



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruna Gonçalves da Silva

Efeito do consumo crônico do adoçante artificial sacarina sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante a lactação

Rio de Janeiro

2024

Bruna Gonçalves da Silva

Efeito do consumo crônico do adoçante artificial sacarina sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante a lactação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de doutor, 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 (*in memoriam*)

Rio de Janeiro

2024

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

S586 Silva, Bruna Gonçalves da.

Efeito do consumo crônico do adoçante artificial sacarina sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante a lactação / Bruna Gonçalves da Silva. – 2024.

132 f.

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

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

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

1. Sacarina – Efeitos adversos. 2. Obesidade – Induzido quimicamente – Teses. 3. Tecido adiposo branco – fisiopatologia – Teses. 4. Metabolismo energético – efeitos dos fármacos – Teses. I. Souza, Érica Patrícia Garcia de. II. Moura, Aníbal Sanchez. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.39

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Bruna Gonçalves da Silva

Efeito do consumo crônico do adoçante artificial sacarina sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante a lactação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Aprovada em 04 de abril de 2024.

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura (*in memoriam*)
Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Karen de Jesus Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Carlos Alberto Soares da Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Vanessa Souza Mello
Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane
Instituto de Nutrição - UERJ

Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberta Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe e a minha irmã (Rosinete Dias e Bianca Gonçalves), por serem mulheres das quais me orgulho e que impactam minha vida e me ajudam a ver calma em meio ao caos. A tese de doutorado é um símbolo palpável de longos anos dedicados à busca por conhecimento. Ser a primeira pessoa da família a conquistar o ensino superior e possuir um elevado título acadêmico traz consigo a responsabilidade de abrir portas, de ser referência para alguns e de possibilitar que novos espaços sejam habitados por aqueles que antes não imaginaram estar. Conquistar esse título é, acima de tudo, uma homenagem aos esforços de uma vida inteira, um tributo a Bruna da infância, que vivenciou oportunidades escassas atreladas ao caos e em meio a tudo isso permitiu que a educação pudesse transformar a sua realidade.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder ajuda nos momentos difíceis, por amparar os meus e por me permitir superar os desafios da vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza, pelo suporte, aprendizado e incentivo na elaboração deste trabalho. Agradeço por me conceder a oportunidade de fazer parte de seu grupo de alunos.

Ao Prof. Aníbal Sanchez Moura, *in memoriam*, fundador do nosso laboratório. Seu legado à ciência brasileira permanecerá eterno. Foi por meio de suas aulas, onde o amor pelo conhecimento transbordava, que aprendi a admirar a ciência.

À minha amiga, Anatólia Kutianski, por sempre me inspirar a almejar caminhos maiores. Você foi peça fundamental para que eu conseguisse realizar esse trabalho. Agradeço pelos dias incansáveis de sacrifícios e experimentos, pela assistência intelectual e emocional e pelos cafés bem aproveitados. Sua generosidade ao dividir seu conhecimento tornou minha jornada acadêmica mais suave. Sou profundamente grata.

Agradeço ao Hyan Franco que se tornou um amigo querido ao longo dos anos de convívio. Obrigada por transformar os dias de trabalho em dias melhores, por sempre compartilhar conhecimentos aleatórios que só você tem e por toda ajuda durante minha trajetória. Eu o admiro pela maturidade precoce para o meio acadêmico e tenho certeza de que seu caminho será incrível, assim como você é. Espero estar por perto para acompanhar suas conquistas.

Agradeço a minha amiga, Andressa Guimarães, por todo apoio nesse último ano de doutorado. Suas palavras tranquilizadoras, reflexões sobre nosso lugar no mundo e a generosidade ao compartilhar seu conhecimento foram essenciais para concluir este trabalho. Sua chegada ao LFND foi uma grata surpresa que trouxe alegria para todos que têm o prazer de conviver ao seu lado no laboratório.

Agradeço a professora Elaine Oliveira, minha sincera gratidão pelo apoio concedido. Sua generosidade tornou possível o avanço deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento (LFND): Nilton França e Nelcir Rodrigues. Vocês são parte da construção desse trabalho, muito obrigada por se empenharem e por me ajudarem a tornar o projeto possível.

Ao meu amor, Igor Monassa, que me ensinou uma nova perspectiva sobre a vida, obrigada pelo dia a dia, pela parceria e por sonhar comigo. Sou profundamente grata por toda a nossa história, pelo presente e pelo futuro que construímos juntos todos os dias.

Eu agradeço a todas as pessoas de laboratórios “vizinhos” que nos ajudaram, sobretudo, após a pandemia da COVID19. A UERJ está repleta de pessoas que dedicam suas vidas a levar a ciência brasileira a outro patamar, agradeço por ter tido o auxílio de algumas delas.

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

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPERJ, que tornam possível não somente a realização deste, mas também de tantos outros trabalhos.

A educação é o poder das mulheres.

Malala Yousafzai

RESUMO

SILVA, Bruna Gonçalves da. **Efeito do consumo crônico do adoçante artificial sacarina sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante a lactação.** 2024. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A obesidade, definida pelo acúmulo excessivo de gordura corporal correlacionado ao aumento do risco de morbimortalidade, tornou-se uma pandemia nas últimas décadas. Paralelamente, o uso de adoçantes não calóricos (ANC), como uma estratégia para o controle de peso, tem crescido de forma constante. No entanto, estudos recentes têm revelado que os ANC não são compostos inertes e podem estar associados ao aumento da adiposidade e promover alterações metabólicas. A sacarina, um dos adoçantes artificiais mais consumidos no mundo, tem sido objeto de amplo debate em relação à sua segurança. Isso se deve à sua capacidade de ativar receptores de sabor doce (T1R2/T1R3) presentes em diversos órgãos, inclusive o tecido adiposo branco (TAB) influenciando o processo de adipogênese. A literatura sugere que seu consumo pode estar correlacionado com efeitos sobre a microbiota intestinal, tolerância à glicose, hiperinsulinemia, aumento do consumo alimentar e ganho de peso corporal. No entanto, há pouca compreensão sobre seus efeitos em mecanismos moleculares e no metabolismo energético mitocondrial dos adipócitos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto do consumo crônico de sacarina sobre os parâmetros endócrino-metabólicos e a função mitocondrial do tecido adiposo branco epididimal (TABE) em camundongos. Para induzir a obesidade realizamos o método de redução de ninhada (RN), no qual as ninhadas foram reduzidas a 3 filhotes machos por lactante ao 3º dia de vida. Aos 90 dias de vida, os grupos foram subdivididos em: grupo controle e obeso que receberam água contendo 0,3% de sacarina (C-SA e O-SA) por 3 meses e grupo controle e obeso que receberam apenas água (C-AG e O-AG). Os animais buscaram mais por adoçante do que por água, sugerindo um efeito viciante pelo mesmo. Os efeitos deletérios da sacarina foi observado principalmente no grupo controle, o qual apresentou aumento do peso corporal, da % de gordura corporal, hiperplasia do TABE, diminuição da expressão gênica Acetil-COA, ChREBP, PPAR α , FASn e da oxidação de carboidratos. Nos animais obesos, o consumo de sacarina foi associado ao aumento da peroxidação lipídica no TABE e à diminuição da oxidação de ácidos graxos e carboidratos, além da diminuição da expressão gênica de FABP4, SREBP-1, PPAR γ , LPL apesar de melhorar a resposta à glicose no teste de tolerância. Propomos que a sacarina age sobre a adiposidade corporal influenciando no metabolismo energético e na regulação da tolerância a glicose de maneira diferente frente ao estado nutricional do animal. Seu consumo elevado apresenta potencial de risco sobretudo para animais eutróficos contribuindo para o aumento da adiposidade nesse grupo e seu uso excessivo deve ser desencorajado sobre tudo para fins de perda de peso.

Palavras-chave: redução de ninhada; obesidade; sacarina; adoçantes não calóricos; tecido adiposo branco.

ABSTRACT

SILVA, Bruna Gonçalves da. **Effect of chronic consumption of the artificial sweetener saccharin on metabolic parameters and mitochondrial activity of white adipose tissue in hyperfed obese mice during lactation.** 2024. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Obesity, defined by the excessive accumulation of body fat correlated with an increased risk of morbidity and mortality, has become a pandemic in recent decades. In parallel, the use of non-caloric sweeteners (NCS) as a weight control strategy has steadily grown. However, recent studies have revealed that NCS are not inert compounds and may be associated with increased adiposity and the promotion of metabolic changes. Saccharin, one of the most widely consumed artificial sweeteners in the world, has been the subject of extensive debate regarding its safety. This is due to its ability to activate sweet taste receptors (T1R2/T1R3) present in various organs, including white adipose tissue (WAT), influencing the process of adipogenesis. The literature suggests that its consumption may be correlated with effects on gut microbiota, glucose tolerance, hyperinsulinemia, increased food intake, and body weight gain. However, there is little understanding of its effects on molecular mechanisms and mitochondrial energy metabolism in adipocytes. Therefore, the present study aimed to evaluate the specific impact of saccharin consumption on endocrine-metabolic parameters and mitochondrial function of epididymal white adipose tissue (EWAT) in mice. To induce obesity, we applied the litter reduction method (LR), in which litters were reduced to 3 male pups per dam on the 3rd day of life. At 90 days of life, the groups were subdivided into: control and obese groups that received water containing 0.3% saccharin (C-SA and O-SA) for 3 months and control and obese groups that received only water (C-AG and O-AG). The animals sought sweeteners more than water, suggesting an addictive effect. The deleterious effects of saccharin were mainly observed in the control group, which showed an increase in body weight, body fat percentage, EWAT hyperplasia, and a decrease in gene expression of Acetyl-CoA, ChREBP, PPAR α , FASN, and carbohydrate oxidation. In obese animals, saccharin consumption was associated with increased lipid peroxidation in EWAT and decreased oxidation of fatty acids and carbohydrates, as well as a reduction in gene expression of FABP4, SREBP-1, PPAR γ , and LPL, despite improving glucose response in the tolerance test. We propose that saccharin acts on body adiposity by influencing energy metabolism and glucose tolerance regulation differently depending on the animal's nutritional status. Its high consumption presents a potential risk, particularly for eutrophic animals, contributing to increased adiposity in this group, and its excessive use should be discouraged, especially for weight loss purposes.

Keywords: litter reduction; obesity; saccharin; non-caloric sweeteners; white adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processos através dos quais a obesidade leva à comorbidades.....	20
Figura 2 - Projeção da prevalência de obesidade ($IMC \geq 30\text{kg/m}^2$) no Brasil.....	21
Figura 3 - Potenciais mecanismos envolvidos na programação metabólica materna e pós-natal.....	24
Figura 4 - Efeitos fisiopatológicos da hiperalimentação durante a lactação em roedores.....	26
Figura 5 - Deposição ectópica de gordura sobre os tecidos.....	30
Figura 6 - Representação esquemática do tecido adiposo como um órgão endócrino.....	31
Figura 7 - Processo de captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e biossíntese de triacilglicerol.....	34
Figura 8 - Achados sobre os efeitos do consumo de adoçantes não calóricos em roedores....	39
Figura 9 - Estrutura química da sacarina.....	41
Figura 10 - Principais vias de absorção, digestão, metabolismo e excreção da sacarina.....	43
Figura 11 - Estrutura do receptor heterodímero de sabor doce (T1R2/T1R3).....	44
Figura 12 - Órgãos extraorais em que os receptores de sabor doce (T1R2/T1R3) são expressos	45
Figura 13 - Sinalização através do T1R2/T1R3 em células do tipo II de botões gustativos, no intestino e em células β do pâncreas.....	47
Figura 14 - Modelo de redução de ninhada e delineamento dos grupos experimentais.....	53
Figura 15 - Consumo de ração (em gramas) dos grupos controles e obesos até 180 dias.....	64
Figura 16 - Consumo de calorias (kcal) dos grupos controles e obesos até 180 dias.....	65
Figura 17 - Consumo acumulado de ração e calorias dos grupos controles e obesos.....	66
Figura 18 - Ingestão semanal de líquidos pelos camundongos dos 90 aos 180 dias.....	67
Figura 19 - Ingestão acumulada de líquidos pelos camundongos dos 90 aos 180 dias.....	68
Figura 20 - Ganho de massa corporal de camundongos até 180 dias.....	69
Figura 21 - Componentes da composição corporal de camundongos aos 90 e 180 dias.....	70
Figura 22 - Tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal e seus respectivos pesos relativos em camundongos aos 180 dias.....	72
Figura 23 - Glicemia e insulinemia de jejum de camundongos aos 180 dias.....	74
Figura 24 - Índice de resistência à insulina de camundongos aos 180 dias.....	75
Figura 25 - Teste intraperitoneal de tolerância a glicose de camundongos aos 180 dias	76

Figura 26 - Análise histológica qualitativa do tecido adiposo branco epididimal de camundongos aos 180 dias.....	77
Figura 27 - Análise histológica quantitativa do tecido adiposo branco epididimal de camundongos aos 180 dias.....	78
Figura 28 - Avaliação da expressão de mRNA dos receptores de sabor doce no TABE de camundongos aos 180 dias.....	78
Figura 29 - Avaliação da expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo glicídico e lipídico no TABE de camundongos aos 180 dias.....	79
Figura 30 - Níveis de malondialdeído no TABE e sangue de camundongos.....	81
Figura 31 - Atividade da catalase no tecido adiposo epididimal de camundongos.....	82
Figura 32 - Respirometria de alta resolução (protocolo de carboidratos).....	83
Figura 33 - Respirometria de alta resolução (protocolo de ácidos graxos).....	84
Figura 34 - Ilustração dos efeitos da obesidade em camundongos adultos.....	86
Figura 35 - Ilustração dos efeitos do consumo crônico de sacarina em camundongos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subdivisões dos grupos controles e obesos e suas respectivas siglas.....	54
Tabela 2 - Composição nutricional da ração padrão Nuvilab CR-1®.....	54
Tabela 3 - Ensaio de expressão gênica e referências das sequências de iniciadores específicos utilizados no PCR em tempo real.....	61
Tabela 4 - Parâmetros biométricos de camundongos controles e obesos aos 180 dias.....	73
Tabela 5 - Apresentação dos principais resultados encontrados no presente estudo.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AgRP	Peptídeo agouti
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Adenosina monofosfato
ANC	Adoçante não calórico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT2R	Receptor do tipo 2 de angiotensina
ATP	Adenosina trifosfato
C/EBP α	Proteínas de ligação a potenciadores de CCAAT
C-AG	Controle água
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética do instituto de biologia Roberto Alcantara Gomes
CID-10	Código internacional de doenças 10
COBEA	Colégio Brasileiro de Exeperimentação Animal
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase do tipo 1
CPT-2	Carnitina palmitoil transferase do tipo 2
CREB	Proteína de ligação do elemento de resposta do AMPc
C-SA	Controle sacarina
CT	Comprimento da tibia
DAG	Diacilglicerol
DM2	Diabetes mellitus 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRC	Domínio curto rico em cisteína
DTM	Domínio transmembrana
DTV	domínio do trapézio de Vênus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDTA-free	Livre de ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FABP	Proteína de ligação a ácidos graxos
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FAS	Ácido graxo sintase
FAT	Translocador de ácido graxos
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA _B	Receptores metabotrópicos transmembranares
GDA	Grande domínio aminoterminal
GHSR	Receptor de grelina
GIP	Péptido insulínico dependente da glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
HCL	Ácido clorídrico
IDA	Ingestão diária aceitável
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
IP3	Inositol trifosfato
IP ₃ -R	Inositol trifosfato receptor
IRI	Índice de resistência a insulina
JAK2	Janus quinase 2
JECFA	<i>Codex Alimentarius, do Joint Expert Committee on Food Additives</i>
LPL	Lipoproteína lipase
Malonil-CoA	Malonil coenzima A

Mir05	Solução de Respirometria Mitocondrial 5
miRNA	Micro RNA
MR	Medidas repetidas
N	Número de animais por grupos
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NPY	Neuropeptídeos Y
O-AG	Obeso água
OMS	Organização mundial de saúde
O-SA	Obeso sacarina
PAI-1	Inibidor de atividade de plasminogênio 1
PCR	Reação de polimerização em cadeia em tempo real
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PLC-β2	Fosfolipase C específica de fosfoinosítídeo beta
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPAR	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PPAR α	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR γ	Receptor gamma ativado por proliferador de peroxissoma
PPAR δ	Receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma
PYY	Peptídeo YY
RAPGs	Receptores acoplados à proteína G
RCR	Razão do controle respiratório
Rf	Ração fornecida
Ri	Ração ingerida
RM	Ressonância magnética
RMN	Ressonância magnética nuclear
RN	Redução de ninhada
RNA	Ácido ribonucleico
SBEM	Sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia
SGLT-1	Co-transportadores de glicose dependentes de sódio
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Enzima superóxido dismutase
SREBP-1	Proteínas ligadoras de elementos reguladores de esterol tipo 1

STAT3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição tipo 3
T0	Tempo zero (antes da infusão de glicose)
T120	Tempo cento e vinte (após 120 minutos da infusão de glicose)
T1R2	Receptor de sabor tipo 1 membro 2
T1R3	Receptor de sabor tipo 1 membro 3
T30	Tempo trinta (após 30 minutos da infusão de glicose)
T60	Tempo sessenta (após 60 minutos da infusão de glicose)
T90	Tempo noventa (após 90 minutos da infusão de glicose)
TAB	Tecido adiposo branco
TABE	Tecido adiposo branco epididimal
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
TG	Triglicerídeos
TITG	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TRPM5	Membro 5 da subfamília do canal catiônico do receptor transiente
UCP1	Proteína desacopladora do tipo 1
VIGITEL	Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
α 1	Subunidade catalítica da AMPK
β 2	beta adrenoceptor 2
β 3	beta adrenoceptor 3
3T3L1	Linhagem celular derivada de 3T3

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	Quilogramas
m ²	Metros quadrados
%	Porcentagem
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilograma
ml	Mililitros
Ca ²⁺	Íons de cálcio
±	Mais ou menos
°C	Graus celsius
g	Gramas
N	Número de animais por grupo
mm	Milímetros
Nm	Nanómetro
µUI/ml	Microunidades internacionais por mililitros
mmol/L	Milimol por litro
Pmol	Picomolar
cm	Centímetros
g/kg	Gramas por quilogramas
pH	Potencial hidrogeniônico
O ₂	Oxigênio
Mm	Milimolar
µl	Microlitros
µg	Microgramas
P	Probabilidade de significância
<	Menor
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
1 JUSTIFICATIVA	50
2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Animais e modelo experimental	52
3.2 Composição nutricional da ração padrão Nuvilab	54
3.3 Composição e obtenção do adoçante artificial sacarina	55
3.4 Análise do consumo alimentar e da ingestão de líquidos	55
3.4.1 <u>Consumo alimentar e ingestão de líquidos ao longo do tempo</u>	55
3.4.2 <u>Consumo alimentar e ingestão de líquidos acumulados</u>	56
3.5 Análise do ganho de massa corporal ao longo do crescimento	56
3.6 Ressonância magnética nuclear (RMN)	56
3.7 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)	57
3.8 Eutanásia e coleta de tecidos	57
3.9 Mensuração do tecido adiposo branco epididimal e outros órgãos	58
3.10 Comprimento naso-anal e comprimento da tíbia	58
3.11 Dosagem de glicose e insulina	58
3.12 Índice de resistência à insulina em jejum (IRI)	59
3.13 Análise morfológica do tecido adiposo branco epididimal	59
3.13.1 <u>Processamento histológico do tecido adiposo branco epididimal</u>	59
3.13.2 <u>Análise qualitativa e quantitativa do tecido adiposo branco epididimal</u>	59
3.14 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	59
3.14.1 <u>Extração do RNA total</u>	60
3.14.2 <u>PCR em tempo real</u>	60
3.15 Biomarcadores do estresse oxidativo	61
3.15.1 <u>Níveis de TBARS</u>	61
3.15.2 <u>Medida da catalase</u>	62
3.16 Análise da função mitocondrial por respirometria de alta resolução	62
3.17 Análise estatística	63
4 RESULTADOS	64
4.1 Consumo alimentar	64
4.1.1 <u>Consumo alimentar de camundongos do desmame até 180 dias de vida</u>	64
4.1.2 <u>Consumo acumulado de ração do desmame até 180 dias de vida</u>	65
4.2 Ingestão líquidos	66
4.2.1 <u>Ingestão de líquidos ao longo da intervenção</u>	66
4.2.2 <u>Ingestão acumulada de líquidos dos grupos controles e obesos</u>	67
4.3 Ganho de massa corporal ao longo do crescimento	68
4.4 Análise de componentes da composição corporal por RMN	69

4.5 Parâmetros biométricos	71
4.6 Dosagem sérica de glicose e insulina em jejum	74
4.7 Índice de resistência à insulina (IRI)	75
4.8 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)	75
4.9 Análise morfológica do tecido adiposo branco epididimal	76
4.10 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real)	78
4.11 Análise de biomarcadores do estresse oxidativo (MDA e catalase)	81
4.11.1 <u>Peroxidação lipídica (TBARS)</u>	81
4.11.2 <u>Análise da catalase</u>	82
4.12 Respirometria de alta resolução no tecido adiposo branco epididimal	82
4.12.1 <u>Metabolismo de carboidratos no tecido adiposo epididimal de camundongos</u>	82
4.12.2 <u>Metabolismo de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal de camundongos</u>	83
4.13 Principais resultados encontrados	84
5 DISCUSSÃO	88
5.1 Efeitos causados pela condição de obesidade em animais adultos	88
5.2 Efeitos causados pelo consumo crônico de sacarina em animais adultos	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS	105
ANEXO A – Submissão do artigo ao Jornal Europeu de Nutrição (EJON) referente aos dados obtidos durante o Doutorado	123
ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA), (IBRAG/UERJ)	124
ANEXO C – Ficha de Informações e Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) - Sacarina124	125

INTRODUÇÃO

Obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como o acúmulo excessivo da massa adiposa corporal correlacionado ao aumento de comorbidades e redução da qualidade de vida. Esse cenário vem sendo associado a uma série de efeitos deletérios, como: desregulação metabólica do tecido adiposo, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial aumentando o risco de doenças potencialmente fatais, incluindo dislipidemias, doenças cardiovasculares, resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial. Além disso, a obesidade é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Figura 1) (SONG et al., 2015; ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018; BRASIL, 2022; OMS, 2023; DELVECCHIO et al., 2024).

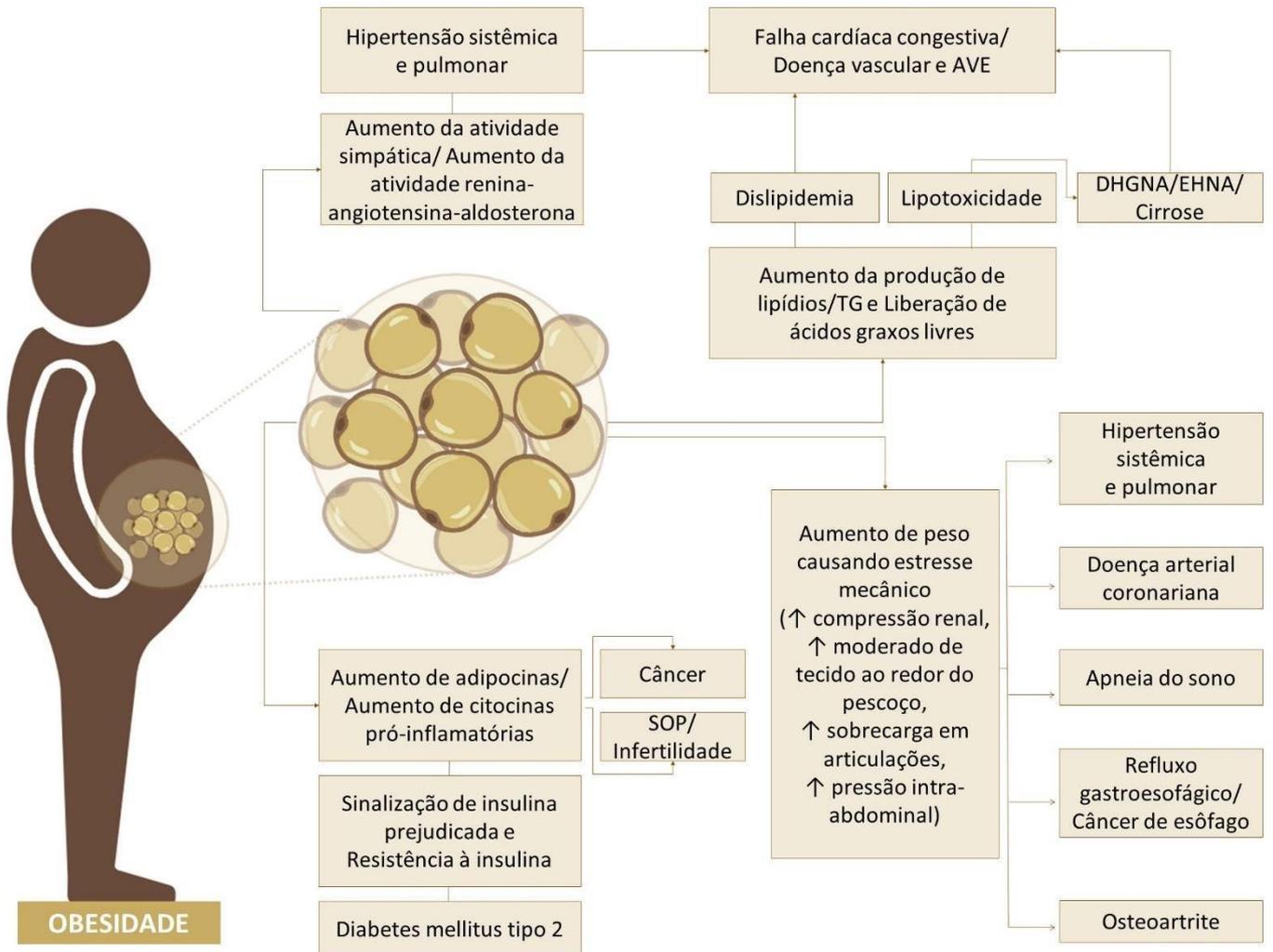
Por essa razão, a obesidade, por si só, é considerada uma condição integrante do grupo de doenças crônicas não transmissíveis (UPADHYAY et al., 2018), categorizada na 10ª revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), no item de doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas (CID10, 1992; DIAS et al., 2017). Dados da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, 2016), apontam que a perda de 5% a 10% do peso corporal pode ser suficiente para reduzir significativamente as complicações associadas a essa condição e, conseqüentemente, a mortalidade relacionada a elas. A obesidade é considerada a doença evitável mais comum (KHANNA et al., 2022).

Sua etiologia não resulta exclusivamente da alta disponibilidade de alimentos hipercalóricos pois, é uma condição crônica, complexa e multifacetada, difícil de ser definida (DIAS et al., 2017; UPADHYAY et al., 2018; BOUCHARD et al., 2021; KHANNA et al., 2022). De acordo com a literatura, é uma doença que envolve diversos aspectos, que incluem influências ambientais, interação entre genética e predisposição epigenética, nutrição, estilo de vida (COMPARE et al., 2016), qualidade e duração do sono (THEORELL-HAGLÖW; LINDBERG, 2016), modificações na microbiota gastrointestinal (GRAHAM; MULLEN; WHELAN, 2015) e aspectos psicológicos que podem resultar em uma batalha contínua contra o excesso de peso ao longo da vida (COLLINS; MENG; ENG, 2016).

Entretanto, é evidente que a sua principal causa é o desbalanço energético positivo crônico (HALL, 2018; MELLO et al., 2018), onde ocorre o desequilíbrio entre o consumo de calorias e o gasto energético. Tal desequilíbrio resulta no acúmulo excessivo de energia e

disfunção do tecido adiposo, o que pode potencializar o estado de doença metabólica do indivíduo (ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018; KHANNA et al., 2022).

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



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

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

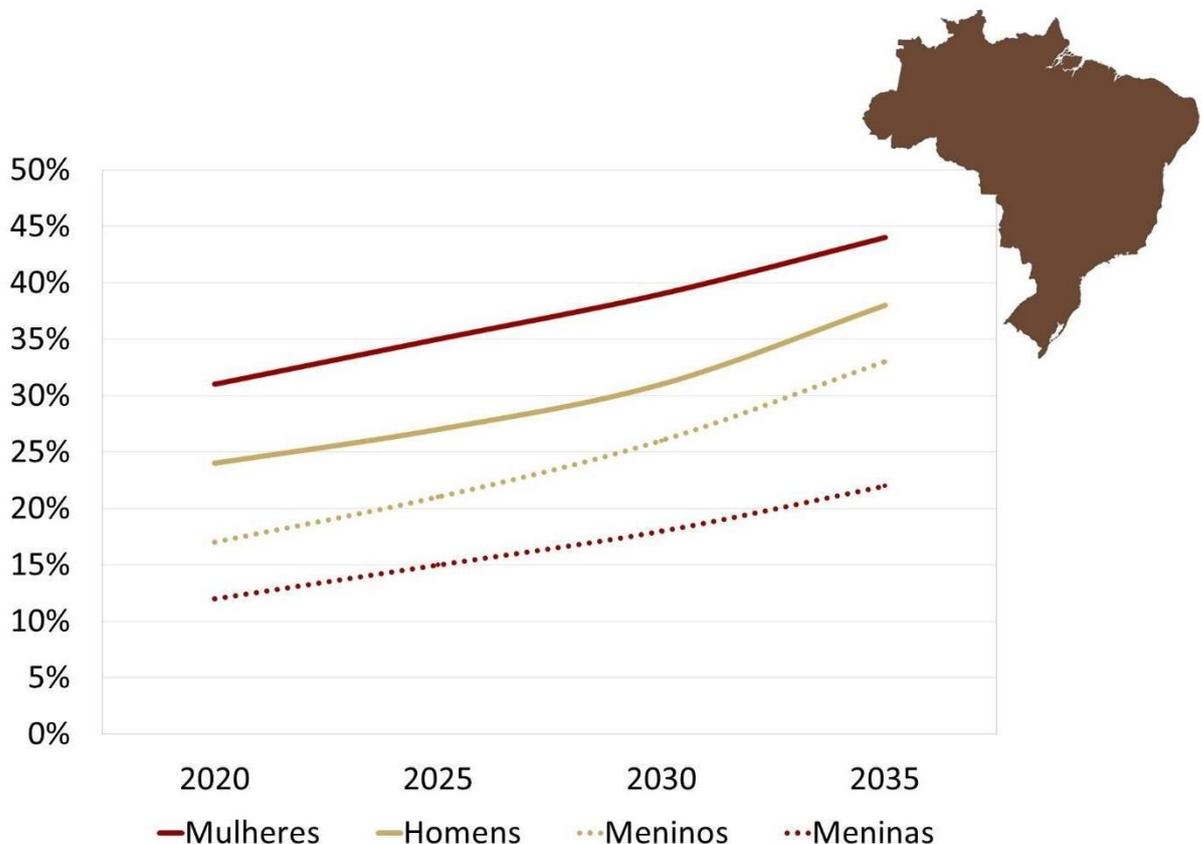
Fonte: Adaptado: UPADHYAY et al., 2018. Feito com Biorender (www.biorender.com).

A obesidade é considerada a maior desordem nutricional de magnitude pandêmica, em decorrência de seu crescimento nas últimas décadas representando, portanto, um desafio global para a saúde pública (MELLO et al., 2018; GREEN et al., 2020). A prevalência da obesidade aumentou acentuadamente, nos últimos 50 anos, nenhum país mostrou redução da doença. Apenas alguns países de renda elevada apresentaram estatísticas estabilizadas, mas o mesmo

não ocorreu nos países mais pobres (UPADHYAY et al., 2018; PANUGANTI; NGUYEN; KSHIRSAGAR, 2023).

Segundo o atlas da obesidade, publicado em 2023, atualmente os índices globais indicam que 38% da população apresenta sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25\text{kg/m}^2$), 14% obesidade ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$) e a estimativa global para 2035 é que esses números aumentem para 51% e 24%, respectivamente (WOF, 2023). No Brasil, a situação também é alarmante, segundo os dados mais recentes fornecidos pelo Ministério da Saúde, cerca de 22% da população é classificada com obesidade (VIGITEL, 2022). A estimativa é que em 2035 a população brasileira chegue a 41% de obesidade (Figura 2) (WOF, 2023).

Figura 2 – Projeção da prevalência de obesidade ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$) no Brasil



Legenda: % = porcentagem;

Nota: Prevalência da obesidade no mundo em 2016;

Fonte: Adaptado: WOF, 2023.

O diagnóstico de sobrepeso e obesidade é realizado por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), representado por: $IMC = \text{massa corporal (kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$. Através desse método de avaliação física é possível categorizar indivíduos adultos como obesos, quando apresentam IMC igual ou superior a 30 kg/m^2 (HARPER; ZISMAN, 2016; WEI; JAN, 2024). Segundo Kilov (2018), quando esse índice supera 40 kg/m^2 (obesidade extrema ou grave) pode reduzir a expectativa de vida em 10 anos. Embora seja amplamente utilizado em estudos populacionais para avaliação da prevalência da obesidade, o IMC apresenta baixa especificidade, visto que não leva em consideração a composição corporal, como por exemplo a proporção de massa muscular e gordura dos indivíduos (ORTEGA; LAVIE; BLAIR, 2016; DIAS et al., 2017; RYAN; KAHAN, 2018). O percentual de gordura, por exemplo, é altamente variável em seres humanos, dados demonstram valores entre 5 e 60% de gordura corporal total ((SANTILLANA et al., 2023).

O custo global com obesidade e complicações causadas pela mesma, tem o impacto de 1,96 bilhões de dólares em 2020 e a projeção é que aumente para mais de US\$ 4 trilhões em 2035. Estes impactos econômicos são equiparados aos gastos estimados da COVID-19 durante o ano de 2020 (WOF, 2023). A obesidade é considerada um dos principais encargos sociais globais, sendo apenas superada pelo tabagismo, violência armada, guerra e terrorismo (KUSHNER; SCOTT, 2018).

Embora a epidemia da obesidade seja uma questão global, evidências indicam a disfunção no controle central do peso corporal, seja amplamente influenciada por predisposição genética (até 80%) em populações que desenvolvem obesidade grave e precoce (FACCIOLI et al., 2023). Acredita-se que a obesidade estabelecida na idade adulta seja um processo prospectivo que se inicia na infância. Sob esta perspectiva, a literatura relata que alterações nutricionais no ambiente intrauterino e pós-natal podem promover o desenvolvimento da obesidade e comprometimento de diferentes órgãos centrais e periféricos, que resultam em comorbidades associadas ao ganho de peso e à síndrome metabólica (Figura 3) (HABBOUT et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2024).

Programação metabólica e obesidade

A programação metabólica refere-se a alterações fisiológicas ou ambientais, ocorridas em períodos críticos da vida, capazes de gerar efeitos duradouros. Essas alterações podem afetar os processos fisiológicos e, em determinadas circunstâncias, resultar no surgimento de patologias (HABBOUT et al., 2013, XAVIER et al., 2019). No período que se estende desde a

pré-concepção até a primeira infância, conhecido como primeiros 1000 dias de vida, ocorre uma fase crítica do desenvolvimento em que a atividade de *imprinting* do DNA é mais intensa. Mudanças epigenéticas durante esse período exercem um impacto permanente na expressão dos genes e são frequentemente desencadeadas por influências ambientais que ocorrem nessa fase. Portanto, distúrbios que ocorram durante esse período, especialmente aqueles relacionados a ingestão nutricional, terá promove efeitos duradouros difíceis de corrigir a longo prazo (Figura 3) (SIMEONI et al., 2014; WARDOYO et al., 2023).

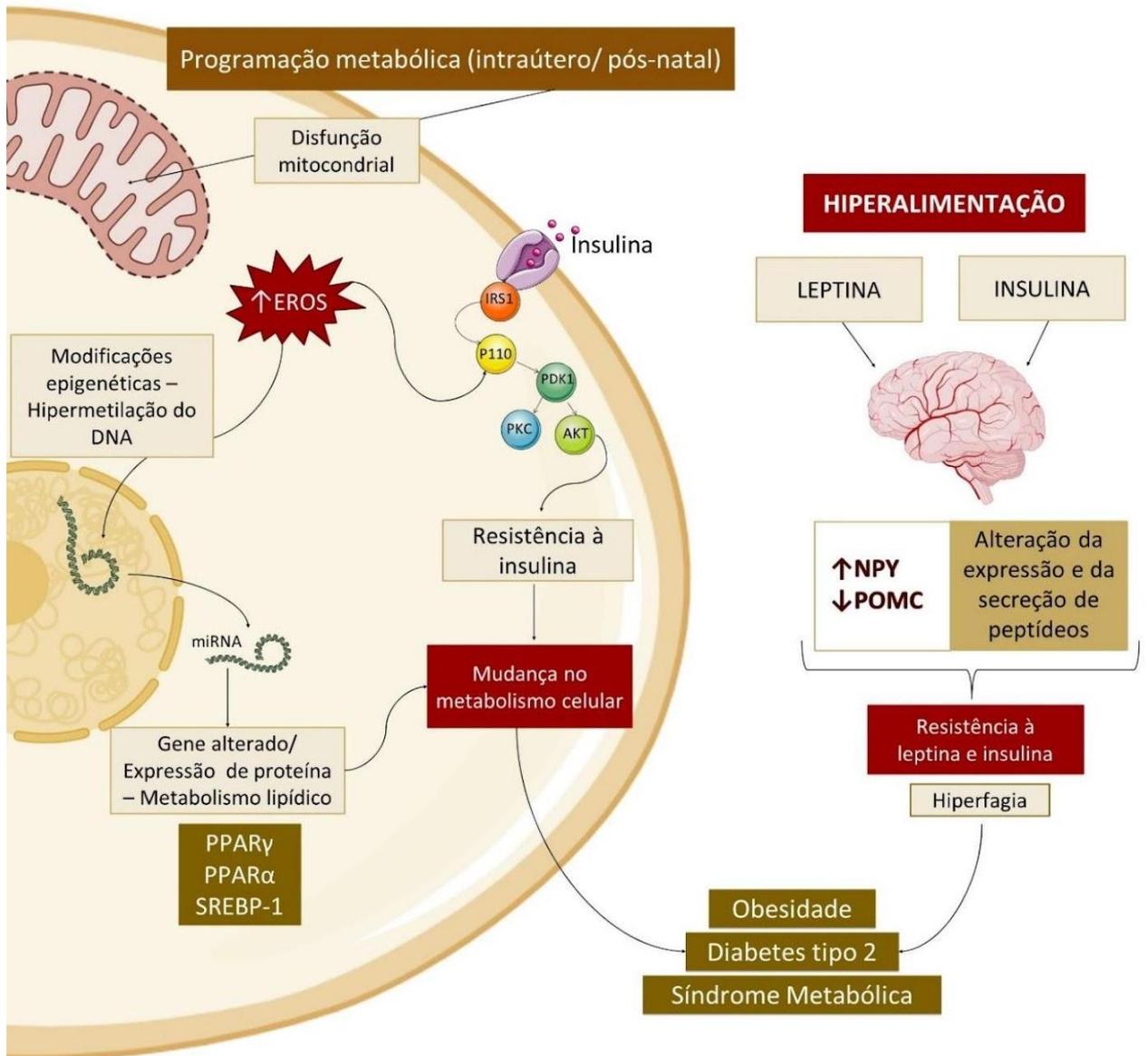
Como dito anteriormente, a obesidade é uma condição que pode ser resultante de modificações nutricionais que ocorram durante as janelas críticas do crescimento, as quais podem programar alterações metabólicas importantes na prole (LI et al., 2018; MILLIKEN-SMITHA; POTTER, 2018; WARDOYO et al., 2023). O estado nutricional dos pais vem sendo estabelecido como um dos principais fatores determinantes para o excesso de peso dos filhos. Segundo a literatura, a probabilidade de obesidade em filhos é 2,5 a 4 vezes maior quando um dos pais tem obesidade, e chega a ser 10 vezes maior quando ambos apresentam esse quadro. Tal fato é decorrente tanto de possíveis hábitos obesogênicos compartilhados entre a família, quanto de fatores genéticos transmitidos para os filhos (REILLY et al., 2005; STRYJECKI; ALYASS; MEYRE, 2018).

Gestantes obesas possuem menor capacidade de adaptação às alterações metabólicas inerentes à gestação o que aumenta a suscetibilidade a intercorrências como dislipidemia e diabetes gestacional (NASCIMENTO et al., 2018). Proles de mães obesas demonstraram hipertrofia dos adipócitos e aumento da expressão do PPAR γ , assim como redução da expressão dos adrenoreceptores β 2 e β 3, indicativo de aumento na regulação da lipogênese e diminuição da lipólise (SAMUELSSON et al., 2008). Portanto, a qualidade do ambiente em que os fetos e embriões são expostos é capaz de induzir mudanças no fenótipo das crianças ao longo da vida, tanto do ponto de vista morfológico quanto metabólico (Figura 3) (LILLYCROP; BURDGE, 2011).

