



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA
DIANTE A ADIÇÃO DE SACAROSE E EDULCORANTES NA
DIETA DE RATOS *WISTAR*

Marcella Omena de Oliveira Duarte

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E NA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA
DIANTE A ADIÇÃO DE SACAROSE E EDULCORANTES NA
DIETA DE RATOS *WISTAR*

Marcella Omena de Oliveira Duarte

Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nelci Fenalti Höehr e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Patrícia Moriel.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

D85a Duarte, Marcella Omena de Oliveira, 1984 -
Aspectos fisiológicos e na expressão de proteínas da
via de sinalização da insulina Diane a adição de
sacarose e edulcorantes na dieta de ratos *wistar*. /
Marcella Omena de Oliveira Duarte. – Campinas, SP :
[s.n.], 2011.

Orientador : Nelci Fenalti Höehr
Coorientador: Patrícia Moriel
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Hipotálamo. 3. Insulina. 4.
Diabetes. 5. Sacarina. I. Höehr, Nelci Fenalti. II.
Moriel, Patrícia. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Physiological aspects and expression of proteins from the insulin signaling pathway given the addition of sucrose and sweeteners in the diet of wistar rats

Palavra-chave em inglês:

Obesity
Hypothalamus
Insulin
Diabetes
Saccharin

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Nelci Fenalti Höer [Orientador]
Patrícia Moriel [Coorientador]
Carla Roberta de Oliveira Carvalho
Célia Regina Garlipp

Data da defesa: 30-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Marcella Omena de Oliveira Duarte

Orientadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr
Co-Orientador: Prof. Dr. Patricia Moriel

Membros:

1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr -



2. Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho -



3. Profa. Dra. Célia Regina Garlipp -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à grande contribuidora da minha história de vida: Márcia Omena, minha mãe e também pai, aos meus avós, Jocedy Omena e Alceu Lima, e à minha segunda mãe, Martha Omena.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, pela oportunidade a mim concedida e pela atenção e sabedoria com as quais conduziu a construção deste trabalho. Também por ter sido capaz de me estimular diante de cada desafio enfrentado.

A Capes por ter concedido recursos financeiros que facilitaram a conclusão deste projeto

Ao grande amor da minha vida, “MAINHA”, por ser meu maior exemplo de força, coragem e determinação, além de, por ter ensinado a mim, tudo o que é essencial, e demonstrado, diariamente, o real sentido de “amor materno”. Todas as minhas conquistas devo a você e qualquer demonstração pública de agradecimento não seria suficiente por tudo que fez e faz por mim. TE AMO!

À minha tia, e também mãe, Martha, por insistir em me manter otimista. Obrigada por suas palavras de sabedoria e incentivo.

Aos meus avôs, pelo afeto, “dengo”, “mimo”, e por me mostrar a importância de um forte núcleo familiar.

Aos meus padrinhos, pelo incentivo e admiração que sempre demonstraram por mim, diante de cada conquista

A todos os meus familiares, em especial aos meus eternos “pequenos”, pelos sorrisos, à minha tia Salete e os primos “grandes”, por compreenderem a ausência em datas comemorativas e, ainda, por terem feito com que eu me sentisse, sempre, especial e muito amada.

Às professoras Patrícia Moriel e Patrícia Prada, pela visão pesquisadora, pelas idéias e todo o apoio científico.

Ao professor Mário Saad, por gentilmente ceder o espaço de seu laboratório (LICRI).

Aos demais amigos desse laboratório, que, cada um a sua maneira, contribuiu para a realização deste estudo; e aos técnicos do laboratório e funcionários do biotério, peças fundamentais na realização deste trabalho.

À minha família de coração, “Turma 7%”, por me mostrarem o REAL sentido da palavra AMIZADE. Mesmo à ^{IX} distância, souberam superar a ausência física e me dar segurança de que sempre farei parte da família que formamos.

À minha “nova família” (do meu namorado) que, além de me acolherem, ofereceram todo carinho durante a reta final (e mais tensa) dessa conquista.

E não menos importante, ao Fábio (namorado) que “sem pedir licença” mudou a minha vida, se tornou meu melhor amigo, confidente, meu “colo”, “ombro”, “braço direito”, MEU COMPANHEIRO. Sua presença foi (e continua sendo) fundamental nas noites mal dormidas, finais de semana de muito trabalho e nos momentos de vitória. Obrigada pela compreensão, pela admiração, pelos doces e mais doces, por me fazer enxergar o quanto sou forte, pelo apoio e o mais importante: por me fazer ACREDITAR EM SONHOS NOVAMENTE.

E, principalmente, a DEUS que trilhou esse meu caminho.

