente na Índia, por volta de 2000 anos atrás (BARREIROS, 2012).

A prática do uso de adoçantes não-nutritivos começou durante o período entre guerras, devido a falta do açúcar. Porém, a partir de 1950, o motivo do consumo passou a ser visando a redução da ingestão de calorias (BARREIROS, 2012). Adoçantes artificiais ou edulcorantes intensos são substitutos do açúcar, usados como alternativa no lugar do tradicional açúcar de mesa, sendo muitas vezes mais doces que o açúcar natural (QURRAT-UL-AIN e KHAN, 2015). De forma geral, as substâncias de sabor adocicado podem ser divididas em dois grupos principais: o grupo dos açúcares (sacarose) e outros hidratos de carbono nutritivos, como glicose e frutose, e o grupo que engloba os adoçantes, que são alternativas isentas de carboidratos, por exemplo os polióis e adoçantes intensos (FAUSTO *et al.*, 2013).

Inicialmente, os adoçantes foram pesquisados e produzidos com o objetivo de atender indivíduos portadores de diabetes, porém com o aumento do interesse das pessoas em uma vida mais saudável, preocupadas com a aparência física e em manter a boa forma, as vendas desse tipo de produto aumentaram em todo mundo tornando-se um mercado bastante lucrativo em expansão (INMETRO, 2006).

Os edulcorantes podem ser classificados como naturais, artificiais, calóricos ou não-calóricos. As substâncias naturais são normalmente compostas de extratos vegetais ou de frutas, já os adoçantes artificiais são produzidos quimicamente em laboratórios. A classificação dos calóricos ou não-calóricos é dada de acordo com o valor nutricional, sendo os calóricos aqueles que apresentam calorias, fornecendo energia e textura aos alimentos e os não-calóricos, os que não possuem calorias (BRUGNERA *et al.*, 2012). No grupo dos adoçantes calóricos que também podem ser chamados de adoçantes nutritivos, encontramos a sacarose, frutose, mel e xarope de milho. Fazendo parte do grupo dos adoçantes não-calóricos,

também chamados de adoçantes intensos, adoçantes de baixa caloria ou alternativos, estão inclusos: aspartame, neotame, sacarina, potássio de acesulfame e sucralose (BARREIROS, 2012).

No Brasil, aproximadamente 13% da população faz uso dos adoçantes artificiais de forma individual ou em combinação com açúcar, sendo mais utilizado por idosos, mulheres indivíduos com sobrepeso, entre os residentes das regiões Nordeste e Sudeste, pertencentes à classe econômica A/B (ARRAIS *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2018). É importante ressaltar que o consumo por idosos brasileiros foi 10 vezes maior quando comparado com adolescentes e triplicou quando comparado com adultos (MONTEIRO *et al.*, 2018).

Segundo Arrais e colaboradores (2019), o consumo elevado entre as mulheres, está associado a uma maior preocupação com o controle de peso e com o cuidado da saúde, além da preocupação estética socialmente construída. Entre os idosos, o envelhecimento e o ganho de peso relacionado às doenças crônicas pode ser incentivo para o uso de adoçantes. Com relação às maiores prevalências de uso encontradas nas regiões Nordeste e Sudeste, dados do sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel, 2017) demonstram que as maiores prevalências de hipertensão arterial e DM foram registradas nas capitais dos estados dessas regiões. Apesar de esses resultados não serem representativos das regiões como um todo, demonstram a possível influência que essas doenças crônicas podem exercer nesse consumo (ARRAIS *et al.*, 2019).

Até a década de 1980, no Brasil, os produtos dietéticos eram regimentados como drogas, sendo vendidos em farmácias e consumidos somente por pessoas que precisavam controlar a ingestão de sacarose, como os portadores de DM e outras doenças. 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: sacarina sódica, ciclamato de sódio, aspartame, acesulfame de potássio, sucralose, esteviosídeo, neotame e taumatina (ZANINI, ARAÚJO e MARTÍNEZ-MESA, 2011).

O consumo de adoçantes não-calóricos nas últimas décadas teve um crescimento considerável. Entre crianças dados apontam para um crescimento de 200% e em adultos, do período de 1999-2000 para 2009-2012, houve um aumento de 54% (KIM, KEOGH, CLIFTON, 2019). Já a busca por alimentos que contêm baixo teor calórico é especialmente alta em países da América do Norte, onde em 2009, o consumo de ANC nos EUA atingiu as marcas de 15% e 26% do consumo total global de ANC por volume e equivalência de sacarose, respectivamente (SYLVETSKY e ROTHER, 2016). O mercado global dos ANCs

projetou um crescimento de anual de 5,1% entre 2008 e 2015 e com um crescimento maior previsto para América Latina e China (KIM, KEOGH, CLIFTON, 2019; SYLVETSKY e ROTHER, 2016). Esses dados em crescimento são justificados por diretrizes da OMS sobre a ingestão de açúcar, maior disponibilidade e baixo preço de produtos que contém ANC (KIM, KEOGH, CLIFTON, 2019).

Apesar de serem consumidos em todo mundo, a estimativa de prevalência do consumo dos ANC nos EUA e os resultados do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) mostraram que o consumo dos ANC aumentou de aproximadamente 26,9% em 1999–2000 para 32,0% em 2007–2008 entre adultos nos Estados Unidos e de 8,7% em 1999–2000 para 15,0% em 2007–2008 entre crianças. Outros resultados, também usando dados do NHANES, detalharam que de 2003 a 2010, o percentual da população que consumiu bebidas contendo ANC aumentou de 21,1% em 2003-2004 para 24,9% em 2009-2010 entre adultos e de 7,8% para 18,9% entre as crianças neste mesmo período de tempo (SYLVETSKY e ROTHER, 2016).

Na Europa e EUA, o órgão responsável pelo controle do uso dos adoçantes é a *Food and Drug Administration* (FDA), que liberou o uso de seis adoçantes somente depois grandes estudos científicos para confirmar a segurança dos mesmos, sendo eles: acessulfame-potássio, aspartame, neotame, sacarina, sucralose e o adventame, recentemente aprovado, que se trata de um derivado do aspartame (QURRAT-UL-AIN e KHAN, 2015).

A OMS, por meio da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, estabeleceu como meta a redução no consumo de bebidas açucaradas, devido a evidência da sua relação com doenças crônicas não-transmissíveis, incluindo DM2 (BARRETO, 2005). Porém, visto que, atualmente, a população apresenta um perfil nutricional de sobrepeso ou obesidade, o uso de edulcorantes se torna cada vez mais presente, visando reduzir o consumo energético para perda de peso e controle glicêmico, auxiliando no tratamento da obesidade e DM, já 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 e FRANCO, 2010).

***Stévia Rebaudiana* Bertoni**

Nos últimos anos a procura por ANC naturais e mais saudáveis aumentou em todo o mundo, e como consequência, algumas plantas, com poder edulcorante, estão sendo amplamente estudadas (BELLOIR, NEIERS, BRIAND, 2017; FIGLEWICZ *et al.*, 2009; SEKI, TAMURA, MURANAKA, 2017). O adoçante natural produzido a partir da stévia tem despertado o interesse econômico e científico por possuir diversas características interessantes, como elevado poder edulcorante, propriedades terapêuticas, alegação natural e relação custo-benefício positiva (FAUSTO *et al.*, 2013; GARDANA e SIMONETTI, 2018).

Stevia Rebaudiana Bertoni, comumente conhecida como stévia, folha de mel e erva doce do Paraguai é uma planta do tipo arbusto de ervas, sendo nativa do Paraguai e do Brasil (FERRAZZANO *et al.*, 2016; PARK e CHA, 2010; SHARMA *et al.*, 2015). As suas folhas contêm diversas substâncias específicas, dentre elas, o rebaudiosídeo A e o esteviosídeo, principais glicosídeos de esteviol derivados desta planta, que conferem um poder edulcorante altamente elevado, chegando a ser 200 a 300 vezes mais doce que o açúcar de mesa, além de não conter nenhuma caloria e, sendo atualmente considerada segura para consumo pela FDA (AGUERO *et al.*, 2015).

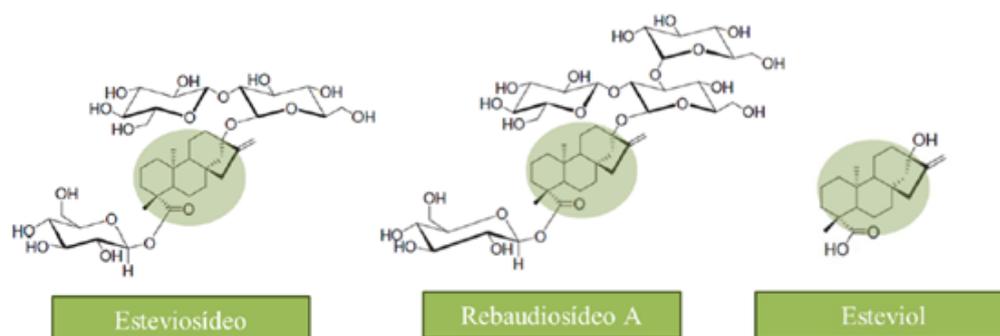
Figura 5– Imagem e ilustração da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni



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

As folhas da Stevia e os extratos feitos a partir dela, contêm uma mistura de nove terpenóides (terpenos - hidrocarbonetos isoméricos $C_{15}H_{26}$ - 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, 2003; LEMUS-MONDACA, 2012; LIMA FILHO, VALOIS, LUCAS, 2004; PARK e CHA, 2010; RIZWAN et al., 2018; SEHAR et al., 2008). 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 stévia disponível para comercialização possui em sua composição apenas os glicosídeos de esteviol, uma vez que os fitoquímicos são removidos da planta no processo de purificação do adoçante (CARRERA-LANESTOSA et al., 2017; GEUNS, 2003; MAGNUSON et al., 2018; PACKER, 2006).

Figura 6 - Estruturas químicas de glicosídeos de esteviol: esteviosídeo, rebaudiosídeo A e seu núcleo 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.

Em um estudo, Erika Ramos-Tovar e colaboradores (2018) demonstraram propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias das folhas de stévia em danos hepáticos agudos e crônicos induzidos pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos, melhorando a defesa antioxidante mediada por Nrf2 e bloqueando o fator pró-inflamatório NF-Kb (RAMOS-TOVAR *et al.*, 2018). A stévia também mostrou ser um protetor contra o dano oxidativo induzido por CCl₄ em células de carcinoma hepatocelular hepático humano (HepG2). Além disso, o Rebaudiosídeo A apresentou atividade antioxidante na redução de EROS e níveis de malondialdeído, aumentando os níveis de glutatona e as atividades de superóxido dismutase e catalase, sugerindo um potencial efeito hepatoprotetor nas células HepG2. Adicionalmente, o Rebaudiosídeo A inibiu significativamente a morte celular induzida por CCl₄ (WANG *et al.*, 2018). Camundongos C57BL/6J hiperalimentados com uma dieta rica em gordura e que receberam o extrato da folha da stévia obtiveram redução nas concentrações séricas e hepática de triglicerídeos e colesterol, além de redução do ganho de peso, sugerindo efeito benéfico quando comparados com o grupo que recebeu sacarose (PARK e CHA, 2010).

A stévia vem sendo utilizada em todo o mundo como uma planta adoçante natural que possui grande importância medicinal e comercial, podendo ser utilizada como uma alternativa para o açúcar nos alimentos, como ingrediente para produtos farmacêuticos e, ainda, como agentes solubilizantes. Dentro do cenário comercial, seu uso pode ser encontrado em alimentos lácteos, como sorvete e iogurte, na fabricação de cereais matinais e barras de cereais. No mercado da saúde, a stévia também é considerada de grande importância, por possuir um potencial terapêutico contra diversas doenças como DM, hipertensão, inflamação e obesidade. Nos últimos 20 anos, ganhou maior interesse industrial e científico, demonstrando uma alternativa nutricional adequada aos adoçantes artificiais e sacarose (AHMAD *et al.*, 2020).