Além disso, alguns estudos demonstram uma associação entre marcadores do estresse oxidativo, obesidade, resistência à insulina e diabetes, devido a alterações na cascata de sinalização da insulina (URAKAWA et al., 2003; NISHIKAWA et al., 2007). O estresse oxidativo desempenha um papel importante no quadro doenças metabólicas, influenciando as vias e sinais críticos que controlam a reprogramação genética e epigenética nesses distúrbios (KLISIC et al., 2024). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pode ser o evento que precede o início da resistência à insulina e obesidade em resposta à má nutrição materna, indicado pelo aumento da expressão de genes associados ao estresse oxidativo na placenta de

mães obesas e no músculo esquelético da prole (YANG et al., 2015). O acúmulo de ERO, seja pela superprodução ou como defesa antioxidante ineficiente, pode levar a danos irreversíveis às mitocôndrias, como frequentemente observado em doenças metabólicas e inflamatórias (KLISIC et al., 2024).

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



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

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

Fonte: Adaptado: ALFARADHI; OZANNE, 2011. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Inúmeros mecanismos fisiológicos e metabólicos atingem a maturação completa somente após o nascimento (GLUCKMAN; HANSON, 2007). O período pós-natal também é conhecido como “janela crítica para a programação”, e representa uma fase na qual o desenvolvimento da prole, incluindo o sistema nervoso, continua a ser suscetível a insultos que levam a alterações fisiológicas permanentes, aumentando a predisposição a doenças metabólicas na vida adulta (LISBOA et al., 2012; FIDALGO et al., 2013; ELLSWORTH et al., 2018; WARDOYO et al., 2023).

Por essa razão, para induzir a obesidade em nossos animais, utilizamos o método de redução de ninhada (RN) durante o período da lactação, descrito por Plagemann e colaboradores em 1992. Os autores demonstraram que a redução do número de filhotes ao 3º dia pós-natal é capaz de promover aumento da adiposidade, desenvolvimento de hiperleptinemia e hipertensão em ratos adultos alimentados com dieta comercial padrão (normocalórica) após o desmame (Figura 4 e Figura 11).

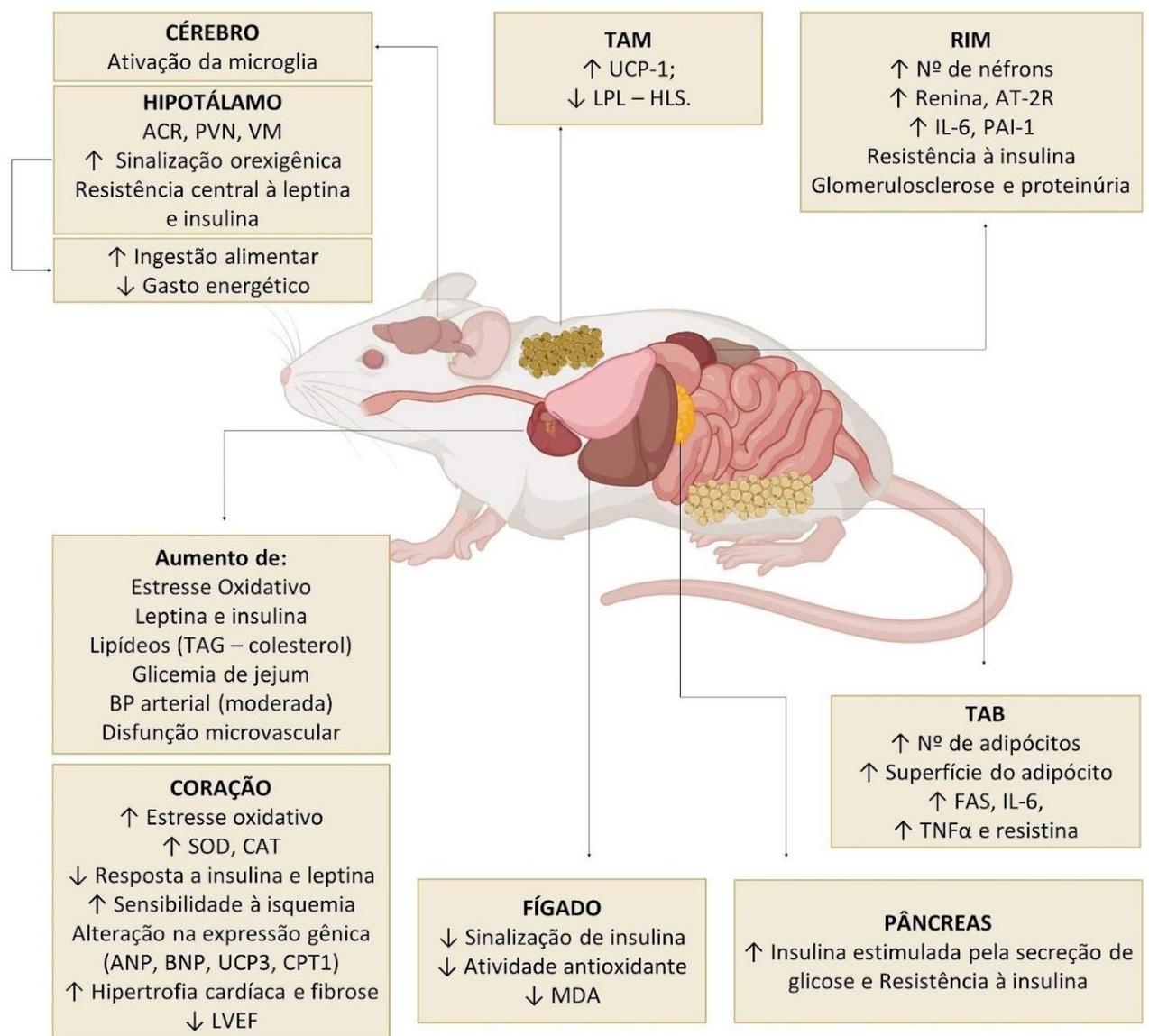
Esses desfechos, vistos por Plagemann, resultantes da simples intervenção de reduzir o tamanho da ninhada ao 3º dia pós-natal, são atribuídos a diferentes justificativas. Porém, a principal delas é que, em circunstâncias normais, mães roedoras possuem menor número de mamilos do que de filhotes, o que resulta em uma competição pela amamentação entre a prole. No entanto, no modelo de RN o número de mamilos da mãe é superior ao número de filhotes, promovendo maior disponibilidade de leite sem a necessidade de competir pelo mesmo (PECKHAM, 1979; SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

Adicionalmente a essa justificativa, nosso grupo de pesquisa já demonstrou em estudo prévio que a prole de ninhadas reduzidas ingere cerca de 1,5 vezes mais leite do que ninhadas de tamanhos normais. Além disso, observamos que a composição do leite materno é modificada após a RN, tornando-se um leite com maior teor de gordura e diminuída quantidade de proteínas (CUNHA et al., 2009). O que também foi visto posteriormente por outro autor (XAVIER et al., 2019). Portanto, esses fatores podem elucidar o surgimento da obesidade nesses animais na fase adulta.

A hiperalimentação durante a lactação (causada pela maior ingestão de leite e modificação na composição do leite materno de ninhadas reduzidas), pode promover alterações persistentes nas vias de sinalização que controlam a ingestão alimentar e o gasto energético através da síntese de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo, integrando-os com sinais periféricos do estado nutricional. A desregulação na expressão hipotalâmica desses neuropeptídeos está associada à obesidade (Figura 3) (ALFARADHI; OZANNE, 2011).

A literatura científica reforça que a ocorrência de alterações nos processos epigenéticos são fortemente influenciadas pelo ambiente, e são mecanismos pelos quais a hiperalimentação pós-natal pode aumentar a susceptibilidade à obesidade (Figura 3). O termo epigenética refere-se aos processos que induzem alterações hereditárias na expressão do gene sem alterar a sequência de nucleotídeos (LILLYCROP; BURDGE, 2011; DIECKMANN; CZAMARA, 2024; ABOUD; TUPPER; JIALAL, 2024). Animais submetidos à RN apresentam hipermetilação da pró-opiomelanocortina (POMC), um gene essencial para a regulação do peso corporal que resulta no aumento da prevalência da obesidade e em alterações da homeostase energética e do apetite (PLAGEMANN et al., 2009). Alguns efeitos descritos na literatura causados pela RN na prole são demonstrados na Figura 4.

Figura 4 - Efeitos fisiopatológicos da hiperalimentação durante a lactação em roedores



Legenda: TAG = triglicerídeos; TAB = tecido adiposo branco; TAM = tecido adiposo marrom; UCP-1 = proteína desacopladora do tipo 1; LPL = lipoproteína lipase; LHS = lipase hormônio sensível; FAS = ácido graxo sintase; TNF- α = fator de necrose tumoral; IL-6 = interleucina 6; AT2R = receptor do tipo 2 de angiotensina; PAI-1 = inibidor-1 do ativador do plasminogênio;

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

Fonte: Adaptado: HABBOUT et al., 2013. Feito com Biorender (www.biorender.com).

A regulação da alimentação é exercida pelos níveis circulantes de grelina, leptina e insulina. A insulina um hormônio peptídico endócrino que se liga aos receptores na membrana plasmática das células-alvo, coordena a resposta anabólica de acordo com a disponibilidade de nutrientes (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Apresenta um papel neurotrófico na regulação da ingestão alimentar e demonstrou envolvimento na formação de sinapse, morfogênese dendrítica e plasticidade (ALFARADHI; OZANNE, 2011). Além disso, a insulina promove *feedback* negativo sobre os neurônios do núcleo arqueado (predominantemente nos neurônios NPY e AgRP), emitindo um sinal de saciedade. Este efeito é reduzido no período pós-natal em ratos hiperalimentados, sugerindo resistência à insulina induzida durante o desenvolvimento da prole e que persiste na vida adulta (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007). Plagemann et al., (2009) observaram que ratos de ninhadas reduzidas apresentaram hipermetilação do receptor de insulina hipotalâmico e, conseqüentemente, resistência à insulina hipotalâmica, hiperfagia e obesidade em ratos jovens.

A leptina, hormônio produzido nos adipócitos, apresenta níveis elevados em indivíduos obesos associado ao quadro de resistência à sua ação. Age como fator de sinalização no tecido adiposo e no sistema nervoso central (SNC), promove a redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético, através da inibição dos neurônios orexigênicos produtores de NPY/AgRP e ativação dos neurônios anorexigênicos (EGUCHI et al., 2008; OSÓRIO, 2015; PANUGANTI; NGUYEN; KSHIRSAGAR, 2023). No modelo de hiperalimentação por RN, foi descrito que animais apresentam hiperleptinemia (PEREIRA et al., 2006; PLAGEMANN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2024). Na idade adulta, esses animais apresentam resistência hipotalâmica à leptina, caracterizada pela redução no conteúdo de JAK2 e menor fosforilação de STAT3, principais proteínas envolvidas na via de sinalização da leptina (Figura 4) (RODRIGUES et al., 2011).

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa documentou achados que reforçam que animais de ninhadas reduzidas apresentaram alterações prejudiciais, tais como: aumento da secreção de insulina e dos níveis de GLUT2 nas ilhotas pancreáticas, hipertrofia do ventrículo esquerdo e resistência à insulina, alteração da sinalização da grelina via GHSR/PI3K e AKT no coração (MARTINS et al., 2008; CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; LACERDA-

MIRANDA et al., 2012), alterações na hemodinâmica cardíaca e deposição de colágeno (VIEIRA et al., 2015) em proles na idade jovem e/ou adulta (BERNARDO et al., 2016), prejuízo na via de sinalização da insulina em adipócitos de ratos (RODRIGUES et al., 2007), hipogrelinemia, acompanhada de aumento da regulação da via de sinalização de grelina no tecido adiposo de camundongos jovens (SOARES et al., 2012), aumento do peso corporal dos animais (MALAFAIA, 2018; GONÇALVES, 2019) e desenvolvimento de hiperfagia no período de lactação e na idade adulta (CUNHA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; GONÇALVES, 2019). A literatura científica respalda e reconhece o modelo de redução de ninhada como um método eficiente para induzir obesidade e suas correlações na prole.

Tecido adiposo

Compreender, de forma mais profunda, a relação entre obesidade e suas complicações frente ao cenário atual torna-se relevante e urgente. Nesse contexto, é crucial avaliar diversos aspectos, com especial destaque para o tecido adiposo e sua unidade celular, o adipócito, como o cerne dessa fisiopatologia.

O tecido adiposo é classificado como tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB). O adipócito marrom é caracterizado principalmente por gotículas lipídicas multiloculares com elevado número de mitocôndrias, que conferem a capacidade de produzir calor através da termogênese (REYES-FARIAS et al., 2021). Em contraste, o TAB desempenha um papel de destaque na homeostase energética, atuando principalmente como um reservatório de energia. No entanto, a visão tradicional do TAB como apenas um depósito de lipídios é obsoleta. Atualmente, ele é reconhecido como um órgão endócrino e sua formação durante o desenvolvimento ocorre a partir de células mesenquimatosas, os lipoblastos, os quais inicialmente apresentam múltiplas gotículas lipídicas em seu citosol. Contudo, à medida que amadurecem, as múltiplas gotículas lipídicas se coalescem formando uma única inclusão citosólica, que ocupa a maior parte do citosol da célula, correspondendo de 80% até 95% da massa celular (PINTO, 2014). Desta maneira, o adipócito maduro é denominado como tecido adiposo unilocular, pois cada adipócito contém uma gotícula lipídica grande e única, capaz de estocar energia excedente, principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG), em resposta a demandas nutricionais (ABENTE et al., 2016; ZAIYOU; AMRI; BAKILLAH, 2018).

A classificação do TAB baseia-se em sua distribuição corpórea, que abrange dois principais depósitos: o tecido adiposo visceral (TAV), compreende depósitos omentais, mesentéricos, retroperitoneais, gonadais e pericárdicos, e o tecido adiposo subcutâneo (TAS),

que está localizado sob a pele, e inclui a área glútea femoral e abdominal ou superior do corpo (Figura 5) (SANTILLANA et al., 2023). Cada depósito de tecido adiposo possui características bioquímicas distintas e desempenha funções metabólicas específicas. Evidências indicam que a distribuição do tecido adiposo tem impacto direto no metabolismo. O aumento do TAV está correlacionado com a desregulação metabólica, levando à intolerância à glicose, resistência à insulina e pior prognóstico de doenças (BÓDIS; RODEN, 2018; REYES-FARIAS et al., 2021). Estudos *in vitro* mostraram ainda, que adipócitos isolados do TAV apresentam elevados níveis de síntese lipídica e lipólise em comparação com adipócitos do TAS (WAJCHENBERG, 2000; RITCHIE; CONNELL, 2007; LEE; WU; FRIED, 2013).

Atualmente, acredita-se que uma capacidade diminuída de expansão do TAS favoreça a deposição de gordura visceral (SANTILLANA et al., 2023). Esse é considerado o principal problema do excesso de peso, a adiposidade abdominal, pois esta representa excesso de gordura visceral metabolicamente ativa, que envolve os órgãos e está associada à desregulação metabólica, predispondo os indivíduos à doença cardiovascular e condições relacionadas. (Figura 5) (PANUGANTI; NGUYEN; KSHIRSAGAR, 2023).

A hipertrofia dos adipócitos está associada a disfunção do tecido quando ocorre a hipersecreção de adipocinas pró-inflamatórias e redução do fluxo sanguíneo o que leva, em última instância, à hipóxia local, à inflamação e à infiltração de macrófagos associada a distúrbios metabólicos (LONGO et al., 2019; KAWAI et al., 2021). De fato, o tamanho dos adipócitos está intimamente ligado à funcionalidade do tecido adiposo e o TAV tende a ter adipócitos maiores em comparação ao TAS, essa disparidade sugere que o tamanho dos adipócitos desempenha um papel determinante na função patogênica ou protetora associada ao tecido adiposo (Figura 5) (QUEIROZ et al., 2009; REYES-FARIAS et al., 2021).

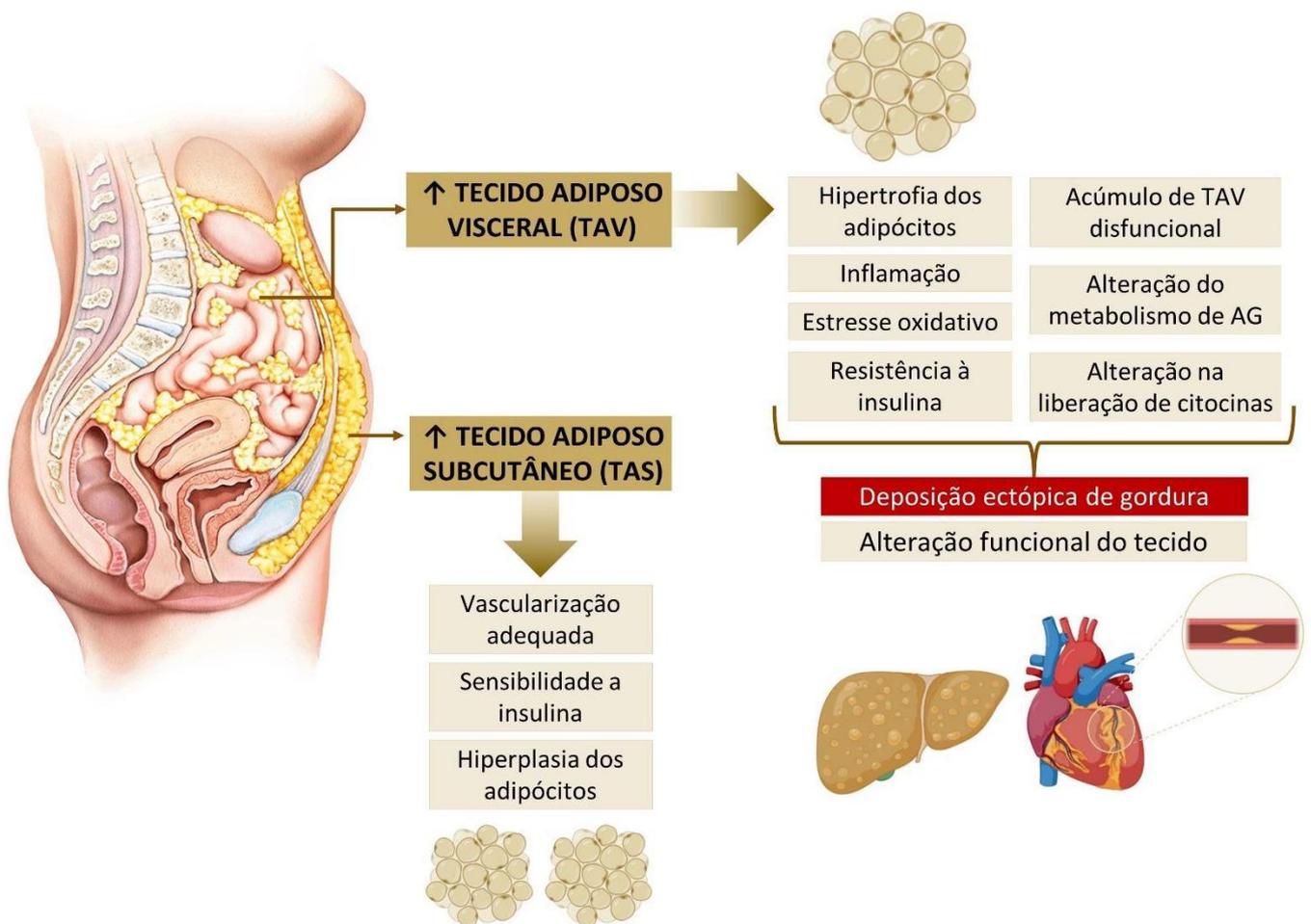
Ruderman e colaboradores (1982) introduziram o conceito de indivíduos obesos metabolicamente saudáveis. Curiosamente, indivíduos com obesidade e que não apresentam complicações metabólicas tendem a possuir adipócitos menores e mais numerosos, além de apresentarem níveis inferiores de inflamação e fibrose em comparação aos seus pares não saudáveis (REYES-FARIAS et al., 2021).

O TAB apresenta a capacidade de secretar moléculas endócrinas que regulam o metabolismo e assim, influencia aspectos como sensibilidade à insulina, controle do apetite, equilíbrio energético, resposta imune, angiogênese, pressão arterial e metabolismo de lipídios, por meio de proteínas bioativas secretadas pelos adipócitos, conhecidas como adipocinas. Em sua composição tecidual, além dos adipócitos, contém matriz extracelular (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, vasos sanguíneos, células do estroma vascular, nódulos linfáticos,

células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (FISCHER-POSOVSZKY; WABITSCH; HOCHBERG, 2007; ABENTE et al., 2016; SANTILLANA et al., 2023).

As células adiposas possuem todas as enzimas e proteínas necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar TAG, em períodos que a oferta energética é abundante, e para mobilizá-los, através da lipólise, quando há déficit calórico, gerando assim substratos para o metabolismo energético através da β -oxidação. A regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais dependentes das necessidades energéticas do indivíduo (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; BÓDIS; RODEN, 2018).

Figura 5 - Deposição ectópica de gordura sobre os tecidos

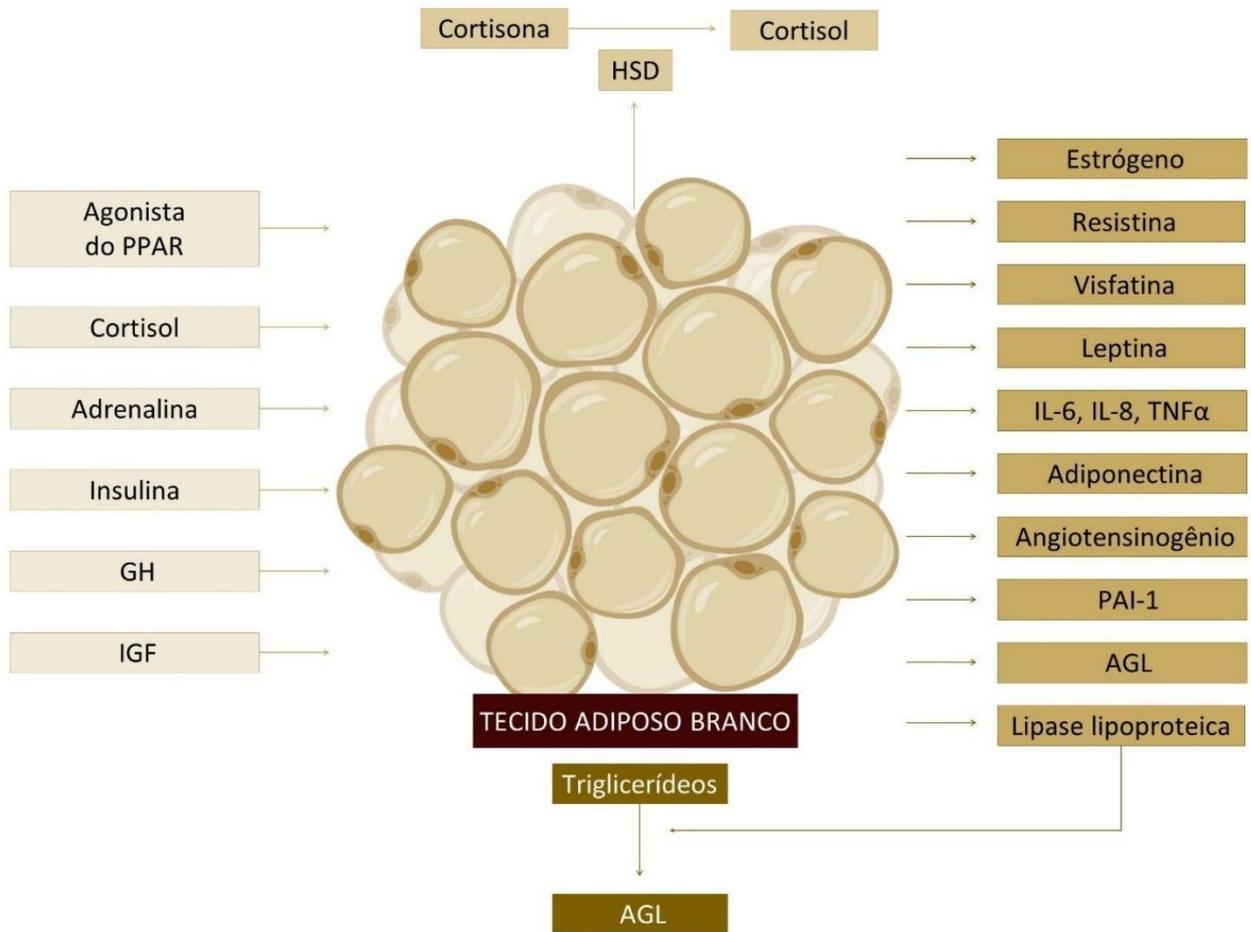


Legenda: TAV = tecido adiposo visceral; TAS = tecido adiposo subcutâneo; AG = ácidos graxos;

Nota: Representação esquemática do TAV e do TAS e consequências da deposição ectópica de gordura sobre os tecidos;

Fonte: Adaptado: DESPRES; LEMIEUX, 2006; SANTILLANA et al., 2023. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Figura 6 - Representação esquemática do tecido adiposo como um órgão endócrino



Legenda: PPAR = receptores ativados por proliferador de peroxissoma; GH = hormônio do crescimento; IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; AG = ácidos graxos livres; PAI-1 = inibidor de atividade de plasminogênio 1; IL = interleucina; TNF = fator de necrose tumoral; HSD = hidroxisteróide desidrogenase;
 Nota: Moléculas bioativas, expressas e secretadas pelos adipócitos, atuando a nível local (autócrina e/ ou parácrina) e sistêmico (endócrino);

Fonte: Adaptado: RIBEIRO FILHO et al., 2006. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Os adipócitos recebem influência de diversos sinais, como a insulina, cortisol e catecolaminas, e, em resposta, expressam e secretam uma ampla variedade de moléculas bioativas, que atuam a nível local (autócrina e/ ou parácrina) e sistêmico (endócrino), sendo algumas destas: interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fatores de crescimento, adiponectina, resistina, leptina, inibidor de atividade de plasminogênio 1 (PAI-1) e lipoproteína lipase (LPL). As adipocinas são citocinas produzidas principalmente por adipócitos e na obesidade, os macrófagos que invadem o tecido também produzem adipocinas. Elas possuem capacidade de atuar como um sinal auto-regulador e regulador do metabolismo de outros tecidos e, por vezes, correlaciona-se com diabetes, sensibilidade à insulina e

imunoregulação (Figura 6) (GOOSSENS, 2008; MELLO et al., 2018; PANUGANTI; NGUYEN; KSHIRSAGAR, 2023).

A nível sistêmico, a secreção alterada de adipocinas pode acarretar no aumento da ingestão alimentar e redução do gasto energético por meio do hipotálamo, bem como diminuição da sensibilidade à insulina a nível muscular e hepático. Desta maneira, a obesidade pode ser vista como uma inflamação crônica de baixo grau, detectada pela elevação de marcadores inflamatórios e citocinas, e pela presença de macrófagos infiltrados no TAB. Esta inflamação se expande tornando-se uma inflamação sistêmica que contribui para o início e progressão de distúrbios metabólicos associados (MELLO et al., 2018).

Modificações em adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas – lipogênese e lipólise – que variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídios que depende, entre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo, do gasto energético, da influência de hormônios e da atividade de enzimas envolvidas nesse processo (JENSEN, 1997).

O tecido adiposo branco é capaz de se expandir através da hiperplasia (aumento do número de adipócitos) e da hipertrofia (aumento do tamanho dos adipócitos) (QUEIROZ et al., 2009). Esta classificação torna-se importante no prognóstico e manejo da obesidade, sendo a obesidade hiperplásica considerada a de mais difícil controle (SPALDING et al., 2008; ABENTE et al., 2016). Quando ocorre uma sobrecarga na capacidade de armazenamento, as funções endócrinas do tecido adiposo alteram e resultam no acúmulo subsequente de gordura ectópica, desencadeando um estresse lipotóxico que promove disfunção metabólica (GROSS et al., 2017).

O aumento crônico dos adipócitos leva da liberação de ácidos graxos livres para a circulação promovendo assim o quadro de lipotoxicidade carretando em prejuízos ao metabolismo hepático, cardíaco e pancreático visto que a deposição ectópica de gordura ocasiona aumento da produção hepática de glicose, apoptose das células β pancreáticas e resistência à insulina nos músculos cardíaco e esquelético (Figura 5) (DESPRES; LEMIEUX, 2006; SANTILLANA et al., 2023).

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

O TAB é inervado pelo sistema nervoso simpático, o qual desempenha um papel crítico no metabolismo lipídico em adipócitos. Diante do exposto, existem evidências indicando que os sinais do circuito neuroendócrino controlam a massa de gordura corporal e modulam o armazenamento ou oxidação dos ácidos graxos. Algumas vias do SNC regulam o metabolismo dos adipócitos independente da ingestão de alimentos, sugerindo que tais vias possuem mecanismos alternativos de regulação da homeostase da energia (MUOIO; NEWGARD, 2006).

Metabolismo dos adipócitos

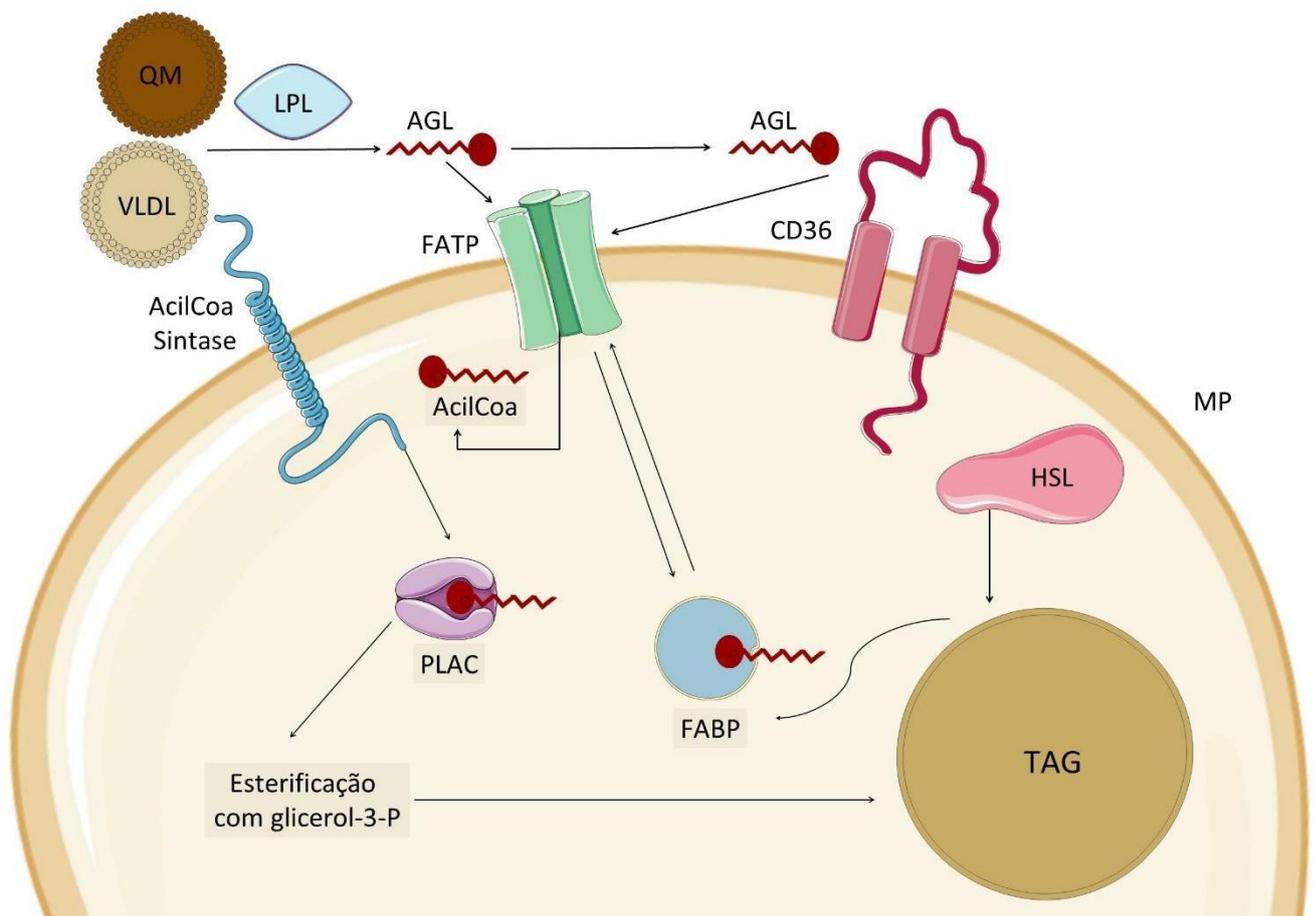
A principal fonte de energia para diversos tecidos e órgãos são os ácidos graxos (AG) de cadeia longa. Grande parte dos tecidos possuem uma reserva pequena de armazenamento de lipídios, desta maneira o fornecimento de AG torna-se contínuo para a produção de energia a partir, principalmente, do tecido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

Os ácidos graxos livres circulam ligados à albumina plasmática ou covalentemente ligados ao núcleo de triacilglicerol das lipoproteínas circulantes, devido à sua baixa solubilidade em água (MERKEL; ECKEL; GOLDBERG, 2002). Para a biossíntese de TAG, o adipócito requer tanto uma fonte de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) quanto um complexo de ácidos graxos livres ligados à coenzima A. O glicerol-3-P é obtido como um dos produtos da via glicolítica, resultante da biossíntese de acetil-CoA ou da captação de ácidos graxos livres provenientes de lipoproteínas plasmáticas, como quilomícrons e VLDL. No tecido adiposo branco, esses ácidos graxos livres são hidrolisados do TAG pela ação da LPL presente na superfície endotelial que são, então, transportados para o citoplasma dos adipócitos (Figura 7) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A produção de glicerol-3-P requer captação de glicose, ação que envolve proteínas transportadoras específicas como o GLUT4. A insulina é responsável por controlar tal processo estimulando, durante o período prandial, a translocação de GLUT4 para a membrana celular, aumentando a captação de glicose. Parte do fluxo metabólico da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato, que será transportado para o interior das mitocôndrias e transformado em acetil-CoA pela ação da piruvato desidrogenase. Este é acoplado ao oxalato pela ação da citrato sintase, gerando, citrato. Parte deste citrato é transportado de volta ao citoplasma, onde

sofre a ação da enzima ATP-citratolise, gerando novamente acetil-CoA (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). A acetil-CoA carboxilase (ACC) que catalisa a carboxilação de acetil-CoA em malonil-CoA, um metabólito intermediário que exerce duas principais funções: (1) entrar na via de síntese de ácidos graxos, catalisada pela enzima ácido graxo sintase (FAS), acarretando a formação de acil-CoA, que é utilizado para esterificação com glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG, e desta forma ser incorporado à gotícula citoplasmática de gordura e (2) alostericamente inibir a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1) que controla o transporte de ácidos graxos ativados para oxidação na mitocôndria (DZAMKO; STEINBERG, 2009).

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



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

Nota: Esquema ilustrativo do processo de captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e biossíntese de TAG; Fonte: Adaptado: FONSECA-ALANIZ et al., 2006. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Em situações de privação da energia celular, como ocorre no jejum, os níveis de AMP aumentam, ativando a AMPK (proteína quinase ativada por AMP) a qual está presente na célula como um complexo heterodímero e tem por função a manutenção da homeostase energética. Quando ativada por fosforilação, inibe a ACC, diminuindo os níveis de malonil-CoA e reduz a inibição alostérica sobre a CPT-1 (DAVAL et al., 2005).

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

Estudos demonstram que os AGs são capazes de estimular seu próprio catabolismo através de um conjunto de receptores nucleares, chamados de receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPARs) (ATHERTON et al., 2009).

(103). Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligação que regulam a expressão gênica pela ligação específica a elementos responsivos ao PPAR (PPREs). Cada receptor se heterodimeriza com o receptor X retinóide (RXR, em que X pode ser α , β/δ ou γ) e liga-se ao seu respectivo PPRE, formando uma estrutura que reconhecerá sequências específicas do DNA (AGGTCA) para a transcrição de seus genes-alvo (104, 105).

Os receptores ativados por PPARs possuem três isoformas descritas na literatura: PPAR- α (alfa), PPAR- β/δ (beta/delta) e PPAR- γ (gama). São fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação da diferenciação celular, desenvolvimento e na regulação da expressão de genes do metabolismo de carboidratos e lipídios (BERGER et al., 2005). Podendo, desta forma, atuar sobre comorbidades associadas à obesidade agindo na capacidade de armazenamento de gordura do TAB e na queima de gordura no TAM, reduzindo assim a sobrecarga de gordura ectópica (GROSS et al., 2017). Além disso, os PPARs podem participar diretamente de respostas imunológicas e de mecanismos de inflamação (MORAIS et al., 2006).

O PPAR- γ é expresso principalmente no TABE e no TAM (HARRINGTON et al., 2007), sua atividade do PPAR γ influencia os estoques de gordura no tecido adiposo, além de induzir a maturação de pré-adipócitos. É considerado um regulador chave na diferenciação de

adipócitos brancos e marrons, além disso, a maioria dos genes alvo do PPAR γ do tecido adiposo estão diretamente envolvidos na via lipogênica, incluindo LPL (KERNER; HOPPEL, 2000). Sua ativação no TAB pode iniciar efeitos metabólicos positivos, favorecendo a expansão do TAB, o que leva à retirada de lipídios de tecidos metabolicamente ativos e, assim, diminui a lipotoxicidade (PELLEGRINELLI et al., 2016).

A expressão do PPAR α no tecido adiposo branco é baixa tanto em humanos quanto em roedores (GOTO et al., 2011). É amplamente expresso no fígado, músculo e coração, e sua ativação sugere participação no metabolismo lipídico (HARRINGTON et al., 2007). Camundongos deficientes em PPAR α , embora tenham morfologia aparentemente normal do TAB, apresentam distúrbios relacionados à termogênese (TONG, et al., 2005; HONDARES, et al. 2011). o PPAR- β apresenta uma distribuição corporal abrangente, com várias funções, incluindo a oxidação de ácidos graxos no músculo e a regulação geral de energia (HARRINGTON et al., 2007).

A mitocôndria, no TAB, possui um papel crucial na regulação da lipólise e reesterificação de AGL, assim como na diferenciação e maturação do adipócito, dado pela sincronização da adipogênese e biogênese mitocondrial (DE PAUW et al., 2009). A disfunção mitocondrial pode ser uma causa primária da inflamação no tecido adiposo (UAU et al., 2019). Na obesidade, as mitocôndrias dos adipócitos alteram a lipogênese e lipólise, regulam os processos de diferenciação dos adipócitos, apoptose, produção de EROS e a eficiência da fosforilação oxidativa (CEDIKOVA et al., 2016). Além disso foi proposto que a disfunção mitocondrial desencadeia a proliferação de macrófagos o que induz a inflamação do tecido adiposo na obesidade (XU et al., 2022).

O excesso de substrato energético, característico na obesidade e síndrome metabólica, podem levar à disfunção mitocondrial, resultando em alterações que impactam o metabolismo energético (BOURNAT, BROWN, 2010). A disfunção mitocondrial, no adipócito, está associada com a redução da oxidação de ácidos graxos, alteração da secreção de adipocinas e desregulação da homeostase energética. Nesta condição, o aumento da produção de EROS resulta em acúmulo de lipídios e resistência à insulina (MEDINA-GOMEZ, 2012).

Adoçantes

O ser humano apresenta preferência inata ao sabor doce e, por esta razão, sempre buscou produtos que pudessem agregar tal sabor aos alimentos. Relatos milenares da cultura chinesa e grega revelam que o primeiro adoçante a ser utilizado pelo homem foi o mel, o qual, mais tarde,

foi substituído pela sacarose, originada da cana-de-açúcar, e utilizada inicialmente na Índia, há cerca de 2000 anos (BARREIROS, 2012; RUSSELL et al., 2023).

De uma forma geral, as substâncias de sabor adocicado podem ser categorizadas em dois grupos principais: o grupo dos açúcares e outros carboidratos nutritivos e o grupo que engloba os adoçantes que são isentos de carboidratos (FAUSTO et al., 2013). Os adoçantes dietéticos são produzidos à base de edulcorantes, utilizados em alimentos e bebidas, possuem pouca ou nenhuma caloria e substituem a doçura do açúcar de mesa (sacarose). Por vezes, apresentam poder de doçura bastante elevado em comparação à sacarose (QURRAT-UL-AIN; KHAN, 2015).

Os adoçantes podem ser classificados como naturais, artificiais, calóricos ou não calóricos. Os adoçantes naturais são, normalmente, compostos extraídos de vegetais ou frutas; já os adoçantes artificiais são substâncias produzidas em laboratório por síntese química. A classificação de adoçantes calóricos ou adoçantes não calóricos (ANC) é dada de acordo com o valor nutricional, sendo os calóricos aqueles que apresentam calorias e os não calóricos aqueles que não possuem calorias (FAUSTO et al., 2013; SCHIANO et al., 2021). No grupo dos adoçantes calóricos, encontramos, por exemplo, a sacarose, frutose, mel e xarope de milho. Já no grupo dos adoçantes não calóricos, estão inclusos glicosídeos de esteviol, aspartame, neotame, sacarina, potássio de acesulfame e sucralose, dentre outros (BRASIL, 2008; BARREIROS, 2012).