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica, multifacetada e de genética complexa que, associada às suas co-morbidades, conduz a um aumento no risco de mortalidade. Essa patologia provém do balanço energético positivo entre a ingestão e gasto calórico, e é um dos principais componentes da síndrome metabólica. A preocupação com a incidência dessa doença influenciou o consumo de produtos com adição de adoçantes que, sem a devida orientação nutricional, podem não suprir adequadamente as necessidades energéticas e, ao invés de prevenir ou regredir a obesidade, podem contribuir para o aparecimento da mesma. Explorando a hipótese de que a resistência à ação central da insulina pode ser o elo entre a obesidade e demais condições clínicas, este estudo investiga os efeitos da adição, na dieta de ratos, da sacarose e dos edulcorantes: ciclamato e sacarina, na via de sinalização hipotalâmica da insulina, e sua possível influência em aspectos fisiológicos, tais como volume de ingestão, ganho de peso, taxa de desaparecimento da insulina (*Kitt*) e peso do tecido adiposo epididimal; bem como em aspectos moleculares, verificando a expressão de proteínas da via de sinalização de insulina, tais como IR, IRS 1 e Akt. Foram analisados dados obtidos a partir do tratamento de ratos *Wistar* machos divididos em quatro grupos, tendo sido cada grupo submetido, por quarenta dias, a uma das seguintes dietas: somente ração (controle), ração com adição de sacarose em solução aquosa a 30%, ração com adição de sacarina associada a ciclamato de sódio em solução aquosa a 30%, e ração com adição de sacarina em solução aquosa a 30%. Para avaliação da ingestão espontânea em doze horas, os animais foram submetidos à estereotaxia do ventrículo cerebral para possibilitar a injeção, de forma aguda, de insulina em quantidades pré-determinadas. O estudo mostrou que os animais submetidos às dietas estudadas apresentaram maior ganho de peso e no volume de ingestão e uma redução na sensibilidade à ação periférica da insulina em relação ao grupo tratado com sacarose. Também se verificou que os grupos tratados com dietas acrescidas de edulcorantes tiveram uma expressão reduzida das proteínas da via de sinalização da insulina, quando comparados ao grupo controle, indicando um risco aumentado de desenvolvimento de resistência central à ação da insulina nesses animais. Assim, concluímos que a adição desses edulcorantes à dieta de ratos supõe-se refletir em menor ação do hormônio, nesses animais, em tecidos periféricos.

Palavras-chave: Obesidade, Hipotálamo, Insulina, Diabetes, Sacarina e Ciclamato.

ABSTRACT

Obesity is a chronic, multifaceted and genetically complex disease which, associated to its co-morbidities, leads to an increased risk of mortality. This disease is a major component of the Metabolic Syndrome and comes from the positive energy balance between caloric intake and expenditure. Concern about the incidence of this disease influenced the consumption of products with the addition of sweeteners that, without proper nutritional guidance, may not adequately supply the energy needs and, instead of preventing or reversing the obesity, may contribute to the appearance of the same. Exploring the hypothesis that Resistance to Insulin may be the link between obesity and other medical conditions, this study investigates the effects of the addition, in the diet of rats, of sucrose and the sweeteners: cyclamate and saccharin, on the signaling pathway of hypothalamic insulin, and also its effects on physiological aspects, such as intake volume, weight gain, insulin decay rate (Kitt) and epididymal adipose tissue weight; as well as on molecular aspects, verifying the expression of proteins related to the insulin signaling pathway, such as IR, IRS 1 and Akt. We analyzed data obtained from the treatment of male *Wistar* rats divided into four groups, each group having been subjected for forty days of one of the following diets: ration only (control group), ration with addition of sucrose in aqueous solution at 30%, ration with addition of associated saccharin and sodium cyclamate in aqueous solution at 30%, and ration with the addition of saccharin in aqueous solution at 30%. To assess the spontaneous intake volume in twelve hours, animals underwent cannulation of the cerebral ventricle to enable the injection, acutely, of insulin in predetermined amounts. The study indicated that animals fed with the diets studied showed greater weight gains, higher intake volume and a reduction in peripheral sensitivity to insulin action compared to the group treated with sucrose. We also found that groups treated with ration containing sweeteners had a reduced expression of proteins of the insulin signaling pathway when compared to the control group, indicating an increased risk of developing resistance to the central action of insulin in these animals. Thus, we conclude that the addition of sweeteners to the diet of rats it is assumed to reflect on a reduced action of this hormone in the peripheral tissues of these animals.

Keywords: Obesity, Hypothalamus, Insulin, Diabets, Saccharin and Cyclamate

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
AgII	Angiotensina II
AgRP	Proteína relacionada à <i>agouti</i>
Akt	Proteína serina/treonina quinase B
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
BHE	Barreira hematocefálica
BSA	Soro de albumina bovina
C3G	<i>Guanylnucleotide exchange factor</i>
CAP	Componente do complexo Cbi/CAP
CART	Transcrição relacionada à cocaína e à anfetamina
Cbi	Proto-oncogene
CCK	Colecistocinina
Cm	Centímetros
CR3	Hormônio liberador de corticotrofina
CrKII	Proteína adaptadora Crk II
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Foxo-1	<i>Forkhead box sub-group</i>
G	Gramas
GH	Hormônio do crescimento
GIP	Polipeptídeo inibitório gástrico
GLP-1	<i>Glucagon like peptide</i>
GLUT 4	Proteína transportadora de glicose
i.c.v	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IKK-beta	<i>The oligomeric IκB kinase</i>
IMC	Índice de massa corporal
IOTF	<i>International obesity task force</i>
IR	Receptor de insulina
IRS 1	Substrato do receptor de insulina
IRS 2	Substrato do receptor de insulina
IRS 3	Substrato do receptor de insulina
IRS 4	Substrato do receptor de insulina
ITT	<i>Insulin tolerance test</i>
JNK	<i>c-JUN NH2-terminal protein kinase</i>
Kg	Quilogramas
Kitt	Constante de desaparecimento de glicose
LH	Hipotálamo lateral
MAP quinase	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>

MC3	Receptor de melanocortina 3
MC4	Receptor de melanocortina 4
MCH	Hormônio de concentração da melanina
MSH	Hormônio estimulador alfa-melanócito
MSH-alpha	Hormônio alfa-melanócito estimulante
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização mundial da saúde
PDK-1	<i>Phosphoinositase-dependent kinase 1</i>
PI 3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína C quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfona
POMC	Pró-opiomelanocortina
PP	Peptídeo pancreático
PYY	Peptídeo YY
QR	Quociente Respiratório
RI	Resistência à insulina
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SH2	<i>Src homology 2</i>
SNC	Sistema nervoso central
TGI	Trato gastro-intestinal
Thr	Treonina
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figuras		
#	Título	Página
1	Interação das condições genéticas e ambientais	22
2	Efeito do aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres (agl) - lipólise - na utilização da glicose e na gliconeogênese	32
3	Via de sinalização da insulina	45