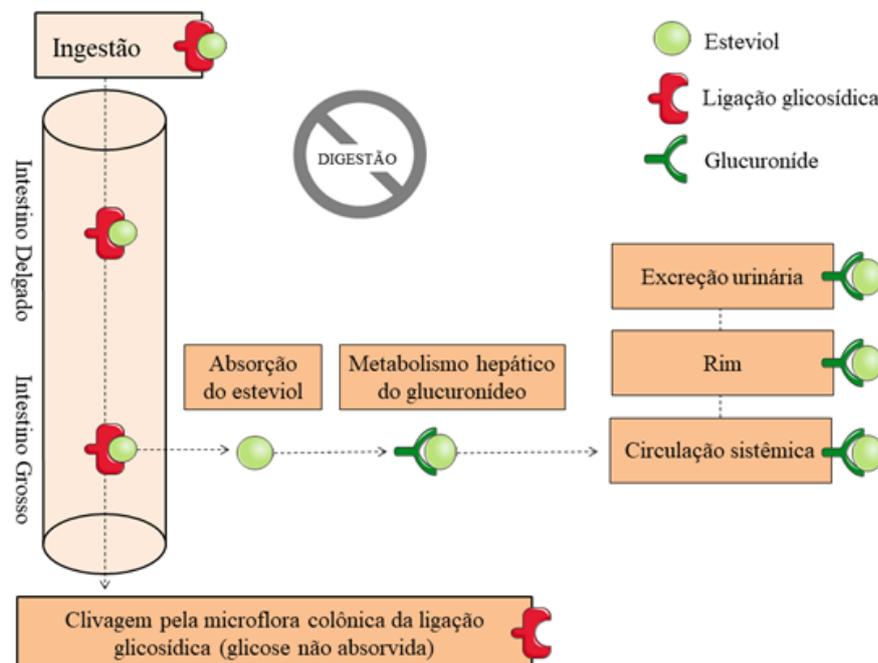
Atualmente, mais de 100 países autorizam a utilização da stévia, como adoçante para alimentos, através de seus respectivos órgãos governamentais, incluindo Coréia do Sul, Japão, Argentina, Paraguai, Brasil, China, Rússia, Indonésia, México, Senegal, Tailândia e Israel (GSI, 2012).

Absorção, metabolismo e excreção dos glicosídeos de esteviol

Todos os glicosídeos de esteviol apresentam um composto químico em comum, o esteviol. Este é o produto final do metabolismo de glicosídeos realizado pelas bactérias da microbiota intestinal no cólon, que em seguida, 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 na porção superior do trato gastrointestinal não são eficientes para hidrolisar os glicosídeos de esteviol (MAGNUSON *et al.*, 2018; SAMUEL *et al.*, 2018). Hutapea e colaboradores, realizaram um estudo em 1997 constatando que o esteviosídeo não foi metabolizado quando incubado com amilase salivar e pancreática, pepsina, secreção gástrica de ratos, camundongos e hamsters e foram obtidos resultados similares com rebaudiosídeo A e D (NIKIFOROV *et al.*, 2013; SAMUEL *et al.*, 2018).

Figura 7 – 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.

Alguns estudos demonstram que o esteviosídeo e o rebaudiosídeo A podem ser convertidos em esteviol por bactérias cecais, colônicas ou fecais, *in vitro* (GARDANA *et al.*, 2003; HUTAPEA *et al.*, 1997; KOYAMA *et al.*, 2003; WINGARD *et al.*, 1980). Outros estudos obtiveram o mesmo resultado quando rebaudiosídeos B, D, E e M foram expostos às bactérias fecais humanas (NIKIFOROV *et al.*, 2013; PURKAYASTHA *et al.*, 2014; PURKAYASTHA *et al.*, 2015). Gardana e colaboradores, em 2003, foram os precursores ao descrever que as espécies de *Bacteroides* eram as únicas bactérias capazes de realizar o metabolismo dos glicosídeos de esteviol, transformando tal composto através de hidrólise em esteviol. O produto final desta degradação é completamente resistente à ação bacteriana.

Estudos *in vivo* foram realizados com o objetivo de esclarecer 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, apontando a presença de metabólitos na circulação entero-hepática (KOYAMA *et al.*, 2003; NAKAYAMA *et al.*, 1986). Por via oral, foi administrado em ratos, glicosídeo de esteviol, resultando em rápida absorção de esteviol no plasma portal, que permaneceu presente por horas (KOYAMA *et al.*, 2003). Os resultados corroboram com dados da literatura que apontam que os glicosídeos de esteviol são metabolizados paulatinamente 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; SAMUEL *et al.*, 2018).

1 JUSTIFICATIVA

Trabalhos do nosso grupo e de diversos pesquisadores demonstram que a hipernutrição no período pós-natal (lactação) é um modelo experimental bem estabelecido, capaz de alterar o balanço energético, levando ao desenvolvimento da obesidade, alterações metabólicas e morfológicas em diversos tecidos periféricos, como coração, músculo esquelético, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, pâncreas e fígado, além de hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistência à insulina, responsividade da glicose hepática reduzida persistentemente, aumento do estresse oxidativo em alguns tecidos, como o fígado, aumentando também o seu peso. Tais modificações persistem até a idade adulta.

Logo, com o aumento da prevalência da obesidade no mundo, a perda e o controle do peso corporal tornaram-se um fator importante para a saúde, causando o aumento da procura por adoçantes, uma vez que tais produtos promovem sabor doce sem acréscimo de calorias. Porém, dados da literatura apontam que os adoçantes não-calóricos não são compostos inertes, sendo seu consumo associado a diversos efeitos relacionados a obesidade, como aumento da ingestão alimentar, ganho de peso, intolerância à glicose, aumento da secreção de insulina, hiperfagia, alterações na adipogênese e lipólise e alterações da homeostase glicêmica, que podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade e suas complicações crônicas.

Dessa forma, pouquíssimos estudos apresentam a ação dos adoçantes sobre as vias moleculares referentes ao metabolismo energético e função mitocondrial em tecidos periféricos, como o fígado, importante regulador da homeostase energética e de glicose, demonstrando a necessidade de estudos que visem elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos pelos quais adoçantes, como a stévia, podem regular a homeostase de glicose e o metabolismo energético hepático

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre a resposta endócrino-metabólica e a função mitocondrial hepática de camundongos adultos obesos submetidos à hiperalimentação na lactação.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar:

- a) o consumo alimentar e hídrico do desmame (21 dias) até a idade adulta (180 dias);
- b) a composição corporal antes (90 dias) e após o consumo de stévia (180 dias);
- c) a insulina plasmática aos 180 dias de vida;
- d) a tolerância à glicose após o consumo da stévia (180 dias);
- e) a função mitocondrial hepática, após o consumo de stévia (180 dias), por respirometria de alta resolução;
- f) o conteúdo e expressão gênica de proteínas que participam do metabolismo energético hepático e sinalização de insulina (GLUT2, IRS-1 e PI3K) após o consumo da stévia (180 dias);
- g) marcadores do dano oxidativo e a atividade enzimática antioxidante no fígado após o consumo da stévia (180 dias);

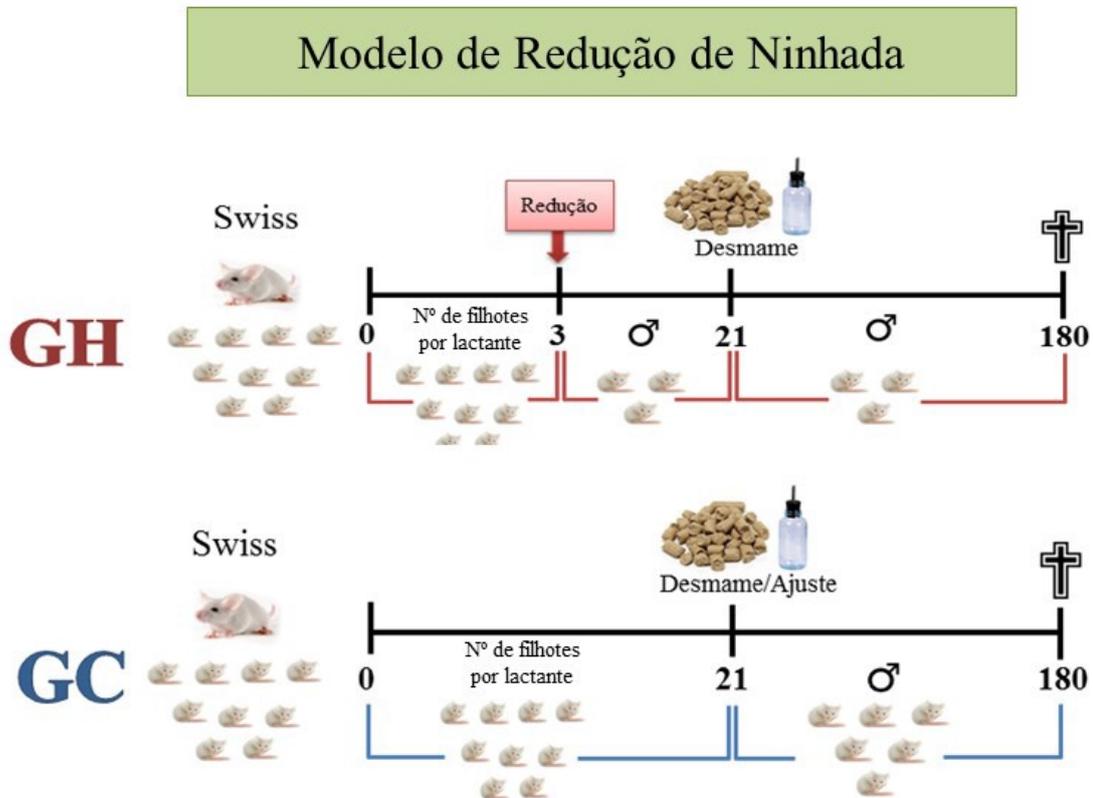
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e modelo experimental

Para o desenvolvimento do modelo experimental, utilizamos o método de hipernutrição durante a lactação através de redução de ninhada (PLAGEMANN et al.,1992), já estabelecido em nosso laboratório. Camundongos fêmeas da raça *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.
- 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 à 3 filhotes machos por gaiola, estes permaneceram com a lactante até o 21º dia (final da lactação ou desmame) (figura 9).

Figura 8 - Esquema do modelo de redução de ninhada e formação dos grupos hiperalimentado e controle até 180 dias de vida



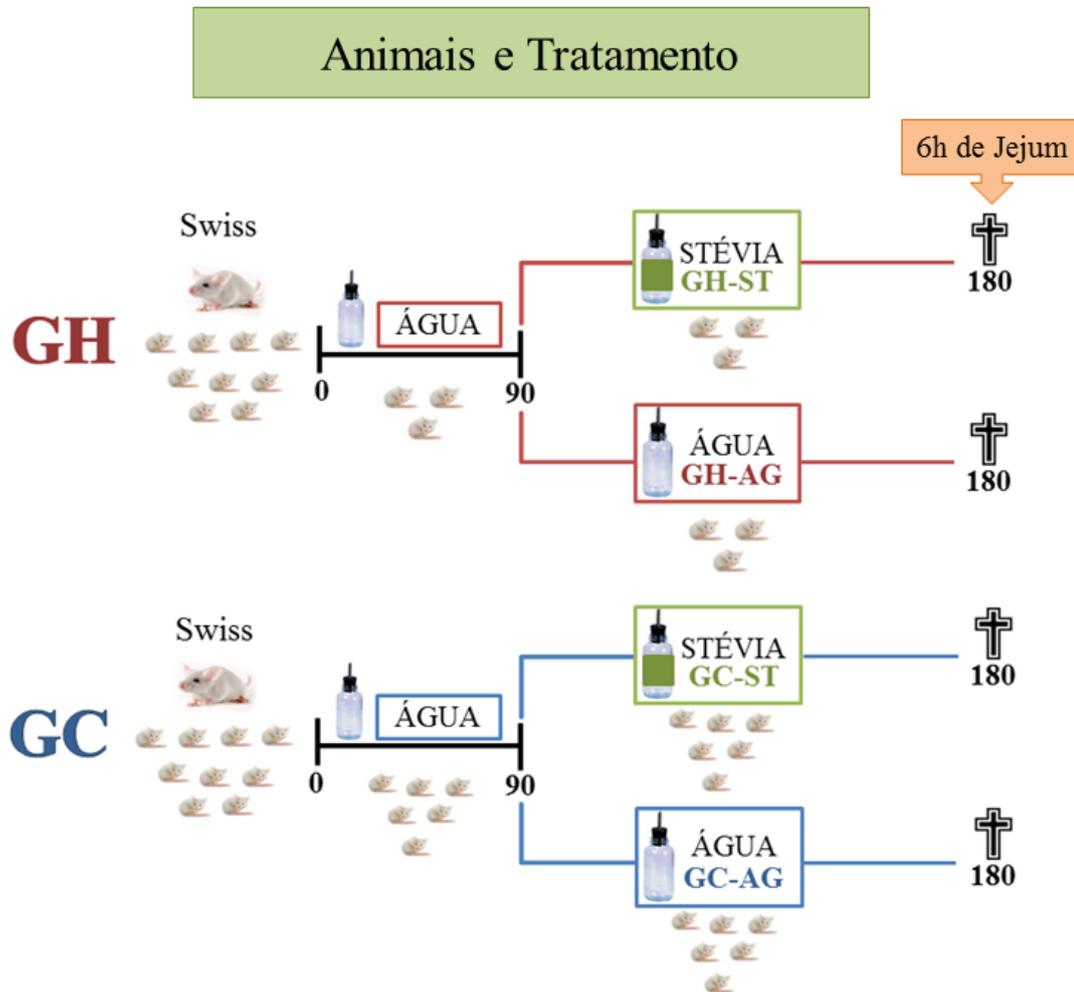
Legenda: GC – grupo controle; GH – grupo hiperalimentado; 0 – dia do nascimento; 3 – terceiro dia após o nascimento; 21 – vinte e um dias após o nascimento; 180 – dia da eutanásia; ♂ machos;

Nota: Modelo de redução de ninhada;

Fonte: O Autor, 2021

Aos 90 dias de vida, os animais do grupo controle e hiperalimentado foram divididos em dois subgrupos, grupo controle e hiperalimentado que receberam água contendo 0,3% de stévia (GC-ST e GH-ST) ou grupo controle e hiperalimentado que receberam água pura (GC-AG e GH-AG) (figura 10). Os animais receberam dieta comercial padrão da Nuvilab® e água pura ou com stévia *ad libitum* por 12 semanas (dos 90 dias de vida até os 180 dias). Foram mantidos em condições padrão de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade controladas ($60 \pm 10\%$), o ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro/escuro (06:00h às 18:00h) e o ciclo de exaustão do ar (15 min/hora).