A regulamentação dos adoçantes no Brasil é de responsabilidade do Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os ANC atualmente permitidos para comercialização no Brasil são: manitol, isomaltiol, maltitol, esteviosídeos, lactitol, taumatina, xilitol e eritritol, classificados como naturais, e acessulfame de potássio (acesulfame K), aspartame, ciclamato de sódio, sacarina, sucralose e neotame, classificados como artificiais (BRASIL, 2008; ZANINI; ARAÚJO; MARTÍNEZ-MESA, 2011). Na Europa e no EUA, o órgão responsável pelo controle do uso de adoçantes é a *Food and Drug Administration* (FDA), a qual liberou o uso de alguns adoçantes somente após grandes estudos científicos que indicam a segurança dos mesmos, sendo eles: esteviosídeos, acessulfame-potássio, aspartame, neotame, sacarina, sucralose e o adventame (QURRAT-UL-AIN; KHAN, 2015).

Os adoçantes dietéticos foram desenvolvidos com o intuito de atender às necessidades específicas de pessoas com diabetes mellitus. Até a década de 1980, no Brasil, esses produtos eram regulamentados como medicamentos, sendo comercializados em farmácias e consumidos exclusivamente por indivíduos que necessitavam controlar a ingestão de sacarose (BARREIROS, 2012). Paralelo a isso, o consumo exagerado de açúcar por aqueles que não

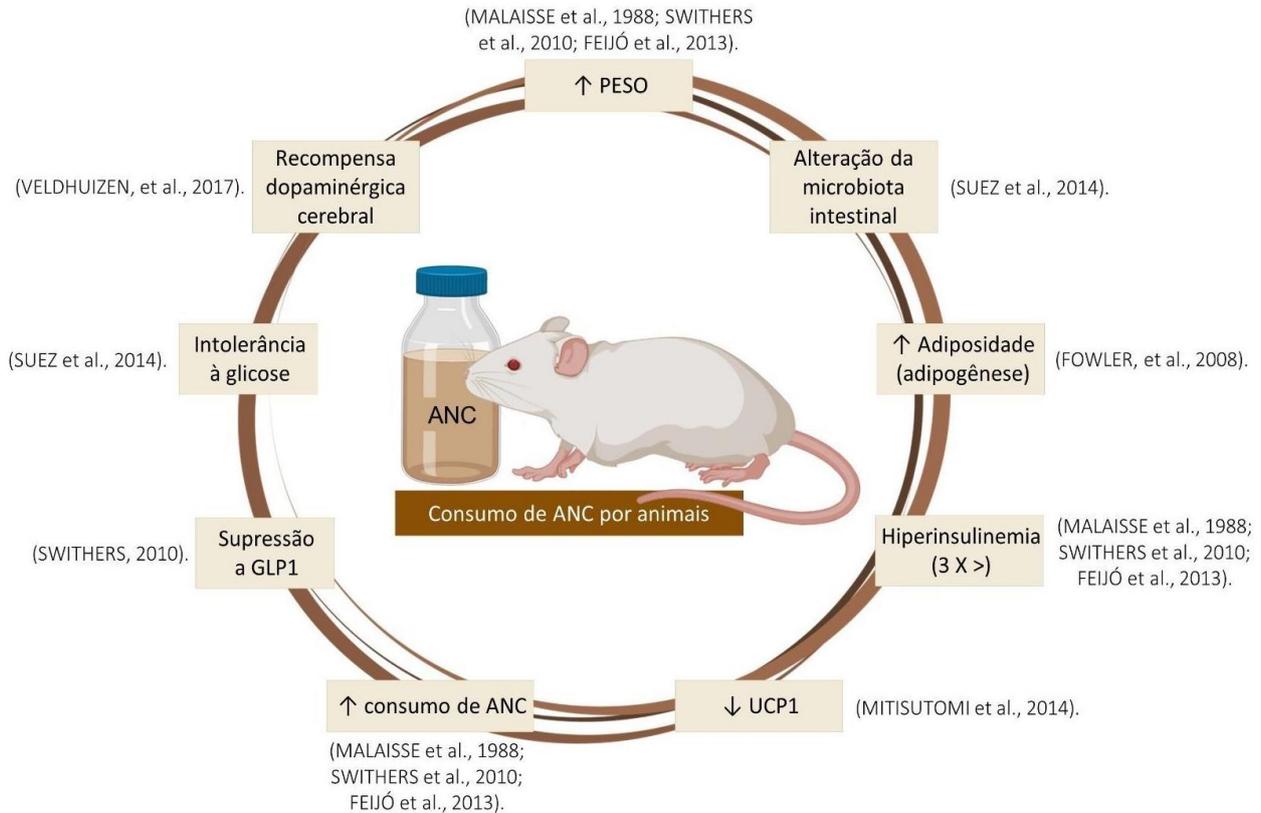
apresentam a doença tem sido parcialmente associado ao crescimento acelerado na incidência de obesidade e diabetes tipo 2 em escala global (MALNIK, 2014; MOORADIANA; SMITHA; TOKUDA, 2017). Uma metanálise, abrangendo 17 coortes, revelou que o consumo de bebidas adoçadas com açúcar estava correlacionado a uma maior incidência de DM2 (IMAMURA et al., 2015). Além disso, diversos estudos relatam uma associação entre o consumo de bebidas com adoçantes e a obesidade (CHAN et al., 2014; GREENWOOD et al., 2014; KELISHADI; MANSOURIAN; HEIDARI-BENI, 2014).

De forma aditiva, a OMS recomenda que os açúcares adicionados não representem mais do que 10% da ingestão calórica diária, com uma proposta para reduzir este nível para 5%, visando um menor impacto na saúde (MALNIK, 2014; OMS, 2015). A prevalência da obesidade está em constante aumento em todo o mundo e a prática do uso desses adoçantes passou a ser atribuída não somente a pessoas com diabetes, mas também foi adotada por consumidores que buscam redução do peso corporal, uma vez que é utilizado de maneira a adoçar os alimentos sem acréscimo de calorias, tornando-se assim, um mercado bastante lucrativo e em crescente expansão (TEYSSEIRE et al., 2024).

Sob essa perspectiva, seria palpável imaginar que substituir o uso de açúcar por ANC contribuiria para menores índices de obesidade e redução da prevalência de doenças associadas a homeostase glicêmica, além de auxiliar no alcance da meta estabelecida pela OMS para a redução do consumo de açúcar. No entanto, não é esse cenário que temos visto nas últimas décadas, desde a incorporação dos adoçantes não calóricos na alimentação da população.

A comunidade acadêmica tem se dedicado à investigação dos efeitos do consumo de ANC no processo de emagrecimento. Em 2023, a OMS emitiu uma diretriz, onde desaconselha o consumo de adoçantes com a finalidade de redução do peso corporal ou diminuição do risco do desenvolvimento de doenças crônicas. Essa recomendação é respaldada por uma investigação profunda da literatura científica, que revelou que o uso de ANC não proporciona benefícios a longo prazo na redução da gordura corporal. Pelo contrário, de forma paradoxal, alguns estudos sugerem associação entre ANC e potenciais efeitos indesejáveis a longo prazo, como aumento do peso, do risco de DM2, doenças cardiovasculares e até mesmo mortalidade em adultos (NICHOL et al., 2018; OMS, 2023). Na Figura 8, apresentamos um esquema ilustrativo com os principais achados experimentais associados ao consumo de ANC descritos na literatura.

Figura 8 - Achados sobre os efeitos do consumo de adoçantes não calóricos em roedores



Legenda: ANC = adoçante não calórico; ↑ = aumento; > = maior; ↓ = diminuição; GLP1 = peptídeo semelhante a glucagon 1;

Nota: Resumo de achados sobre os efeitos do consumo de adoçantes não calóricos em roedores;

Fonte: A autora, 2024. Feito com Biorender (www.biorender.com).

O consumo de adoçantes tem aumentado em diversos países (POPKIN; NIELSEN, 2003; RUSSELL et al., 2023). Os produtos dietéticos, especialmente refrigerantes *diet* e adoçantes de mesa, são as principais fontes de ingestão de ANC. Um estudo recente avaliou a tendência global de adoçantes em produtos embalados, os autores relatam que o volume per capita de ANC provenientes das vendas de bebidas aumentaram 36%, globalmente. Estudos populacionais indicam que o consumo de ANC aumentou 28% por pessoas de todas as idades e esta tendência é prevalente entre as crianças, especialmente, quando se trata de consumo de bebidas (SYLVETSKY et al., 2012). Além do uso como adoçantes em bebidas, os edulcorantes podem ser encontrados nos mais diversos tipos de produtos industrializados, sendo desta forma muito mais fácil atingir o limite máximo diário de ingestão ou até mesmo ultrapassar tal limite (FDA, 2018; PALATNIK et al., 2020).

No Brasil, são poucos os estudos que fornecem estimativas sobre a prevalência da utilização dos adoçantes dietéticos pela população em geral. Zanini e colaboradores (2011) realizaram uma pesquisa com adultos, em Pelotas, e demonstraram que 19% dos 2.732

entrevistados utilizavam adoçantes, sendo o percentual mais elevado em pessoas idosas, diabéticos, hipertensos e indivíduos com excesso de peso. O uso de adoçantes na forma líquida foi o mais utilizado (98%). Nesse estudo, cerca de 10% dos consumidores de adoçante dietético líquido relataram a sua utilização na forma de “esguichos” ao em vez de gotas, sendo assim, a avaliação do consumo dos adoçantes torna-se difícil. Arrais e colaboradores (2019), conduziram um estudo com 41.433 participantes e observaram a prevalência de 13,4% do consumo de adoçantes dietéticos na população superior a 20 anos. A maior parte das pessoas que consumiam ANC eram mulheres, idosos, indivíduos com excesso de peso e pessoas com doenças crônicas.

Durante muitos anos, os adoçantes foram considerados seguros e substitutos saudáveis do açúcar, já que forneciam o sabor doce sem valor calórico agregado e efeitos sobre a glicemia (PEPINO; BOURNE, 2011). Acreditava-se que esses compostos eram inertes e passavam de maneira intacta pelo organismo, entretanto, estudos têm demonstrado que o consumo de ANC não está relacionado com a melhora da saúde. De fato, alguns estudos encontraram associações positivas entre o consumo desses produtos e ganho de peso e do IMC, intolerância a glicose e síndrome metabólica e DM2 (Figura 8) (DE KONING et al., 2011; SWITHERS et al., 2012; NICHOL et al., 2018; LAFOREST-LAPOINTE et al., 2021; NETTLETON et al., 2020).

Além disso, outra preocupação frequente associado ao consumo habitual de adoçantes é a hipótese de que eles podem contribuir para a mudança do paladar da população, encorajando preferências de sabor doce (RIOS-LEYVRAZ; MONTEZ, 2022). Embora o consumo de ANC seja associado a diversos efeitos desfavoráveis à saúde, os mecanismos fisiológicos que contribuem para o aumento da adiposidade e o desbalanço energético ainda não foram completamente elucidados. Além disso, os adoçantes são quimicamente diversos e, conseqüentemente, não acarretam os mesmos efeitos metabólicos (BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017).

Adoçante artificial sacarina

A sacarina (do latim *saccharum*, que significa açúcar) é o adoçante mais antigo e foi descoberto em 1878 por Remsen e Fahlberg, na Universidade John Hopkins. Apresenta poder de doçura de 200 a 700 vezes maior que a sacarose e não possui calorias (Figura 9) (WALBOLT; KOH, 2020). Entre suas características, destaca-se a estabilidade em temperaturas elevadas e em ampla faixa de pH, além de ser solúvel em água (SHANKAR et al.,

2010). Tem sido amplamente utilizada devido ao seu baixo custo de produção (SCHIANO et al., 2021).

Atualmente, a utilização da sacarina é permitida em mais de 100 países, incluindo o Brasil (SCHIANO et al., 2021). Nos EUA, a sacarina possui aprovação da FDA, com recomendação de ingestão diária aceitável (IDA) de 15 mg/kg/dia, porém sem o status de Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) (FDA, 2018). No Brasil e na Europa, a IDA estabelecida pelo Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares FAO/OMS (JECFA) é de 5 mg/kg/dia para adultos e crianças (FDA, 2018; TURNER et al., 2020). Além disso, a utilização de sacarina na indústria é permitida em alimentos, suplementos e bebidas dietéticas, sendo o limite máximo estabelecido de 0,015g a cada 100ml ou 100g do produto (BRASIL, 2008).

Figura 9 - Estrutura química da sacarina



Nota: Estrutura química da sacarina;
Fonte: Adaptado: SCHIANO et al., 2021.

Embora permitida em diversos países, estudos experimentais indicam que a sacarina promove aumento da adiposidade, porém, sem associação direta com aumento da ingestão calórica ou alterações nos níveis glicêmicos. Sugerindo que o ganho de peso pode ser atribuído a uma possível redução do gasto energético, quando comparado com ingestão de glicose (SWITHERS et al., 2010). Alguns estudos relatam que o consumo de sacarina pode induzir à hiperinsulinemia e causar ganho de peso (FEIJÓ et al. 2013), pois um estudo *in vitro* demonstrou que a secreção de insulina foi 3 vezes maior do que níveis basais, quando as células foram expostas à elevada concentração de sacarina (MALAISSE et al., 1988).

Em um estudo com roedores, o consumo de sacarina, sucralose ou aspartame foi avaliado por 11 semanas. Cada um dos grupos suplementados com ANC apresentou intolerância à

glicose e alterações da microbiota intestinal em relação aos animais controles que beberam água pura ou água com açúcar. Avaliou-se, ainda, os efeitos observados da sacarina em diferentes condições nutricionais, grupo de camundongos alimentados com dieta rica em gordura (60% kcal de gordura) e grupo com dieta padrão. De fato, o consumo de sacarina em todas estas condições, agravou a intolerância à glicose (SUEZ et al., 2014).

Evidências científicas destacaram que o consumo de ANC tem sido associado ao aumento de fatores de risco para SM (HESS et al., 2018, ROMO et al., 2016; GREEN; SYN, 2019). O consumo de sacarina foi associado aumento do peso corporal e da adiposidade em ratos (SWITHERS et al., 2011), aumento do estresse oxidativo (POPKIN; HAWKES, 2016), inibição significativa do sistema antioxidante em fígados de ratos e redução da atividade da catalase e SOD (AMIN; ALMUZAFAR, 2016).

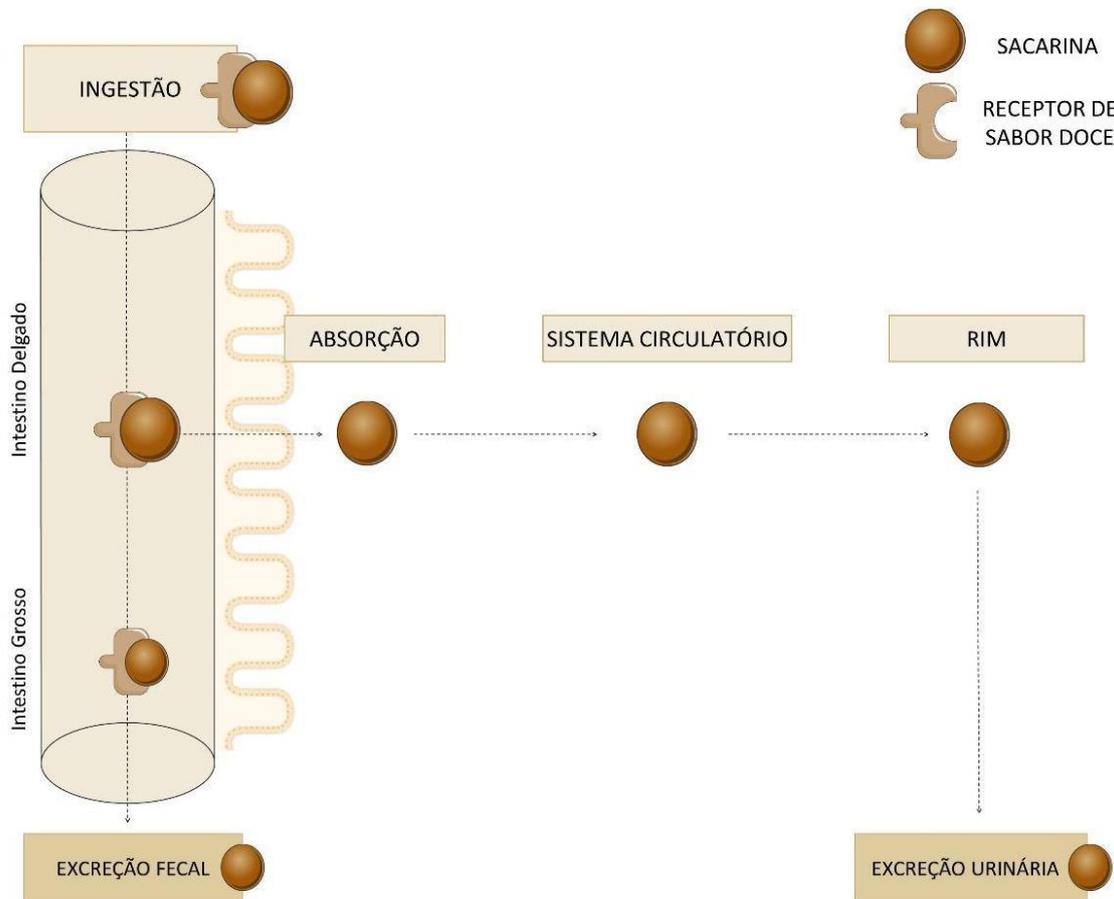
Absorção, metabolismo e excreção de sacarina

Após a ingestão de sacarina, aproximadamente 85-95% é absorvida e se liga reversivelmente às proteínas plasmáticas. Por não sofrer metabolização gastrointestinal, é distribuída por todo o corpo e, por fim, é excretada pela urina por meio de transporte tubular ativo (MAGNUSON et al., 2016). A pequena fração de sacarina que não é absorvida, é eliminada nas fezes (Figura 10) (PALATNIK et al., 2020). Estudos indicam que o consumo desse adoçante pode estar associado a alterações na microbiota intestinal, como o aumento das bactérias do gênero *Turicibacter*, que têm sido associadas a um possível efeito pró-inflamatório da sacarina (PLAZA-DIAZ et al., 2020).

As concentrações de sacarina nos tecidos corporais mantêm-se em equilíbrio com as do plasma sanguíneo, diminuindo simultaneamente. Estudos indicam que a sacarina pode atravessar a placenta, sendo detectada nos tecidos fetais de ratos, macacos e seres humanos, assim como no líquido amniótico, na bexiga fetal e no sangue materno em quantidades semelhantes (PALATNIK et al., 2020). Quando administrada por via intravenosa, a sacarina é rapidamente eliminada da circulação geral, com uma meia-vida de 40 minutos em ratos e 70 minutos em humanos (MAGNUSON et al., 2016). Além disso, de acordo com Magnuson e colaboradores (2016), após a administração oral de sacarina em ratos, os níveis plasmáticos do adoçante atingem o pico em 30 a 60 minutos e diminuem gradualmente devido à absorção lenta e contínua no trato gastrointestinal, o que dificulta a definição do tempo de meia-vida plasmática após o consumo de sacarina (Figura 10).

Em seres humanos, após administração oral, observa-se rápida eliminação nas primeiras 10 horas, seguida de uma eliminação mais lenta. Concentrações elevadas de sacarina no plasma de ratos submetidos a uma dieta rica em sacarina (> 3%) indicam que o processo de excreção renal é saturável, ressaltando a necessidade de investigações adicionais sobre a absorção da sacarina e seus efeitos.

Figura 10 - Principais vias de absorção, digestão, metabolismo e excreção da sacarina



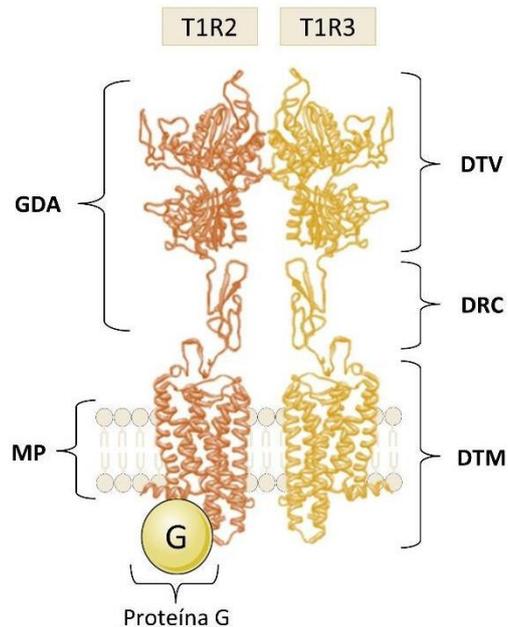
Nota: Esquema ilustrativo do processo de absorção, digestão, metabolismo e excreção da sacarina;
 Fonte: Adaptado: MAGNUSON et al., 2016. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Receptores de sabor doce

O ser humano apresenta preferência inata ao sabor doce, sendo este um dos fatores determinantes para o consumo excessivo de açúcares sobretudo em alimentos industrializados (WILK et al., 2022). O paladar fornece a possibilidade de identificar os principais nutrientes antes mesmo da sua ingestão e, assim, evitar o consumo de moléculas com sabor amargo e potencialmente nocivas, como os alcaloides das plantas. Entre as cinco modalidades básicas de

sabor (doce, salgado, amargo, azedo e umami), o gosto doce é um dos principais determinantes da escolha alimentar (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

Figura 11 - Estrutura do receptor heterodímero de sabor doce (T1R2/T1R3)



Legenda: GDA = grande domínio aminoterminal; DTV = domínio do trapézio de Vênus; DRC = domínio curto rico em cisteína; DTM = domínio transmembrana; MP = membrana plasmática.

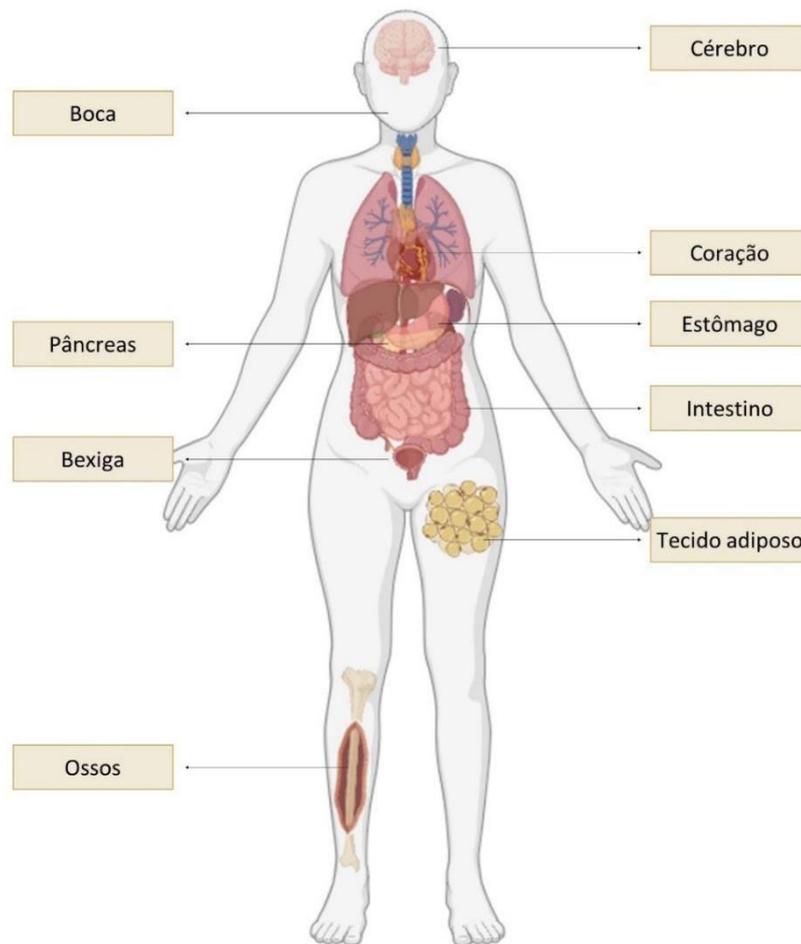
Nota: Receptores de sabor doce, T1R2 e T1R3, que são encontrados principalmente nas papilas gustativas da boca; Fonte: Adaptado: LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014. Feito com Biorender (www.biorender.com).

A percepção dos sabores é identificada através de receptores específicos. No início dos anos 2000, estudos identificaram um receptor capaz de detectar a doçura dos alimentos. Um receptor heterodímero, composto por dois receptores distintos, acoplados à proteína G (RAPGs): tipo 1, membro 2 (T1R2) e tipo 1, membro 3 (T1R3) (Figura 11). O receptor de sabor doce T1R2/T1R3 responde a diversos compostos quimicamente distintos, tais como açúcares naturais, adoçantes artificiais e naturais, alguns D-aminoácidos e proteínas de sabor adocicado. São expressos, principalmente, nas papilas gustativas da boca (NELSON et al., 2001; LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014). Os adoçantes, apesar de apresentarem estruturas químicas diversas, possuem a capacidade de ativar o receptor heterodímero de sabor doce.

O receptor de sabor doce, juntamente com diversas moléculas de transdução de sinal de sabor, é expresso não apenas na cavidade oral, mas também em uma variedade de órgãos, incluindo o tecido adiposo, trato gastrointestinal, pâncreas, bexiga e cérebro (ZHANG et al., 2003; REN et al., 2009; WELLENDORPH et al., 2009; BEHRENS; MEYERHOF, 2011; BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; NUEMKET et al., 2017). Sua função nos tecidos extraorais ainda não está bem esclarecida, no entanto, foi demonstrado que o receptor de sabor

doce expresso nos tecidos pancreáticos e gastrointestinais está envolvido na sinalização da glicose, na expressão dos transportadores de glicose e na manutenção da homeostase glicêmica (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

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



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

Fonte: Adaptado: LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014. Feito com Biorender (www.biorender.com).

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

Ensaio celulares e estudos com camundongos nocaute estabeleceram que T1R2/T1R3 é o principal receptor de sabor doce. No entanto, estudos com camundongos nocaute, em que o gene T1R3 foi interrompido, sugeriram que mecanismos adicionais de detecção de açúcar poderiam existir (DAMAK et al., 2003; LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

Na cavidade oral, compostos doces interagem com os receptores de sabor doce expressos nas membranas apicais das células sensoriais presentes nos botões gustativos. A ativação do receptor de sabor doce, pelos compostos doces, induz uma cascata de transdução intracelular, conduzindo à despolarização das células receptoras gustativas (Figura 13) (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014). A língua é o órgão muscular que se projeta para dentro da cavidade oral a partir de superfície inferior, nela encontramos as papilas linguais que são projeções da mucosa oral que revestem o dorso lingual e que assumem diversas formas e funções. Existem quatro tipos: filiformes, fungiformes, foliadas e circunvaladas. Com exceção das papilas filiformes, as outras três papilas apresentam botões gustativos. Esses botões são estruturas ovais, com uma pequena abertura na superfície denominada poro gustativo. Além dos botões gustativos associados às papilas linguais, encontram-se presentes também no arco glossopalatino, no palato mole e na parede posterior da faringe descendo até o nível da cartilagem cricóide (ROSS, 2012).

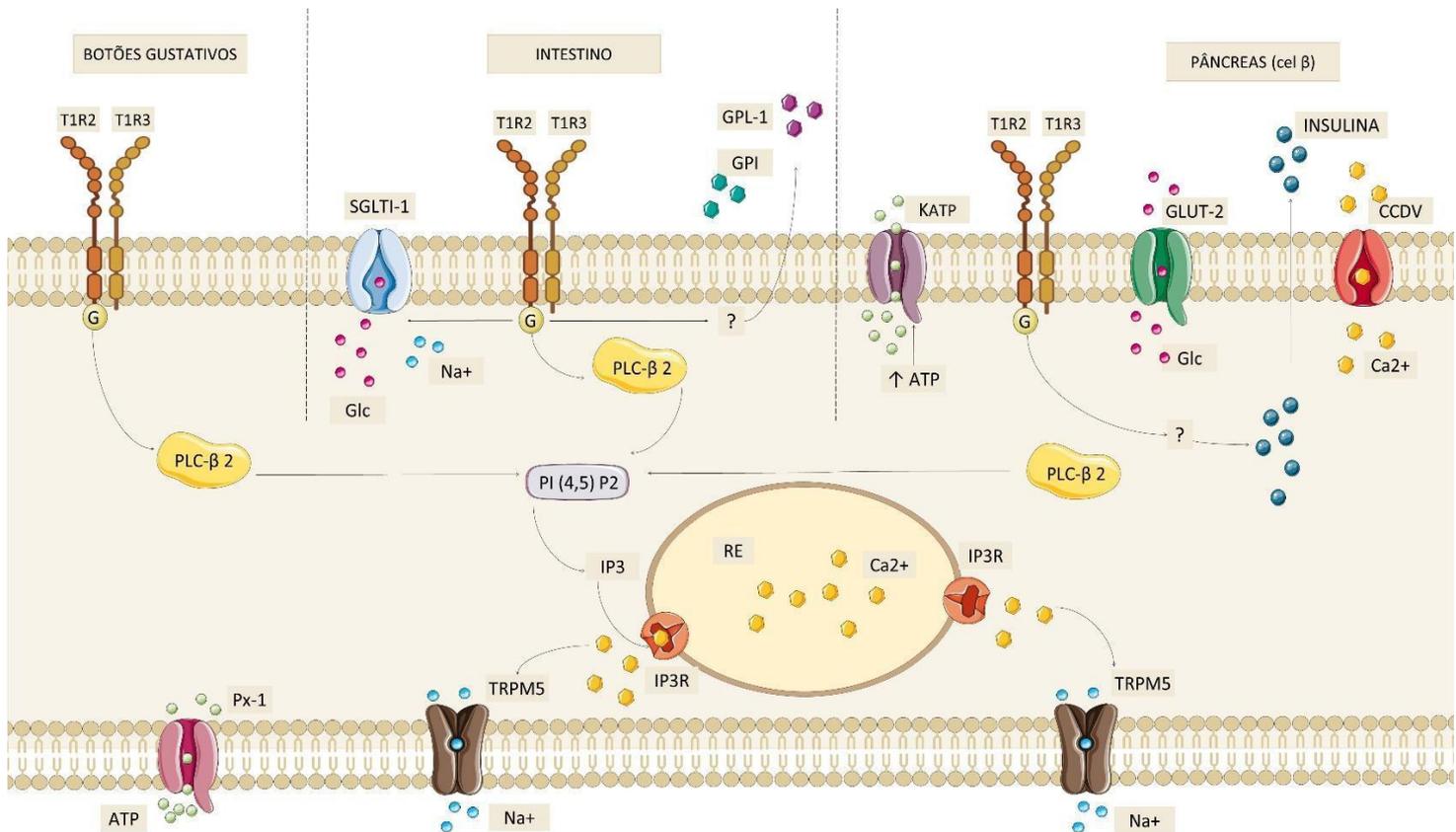
Os principais eventos de transdução da sinalização consequente da percepção do sabor doce foram identificados. A ligação de compostos doces ao receptor T1R2/T1R3 resulta na dissociação da proteína G heterotrimérica (α -gustducina, Gb3 e Gg13), levando a um aumento na atividade da fosfolipase C- β 2 (PLC-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

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

Alguns inibidores específicos do sabor doce foram usados como ferramentas farmacológicas nos estudos de cascata de transdução de sinal ou para investigar as funções fisiológicas do receptor de sabor doce em tecidos orais e extraorais. Os inibidores mais

estudados incluem o lactisole, um inibidor competitivo seletivo da percepção do paladar doce humano e a gurmarina, um potente inibidor do receptor do sabor doce em roedores (SIGOILLO et al., 2012).

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



Nota: Nos botões gustativos, o T1R2/T1R3 ativado interage com proteínas G heterotrímicas compreendendo α -gustducina, G β 3 e G γ 13. Após a dissociação das subunidades da proteína G, a subunidade G β 3 interage com a fosfolipase C- β 2 (PLC- β 2), que por sua vez cliva a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃), produzindo diacilglicerol (DAG). O IP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (RE) via ativação do receptor IP₃ tipo III (IP₃-R). O Ca²⁺ intracelular elevado ativa o canal TRPM5, levando à despolarização da membrana, que permite que o Pannexin-1 (PX1) abra e libere o ATP, que estimula as fibras nervosas eferentes. No intestino, a via de transdução de sinal é semelhante ao descrito nas papilas gustativas. A estimulação da glicose (Glc) do receptor T1R2/T1R3 desencadeia a secreção de duas incretinas, GLP-1 e GIP, e aumenta a expressão do cotransportador sódio-glicose-1 (SGLT-1) para a membrana plasmática. Nas células β do pâncreas, o Glc é transportado pelo transportador de glicose-2 (GLUT2). A glicólise leva a um aumento de ATP, levando ao fechamento do canal K_{ATP}, o que causa despolarização. Essa despolarização, por sua vez, ativa o canal de cálcio voltagem-dependente (CCVD), levando ao acúmulo de Ca²⁺ no citoplasma e à secreção de insulina. O receptor T1R2/T1R3 parece estar envolvido na regulação da secreção de insulina. ATP, trifosfato de adenosina; GIP, péptido insulínico dependente da glicose; GLP-1, peptídeo do tipo glucagon-1; TRPM5; Fonte: Adaptado: LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014. Feito com Biorender (www.biorender.com).

No estômago, T1R3 e α -gustducina são expressos nas células enteroendócrinas do tipo aberto. Sabe-se que as células enteroendócrinas secretam grelina, um hormônio gastrointestinal orexigênico, que atua como um ligante endógeno do receptor secretagogo do hormônio do

crescimento do tipo 1a (GHS-R1a) e está envolvido, principalmente, em processos que impulsionam os animais a buscarem nutrientes mais energéticos. Depois de um aumento na concentração sanguínea de glicose ou aminoácidos, a liberação de grelina é suprimida. Como o T1R3 é expresso em células produtoras de grelina no estômago, foi proposto que o T1R3 está envolvido no ajuste da liberação de grelina após a ingestão de glicose (HASS; SCHWARZENBACHE; BREER, 2010; JANSSEN et al., 2011). Porém foi observado, em roedores obesos, que o consumo de ANC não afetou os níveis de NPY e POMC (MITSUTOMI et al., 2014).

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

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

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

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

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

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

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

Curiosamente, um estudo revelou que camundongos nocautes para T1R2 têm gordura corporal reduzida em comparação com os selvagens. Esta descoberta suporta a proposta de que o T1R2 tenha um papel fundamental na regulação da biologia do tecido adiposo (SMITH et al., 2016). Em humanos, não foi observado efeito de ANC sobre a secreção de GLP-1, PYY e supressão da secreção de grelina, sugerindo que o estímulo aos receptores T1R2/T1R3 do intestino por si só não seja suficiente para produzir respostas relevantes destes peptídeos reguladores do apetite (STEINERT et al., 2011).

1 JUSTIFICATIVA

Em meio ao panorama crescente de obesidade, observa-se um aumento na utilização de adoçantes não calóricos como uma alternativa para a perda de peso e controle glicêmico, uma vez que esses adoçantes agregam sabor doce sem fornecer calorias.

No entanto, de forma inversa, a literatura científica sugere que os adoçantes não são compostos inertes e podem estar associados ao ganho de peso, intolerância à glicose, aumento da secreção de insulina, hiperfagia, alterações na adipogênese e lipólise do tecido adiposo branco. Fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade e suas complicações crônicas associadas.

Dessa forma, paradoxalmente, os adoçantes artificiais amplamente vistos como uma forma de combater a obesidade e diabetes, poderiam contribuir para a epidemia global dessas doenças. Contudo, são escassos os estudos que abordam a ação dos ANC sobre as alterações moleculares relacionadas ao metabolismo energético em tecidos periféricos, como o tecido adiposo branco, que desempenha um papel endócrino e contribui para a regulação da homeostase energética e glicêmica.

Portanto, é necessário investigar seu consumo, com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos pelos quais o adoçante sacarina pode estar envolvido na regulação da adiposidade corporal e do metabolismo energético, em um quadro de obesidade ou não, visando contribuir para o preenchimento de algumas lacunas que ainda não foram elucidadas na literatura científica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos fisiológicos do consumo crônico de sacarina, adoçante artificial não calórico, em camundongos adultos obesos que foram submetidos à hiperalimentação durante o período de lactação.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o consumo alimentar do desmame (21 dias) até a idade adulta (180 dias);
- b) Analisar a ingestão de líquidos do início da intervenção (90 dias) até a idade adulta (180 dias);
- c) Analisar o ganho de massa corporal do desmame (21 dias) até a idade adulta (180 dias);
- d) Analisar alguns componentes da composição corporal (massa corporal, porcentagem de gordura, massa livre de gordura e fluidos) por ressonância magnética nuclear antes (90 dias) e após a intervenção (180 dias);
- e) Analisar a tolerância à glicose nos animais aos 180 dias;
- f) Realizar a dosagem sérica de glicose e insulina nos animais aos 180 dias;
- g) Analisar o índice de resistência à insulina nos animais aos 180 dias;
- h) Analisar a morfologia do tecido adiposo branco epididimal aos 180 dias;
- i) Analisar a expressão gênica dos receptores de sabor doce (T1R2 e T1R3) no tecido adiposo branco epididimal;
- j) Analisar a expressão gênica de proteínas que estão envolvidas no metabolismo glicídico e lipídico no tecido adiposo branco epididimal, sendo elas: Acetil-CoA; ChREBP; CPT1; FABP4; FAS; GLUT4; LPL; PPAR α ; PPAR γ ; SREBP-1;
- l) Analisar biomarcadores do estresse oxidativo: TBARS (tecido adiposo epididimal e sangue) e catalase (tecido adiposo epididimal);
- m) Analisar a função mitocondrial do tecido adiposo branco epididimal, através do consumo de oxigênio frente a substratos energéticos relacionados à oxidação de carboidratos e ácidos graxos pela respirometria de alta resolução.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e modelo experimental

Para induzir a obesidade nos animais, utilizamos o método de redução de ninhada que promove hiperalimentação durante a lactação, resultando no ganho de peso precoce que persiste até a idade adulta. Esse modelo experimental é amplamente estabelecido na literatura científica e muito utilizado em nosso grupo de pesquisa (Figura 11) (PLAGEMANN et al., 1992; RODRIGUES et al., 2007; MARTINS et al., 2008; CUNHA et al., 2009; SOARES et al., 2012; VIEIRA et al., 2015; BERNARDO et al., 2016; MALAFAIA, 2018; GONÇALVES, 2019).

Camundongos fêmeas (46 animais) da espécie *Swiss* com 3 meses de vida, fornecidas pelo Instituto Vital Brasil ao biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento, foram submetidas ao acasalamento (3 fêmeas: 1 macho). Em seguida, as fêmeas grávidas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas de polipropileno recebendo água e ração comercial padrão Nuvilab® *ad. Libtum*. Após o nascimento dos filhotes, todas as ninhadas foram ajustadas para 9 filhotes por lactante e, inicialmente, divididas em dois grupos:

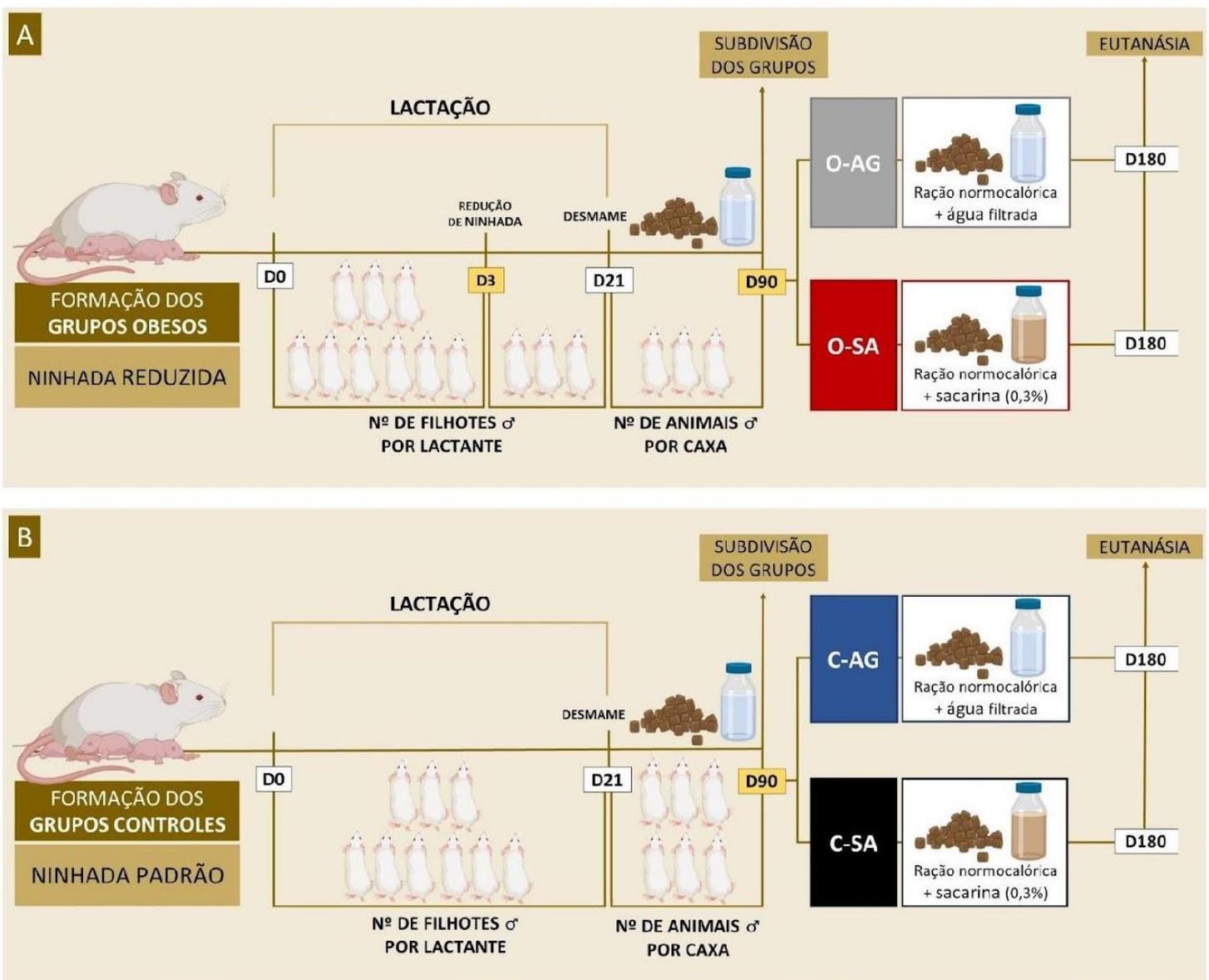
- a) **Grupo Obeso:** ninhadas de 9 filhotes que foram amamentados juntos até o 3º dia pós-natal, em seguida, nesse mesmo dia as ninhadas foram reduzidas a somente 3 filhotes machos por lactante, os quais continuaram juntos em aleitamento até o 21º dia (desmame). Ao findar o período de lactação, os animais foram separados da lactante, permanecendo 3 camundongos machos por gaiola onde passaram a receber ração normocalórica e água filtrada até completarem 90 dias de vida (Figura 14, A).
- b) **Grupo Controle:** ninhadas de 9 filhotes que foram amamentados juntos até o 21º dia (desmame). Ao final do período de lactação, os animais foram separados da lactante e ajustados a 6 camundongos machos por gaiola, onde permaneceram recebendo ração normocalórica e água filtrada até completarem 90 dias de vida (Figura 14, B).