Gráficos		
#	Título	Página
1	Peso Médio Acumulado (g) e Ingestão Média (g)	67
2	Peso Médio Acumulado (g) e Peso de Tecido Adiposo Epididimal (g)	68
3	Correlação Entre a Variação de Peso Médio Acumulado (g) e o Peso do Tecido Adiposo Epididimal (g)	70
4	Resultado do ITT Representado Pela Taxa de Decaimento de Glicose (Kitt) - (% min. -1)	72
5	Correlação Entre os Resultados de Kitt (% min. -1) e o Peso Médio Acumulado (g)	73
6	Medida do consumo alimentar em 4h e 8h após a injeção intracerebroventricular (icv) de salina (-) e insulina (+).	74
7	Expressão da Proteína IR nos Grupos Estudados	77
8	Expressão da Proteína pIR nos Grupos Estudados	78
9	Expressão da Proteína IRS 1 nos Grupos Estudados	81
10	Expressão da Proteína pIRS 1 nos Grupos Estudados	81
11	Expressão da Proteína Akt nos Grupos Estudados	85
12	Expressão da Proteína pAkt nos Grupos Estudados	86

Tabelas		
#	Título	Página
1	Classificação Internacional de Sobrepeso e Obesidade de acordo como o IMC (kg/m ²)	25
2	Patologias com risco aumentado na presença da obesidade	28
3	Edulcorantes sintéticos	48
4	Edulcorantes naturais	49
5	Níveis de Garantia por Quilograma do Produto	54
6	Composição das dietas de cada um dos grupos estudados	55
7	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de IR, em animais estimulados com infusão icv de insulina	115
8	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de IR, em animais estimulados com infusão icv de solução salina	115
9	Resumo das variações na expressão de IR, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina	116
10	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de pIR, em animais estimulados com infusão icv de insulina	116
11	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de pIR, em animais estimulados com infusão icv de solução salina	117
12	Resumo das variações na expressão de pIR, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina	117
13	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de IRS 1, em animais estimulados com infusão icv de insulina	118
14	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de IRS 1, em animais estimulados com infusão icv de solução salina	119
15	Resumo das variações na expressão de IRS 1, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina	119
16	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de pIRS 1, em animais estimulados com infusão icv de insulina	120
17	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de pIRS 1, em animais estimulados com infusão icv de solução salina	120
18	Resumo das variações na expressão de pIRS 1, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina	121
19	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de Akt, em animais estimulados com infusão icv de insulina	121

20	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de Akt, em animais estimulados com infusão icv de solução salina	122
21	Resumo das variações na expressão de Akt, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina	123
22	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de pAkt, em animais estimulados com infusão icv de insulina xvii	123
23	Resumo das variações, entre grupos, na expressão de pAkt, em animais estimulados com infusão icv de solução salina	124
24	Resumo das variações na expressão de pAkt, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina	125

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. ANTECEDENTES DA LITERATURA.....	24
2.1. A EPIDEMIA GLOBAL DA OBESIDADE: HISTÓRICO, CONCEITOS E TRATAMENTO.....	24
2.2. ETIOLOGIA DA OBESIDADE.....	26
2.3. OS TIPOS DE OBESIDADE E SUAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS.....	29
2.4. CIRCUITOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	32
2.5. O CONTROLE CENTRAL DO APETITE.....	35
3. VIA MOLECULAR DA INSULINA.....	36
3.1. O HORMÔNIO: INSULINA.....	36
3.2. AGENTES MOLECULARES ENVOLVIDOS COM A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA.....	37
4. OS EDULCORANTES.....	45
4.1. CONCEITO, FINALIDADE DE USO E CONSEQÜÊNCIAS DO USO CRÔNICO.....	45
5. A HIPÓTESE DO ESTUDO.....	49
6. OBJETIVOS.....	50
6.1. OBJETIVO GERAL.....	50
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
7.1. DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	51
7.2. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	52
7.3. DIETA.....	52
7.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DA INGESTÃO ALIMENTAR E A DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	56
7.5. TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA (ITT).....	57
7.6. A CIRURGIA ESTEREOTÁXICA: IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV).....	58
7.7. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE HIPOTALÂMICA À INSULINA.....	59
7.8. DETERMINAÇÃO DA GORDURA EPIDIDIMAL.....	59
7.9. EXTRAÇÃO DE TECIDO: DISSECAÇÃO DO HIPOTÁLAMO.....	60
7.10. <i>WESTERN BLOT</i> : SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNA.....	60
7.11. <i>WESTERN BLOT</i> : TRANFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITOCELULOSE.....	61
7.12. <i>WESTERN BLOT</i> : INCUBAÇÃO E BLOQUEIO.....	62
7.13. SOLUÇÕES UTILIZADAS DURANTE A PESQUISA:.....	63

7.14. ANTICORPOS, REAGENTES E APARELHOS.....	64
7.15. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, EXCLUSÃO E LIMITAÇÕES DO MODELO DE PESQUISA.....	65
8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	65
9. RESULTADOS.....	66
9.1. RESULTADOS FISIOLÓGICOS.....	66
9.2. RESULTADOS MOLECULARES.....	72
10. DISCUSSÃO.....	87
10.1. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS FISIOLÓGICOS.....	87
10.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS MOLECULARES.....	93
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
12. CONCLUSÃO.....	97
13. REFERÊNCIAS.....	98
14. ANEXOS.....	110

1. INTRODUÇÃO

A obesidade hoje é classificada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma epidemia global, independente de condições econômicas, sociais, gênero e idade. Tendo em vista o aumento em sua incidência, a obesidade torna-se uma importante desordem metabólica, constituindo um importante fator de risco para desenvolvimento de outras doenças altamente prevalentes na sociedade moderna, tais como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, doença arterial coronariana e dislipidemias. Por essa razão, representa um dos principais desafios de saúde pública neste início de século e é alvo de muitos estudos que tentam elucidar os aspectos das patologias relacionadas com a obesidade (Keys *et. al.*, 1981; Reaven, 1988; Jung, 1997; WHO, 1998; Seidell, 1999; Hansen *et. al.*, 1999; Saltiel *et. al.*, 2001; Friedman, 2000; Kopelman, 2000; Pi-Sunyer, 2002; Pereira *et. al.*, 2003; Nobre *et. al.*, 2003; Krause, 2005; Stein *et. al.*, 2004; Teichmann *et. al.* 2006; Coutinho, 2007; IOTF, 2009).