Figura 9 - 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: O Autor, 2021.

Os camundongos foram eutanasiados em condições de jejum (6 horas). Para a realização de todos os experimentos foram utilizados 3 animais machos de cada ninhada hiperalimentada e 6 animais machos de cada ninhada controle, totalizando um n de 9-10 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|007|2019).

3.2 Composição e obtenção do adoçante natural Stévia

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

O produto fornecido tem em sua descrição realizada pelo fabricante, 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 (C₃₈H₆₀O₁₈) e o rebaudiosídeo A (C₄₄H₇₀O₂₃) presentes em maiores quantidades. Possui mais de 99% de pureza (ANEXO).

3.3 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, 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:

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

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.

3.4 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.

3.5 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.

3.6 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 fígado 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.

3.7 Dosagem do hormônio Insulina

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 insulina que foram avaliadas por método colorimétrico utilizando kits comerciais específicos (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.8 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. O fígado foi retirado e imediatamente pesado para quantificação do seu peso total. Logo depois, o tecido foi dividido em 5 porções aleatórias. Uma primeira porção foi pesada e direcionada para a técnica de respirometria de alta resolução, as demais também foram pesadas e congeladas para posteriores técnicas, como western blotting e estresse oxidativo. Todos os tecidos foram pesados em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N®).

3.9 Comprimento naso-anal e comprimento da tíbia

Mensurou-se o comprimento naso-anal (CNA) 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 foi aferido com auxílio de paquímetro.

3. 10 Análise das proteínas através de western blotting

3.10.1 Lise do fígado

O fígado dos animais foi retirado, pesado e congelado 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.

3.10.2 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-

PI3K (sc-423), anti-IRS1 (sc-559), anti-GLUT4 (sc-53566) e anti-GLUT2 (sc-9117) 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).

3.11 Análise da função mitocondrial por Respirimetria de Alta Resolução

3.11.1 Obtenção do fígado permeabilizado

O fígado foi retirado e rapidamente imerso em solução de relaxamento e preservação BIOPS (em mM: CaK₂EGTA 2.77, K₂EGTA 7.23, MgCl₂ 6.56, ditiotritol 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. Aproximadamente 5 a 7 mg de peso úmido foram retirados. Usando pinças microcirúrgicas, cuidadosamente, o tecido foi dissecado para retirada de vasos sanguíneos remanescentes. Após a dissecação, o fígado 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.

3.11.2 Respirometria de alta resolução

O fígado 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. O estudo foi realizado utilizando os seguintes substratos (em mM): Palmitoil-L-carnitina, Malato e ADP, para avaliar a oxidação relacionada à ácidos graxos. Na oxidação relacionada a carboidratos foram utilizados os seguintes substratos: Glutamato, Malato, Piruvato, Succinato e ADP. Os parâmetros respiratórios para a análise dos substratos relacionados a oxidação de ácidos graxos foram definidos como: Estado 1 - taxa respiratória basal, sem adição dos substratos; Estado 2 - antes da adição de adenosina difosfato (ADP); Estado 3 - taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM); e Estado 4 - taxa respiratória máxima após adição do desacoplador Oligomicina. Para os substratos relacionados à oxidação de carboidratos foram definidos os seguintes parâmetros: Estado 1 – taxa respiratória basal, sem adição de substratos; Estado 2- após a adição de glutamato, malato e piruvato; Estado 3 – após adição de ADP (5mM); Estado 3 máximo – taxa respiratória máxima estimulada por succinato (complexo I e II); Estado 4 – taxa respiratória máxima após adição do desacoplador oligomicina. 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 respiratório (RCR) foi calculada através da razão entre a respiração desacoplada máxima por oligomicina (estado 4 e 5) e o estado 3 e 4 máximo (KRAUNS et al., 2010).

3.12 Análise de estresse oxidativo hepático

O fígado foi processado manualmente com tampão KPE. O tampão KPE foi preparado utilizando 1,088g de KH₂PO₄ e 7,14g de K₂HPO₄ em 500ml de água destilada, posteriormente o pH foi aferido e ajustado para 7,5, e então, 0,93g de EDTA adicionado a solução.

O processamento do tecido hepático congelado foi iniciado com o descongelamento e posterior pesagem para o cálculo do volume necessário de tampão para cada amostra a ser lisada. O tecido foi lisado manualmente, adicionando-se o tampão KPE na proporção 1(mg):20 (µL) em cada amostra para a lise completa do tecido. Em seguida, os lisados foram centrifugados por 10min a 4000rpm em 4°C e após este processo o sobrenadante foi aliquotado.

O Fígado foi aliquotado para as análises de TBAR (duplicata de 200 μ L), e para medida de catalase (duplicata de 100 μ L). O resto das amostras foi armazenado com temperatura de -80°C caso haja necessidade de posteriores análises.

A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A) com as amostras diluídas na proporção 1:8.

3.12.1 Peroxidação lipídica

A partir da alíquota de cada amostra para TBAR foram adicionados 400 μ L (fígado) de ácido tricloroacético 10% (TCA 10%) e, os tubos de eppendorf centrifugados por 10min a 7000rpm a 4°C . Posteriormente, 300 μ L do sobrenadante de cada amostra mais 300 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,67% foi adicionado a tubos de ensaio nos quais se tinham 600 μ L de volume final. Todos os tubos de ensaio foram colocados em banho maria por 30min a 95°C juntamente com os tubos de ensaio referentes a curva padrão para TBAR. Após o banho maria, os tubos foram deixados 15min em temperatura ambiente para esfriar. Para a leitura das concentrações, foi montada uma placa de 96 poços contendo 200 μ L em cada poço referente a cada tubo em duplicata obtendo-se assim quadruplicata de cada amostra. A leitura foi realizada a 532nm.

A curva padrão foi preparada com a solução tetrametoxipropano (TMP) nas concentrações 0, 0.02, 0.1, 0.5 e 1.0 nmol. O preparo dos reagentes da curva foi realizado da seguinte maneira: solução A (10 μ L TMP + 500 μ L H₂O), solução B (100 μ L A + 4900 μ L de H₂O) e solução C (41 μ L B + 5000 μ L de H₂O). Para as diferentes concentrações da curva foram adicionados volumes diferentes da solução C diluídos em água destilada.

3.12.2 Medida da catalase

Foram utilizados 20 μ L do lisado do fígado em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de soro fisiológico e peróxido de hidrogênio (0.32%). A concentração de H₂O₂ foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (240

nm; Ultrospec 2100 Pro, AmershamBiosciences, Buckinghamshire, UK) em intervalos de trinta segundos (Aebi, 1984).

3.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro padrão da média de 10 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).

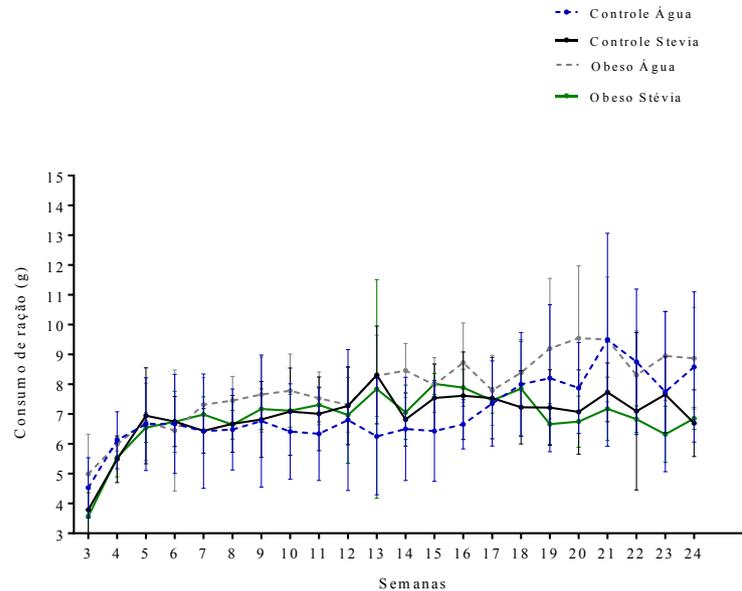
O efeito da hiperalimentação durante a lactação e o consumo de Stevia sobre as variáveis estudadas foram analisados por *Two way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações, através do software *Graph Pad Prisma* 6.00 (San Diego, CA, USA), considerando nível de significância de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da ingestão alimentar semanal dos animais controle e hiperalimentados

Após realizarmos o desmame, aos 21 dias de vida, avaliamos o consumo alimentar dos animais até que os mesmos completassem 180 dias. Observamos uma diferença significativa entre os grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST), onde o grupo que recebeu água consumiu uma quantidade de ração maior nas semanas 19 (28%) (P<0,05), 20 (29%) (P<0,01), 21 (24%) (P<0,05) e 23 (29%) (P<0,05), quando comparado ao grupo que recebeu o adoçante.

Figura 10 - Avaliação da ingestão alimentar semanal de ração dos camundongos controles e hiperalimentados a partir do desmame até os 180 dias de vida



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

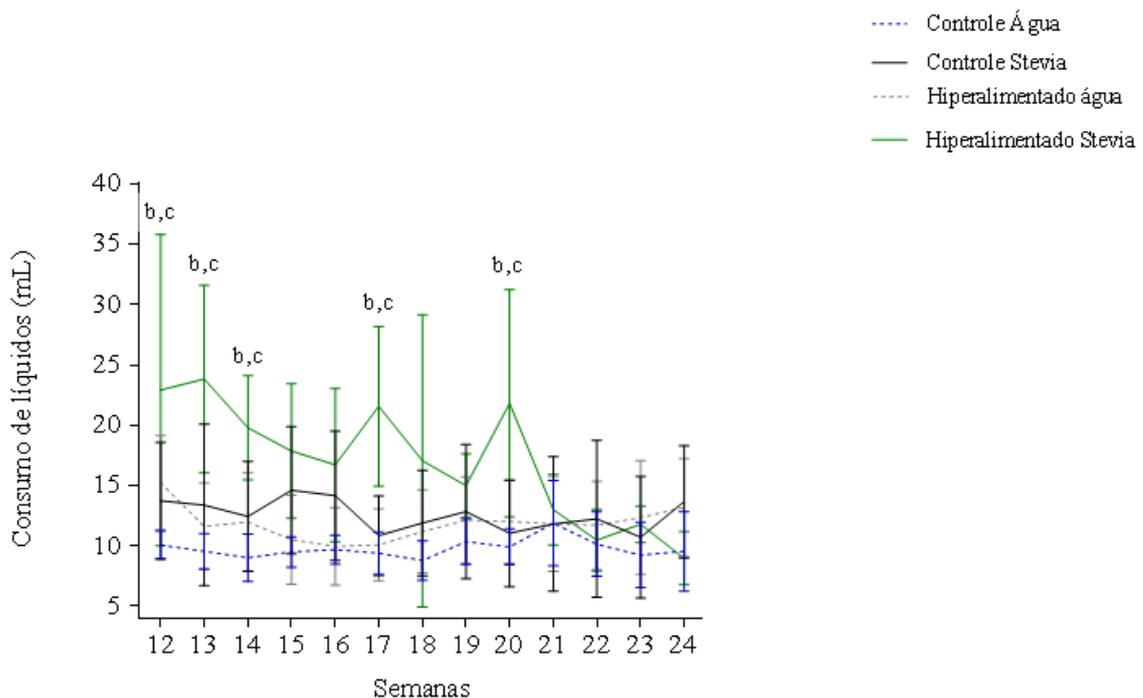
Nota: Os resultados são expressos como Média ± EPM, n = 6 animais por grupo. O gráfico representa a quantidade de ração (g) consumida;

Fonte: O autor, 2021

4.2 Avaliação da ingestão de líquidos semanal dos animais controle e hiperalimentado

A partir dos 90 dias de vida começamos a avaliar a ingestão de líquidos dos animais de todos os grupos através da técnica de resto-ingesta. Conseguimos observar que os animais hiperalimentados que receberam stévia (GH-ST) consumiram uma quantidade maior de líquidos quando comparado com o seu respectivo controle (GC-ST) e quando comparado ao GH-AG, nas semanas 12 ($P<0,01$ e $P<0,05$) (40% e 33%), 13 ($P<0,001$ e $P<0,001$) (44% e 51%), 14 ($P<0,05$ e $P<0,05$) (37% e 39%), 17 ($P<0,001$ e $P<0,001$) (50% e 53%) e 20 ($P<0,001$ e $P<0,01$) (49% e 45%).