Para o desenvolvimento do modelo experimental utilizamos camundongos suíços do sexo masculino em todos os grupos. Os animais que não foram utilizados no modelo experimental foram encaminhados para a produção de novas matrizes. Ao completarem 90 dias de vida, os grupos controle e obeso foram subdivididos em: grupo controle e obeso que

ingeriram água filtrada (C-AG e O-AG) até 180 dias de vida e grupo controle e obeso que ingeriram água contendo sacarina a 0,3% (C-SA e O-SA) dos 90 aos 180 dias de vida. Os animais receberam ração normocalórica Nuvilab® e água filtrada ou água com sacarina *ad libitum*. A oferta do adoçante foi feita por 12 semanas (3 meses, dos 90 até os 180 dias de vida) (Figura 14 e Tabela 1 - Subdivisões dos grupos controles e obesos e suas respectivas siglas (Tabela 1).

Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($60\pm 10\%$), o ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro/escuro (07:00h às 19:00h) e o ciclos de exaustão do ar (15 min/hora) durante todo estudo.

Figura 14 - Modelo de redução de ninhada e delineamento dos grupos experimentais



Legenda: A = formação dos grupos obesos; B = formação dos grupos controles; D0 = dia do nascimento; D3 = terceiro dia após o nascimento; D21 = 21 dias de vida; D90 = 90 dias de vida; D180 = 180 dias de vida (dia da

eutanásia); O-AG = obeso água; O-SA = obeso sacarina; C-AG = controle água; C-SA = controle sacarina; ♂ machos; n° = número;

Nota: A figura mostra a técnica utilizada para a indução da obesidade nos animais e a subdivisão dos grupos experimentais;

Fonte: A autora, 2024. Feito com Biorender (www.biorender.com).

Para a realização dos experimentos foram utilizados animais machos totalizando um n de 8 a 15 animais por grupo. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro com registro CEUA|067|2018 (ANEXO A).

Tabela 1 - Subdivisões dos grupos controles e obesos e suas respectivas siglas

Nome do grupo	Sigla
Grupo Obeso Água	O-AG
Grupo Obeso Sacarina	O-SA
Grupo Controle Água	C-AG
Grupo Controle Sacarina	C-SA

Fonte: A autora, 2024.

3.2 Composição nutricional da ração padrão Nuvilab

Utilizamos a ração padrão para roedores da marca Nuvilab CR-1, atualmente produzida pela Quimtia S/A. A mesma ração foi ofertada para todos os grupos experimentais, sua composição é caracterizada como normocalórica como mostramos na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição nutricional da ração padrão Nuvilab CR-1®

Informação nutricional (porção 100g)		
Quantidade por porção		% VCT*
Valor energético	339 kcal = 1418kj	100%
Carboidratos	54 g	63,4%
Proteínas	22 g	25,9%
Lipídios	4 g	10,6%
*% do valor calórico total da porção.		

Legenda: kcal = quilocalorias; kj = quilojoule; % = porcentagem; g = gramas; VCT = valor calórico total;

Nota: A tabela mostra a composição nutricional da ração consumida por todos os grupos experimentais;

Fonte: Adaptado, YOSHIMURA, 2014.

3.3 Composição e obtenção do adoçante artificial sacarina

A sacarina ($C_7H_4NNaO_3S \cdot 2 H_2O$) utilizada no presente estudo foi adquirida através da empresa fornecedora Merck S/A (São Paulo, Brasil). O produto é descrito pelo fabricante como cristais de cor branca e inodoro (ANEXO B).

Fornecemos para os animais a concentração de 0,3% de sacarina, utilizando água filtrada como veículo. Essa concentração foi determinada com base na ingestão diária aceitável (IDA) (5 mg/kg) e em estudos prévios realizados com diversos tipos de adoçantes. A solução de sacarina a 0,3%, demonstrou alta aceitabilidade por roedores, não prejudicando sua palatabilidade e consumo, além de não ser considerada uma concentração elevada para esses animais (SCLAFANI et al., 2010).

3.4 Análise do consumo alimentar e da ingestão de líquidos

3.4.1 Consumo alimentar e ingestão de líquidos ao longo do tempo

Após o desmame (21º dia), o consumo alimentar (ração normocalórica) e a ingestão de líquidos (água filtrada ou água com adição de sacarina a 0,3%) foram acompanhados a cada dois dias até que os animais completassem 180 dias de vida.

Por meio da técnica de resto-ingesta, foi possível calcular o consumo dos animais. A quantidade de ração ingerida foi estimada pela diferença entre o peso da ração ofertada (R_i – ração inicial) e a quantidade de ração que restou na gaiola dois dias depois (R_f – ração final). O mesmo foi feito com os líquidos, onde o cálculo foi realizado com a quantidade em ml que restavam nos bebedouros. O cálculo foi realizado de acordo com as fórmulas abaixo:

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

$$\text{Ingestão de líquido (ml)} = \frac{(L_i - L_f) \div 2}{n}$$

O “n” corresponde ao número de animais em cada gaiola (sendo 3 animais nas caixas dos grupos obesos e 6 animais nas caixas dos grupos controles), e “2” corresponde ao número de dias. O somatório do consumo alimentar e da ingestão de líquidos foi dividido por 2 (referente ao intervalo de dias do resto-ingesta) para estimar o consumo diário de cada caixa e, em seguida, o valor foi dividido pelo número de animais de cada caixa, gerando a estimativa

do consumo diário de cada animal (g de ração/dia). Os resultados foram apresentados através de gráfico em linha que mostra o consumo ao longo do crescimento.

Após obter as informações referentes a quantidade de ração (em gramas) consumida pelos animais, foi possível calcular a quantidade de calorias ingeridas pelos mesmos através das informações de composição nutricional da ração fornecidas pelo fabricante (Tabela 2).

3.4.2 Consumo alimentar e ingestão de líquidos acumulados

O consumo acumulado (de ração e de líquidos) foi calculado somando os valores do consumo, adquiridos através do resto ingesta, que nos forneceu a informação da quantidade total consumida por cada grupo desde o início do experimento/intervenção até o término do estudo. Neste caso, os resultados foram apresentados por gráfico em barras.

3.5 **Análise do ganho de massa corporal ao longo do crescimento**

Para monitorar o ganho de massa corporal ao longo do crescimento, os animais foram pesados em mini balança digital (profissional digital table scale MOD 1200), do 21º ao 180º dia de vida pós-natal. As pesagens ocorreram em datas específicas: aos 21, 30, 45, 60, 90, 120, 145, 160 e 180 dias de vida, pois marcam períodos importantes do crescimento e desenvolvimento dos animais.

3.6 **Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Alguns componentes da composição corporal dos animais foram analisados através de ressonância magnética nuclear em PN178, para pequenos animais vivos. Os camundongos foram digitalizados pelo equipamento (Minispec LF90 TD-NMR, Bruker, Rheinstetten, Alemanha) sem a necessidade de utilização de anestesia prévia.

A técnica foi realizada aos 90 dias de vida (no dia da subdivisão dos grupos), com o intuito de mostrar que os animais eram iguais antes da subdivisão e aos 180 (ao final do estudo), para observar o efeito das intervenções.

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 posicionados dentro de um cilindro de plástico transparente e imobilizados pela inserção de um êmbolo ajustado ao cilindro. O tubo foi colocado na câmara

do equipamento por aproximadamente 2 minutos, para leitura. A avaliação foi cega uma vez que o técnico de RMN não conhecia o protocolo experimental. Os dados foram expressos em gramas de massa corporal, % de gordura corporal, % de massa livre de gordura e % de fluidos corporais.

3.7 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Ao final do período experimental (180 dias), após o jejum de 6 horas, realizamos o teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos camundongos, o tempo de jejum foi baseado na literatura científica (PEDRO; TSAKMAKI; BEWICK, 2020). Os animais receberam injeção intraperitoneal de glicose (1g/kg de peso) e a glicemia foi verificada através do sangue retirado da veia da cauda dos animais com o auxílio de um 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.

3.8 Eutanásia e coleta de tecidos

Os animais foram eutanasiados em condições de jejum a fim de evitar possíveis fatores de confundimento em algumas análises (BARAZZONI et al., 2005; ASPREA, 2013). O jejum foi realizado das 06:00h às 12:00h (duração de 6h), embora o jejum noturno seja comumente utilizado em seres humanos, os roedores consomem a maior parte de sua alimentação à noite. Conseqüentemente, o jejum noturno pode levar a uma perda significativa de peso, diminuição das reservas de glicogênio e estresse metabólico, desta maneira a literatura sugere evitar o jejum noturno (PEDRO; TSAKMAKI; BEWICK, 2020).

Após o período de jejum matinal, 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 (tecido adiposo branco epididimal, retroperitoneal, tecido adiposo marrom, coração, gordura do coração, fígado, músculo esquelético - sóleo - e tibia). O tecido adiposo branco epididimal, foi removido, pesado e armazenado em freezer -70°C para a realização de diversas técnicas. Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.9 Mensuração do tecido adiposo branco epididimal e outros órgãos

O tecido adiposo branco epididimal (TABE), foco de investigação deste trabalho, abrange o tecido adiposo que envolve os ureteres, bexiga e epidídimo. O TABE foi completamente removido de ambos os lados e imediatamente pesado em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N®), assim como os outros tecidos mencionados acima.

Utilizamos o peso dos tecidos adiposos (epididimal e retroperitoneal) para o cálculo de peso relativo dos tecido mencionados. Onde relativizamos o peso do tecido pela massa corporal do animal. Conforme descrito abaixo:

$$\text{Peso relativo do tecido} = \frac{\text{peso do tecido}}{\text{peso corporal total}}$$

3.10 Comprimento naso-anal e comprimento da tíbia

Mensuramos o comprimento naso-anal dos animais com auxílio do paquímetro, para análise do índice de Lee (raiz cúbica da massa corporal (g)/ comprimento naso-anal (cm) x 1000). Além disso, a tíbia esquerda foi dissecada e o seu comprimento também foi aferido com auxílio de paquímetro, posteriormente, utilizamos seu comprimento para cálculo da massa cardíaca corrigida pela tíbia (VIEIRA et al., 2015).

3.11 Dosagem de glicose e insulina

A glicemia de jejum dos camundongos 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.

Para a dosagem sérica de insulina coletamos as amostras sanguíneas dos animais da cavidade torácica durante o sacrifício, em seguida essas amostras foram vertidas em tubo de ensaio contendo EDTA K3 (concentração final de 1.735 mg/ml). Imediatamente, foram centrifugadas à 3000rpm durante 15 minutos a 4°C para a separação do plasma. Em seguida, o plasma foi alíquotado e mantido a -20°C até a realização da dosagem por técnica ELISA (EZRMI-13K - Merck). A leitura ocorreu no equipamento de leitura de placas (Perkin Elmer EnVision Wallac - 2104 Multilabel Reader), seguindo as informações do fabricante. A sensibilidade deste ensaio é de 0,1 ng/ml.

3.12 Índice de resistência à insulina em jejum (IRI)

Os resultados de glicose e insulina em jejum foram usados para calcular o índice de resistência à insulina em jejum. O cálculo seguiu a fórmula descrita abaixo, baseada na literatura (DUNCAN et al., 1995):

$$IRI = \frac{\text{insulina em jejum } (\mu U/l) \times \text{glicose em jejum } (mmol/l)}{25}$$

3.13 Análise morfológica do tecido adiposo branco epididimal

3.13.1 Processamento histológico do tecido adiposo branco epididimal

Após a eutanásia, fragmentos das amostras de tecido adiposo branco epididimal (aproximadamente 100 mg) foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada (10%) por 72 horas. Após este período, o tecido foi desidratado em banhos de álcool em concentração crescente (70%, 90% e 100%), diafinizado em dois banhos de xilol, infiltrado em banhos de parafina e, por último, incluído em parafina. Os blocos de parafina foram cortados (cortes não seriados) em micrótomo com secções de 5 μ m e os cortes corados com método de rotina de Hematoxilina e Eosina (HE).

3.13.2 Análise qualitativa e quantitativa do tecido adiposo branco epididimal

Após a coloração, os cortes foram analisados em sistema de câmera de vídeo Optronics CCD acoplada a um microscópio de luz Olympus BX 53 (Olympus DP72). As imagens foram capturadas em objetiva de 20x e analisadas no software STEPnalyzer pelo método da contagem de pontos: densidade/área (μm^2). As áreas analisadas foram obtidas aleatoriamente.

Foram utilizadas 5 lâminas por animal, dos quais foram selecionados 10 campos aleatórios.

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

Para avaliação da expressão de mRNA foram realizadas as seguintes etapas de extração de RNA total, transcrição reversa e reação de polimerização em cadeia em tempo real descritas a seguir.

3.14.1 Extração do RNA total

O RNA foi isolado a partir de 100 mg de tecido adiposo epididimal utilizando kit RNeasy de extração de tecidos de lipídios (QIAGEN, Valencia, CA) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensão em 30µl de água livre de RNase.

A quantidade e qualidade do RNA foi determinada utilizando um espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, EUA). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 260/280nm que indicam contaminação por ácidos nucleicos e proteínas, e as absorvâncias de 260/230nm, que indicam contaminação por sais e solventes. As amostras de RNA foram consideradas puras (livres de contaminação) quando a razão da absorvância de 260/280nm e 260/230nm estavam entre 1,8-2,2 garantindo a qualidade do RNA obtido, segundo as exigências vigentes para a biologia molecular. Todas as amostras de RNA extraídas foram armazenadas a -70°C.

3.14.2 PCR em tempo real

O RNA total extraído (2,0 µg) foi reversamente transcrito em cDNA a 42°C, na presença da enzima transcriptase reversa e de Random primers. As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems) com volume de reação de 25 µl. Todas as reações foram realizadas em triplicatas com controle negativo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção *Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System*, nas seguintes condições: inicialmente, ocorre a desnaturação de 95°C por 20 minutos, logo após, as reações ocorreram em 40 ciclos: 95° C por 3 minutos e 60° C por 30 minutos. Os genes foram analisados pelo método CT Comparativo (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Para a etapa de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real) foi utilizado TaqMan *Thermo Fisher Scientific*. Segue abaixo, a Tabela 3 que apresenta os genes com as referências das sequências específicas, incluindo o gene 36B4, utilizado como controle interno.

Tabela 3 - Ensaio de expressão gênica e referências das sequências de iniciadores específicos utilizados no PCR em tempo real

Proteína	Símbolo do gene	Ensaio de expressão gênica TaqMan®	Referência da sequência
Acetil-CoA	acacb	Mm01204671_m1	NM_133904.2
ChREBP	MLXIPL	Mm02342723_m1	NM_021455.4
CPT1	Cpt1b	Mm00487200_m1	NM_009948.2
FABP4	Fabp4	Mm00445878_m1	NM_024406.2
FAS	Fasn	Mm00662319_m1	NM_007988.3
GLUT4	SLC2A4	Mm00436615_m1	NM_009204.2
LPL	Lpl	Mm00434764_m1	NM_008509.2
PPAR α	Ppara	Mm00440939_m1	NM_001113418.1
PPAR γ	Pparg	Mn00440940_m1	NM_011146.3
SREBP-1	Srebf1	Mm00550338_m1	NM_011480.3
T1R2	Tas1r2	Mm00499716_m1	NM_031873.1
T1R3	Tas1r3	Mm00473459_gt	NM_031872.2
36B4	Rplp0	Mm00725448_s1	NM_007475.5

Legenda: Acetil-CoA = acetil-CoA carboxilase; ChREBP = proteína de ligação do elemento responsivo ao carboidrato; CPT1 = carnitina palmitoiltransferase 1; FABP4 = proteína 4 de ligação a ácidos graxos; FAS = ácido graxo sintase; GLUT4 = transportador de glicose tipo 4; LPL = lipoproteína lipase; PPAR α = receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; PPAR γ = receptor gamma ativado por proliferador de peroxissoma; SREBP-1 = proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; T1R2 = receptor de sabor tipo 1 membro 2; T1R3 = receptor de sabor tipo 1 membro 3; 36B4 = proteína ribossômica;

Fonte: A autora, 2024.

3.15 Biomarcadores do estresse oxidativo

3.15.1 Níveis de TBARS

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, seguindo o método de Buege & Aust (1978). A determinação da concentração de TBARS baseou-se na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) se ligar a lipídios oxidados.

Em resumo, 100 mg de tecido adiposo epididimal foram homogeneizados com 1 ml de tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) e, subsequentemente, centrifugados por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em seguida, 500 μ L do sobrenadante do homogeneizado foram misturados com TCA (28% p/v em HCl 0,25N), TBA (1% em ácido acético 0,25M) e BHT (125mM em etanol), sendo aquecido por 15 minutos a 95°C e, posteriormente, resfriado em um banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4°C, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 535 nm, a água destilada foi utilizada como branco. Os níveis de TBARS foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA (154000 M⁻¹ cm⁻¹).

3.15.2 Medida da catalase

A determinação da atividade da catalase seguiu o método proposto por AEBI (1984), que se fundamenta na decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima, sendo observada ao longo de 5 minutos por meio de espectrofotometria a 240 nm.

Para a realização da técnica, 100 mg de tecido adiposo epididimal foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50 µL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 µL de água destilada, o qual foi mantido em banho maria 30°C por 1 minuto.

Em seguida adicionaram-se 10 µL da amostra e a reação foi iniciada pela adição de 900 µL de H₂O₂ (10 mM). As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante cinco minutos a 240 nm, a água destilada foi utilizada como branco. A atividade da catalase foi calculada através do coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio (39,4 M⁻¹ cm⁻¹). Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1µmol de H₂O₂ por minuto.

3.16 **Análise da função mitocondrial por respirometria de alta resolução**

A função mitocondrial do tecido adiposo branco epididimal foi determinada conforme descrito anteriormente, com pequenas modificações (KRAUSS et al., 2005; CANTO; GARCIA-ROVES, 2015). O TUBE foi preparado para medições das taxas de fluxo respiratório por dissecação mecânica com pinças afiadas em um buffer relaxante (BIOPS; em mM: CaK₂EGTA 2,77, K₂EGTA 7,23, MgCl₂ 6,56, ditiotretitol 0,5, K-MES 50, imidazol 20, taurina 20, Na₂ATP 5,77, fosfocreatina 15, pH 7,1 ajustado a 25°C) em gelo.

As taxas de respiração (consumo de oxigênio) do TUBE foram determinadas com o oxígrafo 2k-Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) em 2 ml de MIR05 a 37°C com agitação contínua. Antes de adicionar o tecido à câmara, foram realizadas medidas do peso úmido, utilizando-se de 50-70 mg por câmara. **Todas as medidas foram realizadas em concentrações de oxigênio acima de 400 nmol ml⁻¹ na câmara. O software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi utilizado para aquisição e análise dos dados.**

As taxas de consumo de oxigênio são expressas como $\text{pmol de O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg de peso úmido}^{-1}$. A digitonina é utilizada para permeabilizar as membranas celulares, preservando as membranas mitocondriais devido à sua especificidade em solubilizar o colesterol, que está em concentrações muito maiores na membrana plasmática. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, piruvato 5, malato 2, ADP 1 e succinato 10, para a análise da oxidação relacionada a carboidratos (com entrada de elétrons pelos complexos I e II da cadeia respiratória) e (câmara B, em mM) palmitoil-carnitina 0,02, malato 2 e ADP 5, para a análise da oxidação relacionada a ácidos graxos.

Os parâmetros respiratórios foram definidos como: estado 1 - taxa respiratória basal, sem adição de substratos; estado 2 - antes da adição de adenosina difosfato (ADP); estado 3 (Complexo I) - taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM); estado 3 máximo (Complexo I+II) - após a adição de succinato e estado 4, taxas de respiração após a adição do inibidor de sintase de ATP oligomicina (1 $\mu\text{g/ml}$) para identificar vazamentos de prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial. A partir dos fluxos respiratórios obtidos durante o protocolo de titulação de substratos, a razão de controle respiratório (RCR) foi calculada para o Estado 3/Estado 4, que foi utilizada como uma medida geral do acoplamento mitocondrial. A adição de citocromo c (10 μM) permitiu a avaliação da integridade da membrana mitocondrial, pois um aumento na respiração com a adição de citocromo c indica um defeito na membrana mitocondrial externa (NEVES et al., 2014).

3.17 Análise estatística

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

Foi utilizado para análise estatística do peso corporal e consumo ao longo do crescimento, *Two-way* ANOVA de medidas repetidas (MR).

As demais variáveis estudadas foram analisadas por *Two way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey's com múltiplas comparações, através do software *Graph Pad Prisma* 8.00 (San Diego, CA, USA), considerando nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Consumo alimentar

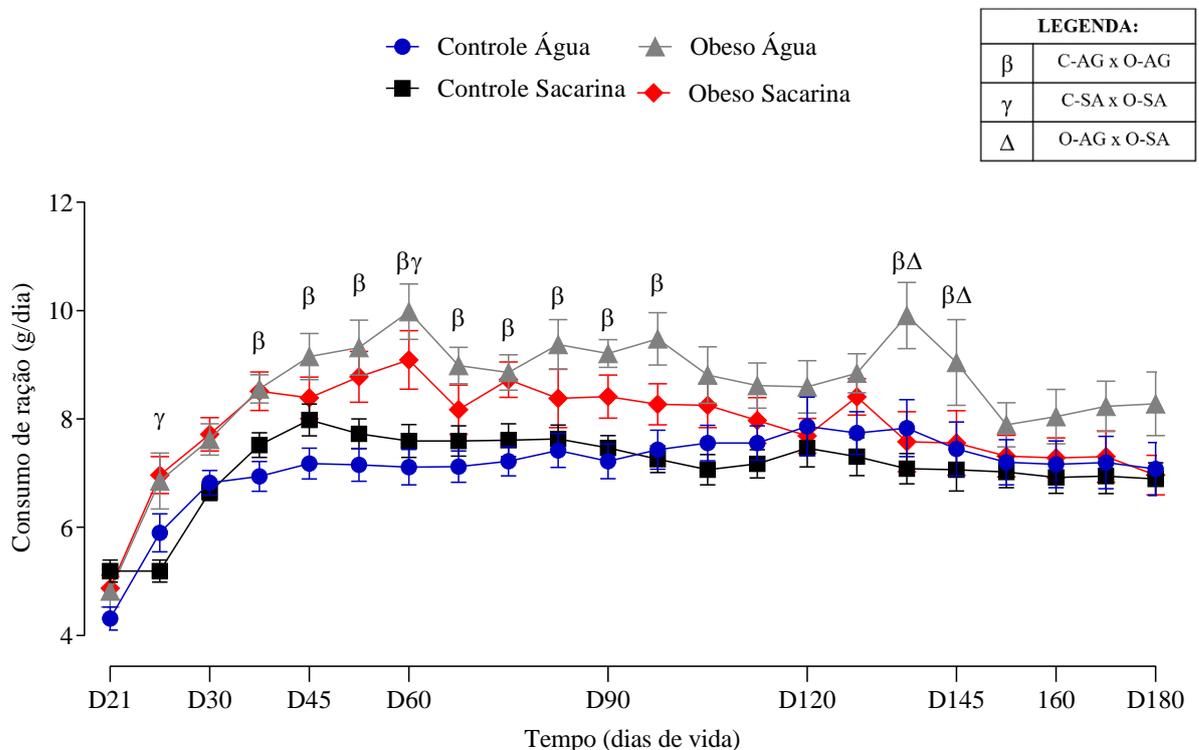
4.1.1 Consumo alimentar de camundongos do desmame até 180 dias de vida

O consumo alimentar dos animais foi monitorado ao longo do estudo, e os resultados dessas avaliações são apresentados tanto em gramas quanto em calorias.

Através dos nossos dados, é possível observar que a redução de ninhada promoveu um maior consumo de ração pelo grupo obeso (O-AG) em alguns momentos ao longo do crescimento, quando comparados com seu controle (C-AG) (Figura 15 e Figura 16).

O consumo de sacarina, por sua vez, não alterou o consumo alimentar, exceto aos 130 e 145 dias de vida, onde os animais obesos que ingeriram o adoçante (O-SA) consumiram uma diminuída quantidade de ração quando comparado com o grupo obeso que consumiu apenas água (O-AG) (Figura 15 e Figura 16).

Figura 15 - Consumo de ração (em gramas) dos grupos controles e obesos até 180 dias

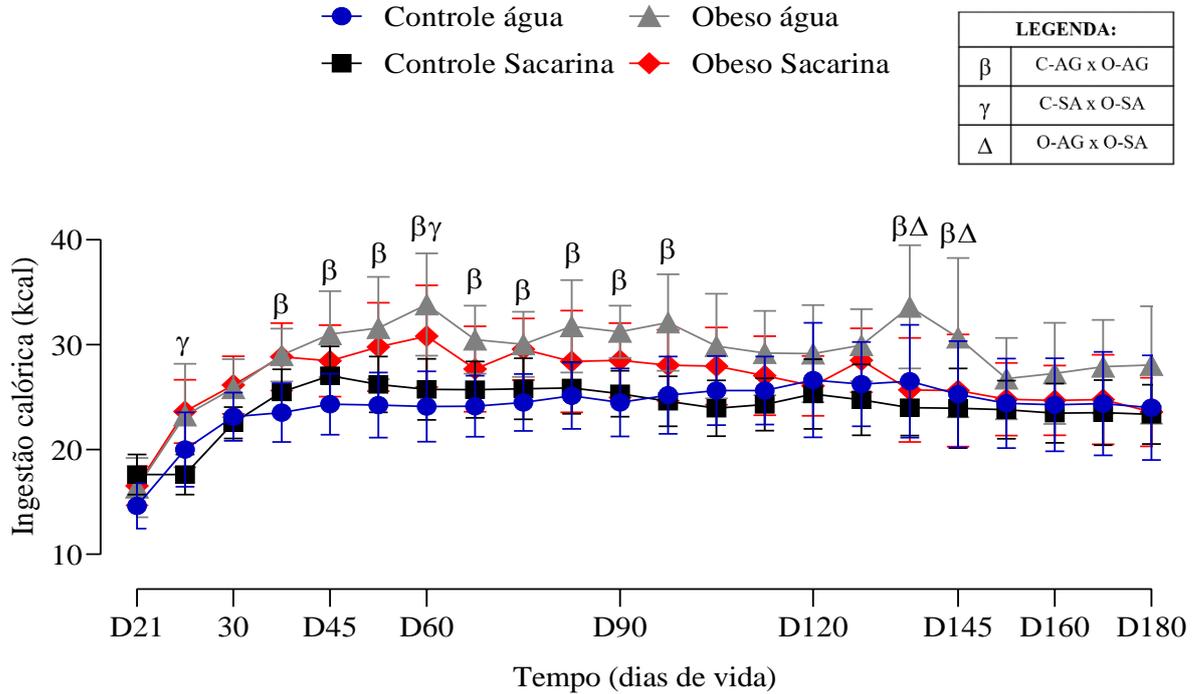


Legenda: β = diferença entre C-AG x O-AG; γ = diferença entre C-SA x O-SA; Δ = diferença entre O-AG x O-SA; g = gramas;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa a quantidade em gramas (g) de ração consumida durante todo o estudo;

Fonte: A autora, 2024.

Figura 16 - Consumo de calorias (kcal) dos grupos controles e obesos até 180 dias



Legenda: β = diferença entre C-AG x O-AG; γ = diferença entre C-SA x O-SA; Δ = diferença entre O-AG x O-SA; kcal = quilocalorias;
 Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa a quantidade em calorias (kcal) de ração consumida durante todo o estudo;
 Fonte: A autora, 2024.

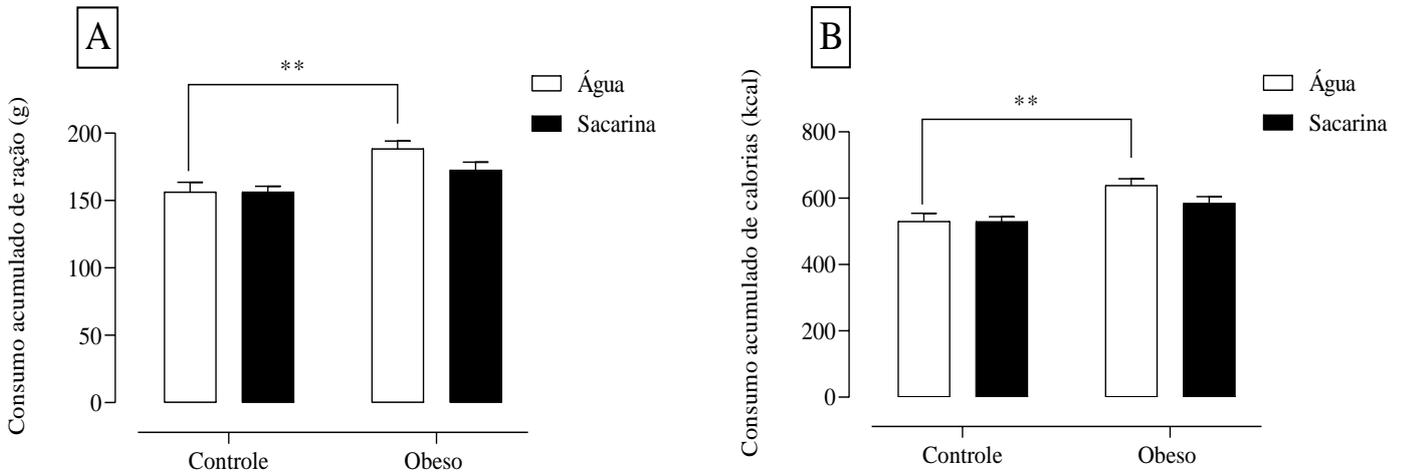
4.1.2 Consumo acumulado de ração do desmame até 180 dias de vida

Para melhor compreensão do impacto das intervenções sobre o consumo alimentar dos animais, avaliamos o consumo acumulado. A análise do consumo ao longo do tempo revela maior consumo em momentos pontuais do crescimento, enquanto o consumo acumulado proporciona uma visualização mais abrangente do impacto dessas variações ao longo das semanas.

Podemos observar um aumento significativo de 20 % ($p < 0,01$) do consumo acumulado de ração padrão (gramas e calorias) no grupo obeso água (O-AG) em comparação ao grupo controle água (C-AG) (Figura 17, A e B).

A sacarina promoveu diferença significativa no consumo acumulado de ração dos animais.

Figura 17 - Consumo acumulado de ração e calorias dos grupos controle e obesos



Legenda: A = Consumo acumulado de ração aos 180 dias; B = Consumo acumulado de calorias aos 180 dias; ** = $p < 0,01$; g = gramas; kcal = quilocalorias;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8-15 animais por grupo. A figura representa a consumo acumulado de ração e calorias dos 21 aos 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2024.

4.2 Ingestão líquidos

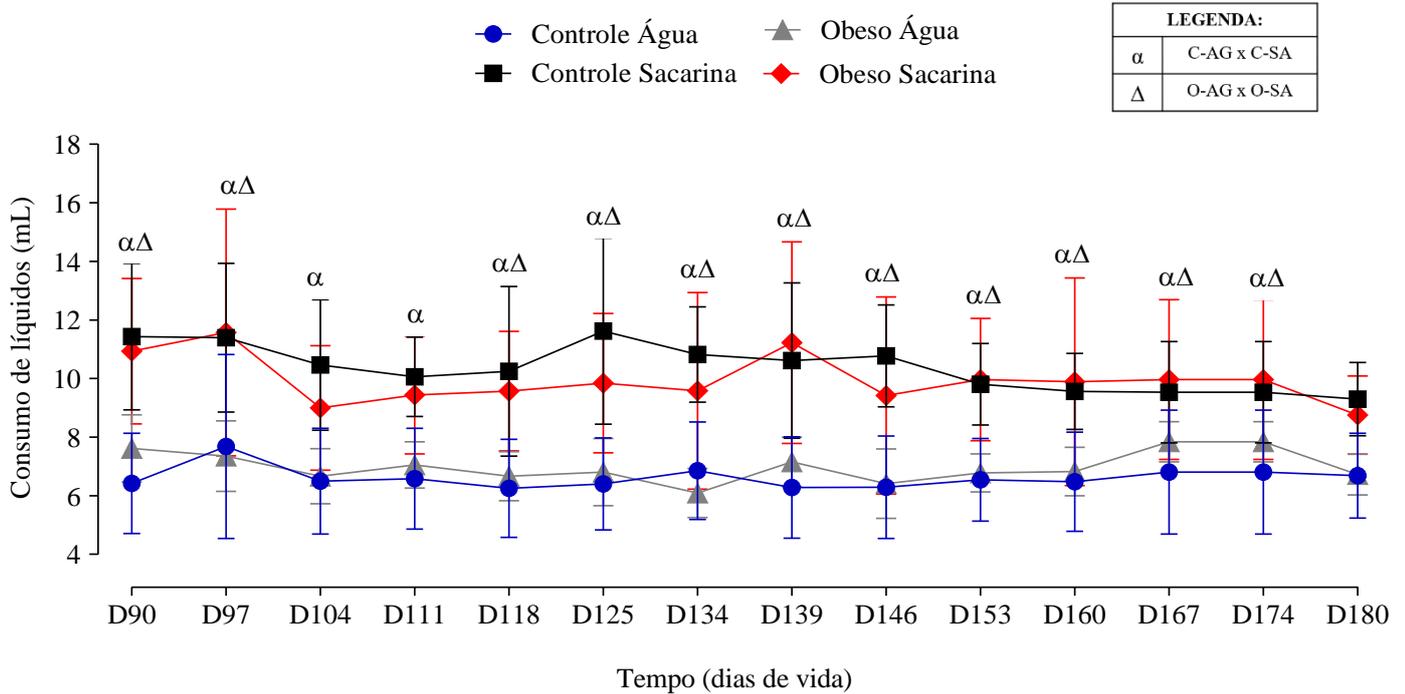
4.2.1 Ingestão de líquidos ao longo da intervenção

Ao completarem 90 dias de vida, iniciamos o acompanhamento da ingestão de líquidos (água filtrada ou água com sacarina a 0,3%) pelos animais, estendendo essa análise até o término do estudo.

Observamos que os camundongos que receberam adoçante (C-SA e O-SA) apresentaram aumento significativo da ingestão de líquidos em comparação com aqueles que consumiram apenas água (C-AG e O-AG). Tal diferença foi observada desde o início da intervenção e se manteve o final do estudo (Figura 18).

Os animais que consumiram apenas água (C-AG e O-AG) não apresentaram diferença significativa no consumo hídrico durante todo o estudo.

Figura 18 - Ingestão semanal de líquidos pelos camundongos dos 90 aos 180 dias



Legenda: α = diferença entre C-AG x C-SA; Δ = diferença entre O-AG x O-SA; ml = mililitros;

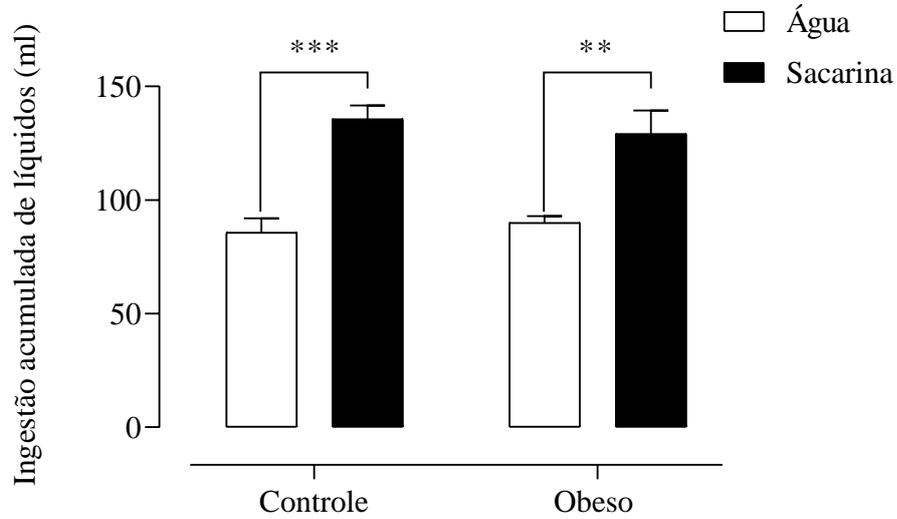
Nota: Os resultados são expressos como Média ± EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa a quantidade em mililitros (ml) de líquidos (água filtrada ou água com sacarina) ingeridos durante a intervenção (90 até 180 dias de vida);

Fonte: A autora, 2024.

4.2.2 Ingestão acumulada de líquidos dos grupos controles e obesos

A avaliação da ingestão acumulada de líquidos corrobora com os dados de ingestão ao longo do crescimento. Observamos um aumento significativo do consumo de sacarina no grupo controle (C-SA) (58%, $p < 0,001$) e no grupo obeso (O-SA) (44%, $p < 0,01$), quando comparados aos seus controles (C-AG e O-AG) (Figura 19).

Figura 19 - Ingestão acumulada de líquidos pelos camundongos dos 90 aos 180 dias



Legenda: *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; ml = mililitros;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, $n = 8$ animais por grupo. A figura representa a ingestão acumulada de líquidos (ml) dos animais controles e obesos, dos 90 aos 180 dias de vida;

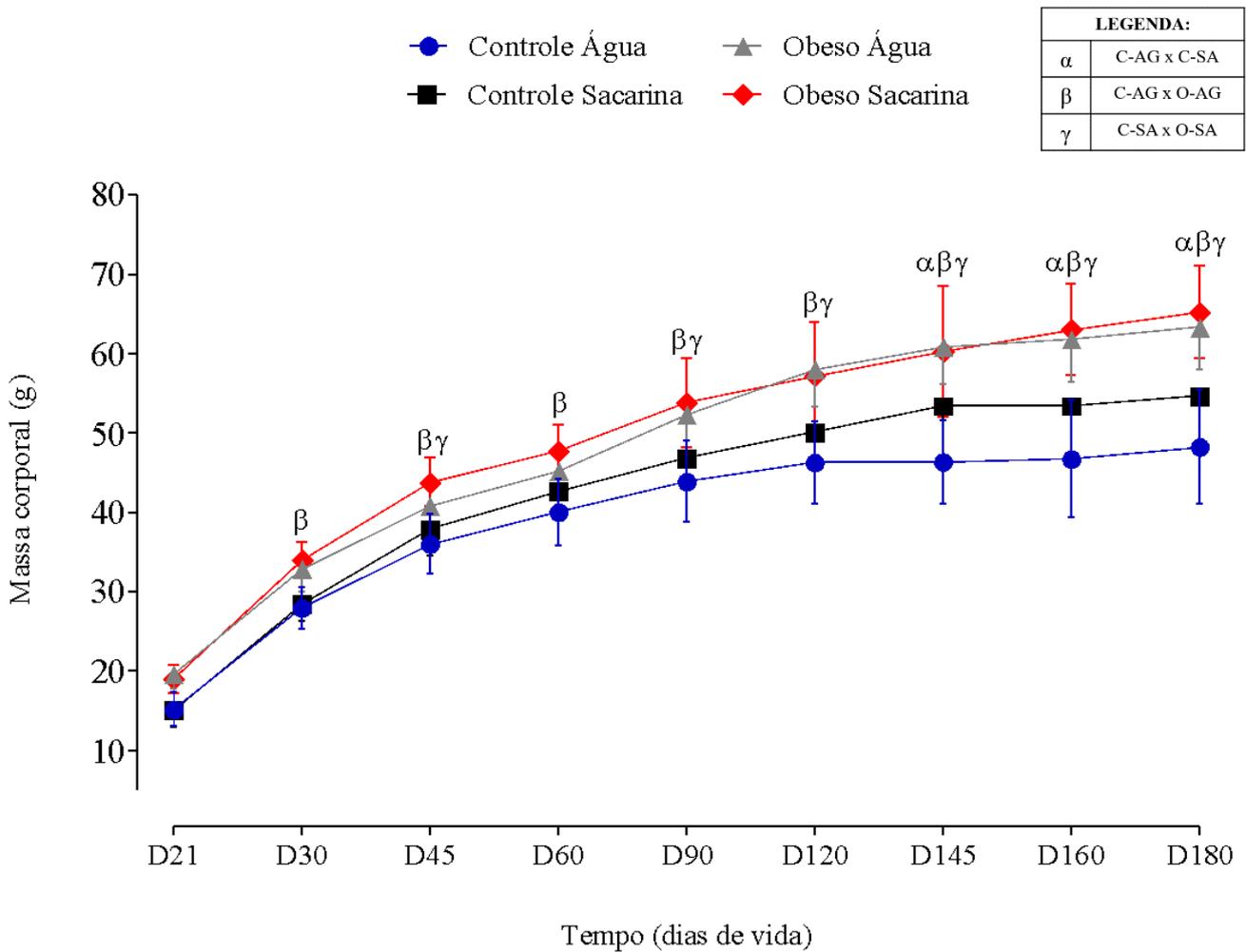
Fonte: A autora, 2024.