Os principais agentes envolvidos no desenvolvimento da obesidade têm sido relacionados a fatores ambientais. O consumo energético excessivo associado à menor utilização desta energia pelo corpo, em longo prazo, estabelece um balanço energético positivo e a instalação de um quadro de obesidade. Por outro lado, o balanço energético negativo resultará na perda da massa corporal (WHO, 1998; Morton *et. al.*, 2006; Stein *et. al.* 2004; Pereira *et. al.*, 2003; De Angelis, 2007).

A interação entre genética e ambiente é um fator importante (figura 1). Algumas pessoas são geneticamente predispostas a desenvolver obesidade, mas o genótipo pode ser expresso apenas em ambiente adverso onde certas condições, tais como pouca atividade física e dieta inadequada, são importantes (Pi-Sunyer, 2002).

Figura 01: Interação das condições genéticas e ambientais

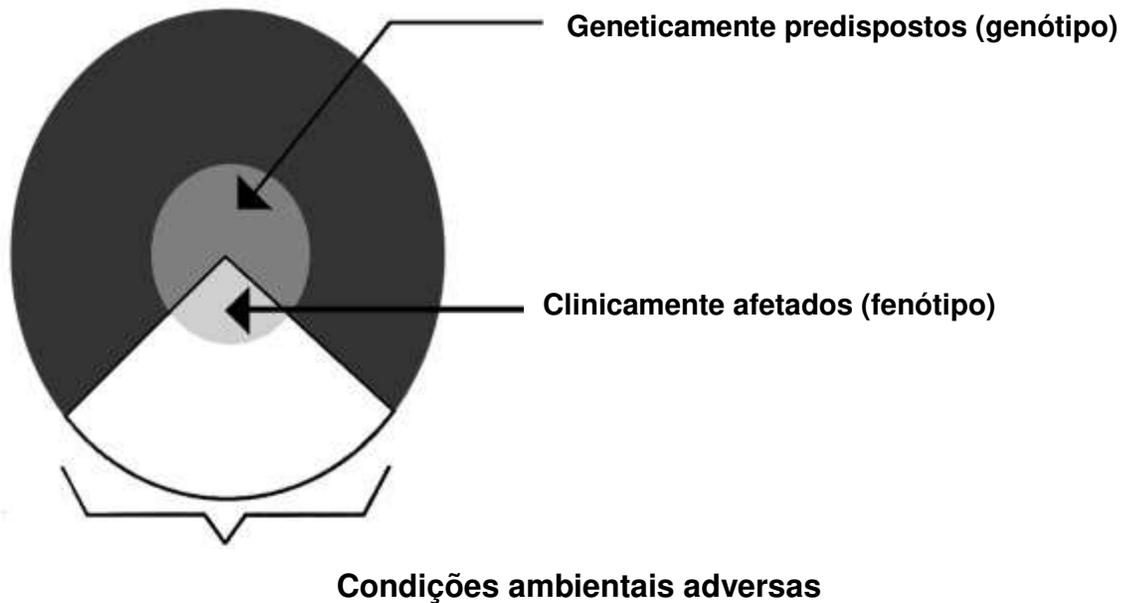


Figura representa associação entre fatores endógenos, exógenos e a influência das condições ambientais sobre o ganho de peso.

Adaptado de: *Obesity Research* vol.10 *Suppl. 2* dec. 2002

Hábitos da cultura moderna, como alimentação inadequada e sedentarismo, atingem principalmente países em desenvolvimento como o Brasil. Esse processo é conhecido por transição nutricional, caracterizado pela aquisição de novos padrões ligados à alimentação e que modificam o perfil antropométrico da população, apresentando um aumento no número de indivíduos obesos (WHO, 1998; Lerayer *et. al.*, 1998; Hill, 1998).

A elevação do percentual de indivíduos obesos trás inúmeras conseqüências tanto para os serviços de saúde quanto para os indivíduos e, com isso, a preocupação com o controle do peso torna-se comum na sociedade moderna.

Estas transformações nos padrões alimentares e seus decorrentes impactos fisiológicos levam a população a buscar uma alimentação alternativa. Alguns procuram os produtos de menor concentração calórica, geralmente com

preocupações ligadas à preservação ou manutenção da saúde, enquanto outros se prendem à estética corporal (Martinez, 2000; Nobre *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003).

Diante da procura por produtos que ofereçam palatabilidade semelhante a dos açúcares naturais, porém com baixa concentração calórica, avanços tecnológicos e industriais levaram ao desenvolvimento de produtos com características destinadas a públicos específicos, dentre eles destacam-se os produtos *light e diet*.

Associados a esses produtos, temos os edulcorantes, substâncias com capacidade adoçante, como são conhecidos, e que podem ser usados por indivíduos que apresentam ou não patologias associadas ao consumo de açúcares, mas que têm como fundamento principal o controle na ingestão de sacarose.

O uso crônico dessas substâncias químicas pode refletir de diferentes maneiras no organismo, auxiliando em processos terapêuticos, principalmente relacionados à obesidade e diabetes, visto que a maioria deles apresenta alto poder “adoçante” e baixa concentração calórica, tornando-se substitutos da sacarose e promovendo diminuição no teor calórico ingerido.