Figura 11 - Avaliação da ingestão de líquidos semanal de camundongos controles e hiperalimentados dos 90 até os 180 dias de vida



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

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 5-9 animais por grupo. O gráfico representa a ingestão de líquidos ingerida (mL);

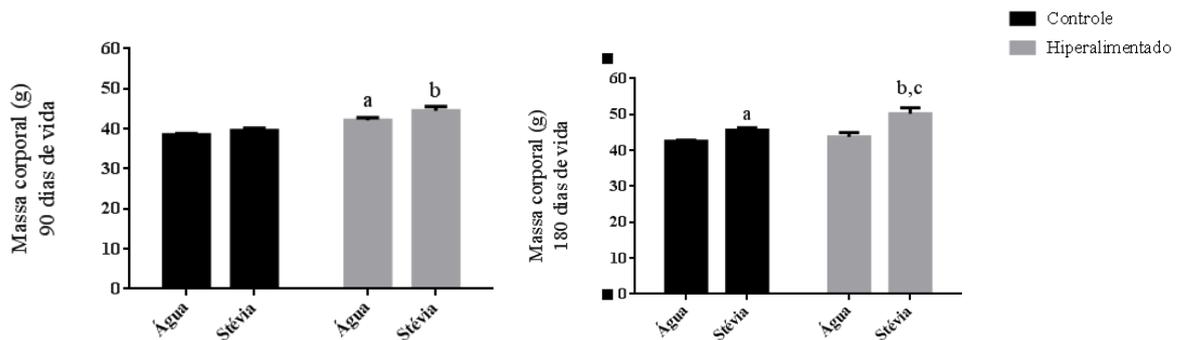
Fonte: O autor, 2021.

4.3 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 uma diferença significativa entre os grupos que receberam somente água, onde o grupo hiperalimentado água (GH-AG) apresentou uma quantidade de massa corporal maior ($P < 0,05$) (8%) em relação ao grupo controle água (GC-AG). E ainda aos 90 dias o grupo hiperalimentado stévia (GH-ST) também apresentou uma quantidade maior de massa corporal ($P < 0,0001$) (11%) quando comparado ao grupo controle stévia (GC-ST).

Aos 180 dias o GC-ST mostrou ter uma quantidade de massa corporal maior ($P < 0,05$) (6%) em comparação ao GC-AG. Ainda foi possível observar uma diferença entre os grupos hiperalimentados, onde o GH-ST apresentou uma maior quantidade de massa corporal ($P < 0,01$) (13%) em relação ao GH-AG e por fim, entre os grupos que receberam o tratamento com stévia, o GH-ST obteve uma maior quantidade de massa corporal ($P < 0,01$) (9%) em relação ao GC-ST.

Figura 12 - Massa corporal dos grupos controles e hiperalimentados aos 90 dias e aos 180 dias de vida



Legenda: g - gramas; **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 = 9-46 animais por grupo. A figura representa a massa corporal (g) dos animais controles e hiperalimentados, aos 90 e aos 180 dias de vida;

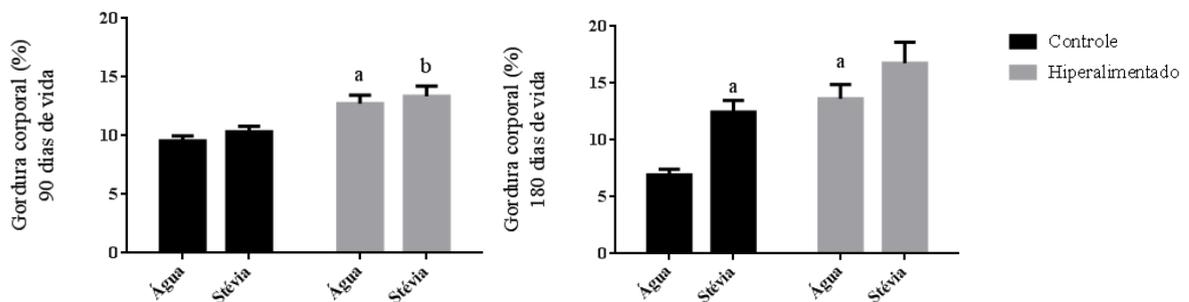
Fonte: O autor, 2021.

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

Aos 90 dias de vida, foi possível observar entre os animais que receberam água, que o GH-AG mostrou ter uma maior porcentagem de gordura corporal ($P < 0,05$) (25%) quando comparado ao GC-AG. Também observamos, nesse mesmo período, que entre os animais tratados com stévia, o GH-ST apresentou maior porcentagem de gordura ($P < 0,01$) (22%) em relação ao GC-ST.

Aos 180 dias, também foi possível observar diferenças significativas entre os grupos água, onde o GH-AG mostrou uma porcentagem maior de gordura ($P < 0,05$) (49%) em relação ao GC-AG e o GC-ST também apresentou uma porcentagem maior de gordura ($P < 0,01$) (44%) quando comparado ao GC-AG.

Figura 13 - Porcentagem de gordura corporal dos grupos controle e hiperalimentado aos 90 dias e aos 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, $n = 8-41$ animais por grupo. A figura representa a quantidade de gordura corporal (%) dos animais controles e hiperalimentados, aos 90 e aos 180 dias de vida;

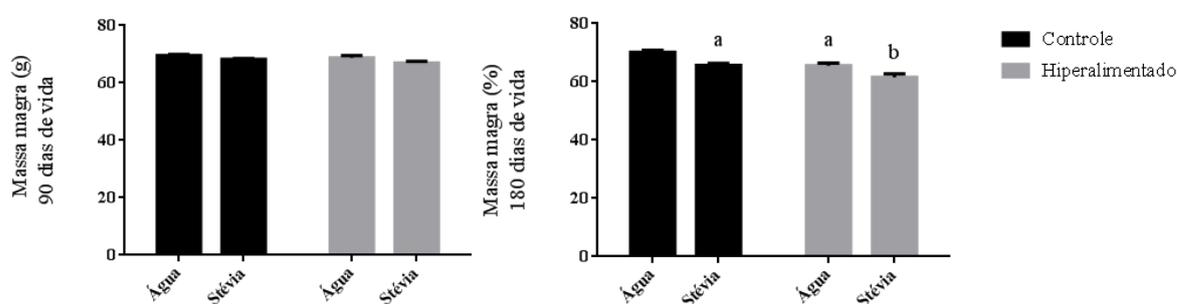
Fonte: O autor, 2021.

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

Aos 90 dias, não observamos diferenças significativas entre todos os grupos na massa magra dos animais.

Já aos 180 dias de vida, quando analisamos os grupos que ingeriram somente água, o GC-AG apresentou uma quantidade maior de massa magra ($P < 0,05$) (6%) quando comparado ao GH-AG. Entre os grupos tratados, o GC-ST também apresentou uma quantidade maior de massa magra ($P < 0,05$) (6%) em relação GH-ST, e por fim, também foi possível observar uma diferença entre os grupos controles, onde o GC-AG apresentou uma maior quantidade de massa magra ($P < 0,001$) (6%) em relação ao GC-ST.

Figura 14 - Porcentagem de massa magra dos grupos controle e hiperalimentados aos 90 e aos 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, $n = 8-46$ animais por grupo. A figura representa a quantidade de massa magra (%) dos animais controles e hiperalimentados, aferidas aos 90 e aos 180 dias de vida;

Fonte: O autor, 2021.

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

Ao analisarmos a massa corporal dos animais aos 180 dias de vida, conseguimos observar os efeitos da hiperalimentação, pois os grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) apresentaram uma quantidade maior de massa corporal ($P < 0,01$ e $P < 0,05$) (12% e 8%) quando comparado aos seus respectivos controles (GC-AG e GC-ST). Além disso, ainda foi possível notar efeitos do adoçante stévia, onde o GC-ST mostrou quantidades maiores de massa corporal ($P < 0,05$) (6%) em relação ao GC-AG.

Como consequência desse efeito da hiperalimentação sobre a massa corporal, foi possível observar também uma diferença significativa no Índice de Lee entre GC-AG e GH-

AG, onde o GH-AG apresentou um maior Índice ($P<0,05$) (5%) quando em comparação com o GC-AG. Não foi possível observar essa diferença entre os grupos que receberam o tratamento com stévia.

Alguns tecidos que retiramos para análises também demonstraram suas mudanças por conta dos efeitos da hiperalimentação, caso do fígado, coração, gordura retroperitoneal (GR), gordura do coração e tecido adiposo marrom (TAM).

No caso do fígado o GH-AG apresentou um tecido mais pesado ($P<0,01$) (15%) em comparação ao GC-AG. O coração do GH-ST demonstrou ser mais pesado ($P<0,01$) (12%) do que o coração do GC-ST.

Foi possível também notar uma diferença entre o peso da gordura do coração dos animais hiperalimentados em comparação aos animais controles. O GH-AG mostrou um peso do tecido maior ($P<0,0001$) (57%) quando comparado ao GC-AG e o GH-ST também teve um peso da gordura do coração maior ($P<0,05$) (34%) em relação ao GC-ST.

Através da divisão do peso do coração pela tibia dos animais, conseguimos analisar a hipertrofia cardíaca dos grupos. O GH-ST apresentou uma redução significativa na hipertrofia cardíaca quando comparado com o GH-AG e o GC-ST ($P<0,0001$ e $P<0,0001$) (54% e 95%).

Ao analisarmos o GR dos animais, foi possível notar uma diferença estatística entre os grupos que receberam água, onde o GH-AG apresentou maior peso do tecido ($P<0,0001$) (74%) em comparação ao GC-AG.

E por fim, quando observamos o TAM dos animais, conseguimos ver os efeitos da hiperalimentação uma vez que o tecido do GH-AG mostrou ser mais pesado ($P<0,05$) (48%) que o TAM do GC-AG. E ainda, foi possível observar efeitos da stévia, onde o GC-ST teve um peso maior de TAM ($P<0,05$) (35%) quando comparado o peso do GC-AG.

Ainda observamos que na relação comprimento nasoanal/ comprimento da tibia, também foi possível ver os efeitos da hiperalimentação, pois o GH-AG apresentou uma relação maior ($P<0,001$) (12%) quando comparado ao GC-AG. E também observamos que o GC-ST apresentou uma maior razão ($P<0,0001$) (11%) em relação ao GC-AG.

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

Parâmetros	Grupo Controle Água (GC-AG)	Grupo Controle Stévia (GC-ST)	Grupo Hiperalimentado Água (GH-AG)	Grupo Hiperalimentado Stévia (GH-ST)
Massa Corporal	42,145 ± 0,513	45,034 ± 0,618 ^a	47,746 ± 1,724 ^a	49,292 ± 1,715 ^b
Comprimento Naso anal (cm) / Comprimento da Tíbia (cm)	4,127 ± 0,088	4,640 ± 0,050 ^a	4,728 ± 0,097 ^a	4,422 ± 0,046
Índice de Lee	354,880 ± 3,944	357,221 ± 2,432	372,357 ± 3,674 ^a	370,827 ± 5,545
TAB total (g)	0,668 ± 0,198	0,955 ± 0,207	1,055 ± 0,240	1,565 ± 0,343
Peso do Fígado (g)	1,755 ± 0,040	1,926 ± 0,051	2,070 ± 0,076 ^a	1,986 ± 0,092
Razão Peso do Fígado (g) / Massa Corporal (g)	0,041 ± 0,001	0,044 ± 0,001	0,042 ± 0,001	0,041 ± 0,002
ME (g)	0,161 ± 0,009	0,186 ± 0,006	0,179 ± 0,014	0,193 ± 0,012
Coração (g)	0,217 ± 0,006	0,205 ± 0,006	0,228 ± 0,007	0,234 ± 0,006 ^b
Gordura Coração (g)	0,056 ± 0,005	0,082 ± 0,006	0,132 ± 0,020 ^a	0,125 ± 0,014 ^b
Peso do coração (g) / comprimento da tíbia (cm)	0,092 ± 0,002	0,097 ± 0,003	0,100 ± 0,005	0,046 ± 0,005 ^{b,c}
TAM (g)	0,078 ± 0,005	0,120 ± 0,009 ^a	0,149 ± 0,023 ^a	0,138 ± 0,023
GR (g)	0,211 ± 0,022	0,421 ± 0,050	0,823 ± 0,184 ^a	0,551 ± 0,103

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 com **GC-ST**; **c**, significativo em comparação com **GH-AG**; g – gramas; cm – centímetros; ME – Músculo esquelético; TAM – Tecido adiposo marrom;

Nota: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 6-47 animais por grupo;

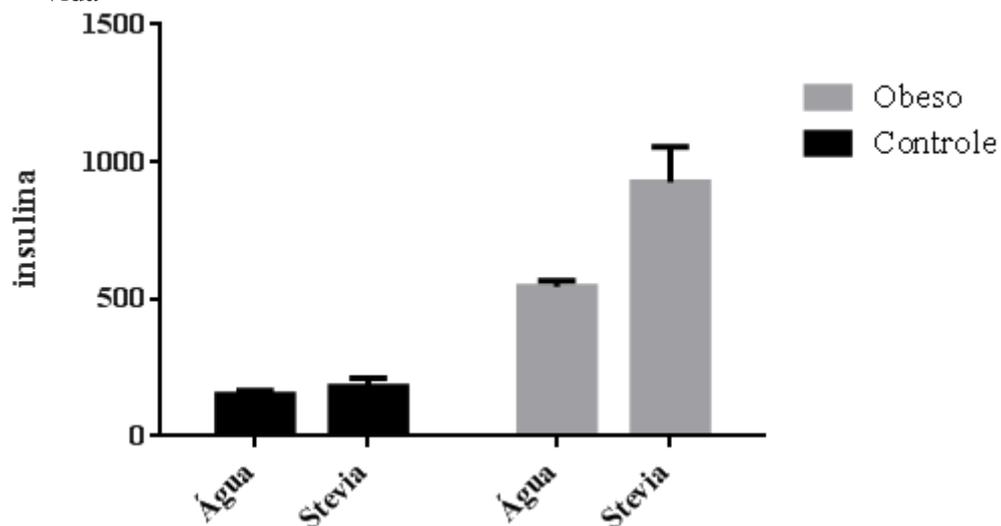
Fonte: O Autor, 2021.