4.3 Ganho de massa corporal ao longo do crescimento

Os animais que foram submetidos à redução de ninhada para indução da obesidade (O-AG e O-SA) apresentaram aumento significativo da massa corporal ($p < 0,05$) quando comparados aos seus controles (C-AG e C-SA). Tal diferença torna-se mais pronunciada à medida que a idade dos animais avança ($p < 0,0001$).

A ingestão de sacarina promoveu, no grupo controle (C-SA), aumento significativo ($p < 0,001$) da massa corporal. Tal aumento foi observado a partir do 145º dia de vida (dois meses após o início da ingestão de sacarina) e manteve-se maior até completarem 180 dias de vida (Figura 20).

Figura 20 - Ganho de massa corporal de camundongos até 180 dias



Legenda: α = diferença entre C-AG x C-SA; β = diferença entre C-AG x O-AG; γ = diferença entre C-SA x O-SA; g = gramas; D = dia;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa o ganho de massa corporal (g) dos animais do desmame (21 dias de vida) até a eutanásia (180 dias de vida);

Fonte: A autora, 2024.

4.4 Análise de componentes da composição corporal por RMN

Através da técnica de ressonância magnética nuclear foi possível analisar alguns componentes da composição corporal dos animais.

Avaliamos os parâmetros estudados antes de iniciarmos a oferta do adoçante (aos 90 dias), com o intuito de demonstrar que os animais eram equivalentes antes da subdivisão dos grupos, e ao finalizarmos o estudo (aos 180 dias) reavaliamos os animais para observar os efeitos das intervenções sobre os mesmos parâmetros.

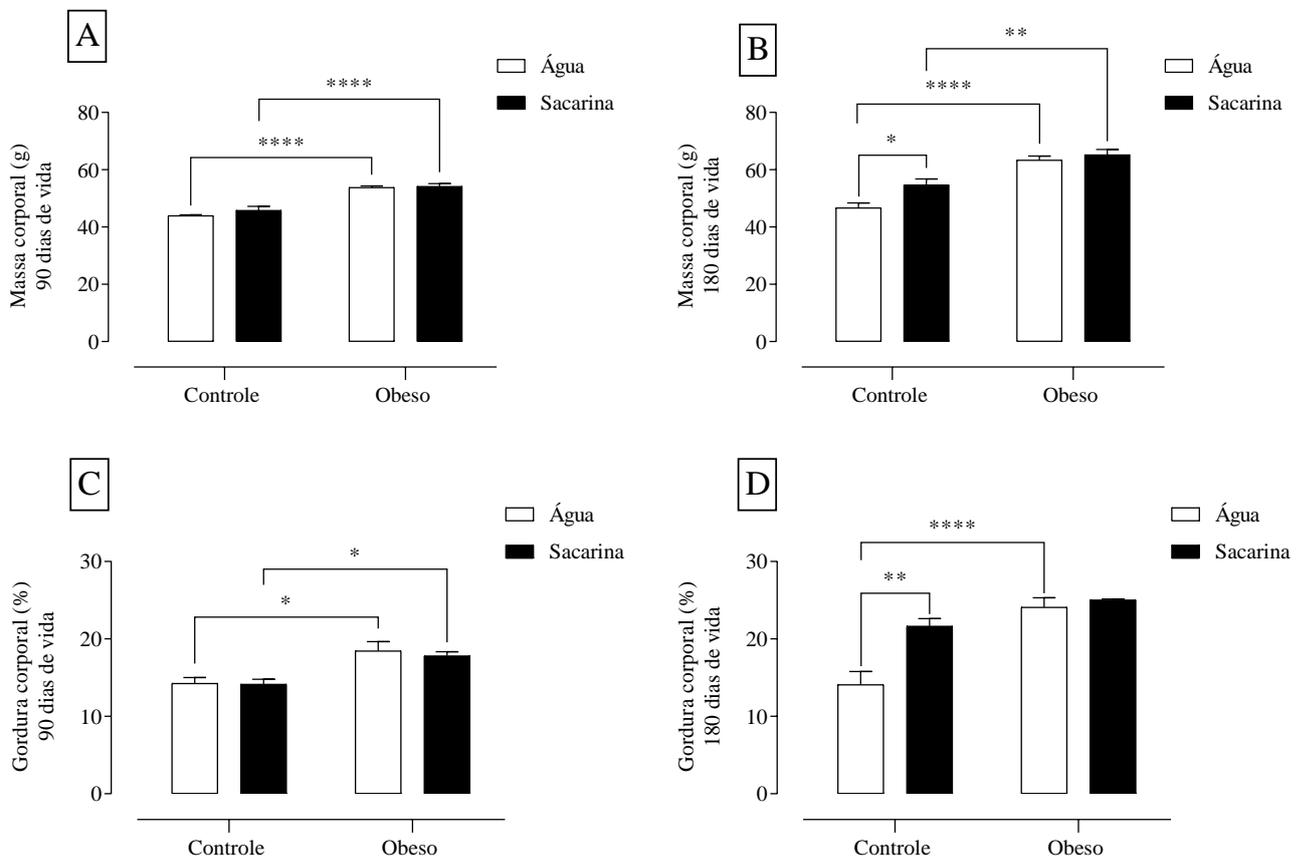
Conforme esperado, já aos 90 dias de vida, os animais obesos (O-AG e O-SA) apresentaram aumento da massa corporal (22% e 18%, $p < 0,0001$, respectivamente), da porcentagem de gordura (29% e 26%, $p < 0,05$, respectivamente) e aumento de fluidos corporais (14% e 15%, $p < 0,001$, respectivamente) como resultado da indução da obesidade nesses animais (Figura 21, A, C e G).

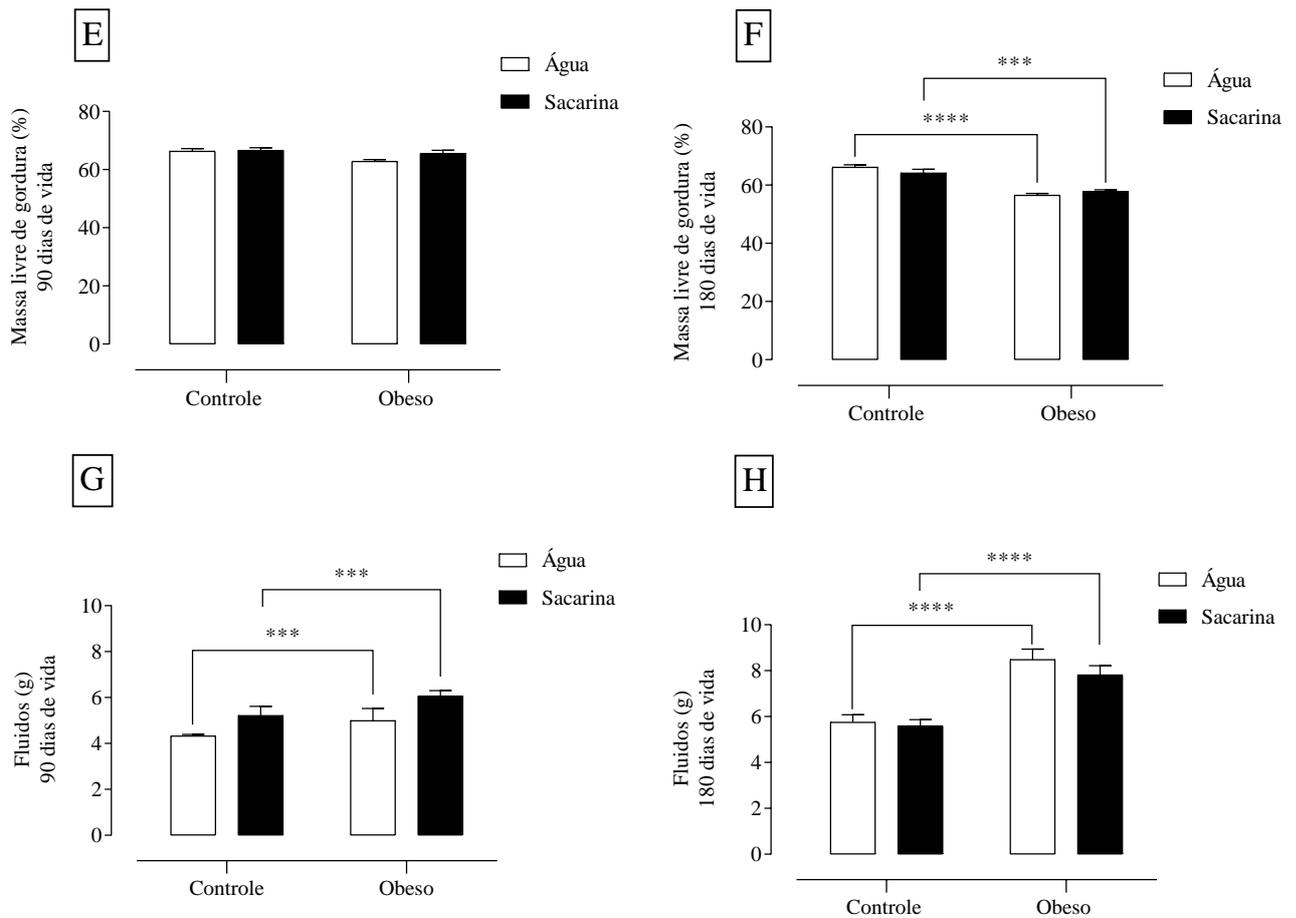
O impacto da redução de ninhada refletiu na idade adulta onde observamos, aos 180 dias, aumento da massa corporal (37%, 19%), da porcentagem de gordura (71%), aumento de fluidos corporais (47%, 42%) e redução significativa (14%, 10%) da massa livre de gordura (predominantemente massa muscular) (Figura 21, B, D, F e H).

O consumo de sacarina promoveu aumento significativo de 17% ($p < 0,05$) da massa corporal e 57% ($p < 0,001$) da gordura corporal nos animais controles que ingeriram o adoçante (C-SA) aos 180 dias (Figura 21, B e D).

Em contrapartida, o consumo de sacarina não influenciou de forma significativa a composição corporal dos animais obesos.

Figura 21 - Componentes da composição corporal de camundongos aos 90 e 180 dias





Legenda: A = massa corporal aos 90 dias de vida; B = massa corporal aos 180 dias de vida; C = porcentagem de gordura corporal aos 90 dias de vida; D = porcentagem de gordura corporal aos 180 dias de vida; E = porcentagem de massa livre de gordura aos 90 dias de vida; F = porcentagem de massa livre de gordura aos 180 dias de vida; G = fluidos corporais aos 90 dias de vida; H = fluidos corporais aos 180 dias de vida; **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; g = gramas; % = porcentagem;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa a avaliação de alguns componentes da composição corporal de animais controles e obesos, aos 90 e aos 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2024.

4.5 Parâmetros biométricos

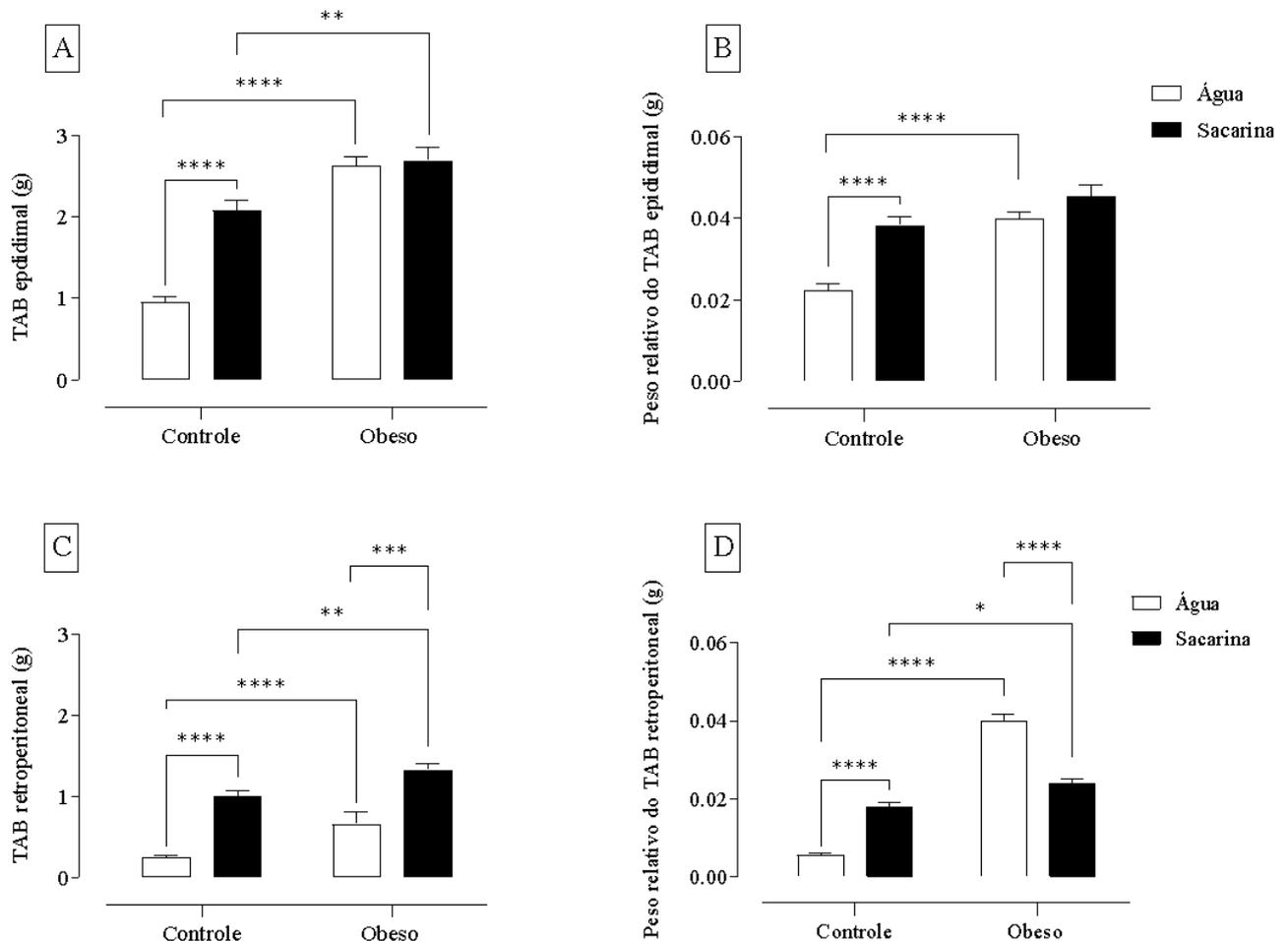
É possível observar que a indução da obesidade através da redução de ninhada promoveu aumento de 177% ($p < 0,0001$) do tecido adiposo branco epididimal no grupo O-AG e de 29% ($p < 0,001$) no grupo O-SA (Figura 22, A). Além disso, foi visto um aumento de 171% ($p < 0,01$) do tecido adiposo retroperitoneal no grupo O-AG e de 32% ($p < 0,05$) no grupo O-SA, quando comparados aos seus controles (C-AG e C-SA) (Figura 22, C).

Foi realizada a análise do peso relativo dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal. Verificamos aumento ($p < 0,0001$) do peso relativo desses tecidos no grupo O-AG, quando comparados ao grupo C-AG (Figura 22, B e D).

A intervenção com sacarina promoveu aumento de 119% ($p < 0,0001$) do tecido adiposo epididimal e de 317% ($p < 0,0001$) do TAB retroperitoneal e de seus pesos relativos nos animais controles (C-SA) quando comparado com o grupo controle que ingeriu apenas água (C-AG) (Figura 22, A e C).

Nos animais obesos (O-SA), o consumo de sacarina promoveu aumento de 103% ($p < 0,0001$) do peso do TAB retroperitoneal, quando comparados ao grupo obeso que bebeu água (O-AG) (Figura 22, C). Em contrapartida, o peso relativo do TAB retroperitoneal foi menor ($p < 0,0001$) no grupo obeso que recebeu o adoçante (O-SA), quando comparado ao grupo obeso água (O-AG) (Figura 22, D).

Figura 22 - Tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal e seus respectivos pesos relativos em camundongos aos 180 dias



Legenda: A = tecido adiposo branco epididimal (g) aos 180 dias de vida; B = peso relativo do tecido adiposo branco epididimal aos 180 dias de vida; C = tecido adiposo branco retroperitoneal (g) aos 180 dias; D = peso relativo do tecido adiposo branco retroperitoneal aos 180 dias de vida; TAB = tecido adiposo branco; **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; g = gramas;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa o peso do TAB epididimal e retroperitoneal e seus respectivos pesos relativos aos 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2024.

Na tabela a seguir, apresentamos os impactos da obesidade e do consumo de sacarina sobre outros tecidos e órgãos. O ganho excessivo de massa corporal observado nos animais obesos (O-AG) refletiu no aumento de 13% ($p < 0,001$) do peso do coração, 120% ($p < 0,01$) do peso da gordura do coração e 22% ($p < 0,01$) do peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia, aumento de 31% ($p < 0,0001$) do peso do fígado, 90% ($p < 0,0001$) do peso do tecido adiposo marrom (TAM) e 10% ($p < 0,05$) do peso do músculo esquelético - sóleo (Tabela 4).

O consumo de adoçante, por sua vez, promoveu nos animais controle (C-SA) aumento de: 5% ($p < 0,01$) do comprimento nasoanal corrigido comprimento da tíbia, 9% ($p < 0,01$) do peso do coração, 22% ($p < 0,01$) do peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia, 16% ($p < 0,001$) do peso do fígado, 100% ($p < 0,0001$) do peso do TAM e 16% ($p < 0,0001$) do peso do músculo esquelético - sóleo (Tabela 4).

LEGENDA:	
α	C-AG x C-SA
β	C-AG x O-AG
γ	C-SA x O-SA

Tabela 4 - Parâmetros biométricos de camundongos controles e obesos aos 180 dias

Parâmetros	C-AG	C-SA	O-AG	O-SA
Massa corporal (g)	47,47 \pm 0,68	53,95 \pm 0,86 ^{α}	64,19 \pm 1,09 ^{β}	62,32 \pm 1,48 ^{γ}
Índice de Lee	356,80 \pm 2,42	359,44 \pm 1,81	368,89 \pm 2,7 ^{β}	367,40 \pm 2,79
Comprimento nasoanal (cm) /comprimento da tíbia (cm)	4,30 \pm 0,06	4,54 \pm 0,05 ^{α}	4,63 \pm 0,05 ^{β}	4,57 \pm 0,06
Peso do coração (g)	0,23 \pm 0,005	0,25 \pm 0,005 ^{α}	0,26 \pm 0,005 ^{β}	0,26 \pm 0,008
Peso do coração (g)/ comprimento da tíbia (cm)	0,09 \pm 0,002	0,11 \pm 0,003 ^{α}	0,11 \pm 0,003 ^{β}	0,11 \pm 0,005
Peso do tecido adiposo do coração (g)	0,05 \pm 0,004	0,07 \pm 0,005	0,11 \pm 0,02 ^{β}	0,14 \pm 0,03 ^{γ}
Peso do fígado (g)	1,85 \pm 0,04	2,15 \pm 0,05 ^{α}	2,42 \pm 0,07 ^{β}	2,30 \pm 0,07
Peso do fígado (g)/ massa corporal (g)	0,039 \pm 0,0007	0,039 \pm 0,0006	0,036 \pm 0,001	0,038 \pm 0,0007
Peso do tecido adiposo marrom (g)	0,10 \pm 0,006	0,20 \pm 0,012 ^{α}	0,19 \pm 0,009 ^{β}	0,19 \pm 0,014
Peso do músculo esquelético (g)	0,19 \pm 0,005	0,22 \pm 0,003 ^{α}	0,21 \pm 0,007 ^{β}	0,22 \pm 0,006

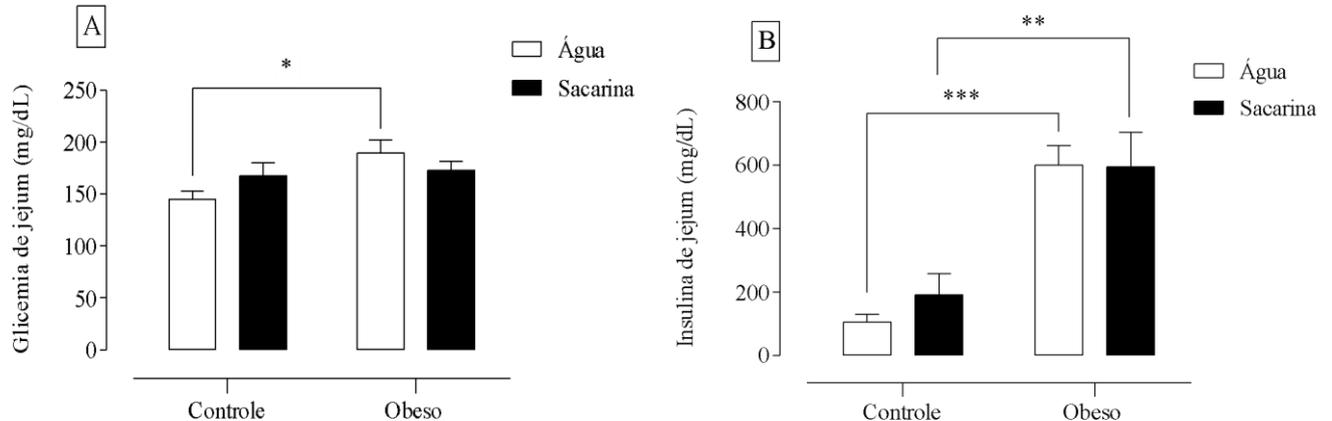
Legenda: C-AG = controle água; C-SA = controle sacarina; O-AG = obeso água; O-SA = obeso sacarina; α = diferença entre C-AG x C-SA; β = diferença entre C-AG x O-AG; γ = diferença entre C-SA x O-SA; g = gramas, cm = centímetros;

Nota: Resultados expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A tabela mostra parâmetros biométricos dos grupos controles e obesos aos 180 dias de vida;
Fonte: A autora, 2024.

4.6 Dosagem sérica de glicose e insulina em jejum

A obesidade induziu um aumento significativo de 31% ($p < 0,05$) da glicemia de jejum apenas no grupo água (O-AG) mas promoveu aumento da concentração sérica de insulina nos dois grupos obesos (O-AG e O-SA). Os animais que consumiram apenas água (O-AG) demonstraram aumento de 473% ($p < 0,001$) e, os animais que ingeriram adoçante (O-SA) apresentaram aumento de 209% ($p < 0,01$), quando comparados aos seus controles (C-AG e C-SA) (Figura 23, B).

Figura 23 - Glicemia e insulinemia de jejum de camundongos aos 180 dias



Legenda: A = glicemia de jejum aos 180 dias de vida; B = insulina de jejum aos 180 dias de vida; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; mg = miligrama; dL = decilitro;

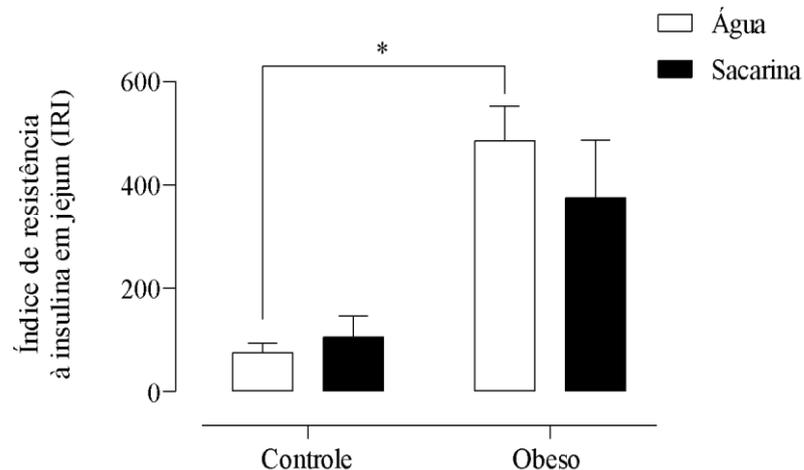
Nota: Resultados expressos como Média \pm EPM, n = 12 animais por grupo. A figura representa a dosagem sérica de glicose e insulina de animais em jejum aos 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2024.

4.7 Índice de resistência à insulina (IRI)

Ao realizarmos o cálculo do índice de resistência à insulina verificamos um aumento significativo de 538% ($p < 0,01$) no grupo obeso água (O-AG x C-AG) (Figura 24).

Figura 24 - Índice de resistência à insulina de camundongos aos 180 dias



Legenda: IRI = índice de resistência à insulina; * = $p < 0,05$;

Nota: Resultados expressos como Média \pm EPM n = 8 animais por grupo. A figura representa o índice de resistência à insulina em jejum de camundongos aos 180 dias de vida;

Fonte: A autora, 2024.

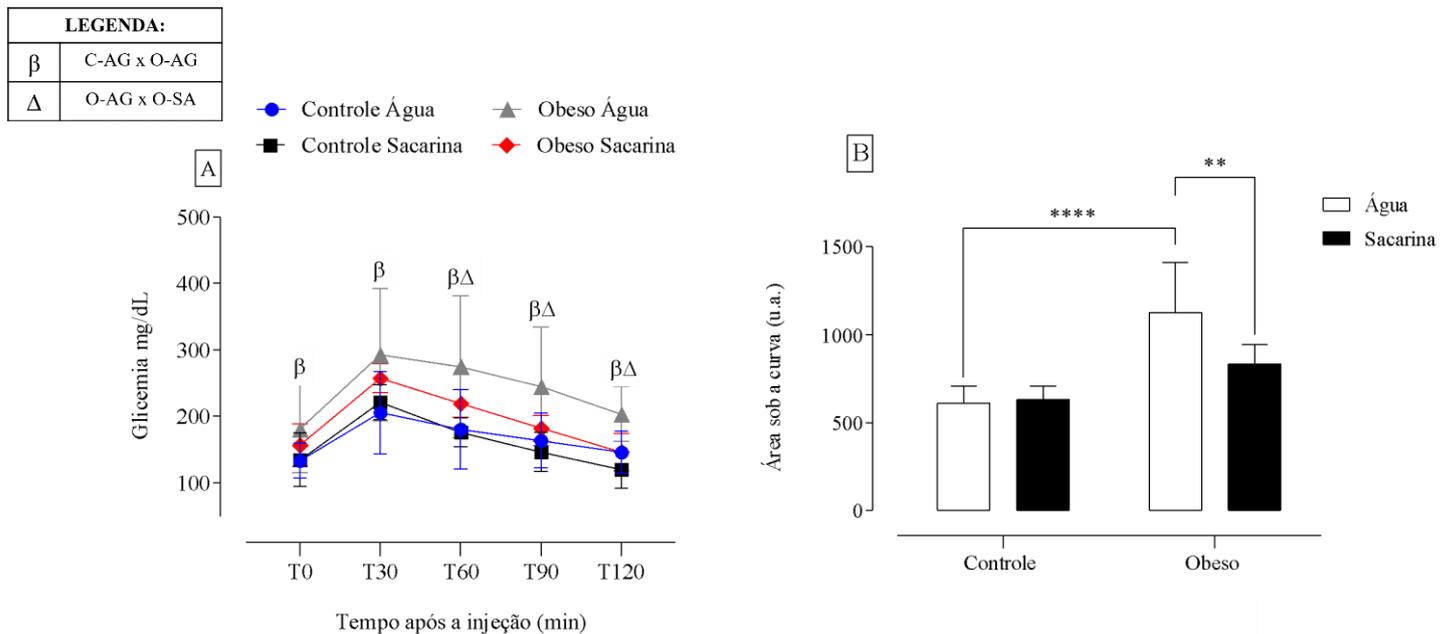
4.8 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Podemos observar que a obesidade promoveu um aumento de 35%, 52%, 50% e 39% ($p < 0,0001$) da glicemia no grupo obeso água (O-AG) nos respectivos tempos do teste (T0, T30, T60, T90 e T120), quando comparado ao seu controle (C-AG).

Contrariamente, a sacarina promoveu diminuição de 20%, 26% e 28% ($p < 0,0001$) da glicemia do grupo obeso (O-SA) nos tempos T60, T90 e T120, respectivamente. Aos 120 minutos, o grupo O-SA reduziu seus níveis glicêmicos a ponto de equiparar-se aos níveis observados nos animais do grupo controle (C-SA e C-AG) (Figura 25, A)

A área sob a curva foi maior (85%, $p < 0,0001$) no grupo obeso que recebeu água (O-AG). De maneira oposta, o grupo obeso que bebeu adoçante (O-SA) apresentou diminuição de 26% ($p < 0,01$) da área sob a curva, quando comparados aos animais obesos que receberam apenas água (O-AG) (Figura 25, B).

Figura 25 - Teste intraperitoneal de tolerância a glicose de camundongos aos 180 dias



Legenda: A = teste intraperitoneal de tolerância a glicose; B = área sob a curva do TITG; β = diferença entre C-AG x O-AG; Δ = diferença entre O-AG x O-SA; 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); mg = miligrama; dL = decilitro; **** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,01$;

Nota: Resultados expressos como Média \pm EPM, $n = 8$ animais por grupo. A figura representa o teste intraperitoneal de tolerância à glicose em camundongos ao final do estudo (180 dias);

Fonte: A autora, 2024.

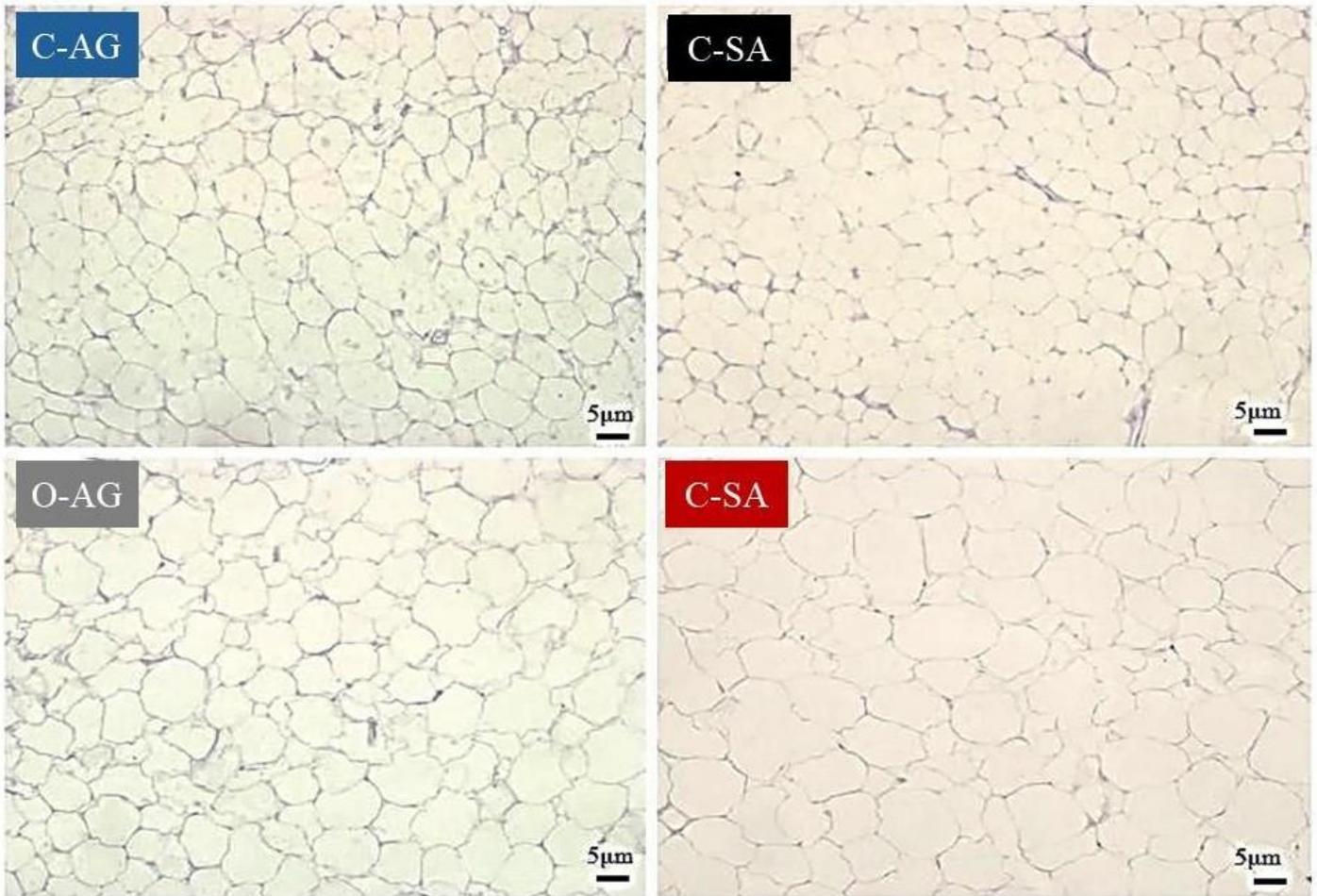
4.9 Análise morfológica do tecido adiposo branco epididimal

As análises do grupo C-AG demonstraram morfologia característica do tecido adiposo branco, com a presença de adipócitos uniloculares, que contêm apenas uma gotícula lipídica grande no citoplasma (Figura 26).

Foi possível verificar, já na análise qualitativa, a hipertrofia (aumento de tamanho) dos adipócitos nos animais obesos, como resultado da indução da obesidade no início da vida (O-AG e O-SA) (Figura 26). Isso é evidenciado pela presença de gotículas de gordura aumentadas em comparação aos seus controles (C-AG e C-SA) (Figura 26).

É possível observar uma hiperplasia do TAFE no grupo controle que ingeriu o adoçante (C-SA) quando comparado ao grupo controle água (C-AG) (Figura 26).

Figura 26 - Análise histológica qualitativa do tecido adiposo branco epididimal de camundongos aos 180 dias



Legenda: C-AG com aumento de 20x; C-SA com aumento de 20x; O-AG com aumento de 20x; O-SA com aumento de 20x;

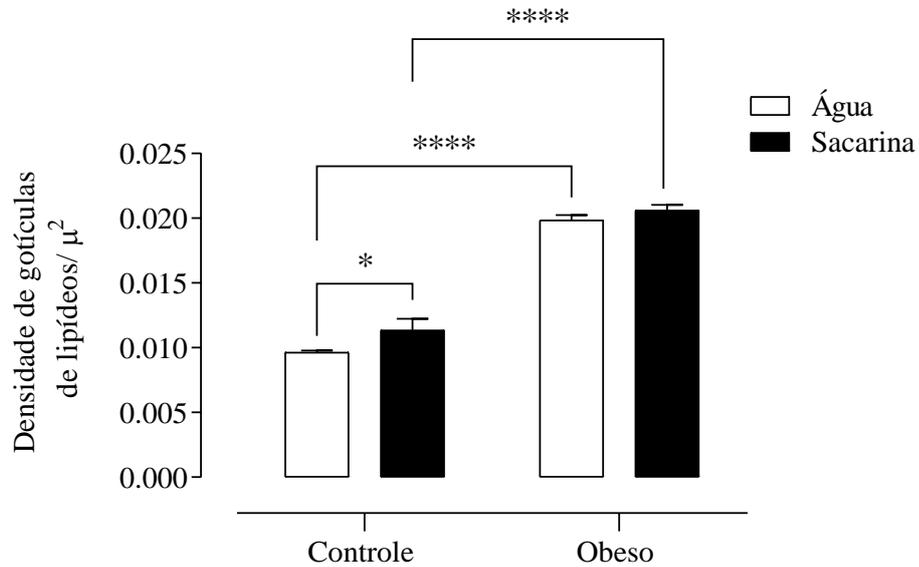
Nota: n = 8 animais por grupo. A figura representa a histologia do tecido adiposo branco epididimal de camundongos adultos por coloração Hematoxilina - Eosina (HE) com aumento de 20x;

Fonte: A autora, 2024.

Com o intuito de aprimorar a compreensão das imagens apresentadas anteriormente, realizamos a análise histológica quantitativa do TABE por meio do cálculo da densidade das gotículas de lipídios. Foi constatado aumento significativo na área dos adipócitos dos grupos obesos em comparação aos controles, atingindo 100% e 133% ($p < 0,0001$) nos grupos O-AG e O-SA, respectivamente (Figura 27), corroborando as análises qualitativas.

O consumo de sacarina promoveu aumento de 22% ($p < 0,05$) da área dos adipócitos no grupo controle que ingeriu o adoçante (C-SA) quando comparado ao grupo controle água (C-AG) (Figura 27). Os grupos O-AG e O-SA não apresentaram diferença.

Figura 27 - Análise histológica quantitativa do tecido adiposo branco epididimal de camundongos aos 180 dias



Legenda: * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$; μ^2 = micrometro ao quadrado;

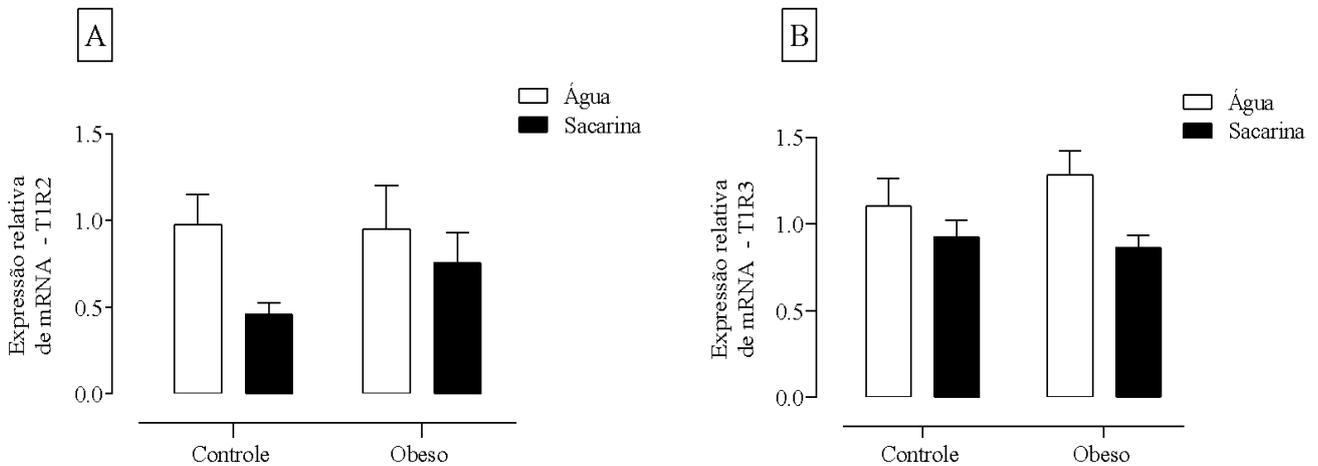
Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, $n = 15$ animais por grupo. A figura representa a densidade de gotículas de lipídios do tecido adiposo branco epididimal de camundongos aos 180 dias;

Fonte: A autora, 2024.

4.10 Reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real)

Não observamos diferenças nas expressões de mRNA dos receptores de sabor doce (T1R2 e T1R3) no tecido adiposo branco epididimal dos animais estudados (Fig. 28, A e B).