A grande variedade de opções existentes no mercado leva indivíduos a consumir diferentes marcas e tipos de edulcorantes, porém, o custo do produto ainda parece ser fator determinante nessa escolha e dessa forma, torna os edulcorantes, sacarina e ciclamato, associados ou não, os mais consumidos em nosso país.

Deste modo, estudar as conseqüências do uso crônico dessas substâncias torna-se de grande valia, tanto para os consumidores quanto para o meio acadêmico, uma vez que toda gama de terapêutica contra a obesidade merece estudos profundos anteriores a sua implantação.

2. ANTECEDENTES DA LITERATURA

2.1. A epidemia global da obesidade: histórico, conceitos e tratamento

Na pré-história, o suprimento de comida não era constante e havia ciclos intercalados de fome e atividade, no qual o esforço para caça e coleta de comida levava ao alto dispêndio energético, e outro ciclo de fartura e descanso. Atualmente, o estilo de vida moderno rompe esses ciclos e agrava o sedentarismo, pois além da facilidade no acesso à comida, há uma grande disponibilidade de opções de alimentos industrializados e de alto teor calórico, além das facilidades tecnológicas características da civilização contemporânea

Com base na história da alimentação, podemos verificar, ao longo do tempo, que a alimentação transcendeu o simples ato de comer, colocando em primeiro plano o desejo ou a necessidade de consumir alimentos (Leite *et. al.*, 2009).

O processo de modernização, observado também na América Latina, promove o que chamamos de transição epidemiológica, demográfica e nutricional, a qual se reflete em mudanças no padrão alimentar das populações, colaborando para o consumo de dietas ricas em fontes lipídicas e protéicas, o que propicia a ocorrência da obesidade.

Em paralelo ao aumento no número de indivíduos obesos, observa-se também uma diminuição nos casos de desnutrição, e, ainda, mudanças nos padrões de consumo e antropométricos são observados nas diversas classes sociais, sendo este quadro resultante do maior acesso às fontes alimentares de origem industrial e pouco consumo de alimentos “*in natura*”.

Assim, as patologias associadas a esse fator, principalmente nos países subdesenvolvidos, conduzem os profissionais e o sistema de saúde a enfrentar problemas os quais não estão aptos a resolver (IBGE, 2004; 2000; 2011; Pereira *et al.* 2003).

Com a tendência de degradação dos fatores ambientais que envolvem a obesidade, verifica-se o agravamento progressivo das altas taxas de incidência da obesidade, principalmente em países ocidentais ou com hábitos de vida ocidentalizados, onde é predominante a oferta de alimentos baratos, palatáveis, práticos e de alta concentração energética. Alia-se a isso um sedentarismo crescente, com prática de atividades físicas cada vez mais dificultadas, principalmente nas grandes cidades (Foreyt & Godrick, 1995; Hill e Peters, 1998).

A obesidade se caracteriza pelo excesso de gordura no organismo e se apresenta quando o índice de massa corpórea, no adulto, é maior que 30 Kg/m² (Quilograma/m²), de acordo com a tabela 01.

Nos dias atuais, a obesidade pode ser considerada a mais importante desordem nutricional nos países desenvolvidos, tendo em vista o aumento no número de casos, bem como as complicações associadas a essa patologia (Franscisci, 2000; Pi-Sunyer *et al.*, 2002).

Tabela 01: Classificação Internacional de Sobrepeso e Obesidade de acordo como o IMC (kg/m²)

Classificação	Pontos de corte	
	Mínimo	Máximo
Sobrepeso	≥25.00	29,99
Pré-obeso	≥25.00	29.99
Obesidade	≥30.00	
Obeso classe I	≥30.00	34.99
Obeso classe II	≥35.00	39.99
Obeso classe III	≥40.00	

Adaptado de: WHO, 1995, WHO, 2000 e WHO, 2004.

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal capaz de provocar danos à saúde. Cientificamente, obesidade é definida como uma doença crônica, multifatorial, caracterizada por um aumento do peso corporal, principalmente do tecido adiposo, e, por esta razão, traz conseqüências deletérias ao organismo. Além disso, é fator determinante no desenvolvimento de várias patologias tais como, hipertensão, diabetes mellitus e dislipidemias que associadas, resultam na instalação da síndrome plurimetabólica ou síndrome “X” (Pi-Sunyer, 2002; Pereira et al, 2003; Pauli et al., 2007).

A obesidade não é uma doença singular, mas sim um grupo de doenças heterogêneas que se refletem no fenótipo obeso. Por esta razão, torna-se uma patologia complexa, capaz de comprometer integralmente o indivíduo (tabela 02), e de afetar pessoas de diferentes gêneros, idades e condições socioeconômicas. Assim, o tema desperta interesse e serve de linha de pesquisa em vários laboratórios do mundo com o intuito de relacionar fatores chaves que contribuam para o desenvolvimento desta patologia e, talvez, identificar quais estratégias pode ser utilizadas para a prevenção (Jeeb *et al.*, 1999; Friedman, 2000; Kopelman, 2000; Freeman *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2003).

2.2. Etiologia da obesidade

O ato de alimentar-se é influenciado por fatores extrínsecos, tais como condições socioeconômicas, hábitos, alergias, aversões, preferências; e intrínsecos, que se caracterizam pelas condições fisiológicas do organismo e ainda seu estado de saúde e doença (Leite *et. al.*, 2009).

Nos seres humanos, a maior parte dos casos de obesidade é resultado do balanço energético positivo proveniente do excesso de calorias ingeridas e da

inatividade física. Do ponto de vista nutricional, é evidente que a ingestão excessiva de alimentos com alta concentração de energia, principalmente fontes lipídicas, possa refletir no surgimento de problemas relacionados à obesidade. Alguns fatores metabólicos foram relatados como capazes de predizer o ganho de peso: baixo gasto energético/ baixo nível de atividade física espontânea (sedentários), um alto quociente respiratório (QR) e uma alta ingestão calórica (Pi-Sunyer, 2002; IBGE, 2004).