4.7 Dosagem do hormônio insulina nos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida

A análise do sangue dos animais dos grupos hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) apresentaram maior concentração do hormônio insulina ($P < 0,001$ e $P < 0,0001$) (259% e 411%) quando comparado aos seus respectivos controles (GC-AG e GC-ST).

Além disso, observamos também os efeitos do consumo do adoçante stévia, onde o GH-ST apresentou maiores concentrações de insulina quando comparado ao GH-AG ($P < 0,01$) (70%).

Figura 15 - Concentração de Insulina nos grupos controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida



Legenda: ng/ml – nanograma por mililitro; **a**, significativo em comparação com **GC-AG**; **b**, significativo em comparação com **GC-ST**; **c**, significativo em comparação com **GH-AG**

Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 5 animais por grupo;

Fonte: O Autor, 2021.

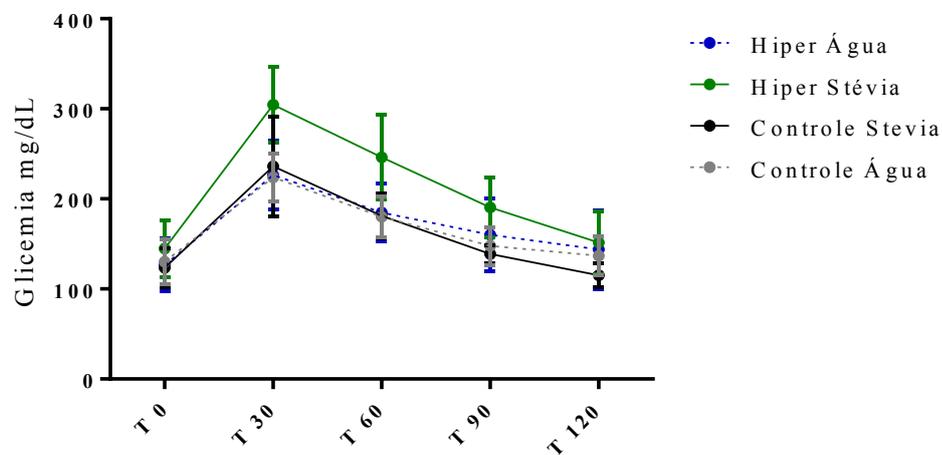
4.8 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não foi observada diferença significativa na glicemia basal dos animais (T0), no entanto observamos que entre os grupos tratados (GC-ST e GH-ST), o grupo hiperalimentado

stévia apresentou um aumento na glicemia nos tempos T 30 (22%) ($P<0,01$), T 60 (26%) ($P<0,01$), e T 90 (27%) ($P<0,05$).

Foi possível observar ainda, que os animais hiperalimentados (GH-AG e GH-ST) apresentaram diferença nos tempos T 30 ($P<0,001$) e T 60 ($P<0,01$), onde o grupo que recebeu o adoçante teve um aumento de 26% e 25% respectivamente.

Figura 16 - 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; mg/dl – miligrama por 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= 6 animais por grupo;

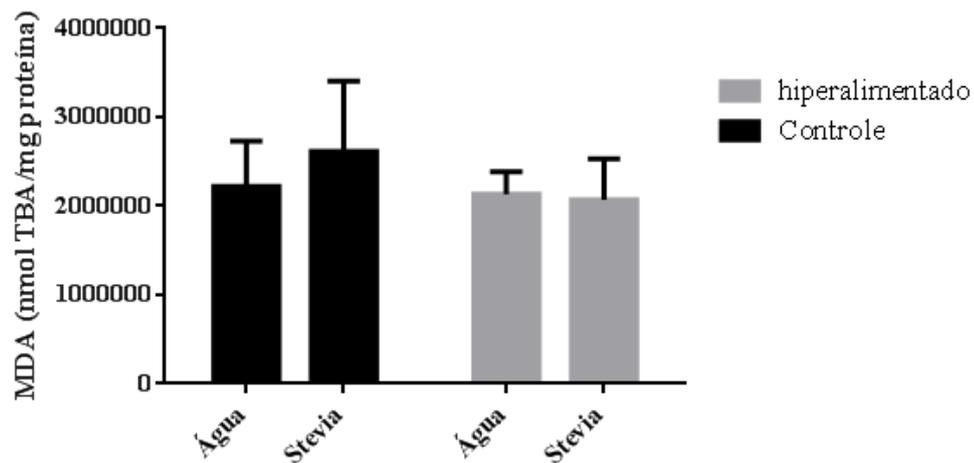
Fonte: O autor, 2021.

4.9 Análise de estresse oxidativo hepático

4.9.1 Peroxidação lipídica

Não foi possível observar diferença estatística entre os grupos na formação de subprodutos (malondialdeído/ MDA) da peroxidação lipídica no fígado dos animais.

Figura 17 - Efeito do consumo do adoçante stévia sobre os níveis de TBARS no fígado de animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida

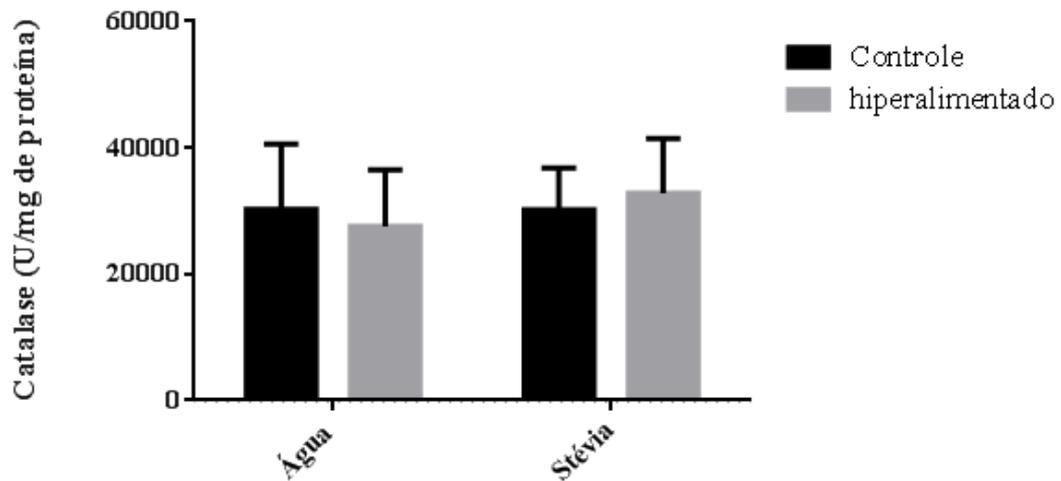


Legenda: nmol TBA/mg – nanomolar de ácido tiobarbitúrico por miligrama de proteína; MDA: malondialdeído
 Nota: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 8-10 animais por grupo;
 Fonte: O Autor, 2021.

4.9.2 Medida de Catalase

Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos na atividade da enzima antioxidante catalase no fígado dos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida.

Figura 18. Efeito do consumo do adoçante stévia na atividade de catalase no fígado dos animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida

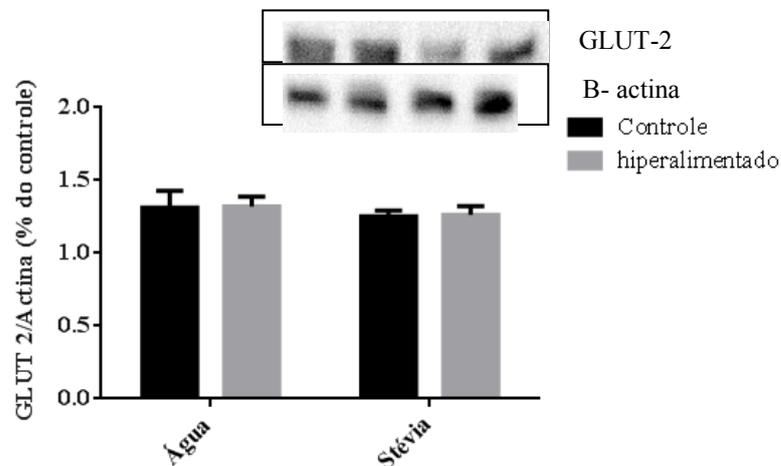


Legenda: U/mg de proteína – Unidade por miligrama de proteína
 Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 8-10 animais por grupo;
 Fonte: O Autor, 2021.

4.10 Efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre o conteúdo de GLUT-2 no fígado de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não foi possível observar diferença estatística entre todos os grupos no conteúdo de GLUT-2.

Figura 19 - Conteúdo de GLUT-2 no fígado de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

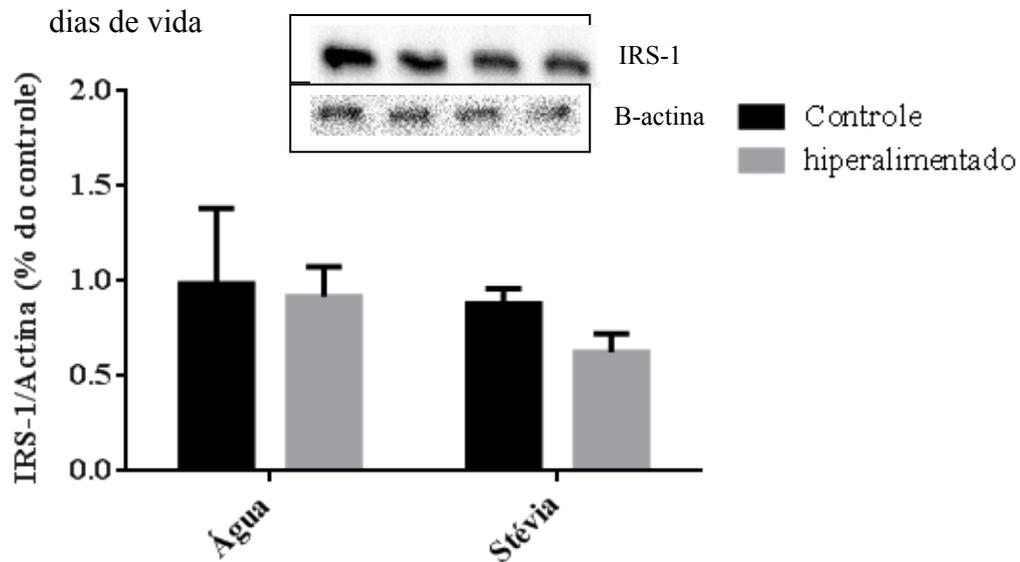


Legenda: GLUT 2 – Transportador de glicose tipo 2;
 Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n=6 animais por grupo;
 Fonte: O autor, 2021.

4.11 Efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre o conteúdo de IRS-1 no fígado de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Não foi possível observar diferença estatística entre todos os grupos no conteúdo de IRS-1.

Figura 20 - Conteúdo de IRS-1 no fígado de animais controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida



Legenda: IRS-1 – Substrato do receptor de insulina;

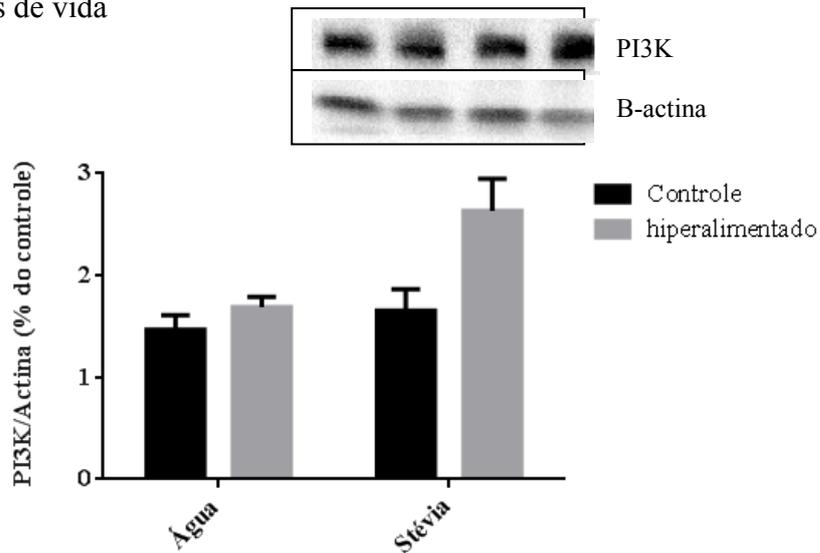
Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 4-5 animais por grupo;

Fonte: O autor, 2021.