Figura 28 - Avaliação da expressão de mRNA dos receptores de sabor doce no TABE de camundongos aos 180 dias



Legenda: A = Expressão gênica de T1R2 aos 180 dias; B = Expressão gênica de T1R3 aos 180 dias; TABE = tecido adiposo branco epididimal; T1R2 = receptor de sabor tipo 1 membro 2; T1R3 = receptor de sabor tipo 1 membro 3;

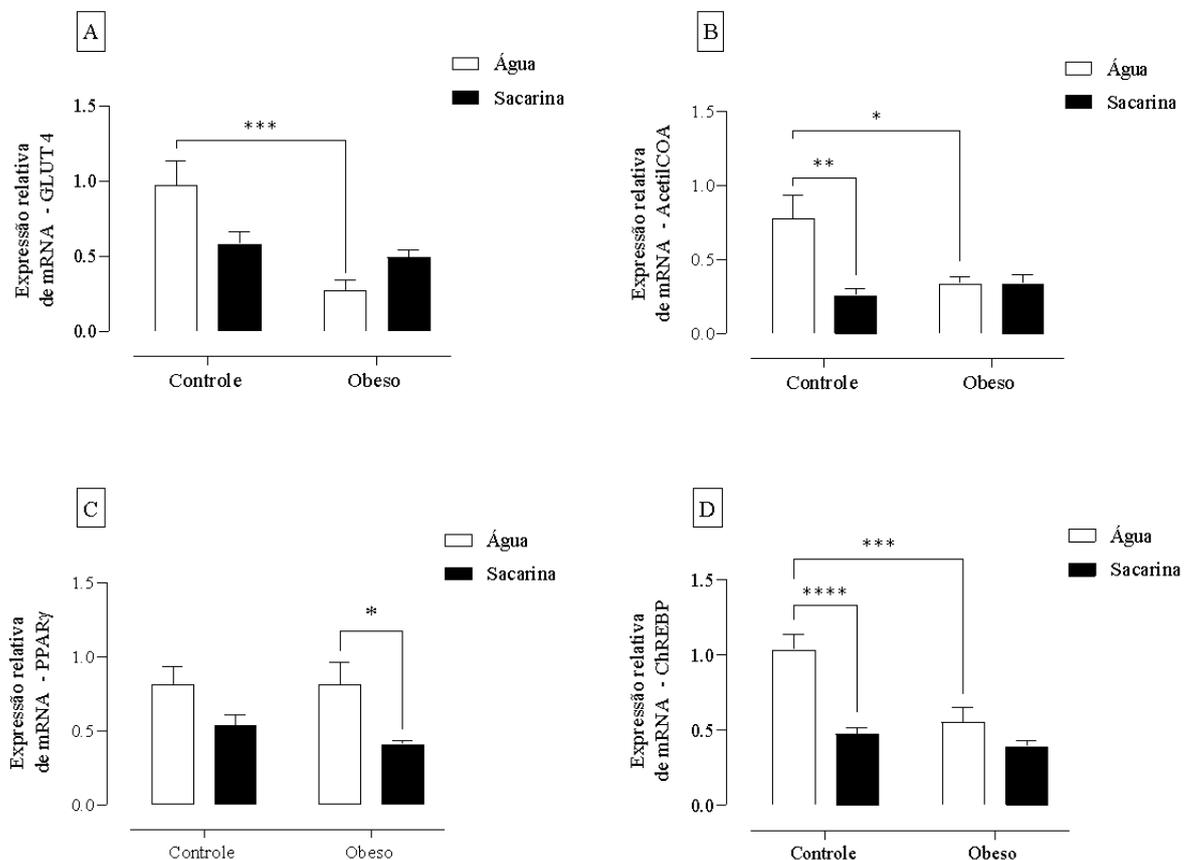
Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa a expressão gênica dos receptores de sabor doce no tecido adiposo branco epididimal de camundongos adultos (180 dias de vida).

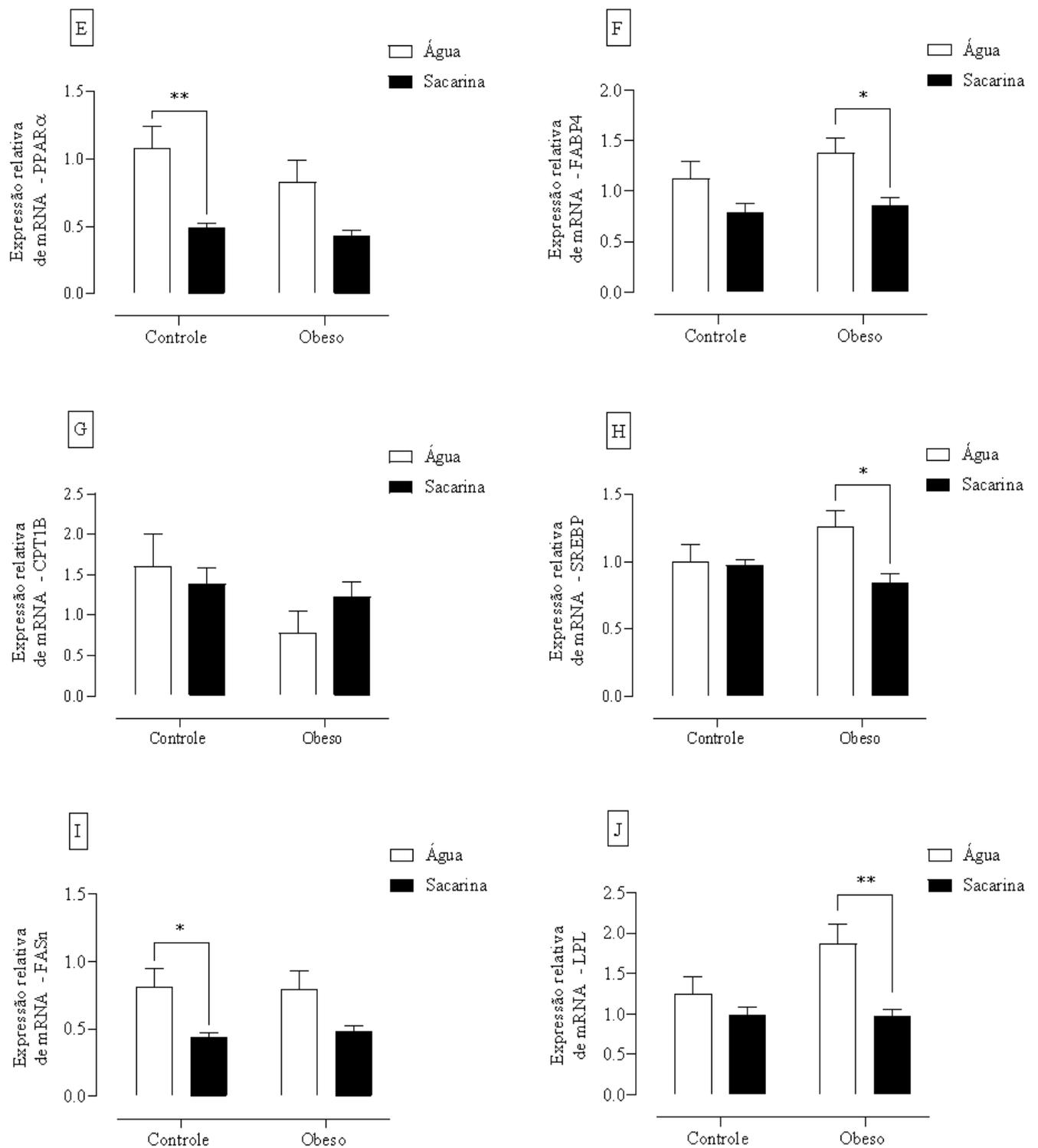
Fonte: A autora, 2024.

A análise da expressão de genes envolvidos no metabolismo glicídico e lipídico no tecido adiposo epididimal demonstrou que os animais obesos que ingeriram apenas água (O-AG) apresentaram diminuição da expressão gênica de GLUT4 (72% $P < 0,001$), Acetil-CoA (56% $p < 0,05$) e ChREBP (46% $p < 0,001$) (Figura 29, A, B e D).

O consumo crônico de sacarina promoveu nos animais controles (C-SA) uma diminuição da expressão de Acetil-CoA (66%, $p < 0,01$), ChREBP (54%, $p < 0,0001$), PPAR α (55%, $p < 0,01$) e FASn (46%, $p < 0,05$) (Figura 29, B, D, E e I). Já no grupo obeso (O-SA), a ingestão do adoçante acarretou a diminuição de PPAR γ (50%, $p < 0,05$), FABP4 (38%, $p < 0,05$), SREBP-1 (33%, $p < 0,05$) e LPL (48% $p < 0,01$) (Figura 29, C, F, H e J).

Figura 29 - Avaliação da expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo glicídico e lipídico no TABE de camundongos aos 180 dias





Legenda: A = Expressão gênica de GLUT4; B = Expressão gênica de Acetil-CoA; C = Expressão gênica de PPAR γ ; D = Expressão gênica de ChREBP; E = Expressão gênica de PPAR α ; F = Expressão gênica de FABP4; G = Expressão gênica de CPT1B; H = Expressão gênica de SREBP-1; I = Expressão gênica de FASn; J = Expressão gênica de LPL; Acetil-CoA = acetil-CoA carboxilase; ChREBP = proteína de ligação do elemento responsivo ao carboidrato; CPT1 = carnitina palmitoiltransferase 1; FABP4 = proteína 4 de ligação a ácidos graxos; FAS = ácido graxo sintase; GLUT4 = transportador de glicose tipo 4; LPL = lipoproteína lipase; PPAR α = receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; PPAR γ = receptor gamma ativado por proliferador de peroxissoma; SREBP-1 = proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; g = gramas; mRNA = microRNA;

Nota: Os resultados são expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa a expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo glicídico e lipídico no tecido adiposo branco epididimal de camundongos adultos (180 dias de vida);

Fonte: A autora, 2024.

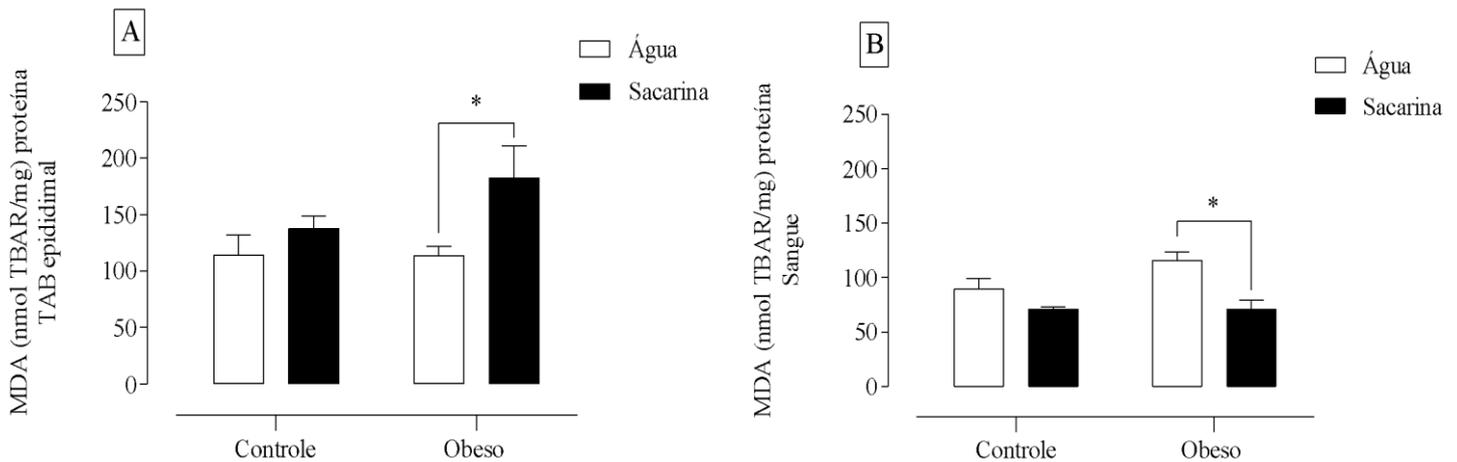
4.11 Análise de biomarcadores do estresse oxidativo (MDA e catalase)

4.11.1 Peroxidação lipídica (TBARS)

Para estimar o grau de estresse oxidativo, a concentração de malondialdeído (MDA) foi avaliada no tecido adiposo branco epididimal e no sangue dos animais.

Nossos resultados sugerem um aumento significativo de 61,5% ($p < 0,05$) da lipoperoxidação no tecido adiposo epididimal dos animais obesos que ingeriram o adoçante (O-SA) (Figura 30, A). Em contrapartida, observamos uma diminuição de 38% ($p < 0,05$) de malondialdeído no sangue dos mesmos animais (O-SAC) (Figura 30, B).

Figura 30 - Níveis de malondialdeído no TABE e sangue de camundongos



Legenda: A = malondialdeído no tecido adiposo branco epididimal; B = malondialdeído no sangue; nmol TBA/mg = nanomolar de ácido tiobarbitúrico por miligrama de proteína; MDA = malondialdeído; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; * = $p < 0,05$;

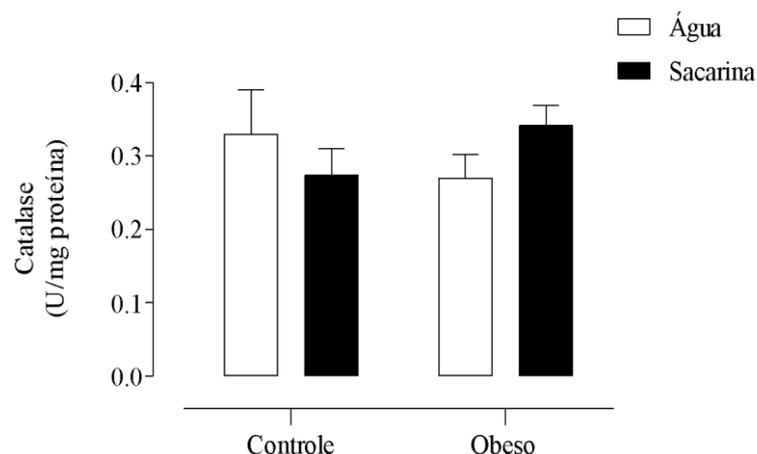
Nota: Resultados expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa os efeitos do consumo de sacarina sobre a peroxidação lipídica (TBARS) no tecido adiposo branco epididimal e no sangue de camundongos adultos (180 dias de vida);

Fonte: A autora, 2024.

4.11.2 Análise da catalase

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima antioxidante catalase no tecido adiposo epididimal dos animais estudados (Figura 31).

Figura 31 - Atividade da catalase no tecido adiposo epididimal de camundongos



Legenda: U/mg de proteína = unidade por miligrama de proteína;

Nota: Resultados expressos como Média \pm EPM, n = 8 animais por grupo. A figura representa o conteúdo de catalase no tecido adiposo branco epididimal de camundongos adultos (180 dias de vida);

Fonte: A autora, 2024.

4.12 **Respirometria de alta resolução no tecido adiposo branco epididimal**

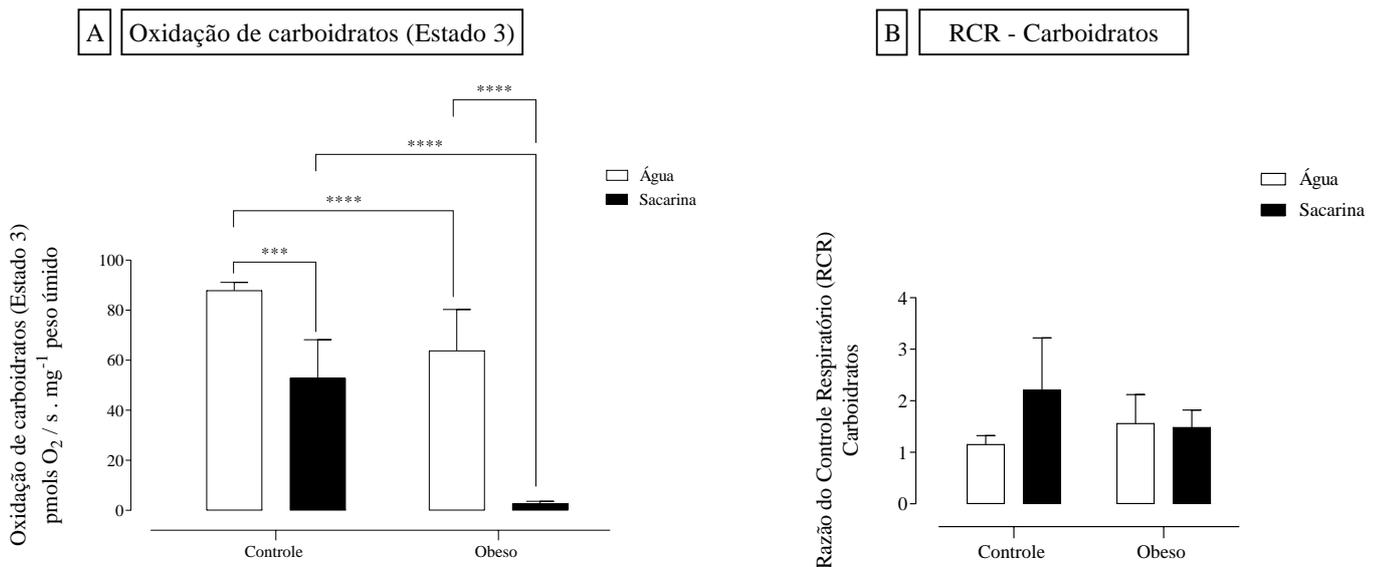
4.12.1 Metabolismo de carboidratos no tecido adiposo epididimal de camundongos

Utilizamos a técnica de respirometria de alta resolução para avaliarmos a atividade mitocondrial na oxidação de substratos energéticos nos animais. O grupo O-AG apresentou disfunção mitocondrial no TABE, com redução significativa na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3 CI+CII), indicando redução de 40% ($p < 0,0001$) da oxidação de substratos referentes a carboidratos quando comparado ao C-AG (Figura 32, A).

Os grupos que ingeriram o adoçante (C-SA e O-SA) apresentaram uma redução significativa de 27% ($p < 0,001$) e 96% ($p < 0,0001$) respectivamente, na oxidação de substratos

relacionados a carboidratos quando comparados aos seus controles (C-AG e O-AG) (Figura 32, A). Entretanto, não observamos diferença significativa em relação à razão do controle respiratório (RCR) (Figura 32, B).

Figura 32 - Respirometria de alta resolução (protocolo de carboidratos)



Legenda: A = oxidação de substratos referentes a carboidratos no tecido adiposo epididimal; B = Razão do controle respiratório; CHO = carboidratos; **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$;

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

Fonte: A autora, 2024.

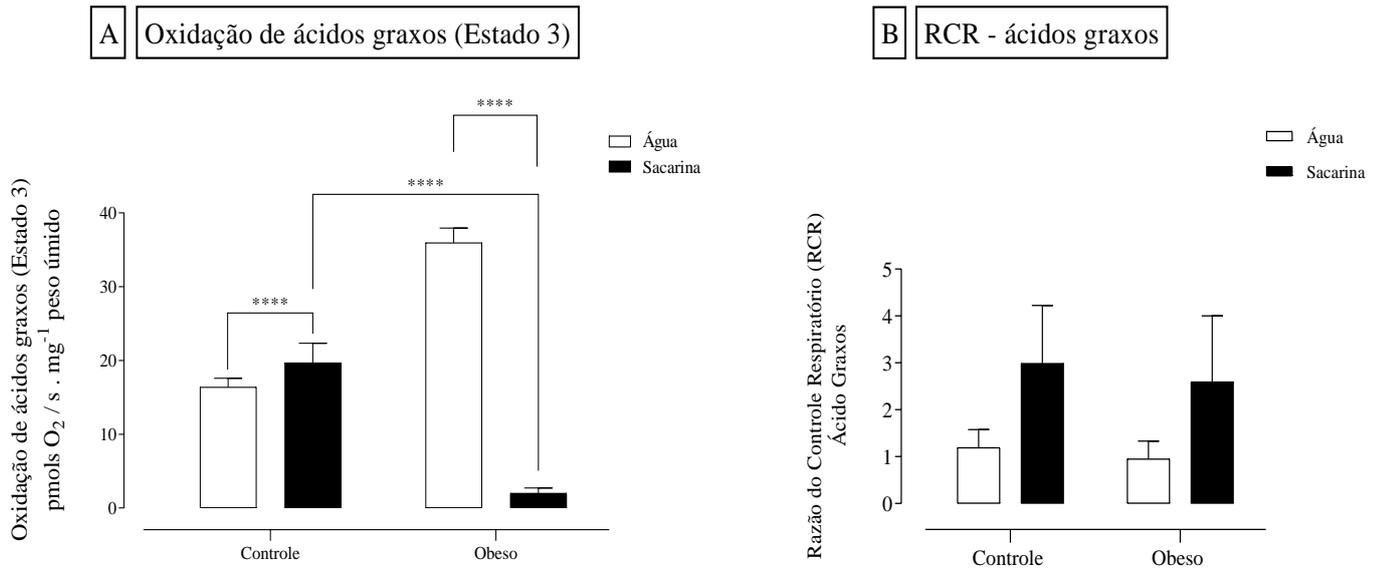
4.12.2 Metabolismo de ácidos graxos no tecido adiposo epididimal de camundongos

Avaliamos a respiração mitocondrial frente a substratos energéticos relacionados à oxidação de ácidos graxos, após a adição de palmitoil-L-carnitina e malato. Observamos que a sacarina foi capaz promover, no animal controle (C-SA), aumento de 20% ($p < 0,0001$) da oxidação de ácidos graxos quando comparado ao animal controle que bebeu apenas água (C-AG).

Em contraste, no animal obeso (O-SA), a sacarina promoveu redução significativa de 94% ($p < 0,0001$) na oxidação relacionada a ácidos graxos (Figura 33, A), quando comparado

ao grupo obeso água (O-AG). Não observamos diferença significativa em relação a razão do controle respiratório (RCR) (Figura 33, B).

Figura 33 - Respirometria de alta resolução (protocolo de ácidos graxos)



Legenda: A = oxidação de substratos referentes a ácido graxos no tecido adiposo epididimal; B = Razão do controle respiratório; AG = ácido graxo; **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$;

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

Fonte: A autora, 2024.

4.13 Principais resultados encontrados

A Tabela 5 apresenta um resumo dos principais resultados encontrados no presente estudo. Onde o grupo obeso água (O-AG) foi comparado ao grupo controle água (C-AG), para avaliação dos efeitos da obesidade. Para avaliação dos efeitos do consumo de sacarina comparamos o grupo controle sacarina (C-SA) e obeso sacarina (O-SA) aos grupos grupo controle água (C-AG) e obeso água (C-AG), respectivamente (Tabela 5, Figura 34 e Figura 35).

Tabela 5 - Apresentação dos principais resultados encontrados no presente estudo

Parâmetros	C-SA (comparado a C-AG)	O-AG (comparado a C-AG)	O-SA (comparado a O-AG)
Consumo Alimentar	=	↑	=
Consumo de líquidos (ml)	↑	=	↑
Massa corporal (g)	↑	↑	=
Índice de Lee (g/cm)	=	↑	=
Gordura corporal (%)	↑	↑	=
Peso do TAB epididimal (g)	↑	↑	=
Peso do TAB retroperitoneal (g)	↑	↑	↑
Peso do coração (g)	↑	↑	=
Peso da gordura do coração (g)	↑	↑	=
Peso do fígado (g)	↑	↑	=
Peso do TAM interescapular (g)	↑	↑	=
Peso do músculo esquelético - sóleo (g)	↑	↑	=
Glicemia de jejum	=	↑	=
Insulina de jejum	=	↑	=
Índice de resistência à insulina	=	↑	=
Tolerância a glicose	=	↓	↑
Densidade de gotículas lipídicas (TABE)	↑	↑	=
Expressão de mRNA (GLUT4) (TABE)	=	↓	=
Expressão de mRNA (Acetil-CoA) (TABE)	↓	↓	=
Expressão de mRNA (PPAR γ) (TABE)	=	=	↓
Expressão de mRNA (ChREBP) (TABE)	↓	↓	=
Expressão de mRNA (PPAR α) (TABE)	↓	=	=
Expressão de mRNA (FABP4) (TABE)	=	=	↓
Expressão de mRNA (SREBP-1) (TABE)	=	=	↓
Expressão de mRNA (FASN) (TABE)	↓	=	=
Expressão de mRNA (LPL) (TABE)	=	=	↓
Peroxidação lipídica (TBARS) no TABE	=	=	↑
Peroxidação lipídica (TBARS) no SANGUE	=	=	↑
Catalase (TABE)	=	=	=
Oxidação de carboidratos (TABE)	↓	↓	↓
Oxidação de ácidos graxos (TABE)	↑	=	↓

Legenda: (↑) = aumento; (↓) = redução; (=) = sem alteração, TABE = tecido adiposo branco epididimal;

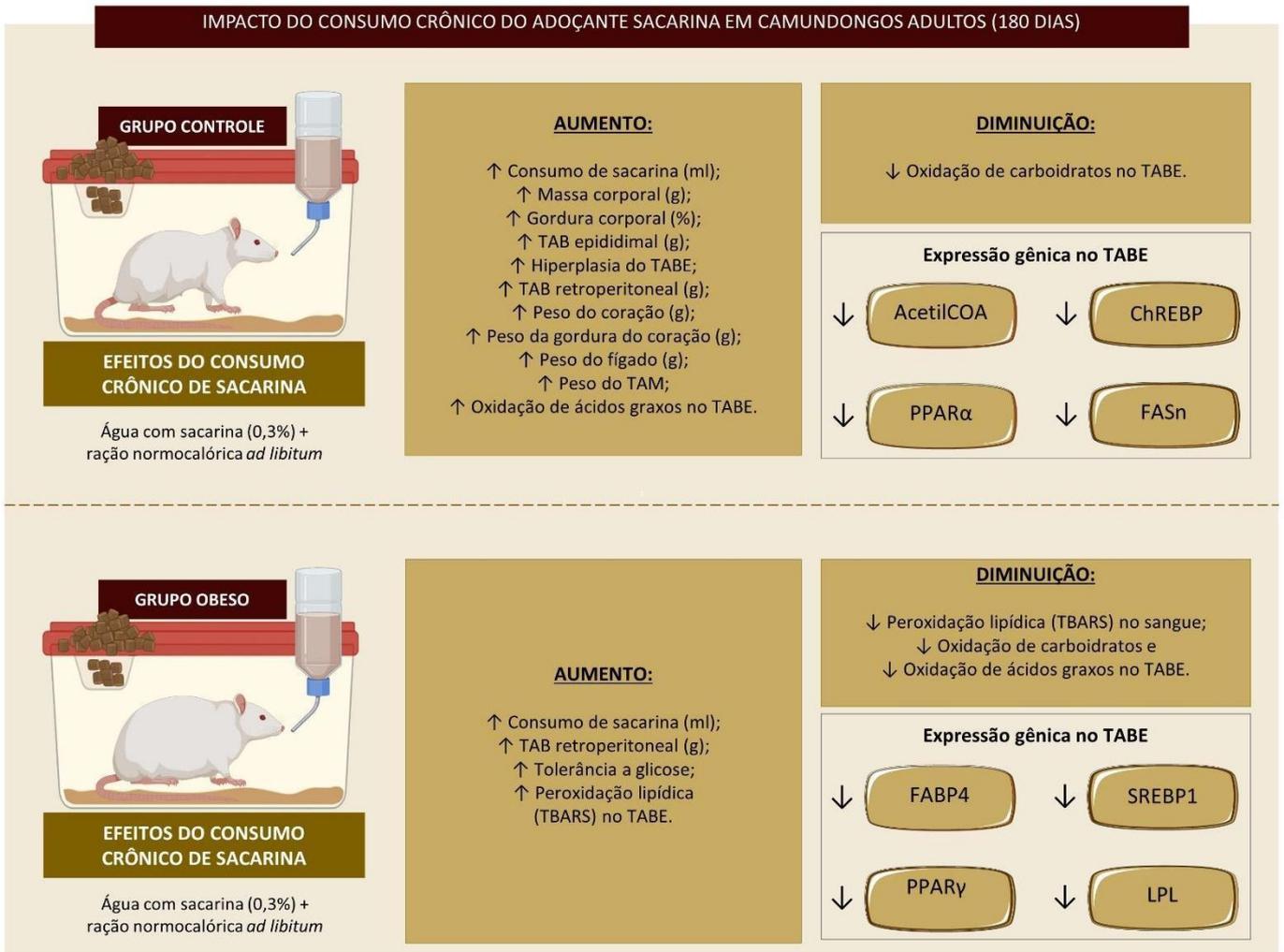
Nota: A figura mostra uma síntese dos principais achados do estudo.

Figura 34 - Ilustração dos efeitos da obesidade em camundongos adultos



Legenda: (↑) = aumento; (↓) = redução; % = porcentagem; GLUT4 = Transportador de glicose tipo 4; Acetil-COA = Acetilcoenzima A; ChREBP = proteína de ligação do elemento responsivo ao carboidrato;
 Nota: A figura mostra uma síntese dos principais achados sobre o efeito da redução de ninhada na prole estudada;
 Fonte: A autora, 2024. Feita com Biorender (www.biorender.com).

Figura 35 - Ilustração dos efeitos do consumo crônico de sacarina em camundongos adultos



Legenda: (↑) = aumento; (↓) = redução; % = porcentagem; ml = mililitros; g = gramas; TAB = tecido adiposo branco; TAM = tecido adiposo marrom; TABe = tecido adiposo branco epididimal; Acetil-CoA = acetil-CoA carboxilase; ChREBP = proteína de ligação do elemento responsivo ao carboidrato; CPT1 = carnitina palmitoiltransferase 1; FABP4 = proteína 4 de ligação a ácidos graxos; FAS = ácido graxo sintase; LPL = lipoproteína lipase; PPAR α = receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; PPAR γ = receptor gamma ativado por proliferador de peroxissoma; SREBP-1 = proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; Nota: A figura mostra uma síntese dos principais achados sobre o consumo crônico de sacarina em animais controles e obesos;

Fonte: A autora, 2024. Feita com Biorender (www.biorender.com).

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeitos causados pela condição de obesidade em animais adultos

Nossos resultados evidenciam a presença de hiperfagia no grupo obeso (O-AG) corroborando com estudos anteriores que empregaram a mesma metodologia experimental e demonstraram aumento do consumo alimentar em roedores durante a infância (CUNHA et al., 2009), adolescência (SILVA, 2023) e na idade adulta (RODRIGUES et al., 2011; ARGENTE-ARIZÓN et al., 2016).

Sabe-se que, em circunstâncias normais, mães roedoras possuem menor número de mamilos do que filhotes o que, naturalmente, gera competição pela amamentação entre a prole. No entanto, no modelo de redução de ninhada (RN), o número de mamilos da mãe supera o número de filhotes, promovendo maior oferta de leite sem a necessidade de competir pelo mesmo (PECKHAM, 1979).

Um estudo prévio, conduzido por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a ninhada reduzida ingere aproximadamente 1,5 vezes mais leite do que ninhadas de tamanhos normais. Além disso, o trabalho evidenciou que a composição do leite materno é modificada após a RN, tornando-se um leite com maior teor de gordura e diminuída quantidade de proteínas. Portanto, esses fatores podem elucidar o surgimento da obesidade nesses animais (CUNHA et al., 2009).

A hiperfagia vista na infância vem sendo relacionada ao excessivo ganho de peso na idade adulta. Em 1992, Plagemann já abordava esse tema em um estudo com ratos. Nele, a RN levou à programação metabólica, refletindo no aumento do consumo alimentar e resultando no incremento da massa corporal.

Dentre os diversos aspectos que determinam a etiologia da obesidade, podemos destacar a importância de períodos críticos do desenvolvimento, incluindo o período pré e pós-natal, pois alterações neste momento podem influenciar a expressão gênica da prole, uma vez que a plasticidade genômica ainda permanece e mudanças epigenéticas e hormonais nos mecanismos centrais e periféricos relacionados ao controle da ingestão alimentar e ao balanço energético na idade adulta, favorecem assim o fenótipo da obesidade (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

A exposição precoce ao excesso de energia e gordura tem sido associada a diversos distúrbios metabólicos e vem sendo cada vez mais discutida e elucidada, sendo a suscetibilidade à obesidade uma das consequências proeminentes e mais associada a graves causas de mortalidade em escala global (PLAGEMANN et al., 1992; BARKER, 1995; WATERLAND, 1999; HABBOUT et al., 2013).

Esse cenário impacta o desenvolvimento e a função de alguns órgãos como pâncreas, tecido adiposo e outros tecidos metabólicos, como o fígado. As alterações causadas nesses órgãos podem estar envolvidas nos ajustes do gasto energético, na resposta ao estresse e na ingestão alimentar (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022). Desta maneira, sustentamos a hipótese de que a hiperfagia precoce, vista no método de RN, originada pela maior oferta de leite durante a lactação, persiste quando o animal é desmamado e passa a consumir ração.

Os nossos resultados demonstram, que camundongos submetidos a RN desenvolveram o fenótipo de obesidade na idade adulta, demonstrando êxito na reprodutividade da metodologia. A condição de obesidade nos animais foi caracterizada pelo aumento eminente do índice de Lee, da massa corporal, da porcentagem de gordura corporal, gordura visceral (tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e gordura do coração), além do aumento de peso de órgãos como coração e fígado. O mesmo foi visto por outros autores que mostraram acréscimo do peso corporal e do tecido adiposo em diversas idades: aos 21 (SOARES, 2016; XAVIER et al., 2019), aos 50 (GUIMARÃES et al., 2024), aos 90 (RODRIGUES et al., 2007), aos 120 (MALAFAIA, 2018) e aos 180 dias de vida (HABBOUT et al., 2013; GONÇALVES, 2019).

Conforme Argente-Arizón descreveu em 2016, a hiperalimentação induz ao aumento de peso nos animais antes mesmo do desmame. Stefanidis e Spencer (2012) relatam que esse aumento de peso pode alcançar até 30% a mais em comparação aos controles magros. Além das alterações biométricas, a análise histológica revelou mudanças morfológicas na arquitetura do tecido adiposo epididimal (TABE), evidenciando a hipertrofia dos adipócitos. Nossos achados estão alinhados com as descobertas presentes na literatura científica; em 2012, Soares e colaboradores, mostraram um aumento significativo de 262% na área dos adipócitos do TABE em camundongos adultos provenientes de ninhadas reduzidas. A hipertrofia dos adipócitos intra-abdominais é caracterizada por um estado hiperlipolítico devido à resistência a ação da insulina (MITTELMAN et al., 2002).

O grupo obeso que bebeu apenas água (O-AG) apresentou alterações na homeostase da glicose, incluindo hiperglicemia, hiperinsulinemia e, com o teste de tolerância à glicose, verificamos uma diminuição da resposta secretora pancreática à glicose, corroborando com diversos estudos que demonstraram aumento dos níveis glicêmicos e desregulação da homeostase da glicose/insulina em animais hiperalimentados no início da vida (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007; CUNHA et al., 2009; KAPPELER et al., 2009; HABBOUT et al., 2013; ARGENTE-ARIZÓN et al., 2016; XAVIER et al., 2019; PRÉVIA et al., 2020). A hiperinsulinemia e hiperleptinemia precoces, vista nesse modelo experimental, podem alterar a percepção de saciedade do animal (SOUZA; MOURA; LISBOA, 2022).

Adicionalmente, foi visto uma diminuição da expressão gênica de GLUT4, Acetil-CoA e ChREBP no tecido adiposo branco epididimal dos animais obesos (O-AG). O tecido adiposo desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo e mudanças na sinalização da insulina nesse tecido estão correlacionadas com uma redução na tolerância à glicose decorrente da resistência à insulina associada à obesidade (RODRIGUES et al., 2007).

A literatura científica documenta uma redução na expressão deste transportador de glicose em animais obesos em diferentes tecidos. No TABE, essa redução foi documentada em roedores com 90 e 120 dias de vida (RODRIGUES et al., 2007; SOARES et al., 2012), enquanto no tecido adiposo marrom, foi observada aos 120 dias (MALAFAIA, 2018), e no coração, aos 21 dias de vida (BERNARDO et al., 2016). A redução no conteúdo de GLUT4 também foi observada em estudos com humanos com diagnóstico de obesidade e/ou RI e/ou DM2 (KLIP et al., 1994; GARVEY et al., 1998; LEGUÍSAMO et al., 2012).

Independente do tecido que apresente declínio na expressão do GLUT4, outros tecidos alvos dependentes de insulina serão afetados. Em estudo com nocaute da expressão do GLUT4 específico do músculo, houve RI no tecido adiposo e no fígado (GRAHAM; KAHN, 2007), associado a um aumento expressivo na probabilidade de desenvolvimento de diabetes (ROSSETTI et al., 1997; LI et al., 2000).

Os adipócitos secretam diversos peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, entre eles TNF- α , IL-6 e resistina (que diminuem a eficácia da insulina), e a adiponectina, que exerce ação oposta. Além disso, os ácidos graxos livres (AGL) provenientes desses adipócitos podem influenciar de maneira significativa o transporte de glicose para as células, competindo como substrato energético. A obesidade induz a resistência à insulina, visto que inibe a via de sinalização da insulina e a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática (HOTAMISLIGIL et al., 1994; GUERRE-MILLO, 2004), podendo suprimir a expressão de GLUT4 em adipócitos (HOTAMISLIGIL, SPIEGELMAN, 1994).

Portanto, é evidente que o tecido adiposo, mesmo contribuindo com apenas cerca de 20% da captação total de glicose no organismo, tem a capacidade de influenciar indiretamente, a sensibilidade à insulina em diversos tecidos, desempenhando um papel significativo na alteração da homeostase glicídica (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006).

Em consonância com os nossos achados, os resultados provenientes da análise de respirometria de alta resolução indicam que os animais obesos (O-AG) apresentaram redução na capacidade de oxidação relacionada aos carboidratos (piruvato, malato e succinato), com entrada de elétrons pelos complexos I e II da cadeia respiratória. Entretanto, não observamos alterações na capacidade de oxidação de ácidos graxos. A literatura propõe que a disfunção

mitocondrial pode ser uma causa primária da inflamação no tecido adiposo (UAU et al., 2019). A obesidade pode causar prejuízos na oxidação mitocondrial desses substratos, esses achados estão em concordância com estudos anteriores que descrevem uma diminuição na capacidade oxidativa mitocondrial de adipócito brancos em indivíduos obesos (YIN, 2014) e em adipócitos marrons de camundongos aos 120 dias (MALAFAIA, 2018).

5.2 Efeitos causados pelo consumo crônico de sacarina em animais adultos

A segurança dos adoçantes artificiais não calóricos (ANC) tem sido objeto de investigação nas últimas décadas, já que diversos estudos associam o seu consumo a desfechos desfavoráveis à saúde (AZEEZ; ALKASS; PERSIKE, 2019). No entanto, ainda existem lacunas acerca desse tema pois alguns achados são contrastantes e pouco se sabe sobre os efeitos decorrentes do seu uso a longo prazo. Nossa pesquisa explorou a ação da sacarina sobre alguns parâmetros metabólicos, principalmente no tecido adiposo branco epididimal, de camundongos adultos.

Os resultados apresentados revelam que os grupos que receberam adoçante ingeriram um volume de líquido (água com sacarina a 0,3%) superior quando comparados com aqueles que beberam apenas água. De forma semelhante, Swithers e Davidson (2008) observaram um aumento significativo da ingestão de adoçantes artificiais por parte dos animais e sugeriram um possível efeito viciante causado por esses compostos. Outros autores reforçam a mesma hipótese (MALAISSE et al., 1998; FEIJÓ et al., 2013).

Embora o consumo de adoçante tenha sido elevado em nosso estudo, sua ingestão não induziu ao aumento do consumo alimentar (gramas e calorias) pelos animais. Pesquisas recentes do nosso grupo reforçam esse achado. Gonçalves, em 2019, demonstrou que camundongos adultos (180 dias) que ingeriram o adoçante stevia (0,3%) ao longo de 3 meses não apresentaram modificações no padrão de consumo alimentar (GONÇALVES, 2019).

De forma semelhante, Bissonnette e colaboradores (2017) investigaram os efeitos da ingestão de ANC sobre o consumo alimentar. Ratos *Wistar* foram submetidos a uma dieta líquida adoçada com sacarina, stevia ou sacarose (1% da dieta líquida) ao longo de 6 semanas. Os resultados evidenciaram que o consumo de sacarina não promoveu incremento da ingestão de calorias quando comparados aos animais que consumiram dieta padrão.

Ruyter et al., (2012) em um estudo clínico, instruíram crianças a substituir sua bebida diária habitual adoçada com açúcar por uma lata da mesma bebida, porém adoçada artificialmente. A cada 6 meses, os participantes realizaram uma avaliação subjetiva sobre fome e saciedade antes e depois da exposição à bebida. Os autores relatam que a bebida adoçada artificialmente não promoveu mudança na percepção de fome e saciedade pelas crianças. Posteriormente, Bryant et al., (2014) avaliaram a resposta apetitiva associada ao consumo de adoçantes em indivíduos saudáveis, os pesquisados não observaram efeito na percepção de fome ou saciedade após o consumo de ANC. Desta forma, acreditamos que a sacarina não exerce impacto significativo na promoção da ingestão compensatória de energia a longo prazo.

Porém, de forma oposta, diversos estudos clínicos e experimentais, associam a utilização de adoçantes artificiais ao aumento do consumo alimentar. A literatura sugere, para esses desfechos divergentes, que a fome seria impulsionada pelo centro hedônico não sendo totalmente satisfeita pelo adoçante não calórico (YANG, 2010). O que poderia levar à incapacidade de autorregular as calorias ingeridas, resultando no aumento da ingestão calórica (SWITHERS; DAVIDSON, 2008).