Mudanças no comportamento derivadas da modernização são ocasionadas por incorporação de um estilo de vida mais sedentário, consequência do uso de equipamentos mecanizados que diminui o esforço físico, e, ainda, alterações nos padrões alimentares, que podem ser notadas diante da repetição dos padrões alimentares de países ocidentais, cuja dieta se baseia, principalmente, em alimentos hiperlipídicos e hiperproteicos, resultante do maior acesso da população às fontes alimentares de origem industrial (WHO, 1998; Pereira *et al.*, 2003).

A ruptura do equilíbrio gasto e ingestão, ou seja, o consumo energético excessivo associado à menor utilização desta energia pelo corpo estabelece, em longo prazo, um balanço energético positivo e um consequente aumento no armazenamento desta energia, principalmente sob a forma gordura, no tecido adiposo branco. Desse modo ocorre a instalação da obesidade e o surgimento de diversas situações clínicas que podem ser prejudiciais ao organismo (Hirsch *et al.*, 1976; IBGE, 2004; Lane *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2006; Leite *et. al.*, 2009).

Tabela 02: Patologias com risco aumentado na presença da obesidade

Resistência à insulina/Hiperinsulinemia	Apnéia do sono
Diabetes tipo 2	Osteoartrite
Doenças cardíacas	Alterações psicológicas (depressão)
Hipertensão	Complicações na gestação
Alterações nos lipídeos plasmáticos	Anormalidades menstruais
Câncer	Morte prematura

Tabela das principais patologias associadas ao quadro de obesidade.

Adaptado de: “*The surgeon general’s all to action to prevent and decrease overweight and obesity, 2001*” e “*The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity, 2002*”

Um estudo feito por Teichmann *et al*, 2006, relacionou a prevalência de obesidade em mulheres diante de alguns fatores de risco, dentre eles: escolaridade, renda, idade e números de filhos; assim, concluiu que a presença de sobrepeso e obesidade é diretamente associada com a idade e número de filhos, mas inversamente associada com escolaridade e renda *per capita*.

Desta maneira, a obesidade torna-se mais presentes em mulheres com nível socioeconômico mais baixo, e, ainda, naquelas que realizam refeições de forma rápida. Outros estudos sugerem que a tendência a obesidade tem se tornado mais prevalente nos grupos de menor classe sócio-econômico e naqueles que tem menos acesso ao esporte e a pratica de exercícios físicos (OMS, 2008; Jacoby, 2004).

A forte relação entre nível socioeconômico, sobrepeso e obesidade diz respeito principalmente a pouca obtenção de informação, orientação nutricional inadequada, acesso a alimentos de pouca qualidade nutricional e a um estilo de vida menos saudável (Teichmann *et al*, 2006).

Está claramente estabelecida na literatura a relação entre a alimentação e qualidade de vida. A ingestão balanceada de alimentos está intensamente

relacionada à prevenção e tratamento de patologias, bem como a existência de fatores que levam ao aumento de peso, como sedentarismo, industrialização, “stress”, ansiedade, depressão, hereditariedade e erros nos padrões alimentares adotados.

O papel do nutricionista é garantir ao indivíduo a melhora da qualidade de vida por meio da perda gradativa de peso ponderal e reversão das alterações metabólicas, tais como hiperglicemia, dislipidemias, inflamações; e hormonais, dentre elas hiperinsulinemia, hiperleptinemia, e hipercorticosemia (Francischi, 2000; Carvalho, 2005; Cotowcz, 2007).

2.3. Os tipos de obesidade e suas complicações clínicas

Inúmeras condições médicas e psicológicas estão associadas ao peso corporal, mas este, usado isoladamente, não é um bom indicador de armazenamento de gordura.

Outras ferramentas podem ser utilizadas a fim de estimar a gordura corporal e avaliar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Estas incluem a análise do IMC, da circunferência da cintura, da relação cintura e quadril, das espessuras de dobras cutâneas e bioimpedância (Stein *et al.*, 2004).

A distribuição da gordura corporal parece influenciar as anormalidades no perfil glicêmico e lipídico, sendo mais comum em indivíduos que possuem uma concentração de gordura armazenada na região visceral, ou seja, com obesidade central (no abdômen), do que naqueles com obesidade femural (nos quadris) (Jensen *et al.*, 1988; Cuppari, 2005).

A obesidade central, medida da circunferência da cintura acima do limite, está presente em pessoas que armazenam mais gordura na região abdominal e estas apresentam um fator de risco importante para a síndrome metabólica (Krause, 2005).

Os homens são mais propensos a ter obesidade abdominal, considerando-se que as mulheres são mais susceptíveis de ter um acúmulo de gordura na região glúteo-femural. No entanto, mulheres ganham peso com mais facilidade e podem tornar-se mais propensas a desenvolver uma distribuição semelhante a masculinas, que é caracterizada por um depósito maior de tecido adiposo na região abdominal (Larsson *et al.*, 1984; Pi-Sunyer, 2002; Krause, 2005; Cuppari, 2005).

De acordo com o Programa Nacional de Combate à Obesidade, 2005 os valores limítrofes que servem como indicador de risco aumentado para o sexo feminino é de ≥ 80 cm e para o sexo masculino ≥ 88 cm

Embora seja importante salientar que essa classificação pode sofrer alterações de acordo com a população avaliada, dificultando a padronização de limites que podem ser usados globalmente.