4.12 Efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre o conteúdo de PI3K no fígado de camundongos controles e hiperalimentados aos 180 dias de vida

Ao analisarmos o a expressão do conteúdo de PI3K sobre os animais controle e hiperalimentado aos 180 dias de vida, conseguimos observar que o GH-ST apresentou um maior conteúdo de proteína quando comparado aos grupos GH-AG ($P < 0,05$) (44%) e GC-ST ($P < 0,05$) (37%).

Figura 21 - Conteúdo de PI3K no fígado 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**;

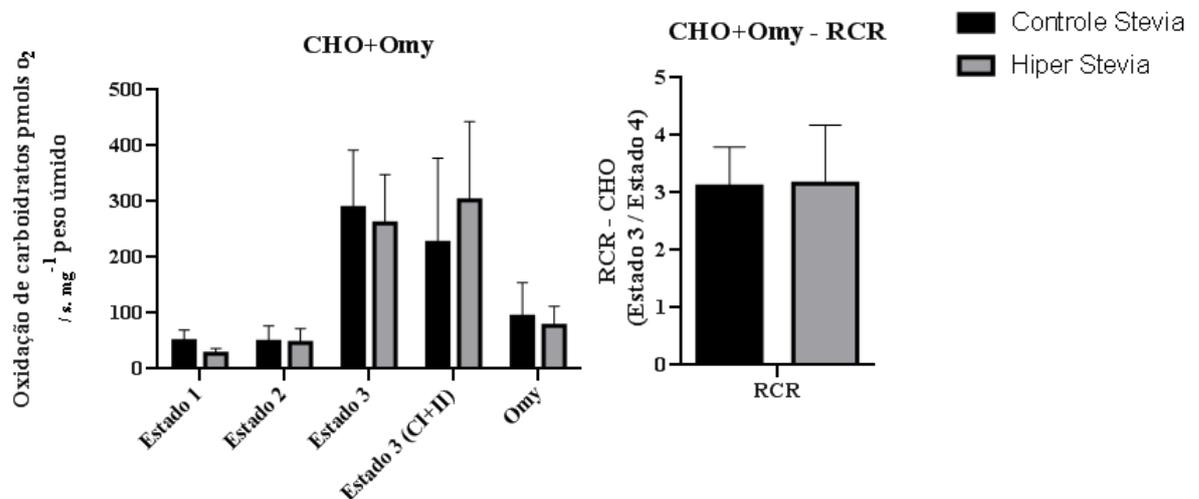
Nota: Resultados expressos como Média \pm E.P.M. n= 5-6 animais por grupo;

Fonte: O autor, 2021.

4.13 Efeito do consumo do adoçante stévia sobre o metabolismo de carboidratos no fígado de camundongos tratados aos 180 dias de vida

Não observamos diferenças significativas entre os grupos nas taxas respiratórias no protocolo de substratos relacionados à oxidação de carboidratos nem na razão do controle respiratório (RCR).

Figura 22 – Respirometria de alta resolução no fígado de animais adultos tratados com stévia submetidos a oxidação de carboidratos



Legenda: Pmols – Picomoles; O₂- Oxigênio; RCR– Razão de controle respiratório; CHO – Carboidratos;

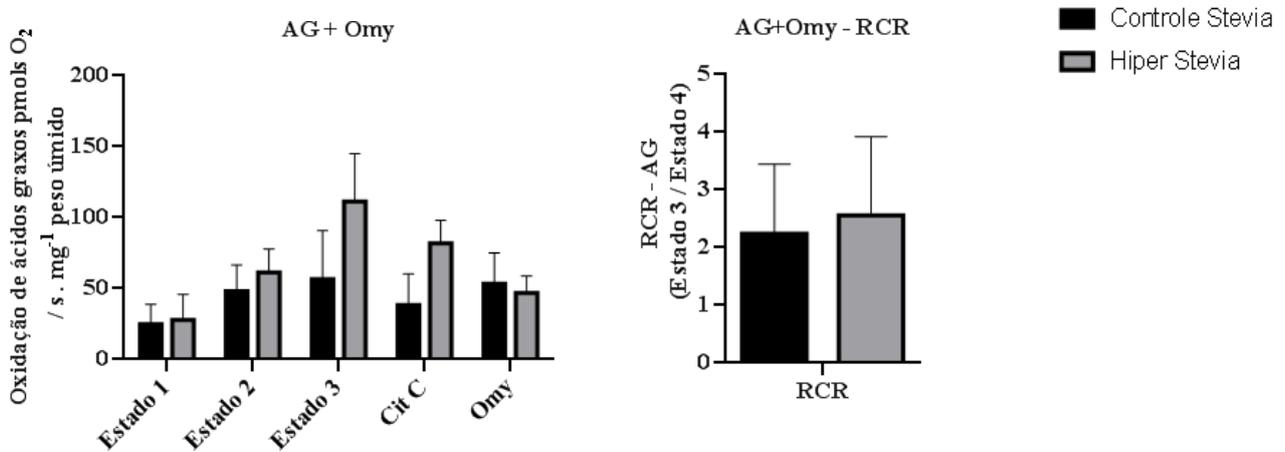
Nota: Respirometria de alta resolução no fígado de animais adultos, submetidos aos substratos relacionados a oxidação de carboidratos após tratamento com stévia. A razão de controle respiratório (RCR) foi calculada com a razão das taxas respiratórias dos estados 3 e 4. Os resultados são expressos como média ± EPM, n = 6 animais por grupo;

Fonte: O autor, 2021.

4.14 Efeito do consumo do adoçante stévia sobre o metabolismo de ácidos graxos no fígado de camundongos tratados aos 180 dias de vida.

Ao analisarmos os efeitos da stévia no metabolismo dos substratos relacionados à oxidação de ácidos graxos, conseguimos observar diferença significativa ($P < 0,05$) (97%), onde o GH-ST apresentou um aumento na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) quando comparado ao GC-ST. Entretanto sem diferenças na razão do controle respiratório.

Figura 23 - Respirometria de alta resolução no fígado de animais adultos tratados com stévia submetidos a oxidação de ácidos graxos



Legenda: Pmols – Picomoles; O₂- Oxigênio; RCR – Razão de controle respiratório; AG – Ácidos graxos;

Nota: Respirometria de alta resolução no fígado de animais adultos, submetidos aos substratos relacionados a oxidação de ácidos graxos após tratamento com stévia. A razão de controle respiratório (RCR) foi calculada com a razão das taxas respiratórias dos estados 3 e 4. Os resultados são expressos como média ± EPM, n = 6 animais por grupo;

Fonte: O autor, 2021.

5 DISCUSSÃO

A hiperalimentação durante a lactação através da redução de ninhada induziu a obesidade em camundongos adultos, visto que nossas análises de ressonância magnética nuclear demonstram que esses animais (GH-AG e GH-ST) aos 90 dias de vida, ou seja, antes dos grupos tratados com stévia receberem o adoçante, apresentaram diferença estatística para massa corporal e gordura corporal. Aos 180 dias de vida, os grupos hiperalimentados apresentaram maior porcentagem de massa magra quando comparado com os seus respectivos controles, além disso ainda observamos que GH-AG apresenta maior porcentagem de massa magra ao ser comparado com GC-AG. Os parâmetros biométricos e morfométricos analisados aos 180 dias de vida reforçam a efetividade da técnica utilizada no trabalho, pois os dados de massa corporal e peso da gordura do coração mostram que os animais hiperalimentados apresentaram um peso maior quando comparado com os seus controles. Também foi possível observar que o Índice de Lee e o peso de tecidos como GR, TAM e fígado do GH-AG foram mais elevados quando comparado com esses mesmos dados do GC-AG. Dentre os múltiplos fatores que caracterizam a obesidade, podemos destacar a importância de períodos críticos da vida, como o período pré e pós-natal, os quais já estão bem definidos na literatura que a hiperalimentação durante tais períodos provoca um aumento na massa corporal desses animais. 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. Desta forma, alterações nesta etapa da vida podem alterar a expressão gênica dessa prole, uma vez que a plasticidade genômica ainda permanece. Entretanto, as consequências desses insultos podem ser deletérias, principalmente na idade adulta (BARKER., 1995; HABBOUT., 2013; PLAGEMANN et al., 1992; WATERLAND., 1999).

Diversos estudos apontam que animais hiperalimentados apresentam aumento dos níveis basais de glicose e alterações na homeostase da glicose/insulina no início da vida (BALONAN, SHENG., 2000; BOULLU-CIOCCA et al., 2005; BOULLU-CIOCCA et al., 2008; CUNHA et al., 2009; HABBOUT et al., 2013; KAPPELER et al., 2009 PLAGEMANN., 1992;).

Nossos resultados evidenciam, ainda, que a hiperalimentação provoca alterações metabólicas, como hiperglicemia. Através da análise dos níveis séricos de insulina,

observamos que a hiperalimentação foi capaz induzir resistência à insulina, visto que os grupos hiperalimentados apresentaram níveis hormonais mais elevados quando comparado com os grupos controles. Tal resultado corrobora com os dados da literatura, que evidenciam a obesidade como um fator de risco para diversas outras complicações metabólicas e cardiovasculares, incluindo a resistência à insulina. Plagemann, em 1992, já tinha observado que animais hiperalimentados apresentam RI (BARAZZONI et al., 2018; PLAGEMANN, 1992; YAZICI, SEZER., 2017;). Dentre os mecanismos pelos quais a obesidade pode levar à RI, podemos citar a disfunção metabólica do tecido adiposo, o estresse oxidativo resultante da geração desequilibrada de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes, bem como inflamação crônica em outros tecidos (BARAZZONI et al., 2018).

Ainda, ao avaliar o tecido alvo do nosso estudo, observamos um aumento do peso do fígado dos animais GH-AG em relação ao GC-AG. De acordo com a literatura, a obesidade está intimamente associada à DHGNA, uma doença que é caracterizada por um depósito excessivo de gordura no fígado (BRUNNER et al., 2019; MILIĆ, LULIĆ, ŠTIMAC., 2014;), no entanto, análises morfológicas são necessárias para uma real identificação da presença de gotículas de lipídio no fígado desses animais hiperalimentados. Assim, os dados apresentados acima corroboram com a hipótese de que a hiperalimentação nos períodos iniciais da vida pode levar à obesidade.

Avaliamos, também, o efeito do consumo do adoçante natural stévia sobre parâmetros metabólicos e função mitocondrial nos animais. A ingestão do adoçante foi acompanhada durante todo o tratamento de 12 semanas.

Nossos dados demonstram que a stévia foi capaz de reduzir o consumo de ração, visto que os animais hiperalimentados que receberam o adoçante (GH-ST) diminuíram o consumo alimentar em algumas semanas quando comparado ao grupo hiperalimentado que recebeu apenas água (GH-AG). Farhat e colaboradores, (2019) avaliou os efeitos do extrato de stévia na resposta pós-prandial da glicose, saciedade e ingestão de energia, usou escalas analógicas virtuais (EVA) para avaliar sentimentos subjetivos de apetite. Nesse estudo, a stévia levou a menores sentimentos subjetivos de fome após a pré-carga, dessa forma Farhat e colaboradores sugeriram que a stévia tem potencial para reduzir o apetite e, conseqüentemente, a ingestão de energia. Segundo os autores, a stévia reduz a sensação de fome e não aumenta a ingestão de alimentos e os níveis de glicose pós-prandial, sugerindo que esta poderia ser uma estratégia útil na prevenção e controle da obesidade e diabetes (FARHAT et al., 2019).

Além disso, ao analisarmos os dados de consumo hídrico dos nossos animais, conseguimos observar que o GH-ST ingeriu uma maior quantidade de líquido quando

comparado ao GC-ST e ao GH-AG. Quando comparamos o GH-ST com o GH-AG, levantamos a hipótese de que a doçura do líquido com o adoçante ingerida pelo GH-ST tenha estimulado o aumento do consumo hídrico, em relação ao GH-AG, que consumiu apenas água pura. De acordo com Robert D. Murray (2017), durante os primeiros anos de vida, a doçura dos açúcares tem uma capacidade de impedir ou ajudar a estabelecer uma base nutricional forte para as preferências alimentares que, geralmente, se estendem por toda a vida. O primeiro relacionamento de uma criança com o sabor doce começa antes do nascimento e continua a evoluir ao longo da alimentação complementar. A doçura do leite materno estimula o consumo e acalma o recém-nascido. Já, quando olhamos para os dados entre os grupos que receberam a stévia, trazemos a hipótese de que o GH-ST apresentou um efeito viciante que o GC-ST não apresentou, visto que desde o 3º dia de vida, os animais hiperalimentados stévia ingeriram uma maior quantidade de açúcar, por ter uma maior oferta de leite do que o seu respectivo controle. 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, carboidratos e proteínas sugerindo que essas alterações podem contribuir para o estabelecimento de efeitos prejudiciais na idade adulta. Sabe-se, também, que gostar de substâncias com sabor doce é inato, embora as experiências pós-natais possam moldar as respostas (BEAUCHAMP., 2016).