Apesar dos adoçantes serem usados popularmente como uma alternativa para a redução de peso, as publicações se mostram controversas pois algumas evidências têm relacionado o aumento do consumo de ANC ao ganho de peso e desenvolvimento de obesidade a longo prazo (YANG, 2010; SWITHERS et al., 2010; FEIJO et al., 2013; MITSUTOMI et al., 2014; GREEN et al., 2019). Em nosso trabalho, observamos que os animais controles que ingeriram sacarina (C-SA) apresentaram diversos efeitos deletérios como: aumento significativo da massa corporal, correlacionado a uma elevada porcentagem de gordura corporal e hiperplasia de adipócitos. Adicionalmente, constatou-se um acréscimo no peso do tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal, assim como no depósito de gordura cardíaca e ainda, aumento do peso cardíaco e hepático nesses animais. É importante lembrar que essas alterações se manifestaram aos 180 dias de vida, sem a contribuição de um maior consumo alimentar ao longo do crescimento dos animais, reforçando que essas alterações estão diretamente relacionadas à ingestão do adoçante e que elas acontecem independente do consumo energético do animal.

De maneira análoga, Foletto et al., (2016) conduziram um estudo com ratos *Wistar* submetidos à ingestão de iogurte com sacarina, por 14 semanas. Ao término do estudo, os autores verificaram que os animais que consumiram iogurte com sacarina apresentaram aumento significativo no ganho de peso, não evidenciando diferença quanto à ingestão energética. O que também foi visto por outros autores (ROGERS et al., 2016; GONÇALVES, 2019).

Swithers e Davidson (2008), investigaram a relação entre o gosto doce obtido por uma fonte calórica (glicose) e outra não calórica (sacarina) e sua influência sobre o consumo energético, peso corporal e adiposidade de ratos *Sprague–Dawley*. Nos primeiros 3 dias foi administrado iogurte natural (não adoçado) para dois grupos e nos 3 dias seguintes os ratos receberam iogurte adoçado com 20% de glicose ou 0,3% de sacarina. Os resultados desse estudo mostraram que, nas semanas 2, 3 e 5, o grupo que consumiu iogurte adoçado com sacarina apresentou maior peso e adiposidade corporal, correlacionando, dessa forma, o consumo de adoçante não calórico ao aumento de peso. Os autores concluem que consumir um alimento adoçado com sacarina sem calorias pode levar a maior adiposidade do que consumir o mesmo alimento adoçado com açúcar de alto teor calórico.

Feijó e colaboradores (2013), ofertaram aos animais iogurte adoçado com sacarose (20%), sacarina (0,3%) ou aspartame (0,4%) pelo período total de 12 semanas. Foi observado um aumento significativo no ganho de peso nos grupos que consumiram iogurte com sacarina ou aspartame quando comparados com o grupo que consumiu iogurte com açúcar, porém a ingestão calórica total foi semelhante em todos os grupos.

Posteriormente, em outro estudo, ratos machos da linhagem *Wistar* foram distribuídos em 4 categorias distintas: grupo controle (que recebeu apenas água) e 3 grupos experimentais (grupos com diferentes doses de sacarina, estabelecidas em 2,5, 5 e 10 mg/kg). Os animais receberam sacarina uma vez ao dia, pela técnica de gavagem, ao longo de 120 dias. A dose de 5 mg/kg de sacarina resultou em maiores valores de peso corporal dos ratos, evidenciados tanto aos 60 dias quanto 120 dias (AZEEZ; ALKASS; PERSIKE, 2019).

Diversos estudos experimentais estabelecem uma correlação entre o consumo de sacarina, aumento do peso corporal e maiores níveis de ingestão de adoçante, embora sem apresentar associação com aumento da ingestão calórica (SWITHERS et al., 2010; FEIJÓ et al., 2013). Bissonnette relata resultados paradoxais, pois em seu estudo os ratos alimentados com ANC ingeriram menos calorias do que os ratos alimentados com sacarose, mas ganharam significativamente mais peso (BISSONNETTE et al., 2017).

No contexto da complexa relação entre o consumo de adoçantes e a incidência de obesidade, pesquisas com humanos também têm investigado essa associação. Estudos prospectivos documentaram risco aumentado de obesidade e síndrome metabólica em indivíduos que consomem bebidas com adoçantes (DHINGRA et al., 2007).

Em estudo transversal, 524 estudantes universitários responderam um questionário e tiveram seu percentual de gordura corporal avaliado. O consumo de sacarina mostrou-se significativamente elevado no grupo com participantes que foram classificados com excesso de

gordura ou obesidade, apesar da quantidade de sacarina ingerida pelos mesmos não ter ultrapassado a recomendação estabelecida para a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 15 mg/kg. Os pesquisadores concluem que o consumo excessivo tanto de açúcar, quanto de sacarina foi associado a maiores percentuais de gordura corporal em adultos jovens (TAPANEE et al., 2023).

Recentemente, em um estudo de coorte prospectivo (chamado de CARDIA), mais de 3 mil adultos jovens eutróficos foram acompanhados por um período de 25 anos. Durante esse intervalo, identificou-se uma associação positiva entre o consumo de ANC, incluindo a sacarina, e maiores volumes de tecido adiposo visceral, intermuscular e subcutâneo, os quais foram avaliados por meio de tomografia computadorizada. Os autores relatam uma correlação com o aumento do IMC, peso corporal e circunferência da cintura. Desta forma, os resultados sugerem que a ingestão prolongada desses adoçantes pode estar associada a maior incidência de obesidade, independentemente da ingestão calórica (STEFFEN et al., 2023).

Corroborando com essa hipótese, outros estudos observacionais indicam que o consumo de adoçantes dietéticos pode estar associado ao aumento da adiposidade, elevação do IMC e da circunferência da cintura. Fowler (2008) mostra em estudo envolvendo 749 idosos de ambos os sexos, que os indivíduos que consumiam bebidas dietéticas apresentaram circunferências de cintura superiores em comparação àqueles que não ingeriam tais bebidas, durante período de acompanhamento de 9,4 anos.

Esses achados estão alinhados com os dados encontrados em nossa pesquisa. No entanto, até o momento, ainda não há um consenso científico quanto aos aspectos de correlação e causalidade entre o consumo de adoçantes e o desenvolvimento da obesidade, sobretudo no contexto de estudos observacionais. Isso se deve, em parte, à divergência de resultados encontrados em pesquisas que envolvem diferentes tipos de adoçantes, tanto em humanos (MILLER; PEREZ, 2014; SØRENSEN et al., 2014; ROGERS; APPLETON, 2021), quanto em animais (CURRY; ROBERTS, 2008; NORDENTOF et al., 2008; DUTTA et al., 2010; PARLEE et al., 2014; ASSAEI et al., 2016; AHMAD et al., 2018).

Uma possibilidade para elucidar os achados relatados acima reside na hipótese de que a sacarina possa induzir a hiperinsulinemia, resultando no ganho de peso (FEIJÓ et al., 2013; AZEEZ; ALKASS; PERSIKE, 2019), pois um estudo conduzido *in vitro* indica que a secreção de insulina aumenta significativamente, atingindo 3 vezes mais do que os níveis basais, quando as células são expostas a concentrações mais elevadas de sacarina (MALAISSE et al., 1988). Além disso, outro estudo demonstrou que as discrepâncias nas respostas dos níveis séricos de glicose e GLP-1 em animais expostos à sacarina foram rápidas e de curta duração, sugerindo

que um dos mecanismos pelos quais o uso de adoçantes não nutritivos interfere na relação preditiva entre sabor doce e calorias pode prejudicar o equilíbrio energético, suprimindo a liberação de GLP-1. Esse fenômeno, por sua vez, poderia alterar a homeostase da glicose e reduzir a sensação de saciedade (SWITHERS et al., 2012).

Evidências respaldam a hipótese de que a regulação da glicemia pode ser afetada em resposta a percepção do sabor doce, uma vez que já foi relatado anteriormente que a interação dos ANC com o receptor T1R2/T1R3 ocorre e que tais receptores também são funcionalmente expressos no pâncreas e poderia influenciar a secreção de insulina (BELLOIR; NEIERS; BRIAND et al., 2017; SERRANO et al., 2022). Embora essa justificativa seja frequentemente empregada nos estudos (SUEZ et al., 2014; AZEEZ, ALKASS, PERSIKE, 2019), nossos resultados revelam que a ingestão de sacarina promoveu um cenário oposto. Os animais obesos que ingeriram o adoçante (O-SA) apresentaram melhora da tolerância à glicose e diminuição expressiva da curva glicêmica ao final do TITG. Considerando que a melhoria da homeostase da glicose pela sacarina poderia ter ocorrido através do aumento da secreção de insulina, avaliamos a insulinemia nos animais. Contudo, não foram identificadas diferenças na concentração plasmática de insulina, quando comparamos os grupos obesos (O-AG x O-SA), o que poderia significar uma melhora da sensibilidade à insulina e explicar a melhora da tolerância à glicose observada nos camundongos obesos durante o TITG, além disso, sugerimos a possibilidade de existirem mecanismos suplementares na via de sinalização de insulina em resposta à sacarina.

Parlee e colaboradores (2014) observaram que a administração de sacarina através da lactação materna foi capaz de melhorar a tolerância à glicose sem alterar a secreção de insulina em camundongos machos adultos. Outros estudos experimentais demonstraram a melhora da tolerância à glicose em roedores que consumiram adoçantes (BAILEY et al., 1997; GONÇALVES, 2019). A suplementação de sacarina em animais promoveu incremento ponderal sem correlação com a resistência à insulina, bem como não influenciou as concentrações de glicose, PYY e leptina em jejum (FOLETTTO et al., 2016).

No entanto, em humanos alguns estudos não relatam nenhum efeito sobre a glicose e a insulina. Indivíduos saudáveis receberam glicose em jejum contendo diferentes adoçantes (sacarina, aspartame ou acesulfame K) e, em seguida, realizaram o teste de tolerância à glicose, com duração de 60 minutos. Nesse estudo não foi observado efeito adicional da sacarina na resposta à glicose oral em nenhum momento do teste. Os autores concluem sua pesquisa sugerindo que não há evidências consistentes de que os ANC, quando consumidos de forma

aguda, tenham um efeito na modulação da glicose sanguínea em pessoas saudáveis (BRYANT et al., 2014).

Além disso, um ensaio clínico randomizado conduzido por Higgins e Mattes (2019) investigou os efeitos dos adoçantes sacarina, aspartame e sucralose no peso corporal de indivíduos com sobrepeso ou obesidade, comportamentos digestivos e tolerância à glicose, em comparação com a sacarose. Após intervenção com duração de 12 semanas, observou-se um aumento no peso corporal no grupo que consumiu sacarina ou sacarose em comparação com aqueles que ingeriram outros adoçantes, sem associação com intolerância à glicose (HIGGINS; MATTES, 2019). Outros estudos não encontraram efeito da sacarina na liberação de insulina em resposta à glicose tanto em indivíduos saudáveis (HORWITZ; MCLANE; KOBE, 1988) quanto em pacientes com diabetes tipo 2 (COOPER; WAHLQVIST; SIMPSON, 1988).

Recentemente, uma revisão sistemática com meta-análise em rede de ensaios agudos que compara os efeitos do consumo de bebidas com adoçantes ou com açúcar em humanos foi publicada. Nas intervenções onde os adoçantes eram avaliados sem a adição de energia ou nutrientes, não foi observado efeito sobre as respostas pós-prandiais de glicose, insulina, GLP-1, GIP, PYY, grelina e glucagon. Os autores concluem que os adoçantes não apresentaram efeitos metabólicos agudos (ZHANG et al., 2023).

De forma oposta, uma meta-análise divulgada em 2020, abrangeu 13 estudos de coorte, com um período médio de acompanhamento de 8,4 anos, investigou a associação entre o consumo de bebidas artificialmente adoçadas e o risco de desenvolver DM2. Os resultados destacaram uma relação linear entre a ingestão de adoçantes artificiais e o risco de DM2, revelando um aumento de 15% do risco para cada acréscimo de 250 ml/dia no consumo de refrigerantes com esses adoçantes. No entanto, o estudo apontou uma heterogeneidade considerável, e fatores de confundimento não mensuráveis não puderam ser totalmente descartados. Portanto, é necessário ter cautela ao interpretar os resultados pois podem não ser considerados conclusivos (QIN et al., 2020). Vale ressaltar que uma possível explicação para esta observação pode ser a causalidade reversa, uma vez que apenas a exposição basal é considerada (PANG; GOOSSENS; BLAAK, 2021).

A despeito disso, além da hipótese de maior ganho de peso resultante da hiperglicemia e/ou hiperfagia que refutamos aqui, alguns autores propõem que o aumento de peso seja decorrente de uma possível redução no gasto energético associada ao consumo de adoçantes causado por alterações fisiológicas (SWITHERS; DAVIDSON et al., 2008; SWITHERS et al., 2010; FEIJÓ et al., 2013). Adicionalmente, um estudo conduzido em camundongos com obesidade induzida por dieta (DIO), evidenciou que o consumo desse adoçante foi capaz de aumentar a

adiposidade corporal, intensificar a deposição de gotículas de lipídios e diminuir a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1) no tecido adiposo marrom (TAM). A UCP-1, localizada na membrana interna mitocondrial, desacopla o transporte de elétrons da cadeia transportadora, dissipando a energia na forma de calor nesse tecido. Esses achados sugerem que os ANC podem, em parte, modular o metabolismo energético ao influenciar a regulação da UCP-1 no TAM de camundongos com obesidade (MITISUTOMI et al., 2014).

Atualmente, diversos estudos demonstram a presença desse receptor no tecido adiposo branco (BEHRENS; MEYERHOF, 2011; SIMON et al., 2013; BELLOIR; NEIERS; BRIAND, 2017; NUEMKET et al., 2017). Sua função nos tecidos extraorais ainda não está bem esclarecida, no entanto, os receptores T1R2/T1R3 apresentam ação sobre a secreção de incretinas (GLP-1), captação de glicose do lúmen intestinal para os enterócitos e secreção de insulina, desta maneira está envolvido na homeostase glicêmica (MARGOLSKEE et al., 2007; NAKAGAWA et al., 2009; LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014). Em nossos resultados observamos que o consumo de sacarina não foi capaz de alterar a expressão gênica do receptor de sabor doce (T1R2/T1R3) no TABE dos animais (C-SA e O-SA). Porém, regulou negativamente a expressão gênica de FABP4, PPAR γ , SREBP-1 e LPL no grupo obeso, quando comparados àqueles que beberam apenas água (O-SA x O-AG).

Simon e pesquisadores (2013) demonstraram que a adição de sacarina em células 3T3L1 estimula a adipogênese, resultando em aumento no acúmulo de lipídios e da expressão da FABP4, além de possuir um efeito supressor da lipólise em adipócitos maduros. De maneira surpreendente, os autores relatam que essas ações da sacarina sobre o tecido adiposo ocorrem na ausência de receptores de sabor doce, sugerindo um novo receptor e/ou mecanismo de ação da sacarina. Apesar disso, os autores sugerem que os receptores de sabor doce podem identificar sinais nutritivos e regular a diferenciação de pré-adipócitos.

A FABP4, uma das proteínas mais abundantes no adipócito, está envolvida na modulação do metabolismo glicídico e lipídico (NING et al., 2016; HE et al., 2021). Camundongos deficientes em FABP4 adquiriram benefícios terapêuticos para hiperinsulinemia relacionada à obesidade e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1994; UYSAL et al., 2000; TROJNAR et al., 2019), reduziu a glicemia plasmática, triacilglicerol, colesterol e melhorou a sensibilidade à insulina em animais obesos (BAAR et al., 2005; MAEDA et al., 2005). Além disso, a deleção do FABP4 diminuiu a lipólise tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (SCHEJA et al., 2000; BALONAN; SHEN, 2000).

Como já postulado, a diminuição da expressão ou atividade da FABP4 possui um importante papel para a homeostase glicêmica (TU et al., 2017). Em conformidade com o que

foi visto na literatura, nossos animais obesos que ingeriram adoçante, apresentaram reduzidos níveis de FABP4 associado a uma melhora da tolerância à glicose. Tal melhoria pode estar relacionada a diminuição da expressão deste gene, que conduz a melhora da sensibilidade à insulina, por conseguinte, promove melhora na captação de glicose pelas células, resultando em uma resposta glicêmica mais eficiente.

O envolvimento da FABP4 na patogênese da obesidade e da resistência à insulina parece ser mediado pela inibição PPAR γ (RODREUGUEZ-CALVO et al., 2017; TROJNAR et al., 2019). A insulina regula negativamente FABP4 (FURUHASHI, 2019) e FABP4 regula negativamente o PPAR γ em adipócitos e macrófagos (TROJNAR et al., 2019). Todas os subtipos de PPAR são detectados no TAB, sendo PPAR γ predominante (CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2000). O PPAR γ é conhecido por ser um importante regulador envolvido nas vias de transcrição da adipogênese, além de influenciar o metabolismo de lipídios e carboidratos (SUGII et al., 2009).

O PPAR γ e C/EBP regulam a expressão da maioria dos genes associados à adipogênese, promove proliferação e diferenciação de adipócitos (SIERSBAEK; NIELSEN; MANDRUP, 2010; HUANG et al., 2018). No tecido adiposo branco, os genes alvo do PPAR γ estão diretamente envolvidos na via lipogênica, incluindo a LPL (KERSTEN, 2014). O PPAR γ não apenas promove a proliferação e diferenciação de adipócitos, mas também confere sensibilidade à insulina aos adipócitos (HUANG et al., 2018), lipogênese e a função dos adipócitos, sua inativação no tecido adiposo de camundongos leva à lipodistrofia e distúrbios metabólicos (WANG et al., 2013).

Masubuchi e colaboradores (2013) relatam que a adição de sacarina em células adiposas (3T3-L1) reduziu consideravelmente a expressão de PPAR γ e C/EBP α , sugerindo uma regulação negativa sobre esses genes. De acordo com nossos dados, a sacarina parece modular de forma negativa a expressão de PPAR γ (nos animais obesos), sua redução ou superexpressão vem sendo associada a desfechos desfavoráveis (KUREK; MIKOŁAJCZYK-STECYNA; KREJPCIO, 2023).

A lipase lipoproteica (LPL) medeia a liberação de ácidos graxos livres (AGL) de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, como quilomícrons e VLDL. Portanto, a LPL representa uma enzima chave para a regulação da homeostase lipídica celular, fornecendo AGLs para fornecimento de energia celular e armazenamento de energia intracelular, bem como um mecanismo de controle para os níveis de triglicerídeos plasmáticos (MEAD; IRVINE; RAMJI, 2002). Foi demonstrado que a insulina desempenha um papel central na resposta pós prandial da atividade adiposa da LPL. Embora aumentos na expressão do gene LPL pela insulina tenham

sido observados em adipócitos *in vitro* as alterações no mRNA da LPL provavelmente são responsáveis apenas por uma pequena porção da estimulação da atividade da LPL pela insulina (KERSTEN, 2014). Em ratos, a atividade desta enzima está associada a um aumento na lipogênese hepática, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e obesidade (BESSESEN; ROBERTSON; ECKEL, 1991; LIM et al., 2009). A literatura sugere ainda, que o aumento da sua expressão pode estar inversamente relacionado à sua atividade (LÓPEZ et al., 2016).

Pontigo et al., (2011) demonstrou uma diminuição da expressão da LPL no tecido adiposo subcutâneo e visceral em obesos; a intensidade desta diminuição esteve relacionada ao grau de obesidade, relação mais evidente no depósito visceral. Esta diminuição está mais relacionada à hipertrofia e à hiperplasia dos adipócitos, do que à resistência à insulina. A diversidade dos resultados sobre expressão gênica da LPL em tecido adiposo pode ser explicada pela fase em que a obesidade é analisada. Em condições normais, o excedente de calorias é estocado no tecido adiposo, o qual, por sua vez, aumenta de tamanho devido aos processos de hipertrofia e hiperplasia. A partir de certo ponto, o tecido adiposo parece alcançar um limite de estocagem de gordura, perdendo a sensibilidade à insulina, e suprimindo as vias lipogênicas, das quais a LPL faz parte (VIRTUE; VIDAL-PUIG, 2010; PONTIGO et al., 2011).

Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, camundongo *Swiss* (180 dias) que consumiram ANC (stevia) por um período de 3 meses também apresentaram redução da expressão gênica de LPL no tecido adiposo branco epididimal (GONÇALVES, 2019). Em nosso trabalho, os animais obesos que ingeriram sacarina não apresentavam resistência à insulina, e o ponto máximo de estocagem de lipídios talvez tenha sido alcançado, o que pode explicar a diminuição na expressão gênica de LPL.

Outro fator que ativa a transcrição do gene LPL e que é reduzido no tecido adiposo em jejum é o SREBP-1, um fator de transcrição relacionado ao metabolismo lipídico, conhecida como proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (KERSTEN, 2014). Estudos com camundongos transgênicos e *knockout* sugerem que o SREBP-1c está envolvida na síntese de AG e no metabolismo da glicose induzido pela insulina (particularmente na lipogênese). Os processos biossintéticos de colesterol e AG são controlados por uma família comum de fatores de transcrição designadas proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol (SREBPs). Os SREBPs ativam transcricionalmente uma cascata de enzimas necessárias para a síntese endógena de colesterol, AG, triglicerídeos (TG) e fosfolipídios. Assim, os SREBPs são considerados reguladores mestres da colesterogênese e da lipogênese. Possui um papel importante no metabolismo dos triglicerídeos (TG) para regular a expressão de apolipoproteínas relacionadas à ativação da LPL no fígado (NAKAGAWA; SHIMANO, 2018).

O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na patogênese das alterações metabólicas, além disso, o aumento do peso corporal tem sido relacionado ao estresse oxidativo e a alterações inflamatórias. O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mecanismos antioxidantes (MURPHY, 2009). Com o intuito de observar os efeitos das ERO sobre os danos oxidativos no tecido adiposo branco induzidos pela sacarina, avaliamos os níveis de malondialdeído (MDA), um subproduto da lipoperoxidação, e observamos que animais obesos que ingeriram o adoçante (O-SA) apresentam maiores níveis de MDA no TABELA e níveis diminuídos no sangue em comparação ao grupo obeso que bebeu apenas água (O-AG). Um estudo contendo pacientes saudáveis e com diabetes que consumiram sacarina e ciclamato demonstrou maiores níveis de MDA nos dois grupos estudados. Os autores concluem que o consumo prolongado de misturas de sacarina e ciclamato induz estresse oxidativo tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes diabéticos (HASAN; ALKASS; DE OLIVEIRA, 2023).

Um estudo anterior, demonstrou que a sacarina aumentou a produção de ERO, foi visto uma inibição significativa dos sistemas de defesa antioxidante durante a administração de sacarina, especificamente uma diminuição nas atividades de catalase (CAT), enzimas superóxido dismutase (SOD) e GSH, que previne a morte celular causada pela produção de radicais tóxicos. Em contraste, os níveis de MDA aumentaram como produto da peroxidação lipídica como resultado da ação das ERO nos lipídios das membranas celulares (POPKIN; HAWKES, 2016; AMIN; ALMUZAFAR, 2016).

Outros estudos demonstraram que, ao analisar cérebros de camundongos e ratos que foram tratados com adoçantes artificiais em curto e longo prazos, em concentrações que variaram de 5,6 mg a 1.000 mg/kg, observaram aumento significativo da peroxidação lipídica, assim como da expressão de óxido nítrico (NO) e da SOD e CAT (ABDEL-SALAM et al., 2012; ABU-TAWEEL et al., 2014; ASHOK et al., 2015; ADARAMOYE; AKANNI, 2016). O tecido adiposo branco é um tecido periférico dependente da homeostase insulinêmica. O consumo crônico de adoçantes pode criar um ambiente metabólico diferente, induzindo estresse metabólico. O que pode desencadear respostas adaptativas nas células, incluindo modificações na expressão gênica para se ajustar às novas condições.

Nos animais magros (C-SA), o consumo de sacarina promoveu diminuição da expressão gênica de FAS, Acetil-Coa, ChREBP e PPAR α , quando comparado ao grupo controle que bebeu apenas água (C-SA x C-AG). A enzima ácido graxo sintase (FAS) desempenha um papel crucial nos processos metabólicos envolvendo acetil-CoA, na biossíntese de ácidos graxos (AG) e na via de sinalização da insulina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; LIZUKA; TAKAO;

YABE, 2020). Sua regulação negativa no tecido adiposo de pacientes obesos foi identificada como um fator inibidor da lipogênese denovo de ácidos graxos, crucial para a sensibilização à insulina. Essa inibição aumenta o risco de intolerância à glicose e, conseqüentemente, o desenvolvimento do diabetes (SIEVERT et al., 2021). Alguns estudos demonstram alterações na síntese de ácidos graxos e na expressão do gene *Fasn*, especialmente em contextos de diabetes e obesidade (DIRAISON et al., 2002; EISSING et al., 2013). No entanto, em nossos achados demonstramos que a sacarina promoveu diminuição dos níveis de expressão de *FAS* no tecido adiposo dos animais controles sem associação com alteração no perfil glicêmico. Foi relatado anteriormente, que o ANC *stevia* apresentou impacto regulatório negativo na expressão gênica e proteica de *FAS* em células 3T3-L1 (PARK et al., 2022; KUREK et al., 2023).

A proteína de ligação ao elemento responsiva a carboidratos (CREB) é um fator de transcrição comum que regula a expressão do gene envolvido na gliconeogênese em situações de baixa disponibilidade de energia. Quando os níveis de energia aumentam com o consumo de alimentos, ChREBP orquestra a resposta transcricional à disponibilidade de nutrientes que muda o metabolismo em direção à utilização e armazenamento de energia (NORIEGA et al., 2011). O gene ChREBP é predominantemente expresso no fígado e no tecido adiposo, apresenta papel dominante no metabolismo lipogênico em comparação a fatores de transcrição (FILHOULAUD, 2013). A superexpressão em camundongos melhora diabetes, obesidade, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Por outro lado, camundongos deficientes em apresentam esteatose hepática e aterosclerose (NAKAGAWA; SHIMANO, 2018).

Em particular, o CHREB interage com o PPAR α para regular a expressão dos genes alvo do PPAR α , incluindo o FGF21. A ativação do PPAR α reduz a massa corporal e a resistência à insulina, favorecendo a beta-oxidação mitocondrial (VEIGA et al., 2017). O consumo crônico de sacarina promove redução da expressão gênica tanto de ChREBP quanto de PPAR α no animais controles que adquiriram ganho de peso ao longo de estudo, tais fatores podem estar associados a uma disfunção do adipócito. Além disso, é importante ressaltar que os resultados deste estudo dizem respeito exclusivamente à expressão de mRNA, e, portanto, devem ser interpretados com cautela, pois nem sempre a expressão gênica está diretamente relacionada à expressão proteica.

As mitocôndrias desempenham um papel central no metabolismo energético. A principal função da mitocôndria é produzir energia para as células, através do consumo de oxigênio por fosforilação oxidativa (FO), na forma de adenosina trifosfato (ATP) a partir de substratos alimentares (carboidratos, lipídios e proteínas) (ROGGE et al; 2009; OSELLAME et al., 2012; KUSMINSKI et al., 2012; SCHÖTTL et al., 2015). No TABE, as mitocôndrias são

cruciais para o metabolismo energético, sendo a β -oxidação de ácidos graxos um importante processo realizado pelas células adiposas para produção de energia (WILSON-FRITCH et al., 2004).

Yin e colaboradores (2014) descrevem que, em indivíduos obesos, há uma redução da capacidade oxidativa mitocondrial do adipócito em comparação com os indivíduos magros. Ainda existe uma limitada compreensão acerca do efeito dos adoçantes sobre o metabolismo mitocondrial e utilização de substratos energéticos. Em nossa análise de respirometria de alta resolução observamos, no obeso que ingeriu o adoçante (O-SA), taxas respiratórias máximas estimuladas por ADP mais baixas em ambos os protocolos de oxidação (A = substratos piruvato, glutamato, malato, succinato; B = substratos palmitoil-L-carnitina, malato, ADP) o que levanta a hipótese de uma menor eficiência dos complexos mitocondriais e, conseqüentemente, piora do metabolismo celular. Desta maneira o consumo de sacarina poderia, em parte, agravar o quadro de disfunção mitocondrial já descrito em obesos.

As mitocôndrias, em indivíduos obesos, têm menor capacidade de geração de energia, membranas internas menos definidas (HERNÁNDEZ-AGUILERA, 2013). A disfunção mitocondrial, está associada com a redução da oxidação de ácidos graxos, alteração da secreção de adipocinas e desregulação da homeostase energética. Nesta condição, o aumento da produção de ERO resulta em acúmulo de lipídios e resistência à insulina (KUSMINSKI; SCHERER 2012; MEDINA-GOMEZ, 2012).

Em um estudo anterior realizado com camundongos DIO (obesidade induzida por dieta) que receberam suplementação com ANC demonstrou que o consumo de adoçante foi capaz de aumentar a deposição das gotículas de lipídios e reduzir a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1) no tecido adiposo marrom (TAM), acarretando assim em déficit no transporte de elétrons da cadeia transportadora. Estes dados indicam que os ANC podem em parte, regular o metabolismo energético através da regulação da UCP-1 e da fosforilação oxidativa do TAM de camundongos obesos (MITISUTOMI et al., 2014).

Nos animais magros (C-SA), observamos que o consumo de sacarina reduziu apenas o uso de substratos relacionados a carboidratos (protocolo A) e, de maneira oposta, vimos um aumento do uso de substratos relacionados a ácidos graxos (protocolo B) nesse grupo. Acreditamos que a sacarina promove um dano oxidativo no TABELA associado ao aumento do depósito de ácidos graxos (hiperplasia) nesse grupo, o que pode causar um efeito adaptativo compensatório promovendo maior utilização de substratos relacionados a ácidos graxos em detrimento ao uso de substratos relacionados a oxidação de carboidratos.

Enquanto o rearranjo mitocondrial mediado por hormônios é bem conhecido, o impacto dos adoçantes não calóricos nas respostas mitocondriais no TABE ainda não é claro. Sugere-se que uma adaptação específica do tecido pode interferir na dinâmica e na função mitocondrial, correlacionada com a extensão da duração a que o organismo foi exposto à sobrecarga de nutrientes (BARBATO et al., 2015).

Desta maneira, de acordo com nossos dados, a sacarina promove, nos animais obesos, aumento do estresse oxidativo no TABE, diminuição da oxidação de substratos relacionados à carboidratos e ácidos graxos e diminuição da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, apesar de melhorar a tolerância à glicose nesses animais. Já nos animais magros, a sacarina promoveu ganho de peso e de adiposidade corporal de forma expressiva associado a diminuição da capacidade mitocondrial de oxidação de substratos relacionados a carboidratos, apesar de demonstrar aumento da capacidade de oxidação de ácidos graxos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribui para a melhor compressão dos efeitos decorrentes do consumo crônico do adoçante artificial sacarina em animais adultos submetidos a hiperalimentação durante o período de lactação.

Nossos resultados trazem evidências sobre os potenciais efeitos deletérios associados à utilização desorientada de adoçantes dietéticos. O consumo de sacarina está pode promover aumento da adiposidade corporal que se correlaciona com a redução da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e redução da oxidação de substratos energéticos resultando em desordens metabólicas no organismo sobre tudo no animal controle.

Considerando tais achados, é pertinente que futuras investigações sejam conduzidas a fim de elucidar de maneira mais abrangente os potenciais riscos associados ao consumo prolongado de adoçantes artificiais. Vale salientar que a generalidade das descobertas obtidas em estudos experimentais para humanos, que vivem em contextos alimentares mais complexos, requer cautela e análises criteriosas. Entretanto, tais descobertas reforçam a premissa de que os adoçantes não são compostos inertes e exercem impacto sobre diversos processos metabólicos e que sua utilização para fins de emagrecimento deve ser desincentivada.

REFERÊNCIAS

- ABENTE, E. J. et al. MicroRNAs in obesity-associated disorders. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 589, p. 108-119, 2016.
- ABOUD A. L., TUPPER N. M., IALAL I. Genetics, Epigenetic Mechanism. Aug 14. In: StatPearls [Internet]. **Treasure Island (FL): StatPearls**, 2023.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMAD, U. et al. Antihyperlipidemic efficacy of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni in albino rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, p. 1-8, 2018.
- AMIN K. A., AL-MUZAFAR H. M, ELSTTAR A. H. A Efeito do adoçante e agente aromatizante nos índices oxidativos, níveis de função hepática e renal em ratos. **Ind. Biol**; 54 :56-63, 2016.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Frontiers in genetics**, v. 2, p. 1-13, 2011.
- ARGENTE-ARIZÓN, P. et al. Efeitos dependentes da idade e do sexo da supernutrição precoce nos parâmetros metabólicos e no papel dos andrógenos neonatais. **Biol. Sex difere.**7, 26, 2016.
- ARRAIS. et al. Utilização de adoçantes no Brasil: uma abordagem a partir de um inquérito domiciliar. **Cad. Saúde Pública**, v. 35, 2019.
- ASPREA M. Procedimentos em anestesia e eutanásia. **Embrapa-Meio ambiente Jaguariúna**, 2013. Disponível em <[https://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2013/ceua/palestras/Anestesia Eutanasia_MarceloAsprea.pdf](https://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2013/ceua/palestras/Anestesia_Eutanasia_MarceloAsprea.pdf)> Acessado em janeiro, 2023.
- ASSAEI, R. et al. Hypoglycemic effect of aquatic extract of *Stevia* in pancreas of diabetic rats: PPAR γ -dependent regulation or antioxidant potential. **Avicenna J Med Biotech**, v. 8 (2), p. 65-74, 2016.
- ATHERTON, H. J. et al. “Metabolomics of the interaction between PPAR- α and age in the PPAR- α -null mouse,” **Molecular Systems Biology**, v. 5, p. 259, 2009.
- AZEEZ, O. H.; ALKASS, S. Y.; PERSIKE, D. S. Long-Term Saccharin Consumption and Increased Risk of Obesity, Diabetes, Hepatic Dysfunction, and Renal Impairment in Rats. **Medicina**, v. 55, n. 10, p. 681, 2019.
- BAAR et al. Investigação do metabolismo de ácidos graxos *in vivo* em camundongos AFABP/aP2 (-/-). **J. Fisiol. Endocrinol. Metab.** 288, E187-E193, 2005.
- BAILEY C. J. et al. Efeito antihiperlicêmico da sacarina em camundongos diabéticos ob/ob. **Farmacia Br J.** 120 (1):74-78, 1997.
- 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.; BOSUTTI, A.; STEBEL, M. et al. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 288, p. 228-E235, 2005.
- 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.
- BEHRENS, M.; MEYERHOF, W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. **Physiol Behav**, v. 105, p. 4-13, 2011.
- BELLOIR, C.; NEIERS, F.; BRIAND, L. Sweeteners and sweetness enhancers. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 20, p. 1363-1950, 2017.
- BERNARDO, A. F. et al. Overnutrition during lactation leads to impairment in insulin signaling, up-regulation of GLUT1 and increased mitochondrial carbohydrate oxidation in heart of weaned mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 29, p. 124-132, 2016.
- BERGER J. P, AKIYAMA T. E, MEINKE P.T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. **Trends in Pharmacological Science.** 26(5):244-51, 2005.
- BESSESEN, D. H.; ROBERTSON, A. D.; ECKEL, R. H. Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v. 261, p. 246-251, 1991.
- BISSONNETTE, D. J. et al. The Effect of Nonnutritive Sweeteners Added to a Liquid Diet on Volume and Caloric Intake and Weight Gain in Rats. **Obesity**, v. 25, n. 9, p. 1556-1563, 2017.
- BJÖRNTORP, P. et al. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. **J. Lipid. Res**, v. 19, p. 316-324, 1978.
- BÓDIS, K.; RODEN, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. **Eur J Clin Invest**, v. 48, p. 13017, 2018.
- BOUCHARD C. Genética da obesidade: o que aprendemos ao longo de décadas de pesquisa. **Obesidade (Silver Spring)**; 29:802-820, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resolução RDC nº18 de 24 de março de 2008 - Regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 137 p., 2020.

BROWN, R. J.; DE BANATE, M. A.; ROTHER, K. I. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. **Int J Pediatr Obes**, v. 5 (4), p. 305-312, 2010.

BRYANT, C. E. et al. Non-nutritive sweeteners: no class effect on the glycaemic or appetite responses to ingested glucose. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 5, p. 629-631, 2014.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CANTO C.; GARCIA-ROVES P. M. High-Resolution Respirometry for Mitochondrial Characterization of Ex Vivo Mouse Tissues. **Current protocols in mouse biology**, 5, 135-153, 2015.

CEDIKOVA, M. et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. **Stem Cells Int**. v. 2016, n. 6067349, p. 1-11, 2016.

CHAN T.F. et al. O consumo de bebidas açucaradas está associado a componentes da síndrome metabólica em adolescentes. **Nutrients**; 6:2088e103, 2014.

CHIA, C. W. et al. Chronic low-calorie sweetener use and risk of abdominal obesity among older adults: a cohort study. **PLoS One**, v. 11, p. 167-241, 2016.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflamm Res**. v. 49, p. 497-505, 2000.

CID10. Busca de **CID.1992**. Disponível em: <<https://www.cid10.com.br/>>. Acessado em: Agosto de 2018.

COLLINS, J.; MENG, C.; ENG, A. Psychological Impact of Severe Obesity. **Current Obesity Reports**, v. 5, p. 435-440, 2016.

COMPARE, D. et al. The Gut Bacteria-Driven Obesity Development. **Karger, Digestive diseases**, v. 34 (3), p. 221-229, 2016.

COOPER, P.; WAHLQVIST, M.; SIMPSON, R. Sacarose versus sacarina como adoçante adicionado no diabetes não dependente de insulina: efeitos metabólicos de curto e médio prazo. **Diabetes. Med**. 5, 676-680, 1988.

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.

CURRY, L. L.; ROBERTS, A. Subchronic toxicity of rebaudioside A. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. S11-S20, 2008.

DAMAK, S. et al. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. **Science**, v. 301, p. 850-853, 2003.

DAVAL, M. et al. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. **J Biol Chem**, v. 1, p. 25250-25257, 2005.

- DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. **Neuroreport**, v. 18, n. 5, p. 521-524, 2007.
- DE KONING, L. et al. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. **Am J Clin Nutr**, v. 93 (6), p. 1321-1327, 2011.
- DE PAUW, A. et al. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. **Am J. Pathol.** v. 175, p. 927-939, 2009.
- DELVECCHIO M., GRUGNI G., HILL J.W. Editorial: Genetic obesity. **Front Endocrinol (Lausanne)**. Jan 4;14:1349582, 2024.
- DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881-887, 2006.
- DHINGRA, R. et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**, v. 116 (5), p. 480-488, 2007.
- DIAS, P. C. et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cad. Saúde Pública**, v. 33 (7), p. 1-12, 2017.
- DIECKMANN L., CZAMARA D. Epigenetics of prenatal stress in humans: the current research landscape. **Clin Epigenetics**. Feb 2;16(1):20, 2024.
- DIRAISON, F. et al. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v. 282, p. 46-51, 2002.
- DUNCAN M.H.; SINGH B. M.; WISE P. H.; CARTER G.; ALAGHBAND-ZADEH J.A simple measure of insulin resistance. **Lancet**, 346, p. 120-121, 1995.
- DUTTA, P. K. et al. Comparative efficacy of aqueous extract of Stevia (*S. rebaudiana* Bertoni) leaves and metformin hydrochloride (Comet) in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. **Int J Biol Res**, v. 2, p. 17 -22, 2010.
- DYER, J. et al. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. **Biochem Soc Trans**, v. 33, p. 302-305, 2005.
- DZAMKO, N. L.; STEINBERG, G. R. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. **Acta Physiol**, v. 196 (1), p. 115-127, 2009.
- EGUCHI, R. et al. Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 3, p. 182-187, 2008.
- ELLSWORTH, L. et al. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. **Society for Reproduction and Fertility**, p. 1-50, 2018.
- FACCIOLI N., POITOU C., CLÉMENT K., DUBERN B. Current Treatments for Patients with Genetic Obesity. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, May 29;15(2):108-119, 2023.

- FAUSTO, L. S. L. et al. Efeito do adoçante à base de estévia (s. Rebaudiana) durante a gestação de ratas wistar e o reflexo do tratamento nos fetos. 2013. **Dissertação** (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Florianópolis - SC.
- FDA. Food and Drug Administration. 2018. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states> >. Acessado em: Janeiro, 2024.
- FEIJÓ. et al. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. **Appetite**, v. 60 p. 203-207, 2013.
- FERNSTROM, J. D. Non-Nutritive Sweeteners and Obesity. **Annu. Rev. Food Sci. Technol**, v. 6, p. 119-36, 2015.
- FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 109, n. 3, p. 449-456, 2013.
- FISCHER-POSOVSZKY, P.; WABITSCH, M.; HOCHBERG, Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. **Horm metab res**, v. 39, p. 314-321, 2007.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr**, v. 83, p. 192-203, 2006.
- FOWLER, S. P. et al. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16 (8), p. 1894-1900, 2008.
- FOLETTTO et al. Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. **Appetite**, v. 96, p. 604-610, 2016.
- FURUHASHI, M. Proteína 4 de ligação a ácidos graxos em doenças cardiovasculares e metabólicas. **J. Atheroscler. Trombo**. 2019.
- GARCIA-SOUZA, E. P. D. et al. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. **Am J. Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 3, p. E626-E636, 2008.
- GARVEY, W. T. et al. Evidência de defeitos no tráfico e translocação de transportadores de glicose GLUT4 no músculo esquelético como causa da resistência humana à insulina. **J. Clin. Investigue.**, p. 2377-2386, 1998.
- GHANAVATIAN, P.; KHALIFEH, K.; JAFARIAN, V. Structural features and activity of Brazzein and its mutants upon substitution of a surfaced exposed alanine. **Biochimie**, v. 131, p. 20-28, 2016.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental plasticity and human disease: research directions. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 461-71, 2007.
- GONÇALVES, B. S. Efeito do consumo do adoçante natural Stevia (S. rebaudiana Bertoni) sobre parâmetros metabólicos e atividade mitocondrial do tecido adiposo branco de

camundongos obesos hiperalimentados durante a lactação. 2019. 131 p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiol behav**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.