A obesidade surge decorrente tanto da hipertrofia, aumento no tamanho, quanto da hiperplasia, aumento no número, das células adiposas. Um grande número de condições médicas e psicológicas está associado à obesidade e as conseqüências do excesso de peso têm sido analisadas em diversos trabalhos, os quais demonstram que a obesidade é fator de risco para a maioria das doenças crônicas (Hench *et al.*, 1976; Lane *et al.*, 2005; Teichmann *et al.*, 2006).

Podemos agrupar algumas patologias como sendo originárias do aumento de massa de gordura, tais como osteoartrite, apnéia do sono e distúrbios psicológicos, e outras decorrentes do aumento nos números de adipócitos, tais como, câncer, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares.

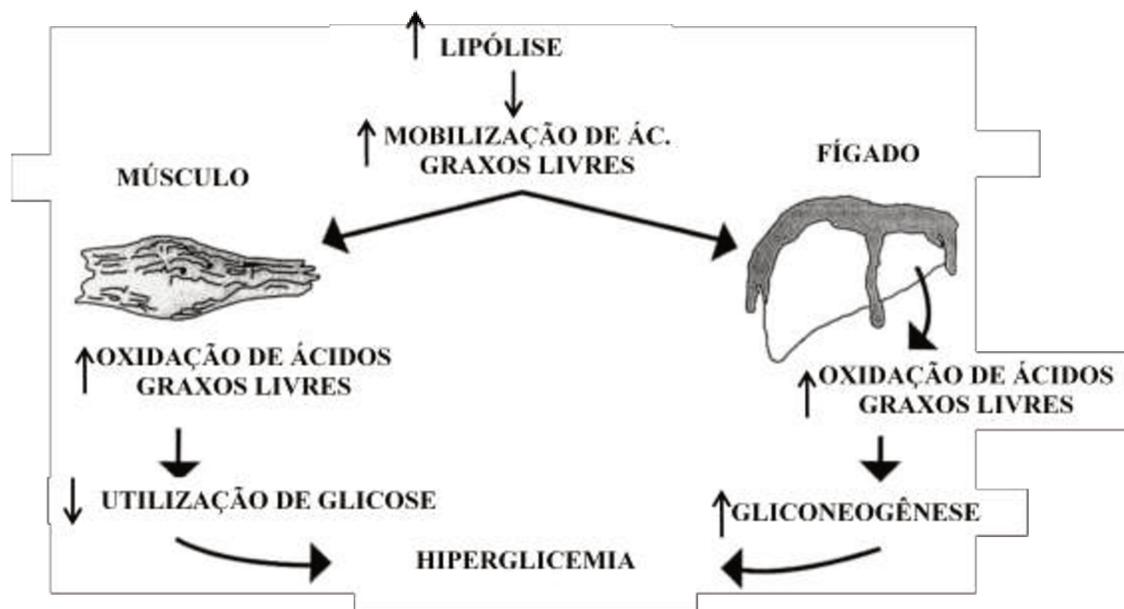
Por ser comumente associada a outras doenças metabólicas, acredita-se que a instalação da obesidade pode favorecer o agravamento da hipertensão arterial, aterosclerose, diabetes mellitus (tipo 2) e a resistência à insulina.

A hiperinsulinemia e a resistência à insulina (RI) podem surgir como consequência da obesidade. Esse quadro leva a uma redução da sensibilidade à insulina e também de sua ação em tecidos-alvos, tais como fígado, diminuindo a glicogênese a partir de aminoácidos e a glicogenólise e no tecido muscular esquelético, facilitando a síntese de glicogênio a glicogenólise (Raw, 1948).

Ainda, a insulina age possivelmente nas reações de fosforilação, direta ou indiretamente, bem como determina uma diminuição da glicose do sangue e um aumento do glicogênio dos tecidos (no indivíduo normal a insulina determina uma diminuição do glicogênio hepático) uma menor formação de ácido aceto-acético, beta hidroxibutírico e acetona, bem como uma diminuição do fósforo inorgânico do sangue (Raw, 1948).

Sabe-se que o aumento de peso é inversamente proporcional à sensibilidade à insulina e que a instalação da RI provoca o início de uma cascata de reações metabólicas capazes de provocar dislipidemia, diabetes e aumento nos níveis de ácidos graxos livres (figura 02). A esse conjunto de patologias dá-se o nome de “Síndrome Metabólica” ou “Síndrome “X” (Pi-Sanyer, 2002; Pereira et al, 2003; Pauli et al., 2007).

Figura 02: Efeito do aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres (agl) – lipólise - na utilização da glicose e na gliconeogênese.



Relação entre aumento da disponibilidade de ácido graxos livres e a utilização de glicose pelo fígado e músculo na lipólise e na gliconeogênese.

Adaptado de: *"The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity, 2002"*

2.4. Circuitos envolvidos na regulação do peso corporal

O peso corporal é regulado por interações entre fatores fisiológicos, predominantemente genéticos e psicossociais, os quais atuam controlando a energia ingerida e a despendida.

O apetite é entendido como desejo psicológico de comer e a fome seria um sinal de necessidade do corpo, relacionada ao estado pós-absortivo, quando essas reservas estão sendo mobilizadas, e a saciedade está associada ao estado

pós-prandial, quando o excesso de alimento está sendo armazenado (Dominiczack, 1999; Krause, 2005; Morton *et al.*, 2006).

A ingestão é geralmente causada pela fome, embora as comunicações entre eventos psicológicos, fisiológicos, comportamentais e metabólicos atuem simultaneamente e determinem a quantidade de alimento consumido. Estes fatores formam um complexo capaz de afetar o apetite e influenciar a ingestão.

O ato de alimentar-se está diretamente relacionado com a questão que envolve as bases neurais da saciedade. Sabe-se que existe uma comunicação entre a ingestão, esvaziamento gástrico, absorção e estoque de nutrientes por meio de moléculas conhecidas como sinalizadoras.