Nossos resultados demonstram que os animais do GC-ST, ao final do tratamento, apresentaram alterações na massa corporal, gordura corporal e massa magra por RMN, e o TAM desses animais apresentou um peso maior em comparação ao GC-AG. Atteh e colaboradores, em 2008, analisaram 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 falta de estudos na literatura que investigaram o efeito da stévia 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.

Apesar de estudos demonstrarem que o uso da stévia pode ser um potencial mecanismo para o controle e redução de peso (AHMAD, U; AHMAD,S., 2018; ELNAGA et al., 2016), nossos dados não foram capazes de demonstrar tal efeito, de maneira que o GH-ST apresentou massa corporal mais elevada quando comparado ao GH-AG e ao GC-ST, corroborando com o peso elevado do coração. Entretanto, através da divisão do peso do fígado pelo comprimento da tíbia, foi possível observar que os GC-ST e GH-AG

apresentaram uma hipertrofia cardíaca elevada quando comparado ao GH-ST. Estudos apontam que extratos da stévia como o estéviosídeo e o isosteviol apresentam propriedades cardioprotetoras, sendo vasodilatador, hipotensor e bradicárdico (BHATT et al., 2020; RAGONE et al., 2017)

Também é bem estabelecido na literatura que a stévia apresenta diversos efeitos insulínótrópicos para tentar combater a DM2 e outras doenças correlacionadas, estimulando a liberação de insulina pelas células tipo β do pâncreas. Nossos resultados mostram que o GH-ST demonstrou uma maior concentração de insulina sérica quando comparado ao GH-AG, levantando a hipótese de um possível efeito compensatório para poder captar a grande quantidade de glicose ingerida pelo GH-ST (CARRERA-LANESTOSA et al., 2017; PARK; CHA, 2010).

Já é bem estabelecido na literatura que a stévia apresenta uma propriedade anti-hiperglicêmica em ratos e em humanos. (ARANDA-GONZÁLEZ et al., 2014; FERREIRA et al., 2006; GREGERSEN et al., 2004; HOSSAIN et al., 2011; JEPPESEN et al., 2003; KUJUR et al., 2010; MISHRA., 2011; SHARMA; RAJESH; ELANGVAM, 2012; SINGH; GARG; YADAV., 2013; SUMON et al., 2008). 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). Porém nossos resultados não demonstraram esse poder anti-hiperglicêmico da stévia, uma vez que os animais GH-ST tiveram níveis maiores de glicemia quando comparados ao GC-ST e ao GH-AG.

Já é bem definido na literatura que a obesidade provoca uma inflamação sistêmica de baixo grau começando no tecido adiposo branco, que contribui para o desenvolvimento de diversas outras patologias como DM2, câncer e DHGNA (KARCZEWSKI et al., 2018). Além disso, o estresse oxidativo tem um papel fundamental nos processos inflamatórios, atacando os fosfolípidios poliinsaturados na membrana celular dos hepatócitos. Visto que estudos apontam que as folhas da *Stévia Rebaudiana* Bertoni apresentam propriedades farmacológicas, como antioxidante e antiinflamatórias, que podem ser benéficas no combate às lesões hepáticas (CASAS-GRAJALES et al., 2018; SHARMA, YADAV,

MANIVANNAN.,2012), avaliamos a formação de subprodutos da peroxidação lipídica, para observarmos um possível comprometimento lipídico oriundo do dano oxidativo proveniente da obesidade no fígado dos animais controle e hiperalimentados. Não conseguimos observar esses efeitos benéficos da stévia através dessa técnica utilizada, dado que nossos resultados não apresentaram diferença estatística entre todos os grupos. Casas-Grajales e colaboradores (2018) sugeriram, baseados em seus resultados, que o esteviosídeo é capaz de manter o estado redox normal das células, principalmente por meio da preservação dos níveis de Nrf2, em vez de um efeito antioxidante direto como eliminador de radicais livres. O esteviosídeo não possui as características presentes nas moléculas antioxidantes, mas é muito eficaz na regulação positiva do sistema antioxidante endógeno da célula, preservando os níveis de Nrf2, que são responsáveis por regular a expressão de genes antioxidantes (CASAS-GRAJALES et al., 2018).

Além de avaliar os subprodutos da peroxidação lipídica, também analisamos a atividade da enzima antioxidante catalase que, junto com a superóxido desmutase, são as duas principais enzimas que removem os radicais livres tóxicos *in vivo*, onde a catalase atua retirando uma quantidade significativa de peróxido de hidrogênio. Não observamos diferença significativa entre todos os grupos, entretanto, Sharma, Yadav, Manivannan (2012) mostraram que o fígado de ratos diabéticos induzidos por monohidrato de aloxano tem atividades reduzidas de SOD e catalase, resultando em vários efeitos deletérios devido ao acúmulo de gotículas de superóxido e que, quando esses ratos foram tratados com stévia, verificou-se um aumento na atividade da catalase quando comparado ao grupo diabético não tratado. Wang e colaboradores (2018) mostraram que Rebaudiosídeo A apresentou atividade antioxidante na redução de espécies reativas de oxigênio e níveis de malondialdeído, aumentando os níveis de glutathione e as atividades de superóxido dismutase e catalase, sugerindo um potencial efeito hepatoprotetor nas células HepG2 (SHARMA, YADAV, MANIVANNAN.,2012; WANG et al., 2018).

Estudos apontam que animais submetidos à técnica de redução da ninhada, ocasionando a hiperalimentação durante o período de lactação, apresentam alterações na homeostase energética, levando a consequências como aumento do tecido adiposo corporal, dislipidemia, intolerância à glicose, resistência à insulina e alterações cardiovasculares (CRUZ, GORAN., 2004; HABBOUT et al., 2013; XAVIER et al., 2015). Desta forma, analisamos o efeito do consumo do adoçante stévia e da hiperalimentação na lactação sobre algumas proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, GLUT-2, PI3K e IRS-1 no fígado de camundongos adultos através da técnica de Western Blotting.

A isoforma 2 do transportador de glicose (GLUT 2) representa o principal membro da família GLUT em células beta pancreáticas e hepatócitos, mas também é abundante no intestino, rim e sistema nervoso central (AL-HASANI, CHADT., 2020). O GLUT-2 hepático está localizado na face sinusoidal da membrana plasmática dos hepatócitos e tem como função principal o transporte de glicose. Durante o jejum, o fígado produz glicose por meio da glicogênese ou glicogenólise, com a conversão de glicose-6-fosfato em glicose, precedendo a liberação via GLUT 2. Contudo, no estado alimentado, os níveis de glicose e insulina aumentam e inibem a produção endógena de glicose por meio de efeitos nas enzimas envolvidas na gliconeogênese, isso está associado à remoção de GLUT 2 da membrana e uma subsequente queda na liberação mediada por GLUT 2. Por fim o excesso de glicose é armazenado como glicogênio ou convertido em lipídios e o GLUT 2 hepático e o receptor de insulina são internalizados em endossomos em resposta à insulina (KARIM, ADAMS, LALOR, 2012).

De acordo com Guo e colaboradores (2020), durante a patogênese da DHGNA, a interrupção da sinalização da insulina resulta em esteatose hepática e é acompanhada por comprometimento da translocação de GLUT 2 para a membrana plasmática dos hepatócitos. Tal comprometimento na captação de glicose mediada pelo GLUT 2 e a consequente conversão em glicogênio são sugeridos como responsáveis pela deposição ectópica de gordura no fígado. Acredita-se que isso ocorra por meio da conversão do excesso de carboidratos em ácidos graxos por meio da via de lipogênese de novo, que, por sua vez, contribui ainda mais para a esteatose hepática. Portanto, a expressão de GLUT 2 e / ou sua translocação em hepatócitos desempenham um papel importante na regulação da homeostase da glicose e da sensibilidade à insulina (GUO et al., 2020).

Nordentoft e colaboradores (2008), avaliaram os efeitos do isosteviol, um componente extraído da *Stévia Rebaudiana* Bertoni em genes de proteínas relacionadas à via de sinalização a insulina em ratos diabéticos KKay e observaram que os animais diabéticos tratados com isosteviol apresentaram uma regulação positiva de mais de três vezes no transcrito do gene da proteína GLUT 2, sugerindo um aumento na sensibilidade à glicose. Apesar dos estudos apontarem as modulações do GLUT 2 na DHGNA e com o tratamento com componentes presentes na *Stévia Rebaudiana* Bertoni, não foi possível observar diferenças significativas entre os nossos grupos no conteúdo de GLUT 2 (NORDENTOFT et al., 2008).

O substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) exerce um papel fundamental 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. Assim, 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). Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos na expressão do conteúdo de IRS-1 nos nossos resultados. Estudos mostram que existe uma forte ligação dos IRS na via de sinalização da insulina hepática, levantando a hipótese de que uma expressão diminuída dessas proteínas pode ser uma lesão molecular chave da resistência à insulina hepática. Taniguchi et al., (2016) demonstraram que IRS-1 e o IRS-2 hepáticos mantêm a homeostase metabólica por meio de seus papéis complementares na regulação da sinalização da insulina e da expressão gênica, com o IRS-1 mais intimamente ligado à regulação da gliconeogênese e a expressão de glicoquinase e o IRS-2 mais intimamente ligado à regulação da lipogênese. Assim, a modulação diferencial da expressão e sinalização hepática de IRS pode representar um componente importante da fisiopatologia molecular subjacente ao DM e à síndrome metabólica (TANIGUCHI, UEKI, KAHN., 2016).

Em um estado alimentado, a insulina produzida pelas células β passa para a corrente sanguínea e ativa o receptor de insulina na superfície da membrana da célula hepática. O IR ativado fosforila o local da tirosina do substrato IRS-1 / 2 (IRS-1 / 2) que ativa as fosfoinositídeo 3-quinases (PI3Ks). PI3K ativada pode catalisar PIP2 (4,5-2 fosfatidil inositol fosfato) e gerar PIP3, que atua como o segundo mensageiro para ativar a proteína quinase B (AKT). Por isso, a via PI3K / AKT desempenha um papel central na fisiologia celular, mediando processos celulares críticos, como a homeostase da glicose, metabolismo lipídico, síntese de proteínas e proliferação e sobrevivência celular. O Fígado, músculo esquelético e tecido adiposo são três principais tecidos-alvo de insulina envolvidos na utilização de glicose, enquanto o fígado é o único órgão que responde agudamente à insulina, reduzindo os níveis de glicose. A via PI3K / AKT no fígado também foi relatada para regular a expressão da proteína-1c de ligação do elemento regulador de esterol para mediar a síntese de triglicerídeos. Portanto, o comprometimento da via PI3K / AKT no fígado pode causar distúrbio no metabolismo de triglicerídeos e glicose (HUANG et al., 2020).

Não foi possível observar os efeitos da hiperalimentação nesta via, porém Huang e colaboradores (2020) demonstraram a expressão de proteínas relacionadas à via PI3K / AKT

no fígado de animais hiperalimentados durante a lactação. A fosforilação de PI3K e AKT foi diminuída no grupo hiperalimentado. Normalmente, a expressão de PI3K é regulada positivamente por IRS-2, no entanto, no presente estudo, o aumento de IRS-2 no grupo hiperalimentado não foi capaz de ativar a expressão de PI3K, indicando comprometimento da via PI3K / AKT (HUANG et al., 2020).

Ao olharmos para os efeitos da stévia sobre o IRS-1, Mohd-Radzman et al (2013) em um estudo *in vitro*, mostrou que o tratamento com esteviosídeo em células 3T3-L1 aumentou a expressão do IRS-1, além de aumentar a atividade de captação de glicose em 2,1 vezes, em condições normais, podendo chegar a 4,4 vezes, nos estados resistentes à insulina. O estudo ainda observou que esse aumento foi maior que no grupo controle tratado com um agente antidiabético, trazendo a hipótese de que o esteviosídeo apresentaria 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 (MOHD-RADZMAN et al, 2013)

Em contrapartida, nossos dados mostram que o consumo do adoçante stévia aumentou a expressão do PI3K no GH-ST em relação ao GH-AG e ao GC-ST. Rizzo e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos dos glicosídeos de esteviol na atividade de transporte de glicose em duas linhagens celulares diferentes. Foi demonstrado que os tratamentos (insulina e Stevia) aumentaram a fosforilação de PI3K e Akt e, como consequência, a captação de glicose aumentou tanto no neuroblastoma SHSY5Y quanto nas células humanas de leucemia mielóide HL-60. O rebaudiosídeo A e o esteviosídeo, os principais glicosídeos nos extratos de stévia, são capazes de aumentar a captação de glicose, sendo o aumento semelhante ao induzido pela insulina. Os resultados sugerem que os glicosídeos de esteviol atuam modulando a translocação de GLUT através da via PI3K / Akt. Além disso, o extrato de stévia 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 (RIZZO et al., 2013).