GOTO, T. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. **J. Lipid Res.** 52, 873-884, 2011.

GRAHAM, C.; MULLEN, A.; WHELAN, K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. **Nutrition Reviews**, v. 73 (6), p. 376-385, 2015.

GRAHAM, T.E.; KAHN, B. B. Alterações específicas do tecido no transporte de glicose e mecanismos moleculares de comunicação intertecido na obesidade e diabetes tipo 2. **Hormônio. Metab.**, p. 717-721, 2007.

GREEN, C. H.; SYN, W. K. Adoçantes não nutritivos e sua associação com a síndrome metabólica e a doença hepática gordurosa não alcoólica: uma revisão da literatura. **Revista Europeia de Nutrição**, 58, 1785-1800, 2019.

GREENWOOD D. C. et al. Associação entre refrigerantes adoçados com açúcar e adoçados artificialmente e diabetes tipo 2: revisão sistemática e meta-análise de resposta à dose de estudos prospectivos. **Br J Nutr**, 112 p. 725-734, 2014.

GROSS, B., PAWLAK, M., LEFEBVRE, P. et al. PPARs no DM2 induzido pela obesidade, dislipidemia e DHGNLPPA. *Nat Rev Endocrinol* ,13, 36-49, 2017.

GUERRE-MILLO M. Adipose tissue and adipokines: For better or worse. **Diabetes Metab.** 30:13-92, 2004.

GUIMARÃES, A. C. et al. Citrus aurantium L. and synephrine improve brown adipose tissue function in adolescent mice programmed by early postnatal overfeeding. **Frontiers in nutrition**, v. 10, p. 01-15, 2024.

HABBOU, 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)**. v. 26 (1), p. 11-13, 2018.

HARPER, J. W.; ZISMAN, T. L. Interaction of obesity and inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 21, 22 (35), p. 7868-7881, 2016.

HASAN H. M, ALKASS S.Y, DE OLIVEIRA D. S. P. Impact of Long-Term Cyclamate and Saccharin Consumption on Biochemical Parameters in Healthy Individuals and Type 2 Diabetes Mellitus Patients. **Medicina**, 2023.

HASS, N.; SCHWARZENBACHER, K.; BREER, H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. **Cell Tissue Res**, v. 339, p. 493-504, 2010.

HARRINGTON W.W. et al. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. **PPAR Research**. 2007:97125, 2007.

HE Y. L. et al. Development of FABP4/5 inhibitors with potential therapeutic effect on type 2 Diabetes Mellitus, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, 2021.

HESS, E.L.; MYERS, E. A.; SWITHERS; HEDRICK E. S. Associações entre Ingestão de adoçantes não nutritivos e síndrome metabólica em adultos. **Journal of the American College of Nutrition**, 37, 487-493, 2018.

HIGGINS, K. A.; MATTES, R. D. A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 109, n. 5, p. 1288-1301, 2019.

HONDARES, E. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. **J. Biol. Chem.** 286, 43112-43122, 2011.

HORWITZ, D. L.; MCLANE, M.; KOBE, P. Resposta à dose única de aspartame ou sacarina por pacientes com NIDDM. **Cuidados com diabetes**, 11, 230-234, 1988.

HOTAMISLIGIL G. S.; BUDAVARI A.; MURRAY D.; SPIEGELMAN B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. **J Clin Invest**. 94:1543-9, 1994.

HOTAMISLIGIL G. S.; SPIEGELMAN B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**. 43:1271-8, 1994.

HUANG, Q.; MAC.; CHEN, L.; LUO, D.; CHEN, R.; LIANG, F. Insights mecanísticos sobre a interação entre fatores de transcrição e modificações epigenéticas e a contribuição para o desenvolvimento da obesidade. *Frente. Endocrinol. (Lausana)* 2018,9, 370. **J Clin Nutr.**,100: 765-77, 2014.

IIZUKA K.; TAKAO K.; YABE D. Regulação do metabolismo lipídico mediada por ChREBP: envolvimento da microbiota intestinal, fígado e tecido adiposo, **Front. Endocrinol.** 11, 587189, 2020.

IMAMURA F. et al. Consumo de bebidas adoçadas com açúcar, bebidas adoçadas artificialmente e sucos de frutas e incidência de diabetes tipo 2: revisão sistemática, metaanálise e estimativa da fração atribuível à população. **BMJ**, 351: 3576, 2015.

IWATSUKI, K.; UNEYAMA, H. Sense of taste in the gastrointestinal tract. **J Pharmacol Sci**, v. 118, p. 123-128, 2012.

JAMES, P. T. Obesity: the worldwide epidemic. **Clin Dermatol**, v. 22, p. 276-280, 2004.

JANG, H. J. et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 15069-15074, 2007.

JANSSEN, S. et al. Bitter taste receptors and alphasugducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. 2094-2099, 2011.

JENSEN, M. D. Health consequences of fat distribution. **Horm res**, v. 48, p. 88-92, 1997.

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

KAWAI, T.; AUTIERI, MV; SCALIA, R. Inflamação do tecido adiposo e disfunção metabólica na obesidade. **J. Physiol.-Cell Physiol**, 320 , C375–C391, 2021.

KELISHADI R.; MANSOURIAN M.; HEIDARI-BENI M. Associação de consumo de frutose e componentes da síndrome metabólica em estudos humanos: uma revisão sistemática e meta-análise. **Nutrition**, 30: p. 503-510, 2014.

KERNER, J.; HOPPEL, C. L. Fatty acid import into mitochondria. **Biochim biophys acta**, v. 1486, n. 1, p. 1-7, 2000.

KERSTEN, S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 7, p. 919-933, 2014.

KHANNA D., WELCH B.S., REHMAN A. **Pathophysiology of Obesity**, 2022.

KILOV, D.; KILOV, G. Philosophical determinants of obesity as a disease. **Obesity Reviews**, Australia, v. 19, p. 41-48, 2018.

KLIP A.; TSAKIRIDIS T.; MARETTE A.; ORTIZ P.A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: A review of studies in vivo and in cell cultures. **Faseb J.** 8:43-53, 1994.

KLISIC A., AHMAD R., HADDAD D., BONOMINI F., SINDHU S. Editorial: The role of oxidative stress in metabolic and inflammatory diseases. **Front Endocrinol (Lausanne)**. Feb 8;15:1374584, 2024.

KRAUSS S.; ZHANG C. Y.; LOWELL B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues, Nature reviews. **Molecular cell biology**, 6, 248-261, 2005.

KUREK J. M.; MIKOŁAJCZYK-STECYNA J.; KREJPCIO Z. Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni mitigate lipid metabolism abnormalities in diabetes by modulating selected gene expression – An in vivo study, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 166, 2023.

KUSHNER, R. F.; SCOTT K. Introduction: The State of Obesity in 2017. **Med Clin N Am**, v. 102, p. 1-11, 2018.

LACERDA-MIRANDA, G. et al. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. **Peptides**, v.35, n.1, p. 65-73, 2012.

LAFFITTE, A.; NEIERS, F.; BRIAND, C. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 17, p. 379-385, 2014.

LEE M. J.; WU Y.; FRIED S. K., Heterogeneidade do tecido adiposo: implicação das diferenças de depósito no tecido adiposo para complicações da obesidade, **Mol. Aspectos Med.** 34, 2013.

LEGUÍSAMO, N. M. et al. O conteúdo de GLUT4 diminui junto com a resistência à insulina e altos níveis de marcadores inflamatórios em ratos com síndrome metabólica. **Cardiovascular. Diabetol**, 2012.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPARgamma. **Cell.** v. 16, n. 123(6), p. 993-999, 2005.

LI, J. et al. A captação reduzida de glicose precede defeitos de sinalização de insulina em adipócitos de camundongos knockout para GLUT4 heterozigotos. **FASEB J. Publicação Fed. Sou. Soc. Exp. Biol.**, 1117-1125, 2000.

LI, J. et al. Folate treatment of pregnant rat dams abolishes metabolic effects in female offspring induced by a paternal pre-conception unhealthy diet. **Diabetologia**, v. 61 (8), p. 1862-1876, 2018.

LILLYCROP, K. A.; BURDGE, G. C. Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. **Int J Obes**, v. 35, n. 1, p. 72-83, 2011.

LIM W.Y. et al. Expressão de lipase de lipoproteína, lipídios séricos e deposição de lipídios teciduais em ratos tratados com ácido glicirrízico administrados por via oral. **Saúde lipídica Dis.** 29:31, 2009.

LISBOA, P. C. et al. Postnatal Low Protein Diet Programs Leptin Signaling in the Hypothalamic- Pituitary-Thyroid Axis and Pituitary TSH Response to Leptin in Adult Male Rats. **Horm Metab Res**, v. 44, p. 114-122, 2012.

LÓPEZ-ALARCÓN, M. G.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. Epidemiología y genética del sobrepeso y la obesidad. Perspectiva de México en el contexto mundial. **Medigraphic Artemi Isína**, v. 65, p. 421-430, 2008.

LÓPEZ Y.R. et al. Efeito da glicina na hipertrofia de adipócitos em um modelo de síndrome metabólica em ratos. **Curr. Medicamento.** 13 :158-169, 2016.

LONGLO, M. et al. Disfunção do tecido adiposo como determinante das complicações metabólicas associadas à obesidade. **Internacional J. Mol. Ciência**, 20, 2358, 2019.

LUDWIG, D. S.; PETERSON, K. E.; GORTMAKER, S. L. Relation between consumption of sugarsweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. **Lancet**, v. 357, p. 505-508, 2001.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. Artigos Originais, Revisões e Atualizações. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 50 (2), 2006.

MAEDA et al. As proteínas de ligação aos ácidos graxos de adipócitos/macrófagos controlam as respostas metabólicas integradas na obesidade e no diabetes. **Metab celular.** 107-119, 2005.

MAGNUSON, M. C. et al. Renwick. Biological fate of low-calorie sweeteners. **Nutrition Reviews**, v. 74 (11), p. 670-689, 2016.

MALAFAIA, T. O. Estudo da via de sinalização da grelina e sua ação no metabolismo energético do tecido adiposo marrom de camundongos obesos hiperalimentados na lactação. 2018. 107 p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MALAISSE et al. Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets. **Cell Signal**, v. 10, p. 727-733, 1998.

MALNIK E. Organização Mundial da Saúde recomenda reduzir pela metade a ingestão de açúcar. O telégrafo; Março 2014. <<http://www.telegraph.co.uk/news/health/news/10677712/World-Health-Organisation-advises-halving-sugar-intake.html>> Acessado em fevereiro de 2024.

MARGOLSKEE, R. F. et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 15075-15080, 2007.

MARTINS, M. R.; VIEIRA, A. K.; DE SOUZA, E. P.; MOURA A. S. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. **J Endocrinol**, v.198, n.3, p. 591-598, 2008.

MASUBUCHI, Y. et al. A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. **PLoS One**, v. 8 (1), 2013.

MEAD J. R.; IRVINE S.A.; RAMJI D. P. Lipoproteína lipase: estrutura, função, regulação e papel na doença. **J. Mol. Med.**; 80 :753-769, 2002.

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

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

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

MILLER, P. E.; PEREZ E. V. Adoçantes de baixas calorias e peso corporal e composição: Uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados e estudos de coorte prospectivos. **Jornal Americano de Nutrição Clínica**, 100, 765-777, 2014.

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

MITSUTOMI K.; MASAKI T.; SHIMASAKI T.; GOTOH K.; CHIBA S.; KAKUMA T.; SHIBATA H. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. **Metabolism**. J63 (1): 69-78, 2014.

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

MORAES L.A, PIQUERAS L., BISHOP-BAILEY D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology and Therapy**.110(3):371-85, 2006.

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

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

MURPHY, M. P. Como as mitocôndrias produzem espécies reativas de oxigênio. **Bioquímica. J.** 417, 1–13, 2009.

NAKAGAWA Y.; SHIMANO H. CREBH regula a glicose sistêmica e o metabolismo lipídico. **Internacional J. Mol. science**. 19, 1396, 2018.

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

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

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

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

NEVES F.A. et al. Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. **J Nutr Biochem**. 25:50-7, 2014.

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

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

NORIEGA L. G, et al. CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. **EMBO Rep**. Sep 30;12(10):1069-76, 2011.

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

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

OMS. WHO acceleration plan to stop obesity. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240075634>>. Acessado em: janeiro de 2024.

OMS. Ingestão de açúcares para adultos e crianças: diretriz. OMS; Genebra, Suíça: 2015.

- ORTEGA, F. B.; LAVIE, C. J.; BLAIR, S. N. Obesity and Cardiovascular Disease. **Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Diseases Compendium**, v. 118, p.1752-1770, 2016.
- OSÓRIO, J. As muitas faces da leptina - um novo papel para a sinalização da leptina na hipertensão induzida pela obesidade. **Nat Rev Endocrinol** 11, 129, 2015.
- PALATNIK, A.; MOOSREINER, A.; OLIVER-VAN; S. Consumption of Non-Nutritive Sweeteners in Pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2020.
- PANG, M. D.; GOOSSENS, G. H.; BLAAK, E. E. O impacto dos adoçantes artificiais no controle do peso corporal e na homeostase da glicose. **Frente. Nutr.** 7, 598340, 2021.
- PANUGANTI K.K., NGUYEN M., KSHIRSAGAR R.K. Obesity. 2023 Aug 8. In: StatPearls. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; Jan-. PMID: 29083734, 2024.
- PARK M.; BAEK H.; HAN J. Y.; LEE H. J. O esteviosídeo aumenta o efeito antiadipogênico e a βoxidação ativando AMPK em células 3T3-L1 e tecidos adiposos epididimais de camundongos Db/Db, **Cells**, 1076, 2022.
- PARLEE, S. D. et al. Administration of Saccharin to Neonatal Mice Influences Body Composition of Adult Males and Reduces Body Weight of Females. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1313-1326, 2014.
- PECKHAM, J. C. O rato de laboratório. **Academic Press**: Nova York, NY, EUA, 1979.
- PEDRO, P. F.; TSAKMAKI, A.; BEWICK, G. A. O teste de tolerância à glicose em ratos. **Methods Mol Biol**, 207-216, 2020.
- PELLEGRINELLI, V., CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia** 59, 1075-1088, 2016.
- PEPINO, M.; BOURNE, C. Nonnutritive sweeteners, energy balance and glucose homeostasis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14 (4), p. 391-395, 2011.
- PEREIRA, R. O. et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. **Regul Pept**, v.136, n.1-3, p. 117-121, 2006.
- PETERSEN M.C., SHULMAN G.I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**. Oct 1;98(4):2133-2223, 2018.
- PINTO, W. J. A função endócrina do tecido adiposo. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.
- PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 20, p. 4963-4976, 2009.
- PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adults due to early postnatal overfeeding. **Exp Clin Endocrinol**, v. 99, n.3, p. 154-158, 1992.
- PLAZA-DIAZ, J. et al. Plausible biological interactions of low- and non-calorie sweeteners with the intestinal microbiota: an update of recent studies. **Nutrients**, v. 12, p. 1-15, 2020.

- POPKIN, B. M.; NIELSEN, S. J. The sweetening of the world's diet. **Obesity**, v. 11, p. 1325-1332, 2003.
- POPKIN B. M., HAWKES C. Adoçamento da dieta global, particularmente bebidas: Padrões, tendências e respostas políticas. **Lancet Diabetes Endocrinol**; 4 :174–186, 2016.
- PRÉVIA, C. et al. O tratamento precoce com metformina melhora a função pancreática e previne a disfunção metabólica na superalimentação precoce de ratos machos na idade adulta. **Exp. Fisiol.**, 105, 2051-2060, 2020.
- QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.
- QURRAT-UL-AIN.; KHAN, S, A. Artificial sweeteners: safe or unsafe? **Recent advances in endocrinology**, v. 65, n2, p. 225-227, 2015.
- REILLY, J. J. et al. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. **BMJ**, v. 330, p. 1357, 2005.
- REN, X. et al. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 3, p. 1-15, 2009.
- REYES-FARIAS, M. et al. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. **Biochemical Pharmacology**, v. 192, p. 114723, out. 2021.
- RIBEIRO FILHO, F. F. et al. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.**, v. 50 (2), p. 230-238, 2006.
- RIOS-LEYVRAZ, M & MONTEZ, J. Efeitos do uso de adoçantes não açucarados na saúde: uma revisão sistemática e meta-análise. Genebra: Organização Mundial da Saúde., J (2022) Efeitos do uso de adoçantes não açucarados na saúde: uma revisão sistemática e meta-análise. Genebra: **Organização Mundial da Saúde**, 2022.
- RITCHIE S.A.; CONNELL J. M. A ligação entre obesidade abdominal, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** 17, 319-326, 2007.
- RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **J Endocrinol**, v. 195, n. 3, p. 485-94, 2007.
- RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **J Nutr Biochem**, v. 22, p. 109-117, 2011.
- RODREUGUEZ-CALVO, R. et al. Papel da proteína 4 de ligação a ácidos graxos na insuficiência cardíaca e doenças cardiovasculares. **J. Endocrinol.** 233, R173-R184, 2017.
- ROGERS P. J.; APPLETON K. M. Os efeitos dos adoçantes de baixas calorias na ingestão de energia e no peso corporal: uma revisão sistemática e meta-análises de estudos de intervenção sustentada. **Int J Obes.** Londres, 45: p. 464-478, 2021.
- ROMO, A. et al. Efeitos dos adoçantes não nutritivos no metabolismo da glicose e nos hormônios reguladores do apetite: Revisão sistemática de estudos prospectivos observacionais e ensaios clínicos. **PLoS One**, 11, 2016.

ROSS, M. H. Histologia: Texto e Atlas. Em correlação com biologia celular e molecular/ Michael H. Ross, Wojciech Pawlina; [Revisão técnica Jorge Mamed de Almeida; tradução Antonio Fracisco Dieb Paulo]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Ed 6º, 2012.

ROSSETTI, L. et al. Resistência à insulina periférica, mas não hepática em camundongos com um alelo interrompido do gene transportador de glicose tipo 4 (GLUT4). **J. Clin. Investigue.**,100, 1831-1839, 1997.

RUDERMAN N.B., BERCHTOLD P., SCHNEIDER S. Transtornos associados à obesidade em indivíduos com peso normal: algumas especulações. **Int J Obes.** 6 Suplemento 1 :151-7, 1982.

RUYTER, J. C.; OLTHOF, M. R.; SEIDELL, J. C.; KATAN, M. B. Um ensaio de bebidas sem açúcar ou adoçadas com açúcar e peso corporal em crianças. **N. Engl. J. Med.**, 367, 1397-1406, 201.

RUSSELL C., BAKER P., GRIMES C., LINDBERG R., LAWRENCE M.A. Tendências globais no uso de açúcares adicionados e adoçantes não nutritivos no fornecimento de alimentos embalados: motivadores e implicações para a saúde pública. **Nutrição em Saúde Pública**, 2023.

RYAN, D. H.; KAHAN S. Guideline Recommendations for Obesity Management. **Med Clin N Am**, v.102, p. 49-63, 2018.

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

SANTILLANA N., ASTUDILLO-GUERRERO C., D'ESPESSAILLES A., CRUZ G. White Adipose Tissue Dysfunction: **Pathophysiology and Emergent Measurements. Nutrients**, Mar 31;15(7):1722, 2023.

SCHIANO, C. et al. Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners? **Food Research International**, v. 142, p. 110220, 2021.

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

SCLAFANI A.; BAHRANI M.; ZUKERMAN S.; ACKROFF K. Stevia and saccharin preferences in rats and mice. **Chem Senses**, 35, 433-443, 2010.

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

SERRANO et al. Saccharin Stimulates Insulin Secretion Dependent on Sweet Taste Receptor-Induced Activation of PLC Signaling Axis. **Biomedicines**, v. 10, 2022.

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

SIERSBAEK, R.; NIELSEN, R.; MANDRUP, S. PPARgamma na diferenciação e metabolismo de adipócitos - novos insights de estudos de todo o genoma. **FEBS Lett.** 584, 3242-3249, 2010.

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

SILVA, S. G. Efeito do tratamento antiobesidade com Citrus aurantium ou sinefrina sobre o metabolismo lipídico no fígado em camundongos com obesidade programada por superalimentação pós-natal. 2023. 93 p. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

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

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

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

SOARES, V. M. S. Ação da grelina acilada sobre o metabolismo energético no tecido adiposo branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no início da vida. 2016. 110 f. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

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

SØRENSEN, L. B. et al. Sucrose compared with artificial sweeteners: a clinical intervention study of effects on energy intake, appetite, and energy expenditure after 10 wk of supplementation in overweight subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 36-45, 2014.

SOUZA, L. L.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Redução do tamanho da ninhada como modelo de supernutrição durante Lactação e suas consequências para o desenvolvimento de doenças metabólicas na prole. **Nutrientes**, 14, 2045, 2022.

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

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

STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. Efeitos da superalimentação neonatal na alimentação de jovens e adultos e no gasto de energia em ratos. **PLoS One** ,7, e52130, 2012.

STEFFEN et al. Long-term aspartame and saccharin intakes are related to greater volumes of visceral, intermuscular, and subcutaneous adipose tissue: the CARDIA study. **Int J Obes.**, 2023.

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

SUEZ et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**, v. 514, p. 181-186, 2014.

SUGII, S. et al. PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. **Proc Natl Acad Sci**. v. 106, n. 52, p. 22504-22509, 2009.

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

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

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

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

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

SWITHERS S. E., MARTIN A. A., CLARK K. M., LABOY A. F., DAVIDSON T. Ganho de peso corporal em ratos que consomem líquidos adoçados. Efeitos da cafeína e composição da dieta. **PMC**, 55 :528–533, 2011.

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

TAPANEE, P. et al. Sugar, non-nutritive sweetener intake and obesity risk in college students. **Journal of American College Health**, v. 71, n. 7, p. 2093–2098, 2 set. 2023.

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

TEYSSEIRE F. et al. Metabolic Effects of Selected Conventional and Alternative Sweeteners: A Narrative Review. **Nutrients**. Feb 23;16(5):622, 2024.

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

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

TONG, Y. et al. Suppression of expression of muscle-associated proteins by PPAR α in brown adipose tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 336, 76-83, 2005.

TROJNAR, M. et al. Associations between Fatty Acid-Binding Protein 4—A Proinflammatory Adipokine and Insulin Resistance, Gestational and Type 2 Diabetes Mellitus. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 227, 2019.

TU, W. J. et al. Proteína 4 de ligação de ácidos graxos séricos no primeiro trimestre e diabetes mellitus gestacional subsequente. **Obsteto. Ginecol.** 130, 1011-1016, 2017.

TURNER, A. et al. Intense Sweeteners, Taste Receptors and the Gut Microbiome: A Metabolic Health Perspective. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 1-18, 2020.

UAU, C.Y.; JANG, J.E.; LEE, S.E.; KOH, E.H.; LEE, K.U. Disfunção mitocondrial em adipócitos como causa primária de inflamação do tecido adiposo. **Diabetes Metab. J.** 43, 247–256, 2019.

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

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

UYSAL K.T. et al. Melhoria do metabolismo da glicose e dos lipídios em camundongos geneticamente obesos sem aP2, **Endocrinology** 141, 3388-3396, 2000.

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

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

WAJCHENBERG B. L. Tecido adiposo subcutâneo e visceral: sua relação com a síndrome metabólica, **Endocr. Apocalipse**, 21, 2000.

WALBOLT., L.; KOH, Y. Non-nutritive Sweeteners and Their Associations with Obesity and Type 2 Diabetes. **Journal of Obesity & Metabolic Syndrome**, v. 29, p. 114-123, 2020.

WANG, F.; MULLICAN, S. E.; DISPIRITO, J. R.; PEED, L. C.; LAZAR, M. A. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPAR γ . **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 110, 18656-18661, 2013.

WARDOYO H. et al. Mental Health Awareness and Promotion during the First 1000 Days of Life: **An Expert Consensus**. *Healthcare (Basel)*. Dec 24;12(1):44, 2023.

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.

WEIR C.B., JAN A. BMI Classification Percentile And Cut Off Points. 2023 Jun 26. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan—. PMID: 31082114, 2024.

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

WILK, K. et al. The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p. 1261, 2022.

WOF. World Obesity Federation, **World Obesity Atlas 2023**. Disponível em: <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19> Acessado em: janeiro de 2023.

XAVIER J. L. P. et al. Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. Metabolic And Histological Adjustments In Lactation. **An Acad Bras Cienc**, 91(1), 2019.

XU, L., et al. Polarização de macrófagos mediada por disfunção mitocondrial induz inflamação do tecido adiposo na obesidade. **Internacional J. Mol. Ciência**. 23 , 9252. 2022

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

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

YOSHIMURA, T. M. Luz de baixa potência como proposta terapêutica à síndrome metabólica em modelo animal. 2014. 72 f. **Dissertação** (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo.

YIN M. X, ZHANG L. Hippo signaling in epithelial stem cells. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**. 891 Jan;47(1):39-45, 2014.

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

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

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

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

ZHANG, Y. et al. Coding of sweet bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. **Cell**, v. 112, p. 293-301, 2023.

ANEXO A – Submissão do artigo ao Jornal Europeu de Nutrição (EJON) referente aos dados obtidos durante o Doutorado



Bruna Gonçalves <bgoncalvesnutri@gmail.com>

**EJON-D-24-00411 - Submission Notification to co-author -
[EMID:278a39216786ba05]**

Editorial Office (EJON) <em@editorialmanager.com>

13 de março de 2024 às 16:07

Responder a: "Editorial Office (EJON)" <eurjnutr@gmail.com>

Para: Bruna Gonçalves da Silva <bgoncalvesnutri@gmail.com>

Re: "Chronic consumption of the non-caloric sweetener saccharin increases adiposity and impairs mitochondrial function in white adipose tissue of mice"

Full author list: Bruna Gonçalves da Silva; Hyan de Freitas Franco; Lucas Santos Barbosa de Lima; Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira; Tayanne de Oliveira Malafaia; Andressa Cardoso Guimarães; Elaine de Oliveira; Julio Beltrame Daleprane; Vanessa da Silva Tavares Rodrigues; Patricia Cristina Lisbôa; Daniela Caldas de Andrade; Erika Afonso Costa Cortez Marques; Mateus de Almeida Rainho; Alessandra Alves Thole; Anibal Sanchez Moura; Érica Patricia Garcia de Souza

Dear Miss da Silva,

We have received the submission entitled: "Chronic consumption of the non-caloric sweetener saccharin increases adiposity and impairs mitochondrial function in white adipose tissue of mice" for possible publication in European Journal of Nutrition, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Professor Érica Patricia Garcia de Souza who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

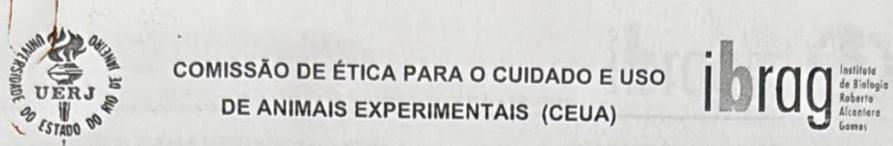
Springer Journals Editorial Office
European Journal of Nutrition

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ejon/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA), (IBRAG/UERJ)

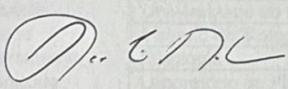


CERTIFICADO

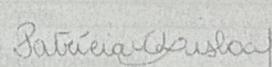
Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito do consumo dos adoçantes sacarina e stevia sobre parâmetros endócrinos-metabólicos e o metabolismo energético do tecido adiposo branco em camundongos obesos"**, registrada com o nº 067/2018, sob a responsabilidade de **Erica Patricia Garcia de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 27/11/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/11/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo suíço
Nº de animais	210
Peso/Idade	42-52 g / 90 dias
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 27 de Novembro de 2018.



Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ



Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>
ceua.ibrag@yahoo.com.br

ANEXO C – Ficha de Informações e Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) - Sacarina



Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

Data da revisão 04.12.2015

Versão 1.4

SEÇÃO 1. Identificação do produto e da empresa

1.1 Identificador do produto

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese
Número de registro REACH	Não há número de registro disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registro de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registro ou o registro está previsto para um prazo posterior.
Nº CAS	6155-57-3

1.2 Usos identificados da substância ou mistura e usos não recomendados

Usos identificados	Químico para síntese Para informações adicionais sobre os usos, por favor consulte o portal Merck Chemicals (www.merckgroup.com).
--------------------	--

1.3 Detalhes do fornecedor da Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

Empresa	Merck S/A * Brasil * Rua Torre Eiffel, 100 - Parque Rincão - Gleba A Cotia - CEP: 06705-481 - São Paulo - SP * tel/fax: +55 11 3127-7389
---------	--

1.4 Número do telefone de emergência

Suatrans: : 0800 707 7022 / 0800 17 2020

SEÇÃO 2. Identificação de perigos

2.1 Classificação da substância ou mistura

Esta substância não é classificada como perigosa de acordo com a legislação da União Européia.

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem (de acordo com a ABNT 14725-2)
Substância ou mistura não perigosa de acordo com o Regulamento Europeu 1272/2008 (EC).

2.3 Outros perigos

Não conhecidos.

SEÇÃO 3. Composição e informações sobre os ingredientes

3.1 Substância

Fórmula	C ₇ H ₄ NNaO ₅ S * 2 H ₂ O (Hill)
Nº CE	204-886-1
Massa molar	241,19 g/mol

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese

Observações Não apresenta ingredientes perigosos conforme o Regulamento (EC) No. 1907/2006.

3.2 Mistura
Não aplicável

SEÇÃO 4. Medidas de primeiros-socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros-socorros

Após inalação: Exposição ao ar fresco.

Após contacto com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada.

Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água.

Após ingestão: fazer a vítima beber água (dois copos no máximo). Consultar o médico se se sentir mal.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, agudos e retardados

Não há descrição de quaisquer sintomas tóxicos.

4.3 Indicação da atenção médica imediata e do tratamento especial necessário

Não existem informações disponíveis.

SEÇÃO 5. Medidas de combate a incêndio

5.1 Meios de extinção

Meios adequados de extinção

Água, Dióxido de carbono (CO₂), Espuma, Pó seco

Agentes de extinção inadequados

Nenhuma limitação de agentes extintores é dada para essa substância/mistura.

5.2 Riscos especiais resultantes da substância ou da mistura

Combustível.

Em caso de forte aquecimento podem formar-se misturas explosivas com o ar.

Em caso de incêndio formam-se gases inflamáveis e vapores perigosos.

Um incêndio pode provocar o desenvolvimento de:

Oxidos de enxofre, óxido nítrico

5.3 Precauções para bombeiros

Equipamentos especiais para proteção das pessoas envolvidas no combate a incêndio.

Usar equipamento de respiração autônomo em casos de incêndio.

Informações complementares

Suprimir (abater) com jatos de água os gases, vapores e névoas. Evitar a contaminação da água de superfície e da água subterrânea com a água de combate a incêndios.

SEÇÃO 6. Medidas de controle para derramamento ou vazamento

6.1 Precauções pessoais, equipamentos de proteção e procedimentos de emergência

Recomendações para pessoal não envolvido com emergências: Evitar a inalação de pós.

Evacuar a área de perigo, observar os procedimentos de emergência, consultar um especialista.

Recomendações para atendentes de emergências: Equipamento protetor, vide seção 8.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo 814114
Nome do produto Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese

6.2 Precauções ambientais

Não se requer a adopção de medidas especiais.

6.3 Métodos e materiais de contenção e limpeza

Observar as possíveis restrições de material (vide seções 7 e 10).

Absorver em estado seco. Proceder à eliminação de resíduos. Limpeza posterior. Evitar a formação de pós.

6.4 Consulta a outras seções

Indicações sobre tratamento de dejetos, vide seção 13

SEÇÃO 7. Manuseio e armazenamento

7.1 Precauções para manuseio seguro

Recomendações para manuseio seguro

Observar os avisos dos rótulos.

Medidas de higiene

Mudar a roupa contaminada. Depois de terminar o trabalho, lavar as mãos.

7.2 Condições para armazenamento seguro, incluindo incompatibilidades

Condições de armazenamento

Hermeticamente fechado. Em local seco.

Temperatura recomendada de armazenamento, consulte na etiqueta de produto.

7.3 Utilizações finais específicas

Nenhum uso específico é previsto além dos mencionados na sessão 1.2.

SEÇÃO 8. Controle de exposição e proteção individual

8.1 Parâmetros de controle

Não contém substâncias com valores limites de exposição ocupacional.

8.2 Controles da exposição

Medidas de controle de engenharia

Medidas técnicas e operações de trabalho adequadas devem ter prioridade sobre o uso de equipamento de proteção pessoal.

Vide seção 7.1.

Medidas de proteção individual

As características dos meios de protecção para o corpo devem ser seleccionadas em função da concentração e da quantidade das substâncias tóxicas de acordo com as condições específicas do local de trabalho. A resistência dos meios de protecção aos agentes químicos deve ser esclarecida junto dos fornecedores.

Protecção para a pele/olhos

Óculos de segurança

Protecção das mãos

contacto total:

Substância da luva: Borracha nitrílica

Espessura da luva: 0,11 mm

Pausa: > 480 min

contacto com salpicos:

Substância da luva: Borracha nitrílica

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese

Espessura da luva:	0,11 mm
Pausa:	> 480 min

As luvas de protecção a usar têm que obedecer às especificações da directiva EC 89/686/EEC e do padrão resultante EN374, por exemplo KCL 741 Dermatril® L (contacto total), KCL 741 Dermatril® L (contacto com salpicos).

As ruturas acima descritas foram determinadas pelo KCL em testes de laboratório seg. a EN374 com amostras dos tipos de luvas recomendados.

Esta recomendação aplica-se apenas ao produto descrito na ficha de dados de segurança por nós fornecida bem como para a aplicação especificada. Quando houver dissolução ou mistura com outras substâncias e sob as devidas condições houver desvios aos descritos na EN374 por favor contactar o fornecedor de luvas com marcação CE (ex: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Internet: www.kcl.de).

Protecção respiratória

necessário em caso de formação de pós.

Tipo de Filtro recomendado: Filtro P 1

O empresário deve assegurar que a manutenção, limpeza e teste dos dispositivos de protecção respiratória sejam executados de acordo com as instruções do produtor. Estas medidas devem ser adequadamente documentadas.

SEÇÃO 9. Propriedades físicas e químicas

9.1 Informações sobre propriedades físico-químicas básicas

Estado físico	cristais
Cor	branco
Odor	inodoro
Limite de Odor	Não aplicável
pH	6,0 - 7,5 em 100 g/l 20 °C
Ponto de fusão	Não existem informações disponíveis.
Ponto de ebulição	Não existem informações disponíveis.
Ponto de fulgor	> 200 °C Método: vaso aberto
Taxa de evaporação	Não existem informações disponíveis.
Inflamabilidade (sólido, gás)	Não existem informações disponíveis.
Limite inferior de explosividade	Não existem informações disponíveis.
Limite superior de explosividade	Não existem informações disponíveis.
pressão de vapor	Não existem informações disponíveis.
Densidade relativa do vapor	Não existem informações disponíveis.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese
Densidade	Não existem informações disponíveis.
Densidade relativa	Não existem informações disponíveis.
Solubilidade em água	1.000 g/l em 20 °C
Coefficiente de partição (n-octanol/água)	log Pow: 0,45 (calculado) (Literatura) Não se prevê qualquer bio-acumulação.
Temperatura de autoignição	Não existem informações disponíveis.
Temperatura de decomposição	230 - 235 °C
Viscosidade, dinâmica	Não existem informações disponíveis.
Riscos de explosão	Não aplicável
Propriedades oxidantes	não
9.2 Outras informações	
Densidade aparente	600 - 800 kg/m3

SEÇÃO 10. Estabilidade e reatividade

10.1 Reatividade

Em geral o seguinte aplica-se a substâncias e misturas orgânicas inflamáveis: numa distribuição geralmente fina, quando voltado para cima pode gerar uma potencial explosão de pó.
Em caso de forte aquecimento podem formar-se misturas explosivas com o ar.

10.2 Estabilidade química

O produto é quimicamente estável em condições ambientes padrão (temperatura ambiente).

10.3 Possibilidade de reações perigosas

Reações violentas são possíveis com:

Agentes oxidantes fortes

10.4 Condições a serem evitadas

Aquecimento muito forte (decomposição).

Uma gama de aproximadamente 15 Kelvin abaixo do ponto flash é considerada como crítica.

10.5 Materiais incompatíveis

não existem indicações

10.6 Produtos de decomposição perigosa

em caso de incêndio: vide o capítulo 5°.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese

SEÇÃO 11. Informações toxicológicas

11.1 Informações sobre efeitos toxicológicos

Toxicidade aguda oral

DL50 Ratazana: 14.200 mg/kg

(substância anidra) (RTECS)

Toxicidade aguda - Inalação

Esta informação não está disponível.

Toxicidade aguda - Dérmica

Esta informação não está disponível.

Irritação da pele

Esta informação não está disponível.

Irritação nos olhos

Esta informação não está disponível.

Sensibilização

Esta informação não está disponível.

Mutagenicidade em células germinativas

Genotoxicidade in vitro

Teste de Ames

Resultado: negativo

(substância anidra) (Literatura)

Carcinogenicidade

Esta informação não está disponível.

Toxicidade à reprodução

Esta informação não está disponível.

Teratogenicidade

Esta informação não está disponível.

Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única

Esta informação não está disponível.

Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição repetida

Esta informação não está disponível.

Perigo por aspiração.

Esta informação não está disponível.

11.2 Informações complementares

Não se podem excluir propriedades perigosas, no entanto, são pouco prováveis se a manipulação do produto é adequada.

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança.

SEÇÃO 12. Informações ecológicas

12.1 Toxicidade

Não existem informações disponíveis.

12.2 Persistência e degradabilidade

Não existem informações disponíveis.

12.3 Potencial bioacumulativo

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese

Coefficiente de partição (n-octanol/água)

log Pow: 0,45
(calculado)

(Literatura) Não se prevê qualquer bio-acumulação.

12.4 Mobilidade no solo

Não existem informações disponíveis.

12.5 Resultados da avaliação PBT e vPvB

Avaliação de PBT/vPvB não realizada uma vez que a avaliação de segurança química não é exigida/não foi realizada.

12.6 Outros efeitos adversos

A descarga no meio ambiente deve ser evitada.

SEÇÃO 13. Considerações sobre tratamento e disposição

Métodos de tratamento de resíduos

Os dejetos devem ser descartados em conformidade com regulamentações nacionais e locais. Mantenha as substâncias químicas em seus recipientes originais. Não misturar com outros dejetos. O manuseio de recipientes sujos deve ser realizado da mesma forma que o do produto em si.

As frases de perigo e de precaução apresentadas no rótulo também se aplicam a qualquer resíduo deixado na embalagem. A disposição não controlada ou reciclagem desta embalagem não é permitida e pode ser perigosa. Deve ser incinerado em instalação de incineração adequada pelas autoridades competentes.

SEÇÃO 14. Informações sobre transporte

Transporte terrestre (ADR/RID)

14.1 - 14.6 Produto não perigoso segundo o regulamento de transporte.

Transporte fluvial (ADN)

Não relevante

Transporte aéreo (IATA)

14.1 - 14.6 Produto não perigoso segundo o regulamento de transporte.

Transporte marítimo (IMDG)

14.1 - 14.6 Produto não perigoso segundo o regulamento de transporte.

14.7 Transporte em massa de acordo com o Anexo II de MARPOL 73/78 e do Código IBC

Não relevante

SEÇÃO 15. Regulamentações

15.1 Normas de segurança, saúde e ambientais específicas para a substância ou mistura

Legislação nacional

Classe de armazenagem 10 - 13

15.2 Avaliação de segurança química

Não foi realizada uma avaliação de segurança química conforme a regulamentação UE REACH Nº 1907/2006 para este produto.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2014

No. de catálogo	814114
Nome do produto	Sacarina de sódio, sal dihidratado para síntese

SEÇÃO 16. Outras informações

Recomendação de treinamento

Proporcione informações, instruções e treinamento adequados para os operadores.

N° CE 204-886-1

Legenda das abreviações e acrônimos

As abreviaturas e acrônimos utilizados podem ser consultados em <http://www.wikipedia.org>.

As indicações baseiam-se no nível actual dos nossos conhecimentos e servem para a caracterização do produto no que se refere às medidas de segurança a tomar. Estas indicações não implicam qualquer garantia de propriedades do produto descrito.