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) (KUSMINSKI et al., 2012; OSELLAME et al., 2012; ROGGE, et al., 2009; SCHÖTTL et al., 2015). Para melhor entender o papel regulador que as mitocôndrias dos hepatócitos desempenham no controle da homeostase energética sistêmica, em nosso estudo, avaliamos os efeitos do tratamento com stévia sobre a respiração mitocondrial do fígado.

Nossos resultados não foram capazes de demonstrar diferenças significativas nas taxas respiratórias mitocondriais no protocolo de substratos relacionados à oxidação de carboidratos, entretanto um estudo anterior realizado em hepatócitos demonstrou que a stévia foi capaz melhorar o acoplamento da fosforilação oxidativa, assim como aumentar a oxidação de Glutamato e Malato (BRACHT, 1984).

Contudo, ao analisarmos os dados relacionados à oxidação de ácidos graxos, observamos que o GH-ST apresentou um aumento significativo da taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) quando comparado ao GC-ST. Corroborando com tal resultado, Park e Cha (2010) demonstraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica que receberam suplementação com extratos da stévia conseguiram regular positivamente os genes que codificam as enzimas da oxidação de ácidos graxos no fígado por meio da ativação do PPAR α .

CONCLUSÃO

O nosso estudo conseguiu demonstrar que a hiperalimentação em períodos cruciais do desenvolvimento, como a gestação e lactação, pode promover alterações morfológicas e metabólicas, como aumento de gordura corporal, do peso do fígado e do tecido adiposo marrom, além de elevar os níveis séricos de insulina.

Além disso, concluímos que o consumo crônico do adoçante natural produzido a base de stévia promove alterações metabólicas distintas de acordo com o estado nutricional do animal, reduzindo a ingestão alimentar, aumentando a captação de glicose e a função mitocondrial em animais hiperalimentados.

Porém sugerimos que mais estudos sejam realizados para esclarecer melhor os possíveis efeitos medicinais da stévia em tecidos periféricos, como o fígado.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. Oxygen Radicals in Biological Systems, 121–126. *Methods Enzymol*, v. 105, p.121-126, 1984.
- 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, J *et al.* Stevia rebaudiana Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science & Technology*. v,100, p. 177 – 189, 2020.
- ANDOLFI, C., FISICHELLA, M. Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities. *Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques*, v. 8, 2018.
- 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.
- ARRAIS, D, S, P *et al.* Utilização de adoçantes no Brasil: uma abordagem a partir de um inquérito domiciliar. *Cadernos de saúde pública*. 2019.
- 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.
- 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.
- BARAZZONI, R. *et al.* Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity* v. 23, p.149–157, 2018.
- 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.
- BATESON, P. *et al.* Developmental plasticity and human health. *Nature*, v.430, n.6998, p.419-421, 2004.
- BECKWITT, H, C *et al.* Liver ‘organ on a chip’. *Exp Cell Res*, p. 15-25, 2019.

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

BHATT, L. *et al.* Evaluation of cardioprotection and bioefficacy enhancement of stevioside and diltiazem in rats. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. p. 1-13

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.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature reviews*, 2019.

BLUTER, J, M; BARRIENTOS, M, R. The impact of nutrition on COVID-19 susceptibility and long-term consequences. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia alimentar para a população brasileira*. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia alimentar para a população brasileira*. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRACHT, K, A; ALVAREZ, M; BRACHT, A. Effects of stevia rebaudiana natural products on rat liver mitochondria. *Biochemical pharmacology*. v. 34, p. 873-882, 1984.

BRUGNERA, F, V; BARUFFI, R; PANATTO, E. Utilização dos adoçantes durante a gestação e lactação. *Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia*. n.2, 2012.

BRUNNER, T, K *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obesity Treatment. 2019.

CARPINELLO, J, O; DeCHERNEY, H, A; HILL, J, M. Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology. *Semin Reprod Med*. v, 37. p.177-182, 2018.

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.

CASAS-GRAJALES *et al.* Antioxidant and immunomodulatory activity induced by stevioside in liver damage: *in vivo*, *in vitro* and *in silico* assays. *Life Sci*. v.224, p.187-196, 2019.

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.

CHADT, A; AL-HASANI, A. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *European Journal of Physiology*. v. 472, p.1273–1298,2020.

CHOOI, Y, C., DING, C., MAGKOS F. The epidemiology of obesity. *Metabolism clinical and experimental*, 2018.

CRUZ, M, L; GORAN, M, I. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Curr Diab Rep*, v. 4, n. 1, p. 53-62, 2004.

DE LORENZO A. *et al.* 2020. Obesity: a preventable, treatable, but relapsing disease. *Nutrition*, 2019.

DE BOO, A, H; HARDING, E, J. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. v. 44, p.4-14, 2006.

DIAS, P. C; HENRIQUES, P; DOS ANJOS, L. A; BURLANDY. L. Obesidade e políticas públicas: Concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. *Cad. Saúde publica*, v. 33, p.1-12, 2017.

ELNAGA, A, N.I.E *et al.* Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats. *Annals of Agricultural Science*, p. 1- 9, 2016.

FAUSTO, L. S. L. *et al.* Efeito do adoçante à base de estevia (*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.*

FARHAT, G; BERSET, V; MOORE, L. Effects of Stevia Extract on Postprandial Glucose Response, Satiety and Energy Intake: A Three-Arm Crossover Trial. *Nutrients*. P.1-8, 2019.

FERRAZZANO, G. F. *et al.* Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener? *A Review. Molecules*, v. 21 (38), 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.

FERNSTROM, J. D. Non-Nutritive Sweeteners and Obesity. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, v. 6, p. 119-36, 2015.

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.

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

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.

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/>>.

GUO *et al.* Hepatocyte TMEM16A Deletion Retards NAFLD Progression by Ameliorating Hepatic Glucose Metabolic Disorder. *Advanced science*. p. 1-15, 2020

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.

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.

HUANG, F *et al.* Postnatal overfeeding induces hepatic microRNA-221 expression and impairs the PI3K/AKT pathway in adult male rats. *Pediatric research*. 2020.

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. Um a cada quatro adultos do país estava obeso em 2019; atenção primária foi bem avaliada. Out, 2020. Disponível em <<http://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>> acessado em 05/04/2021>.

JEONG-EUN PARK, YOUN-SOO CHA. Stevia rebaudiana Bertonii 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.

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.

KARCZEWSKI, J *et al.* Obesity and Inflammation. *Eur. Cytokine Netw*, v. 29, p. 83-94, 2018.

KARIM ,S; ADAMS, H, D; LALOR, F, P. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World journal of gastroenterology*. v. 46, p.6771-6781, 2012.

KAPPELER, L. *et al.* Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice. *Endocrinology*, v. 150, p. 314-323, 2009.

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, 2000.

KIM, Y; KEOGH, B, J; CLIFTON, M, P. Non-nutritive Sweeteners and Glycaemic Control. *Current Atherosclerosis Reports*. p. 21- 49, 2019.

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.

KUJUR, R. S. *et al.* Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetis rats. *J Pharmacogn*, v. 2, p. 27-32, 2010.

LIMA FILHO, O. F.; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. Estévia. Sistema de Produção. *Embrapa Agropecuária Oeste*, v. 5, p. 55, 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.

MAGNUSON, M. C. *et al.* Renwick. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*, v. 74 (11), p. 670-689, 2018.

MELDRUM, D, R *et al.* Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will? *Fertility and Sterility* Vol. 107, 2017.

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

MILIĆ, S; LULIĆ, D; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World journal of gastroenterology*. v. 28, p.9330-9337, 2014.

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

MOHAMMED, S. M; SENDRA, S; LLORET, J; BOSCH, I. Systems and WBANs for Controlling Obesity. *Journal of Healthcare Engineering*, p. 1-21, 2018.

MOHD-RADZMAN, H, N *et al.* Potential Roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. *Hindawi Publishing Corporation*, p. 1-10, 2013.

MONTEIRO, S, L *et al.* Use of Table Sugar and Artificial Sweeteners in Brazil: National Dietary Survey 2008–2009. *Nutrients*. 2018.

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.

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

NORDENTOFT, I *et al.* Isosteviol increases insulin sensitivity and changes gene expression of key insulin regulatory genes and transcription factors in islets of the diabetic KKAY mouse. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. V. 10, p.939–949, 2008

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, Obesidade e Sobrepeso. Abr -2020 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>>. Acesso em: 29 de setembro, 2020.

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.

PICHÉ, ME. *et al.* Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v.61, p. 103-113, 2018.

PINHEIRO, A. R. O; FREITAS, S. F. T; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de nutrição, Campinas*, v. 17, p.523-533 , 2004.

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.

POLYZOS, A, S; KOUNTOURAS, J; MANTZOROS, S, C. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 92, p. 82-97, 2019.

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.

QURRAT-UL-AIN; KHAN, S, A. Artificial sweeteners: safe or unsafe? Recent advances in endocrinology, v. .65, n..2, p. 225-227, 2015.

RAMOS-TOVAR, E, *et al.* Stevia Prevents Acute and Chronic Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride by Blocking Oxidative Stress through Nrf2 Upregulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-12, 2018.

RAGONE, I, M. *et al.* Cardioprotection of stevioside on stunned rat hearts: A mechano-energetical study. *Phytomedicine*. v.35, p.18-26, 2017.

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.

SAMUEL, P *et al.* Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential. *The Journal of Nutrition* v, 148, p. 1186 – 1205, 2018.

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

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.

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.

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.

SHARMA, R; YADAV, R; MANIVANNAN, E. Study of effect of *Stevia rebaudiana bertoni* on oxidative stress in type-2 diabetic rat models. *Biomedicine & Aging Pathology* 2. p.126–131, 2012

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.

SULLIVAN, L, E; SMITH, S, M; GROVE, L, K. Perinatal Exposure to High-Fat Diet Programs Energy Balance, Metabolism and Behavior in Adulthood. *Neuroendocrinology*, v 93, p. 1- 8, 2011.

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.

SYLVETSKY, C, A; ROTHER, I, K. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology & Behavior*. v. 164, p. 446-450, 2016.

TANIGUCHI, M, C; UEKI, K; KAHN, R, C. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *The journal of clinical investigation*.

TREFTS, E; GANNON, M; WASSERMAN, H, D. The Liver. 2018.

WATT, J, M *et al.* The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, p. 1367-1393, 2019.

WANG Y, *et al.* New application of the commercial sweetener rebaudioside a as a hepatoprotective candidate: Induction of the Nrf2 signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 882, p. 128-137, 2018.

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.

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.

XAVIER, L. P *et al*, 2015. Programação metabólica: Causas e consequências. *Visão acadêmica*, v. 16, p. 33-44, 2015.

YAZICI, D; SEZER, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity.

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*, v. 27, p. 924-934 , 2011.

ANEXO – Protocolo de extração dos glicosídeos de esteviol

STEVIOI 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

The product is obtained from the leaves of *Stevia rebaudiana* 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.

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.

Chemical name

Stevioside: 13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid, β-D-glucopyranosyl ester

Rebaudioside A: 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

C.A.S. number

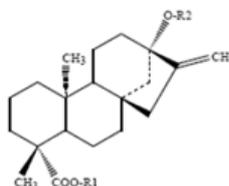
Stevioside: 57817-89-7
Rebaudioside A: 58543-16-1

Chemical formula

Stevioside: C₃₈H₇₀O₁₈
Rebaudioside A: C₄₄H₇₀O₂₃

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)

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

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

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

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

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).

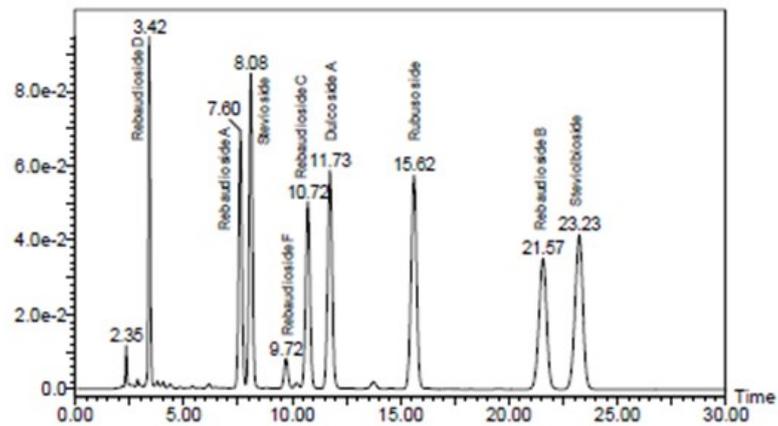


Figure. Chromatogram of mixture of nine steviol glycosides standard solution

Column: Capcell pak C₁₈ MG II

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