Os adultos saudáveis mantêm um peso constante graças a este sistema complexo de mecanismos neurais, hormonais e químicos, que mantém o equilíbrio entre ingestão e perda energética, dentro dos limites precisamente regulados, podendo os fatores genéticos contribuir para diferenças individuais (Bouchard *et al.*; 1993; Proserpi *et al.*; 1997; Ravussin *et al.*; 1988; Blundell 1998; Spiegelman, Flier, 2001; Williams *et al.*, 2001; Teichmann *et al.*, 2006).

Fome, saciedade e gasto energético surgem em resposta à integração das informações obtidas através das vias neuroendócrinas e metabólicas. Fazem parte dos fatores neuroendócrinos os neuromoduladores da fome e do apetite, os fatores gastrintestinais, a insulina e os fatores adipocitários (Bradley, 1986; Leite *et al.*, 2009).

a) Neuromoduladores da fome e do apetite: são neuropeptídios emitidos pelo núcleo arqueado do hipotálamo. Dividem-se em: orexígenos, tais como o neuropeptídio Y (NPY), e a proteína relacionada à agouti (AgRP); e anorexígenos, como o hormônio estimulador alfa–melanócito (MSH), a pró-ópio-melanocortina (POMC), e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART).

O NPY é o mais abundante dos neuropeptídios e tem como função aumentar a ingestão alimentar por meio do estímulo de neurônios localizados

principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo. Tem sua síntese aumentada, em situações específicas, tais como em casos de diminuição do peso corporal.

O AgRP é antagonista endógeno dos receptores MC3 e MC4 e, assim como o NPY, a produção desse neuropeptídeo induz o apetite e aumenta a ingestão. Tem sua produção influenciada pelos níveis séricos de leptina e insulina. Sua ação é mais prolongada que a do NPY.

O POMC é precursor do MSH e é expresso em vários locais do corpo, por exemplo, no sistema nervoso central. Ele modula a homeostasia energética por expressar o MSH.

O MSH é antagonista do AgRP e do NPY e tem ação anorexígena, ou seja, tem como função inibir o apetite.

O CART é outro componente da via anorexígena, também expresso no núcleo arqueado do hipotálamo. Tem sua expressão estimulada pela presença da leptina

b) Fatores adipocitários ou adipocinas: são aqueles cuja secreção provém do tecido adiposo que, diante das atuais comprovações científicas, são capazes de influenciar profundamente o gasto energético, exercendo função de órgão endócrino- metabólico. Pode produzir substâncias sinalizadoras de estruturas hipotalâmicas envolvidas na regulação da fome, saciedade e ingestão alimentar.

A Leptina é uma proteína circulante, de ação hormonal, pertence à família das citocinas, secretada principalmente pelos adipócitos, localizados no tecido adiposo branco. Circula no plasma em concentrações proporcionais à massa de gordura corporal e tem capacidade de regular o armazenamento, equilíbrio e uso de energia pelo organismo. Atua no metabolismo da glicose e lipídeos, induzindo a saciedade, o aumento do gasto energético; e, ainda, atua no sistema nervoso central, mais especificamente em células hipotalâmicas;

A Adipocina é um peptídeo derivado do adipócito. Parece ter expressão reduzida em indivíduos obesos, em alguns modelos animais.

A Resistina, também pertencente à família dos hormônios peptídicos, é secretada pelas células do tecido adiposo. Parece estar envolvida na gênese da resistência à insulina, porém mais estudos devem ser realizados a fim de eliminar essa incerteza.

A relação desses fatores ocorre de maneira simultânea, sincronizada e integrada, a fim de controlar a homeostase, que é o conjunto de processos que regulam as funções orgânicas por meio da regulação entre consumo e dispêndio de energia, dentro dos limites adequados para manter o peso constante.

É de extrema importância ressaltar que leptina e insulina agem sobre vias distintas a fim de regular o padrão da fome. Assim, a insulina atua por meio da ação imediata sobre a fome enquanto a leptina tem efeito mais tardio e intenso.

Acredita-se hoje que falhas em alguns dos componentes deste complexo sistema de controle da homeostase energética possam se refletir na perda do controle coordenado entre ingestão alimentar e gasto energético, e isto parece representar um mecanismo fundamental no desenvolvimento da obesidade (Bouchard *et. al.*; 1993; Frederich *et al.*, 1995; Proserpi *et. al*; 1997; Ravussin *et. al*; 1988; Yeo *et al.* 1998; Pereira *et al.* 2003; Nandi *et. al*; 2004; Lício, 2006; Leite *et al*, 2009).

2.5. O controle central do apetite

O conhecimento dos mecanismos gerados pelo sistema nervoso central a fim de influenciar a fome e a saciedade faz com que passemos a enxergar a obesidade como uma doença neuroquímica recidivante. Também a compreensão no que diz respeito às etapas moleculares de sinalização da insulina pode proporcionar novas abordagens terapêuticas para estados nos quais o metabolismo da glicose se encontra alterado (Carvalho *et al.*, 2003; Neto *et al.*, 2006; *et al.*, 2007).

No hipotálamo, mais especificamente, no núcleo arqueado (ARC), chegam estímulos vindos de outra parte do cérebro e da corrente sanguínea, que podem estimular tanto os neuropeptídeos orexígenos, NPY e AgRP, como, os anorexígenos, CART e POMC, e, assim, regular o consumo alimentar e o gasto energético (Flier, 2004; Neto et al., 2006; Velloso, 2006).

3. VIA MOLECULAR DA INSULINA

3.1. O hormônio: insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico, secretado pelas células β pancreáticas, que tem sua síntese ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos e, ainda, age com potentes efeitos metabólicos em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, tecido adiposo e fígado. De forma similar a outros fatores de crescimento, a insulina usa a fosforilação e interações proteína-proteína como ferramentas essenciais para transmitir o sinal.

A maioria dos estudos que geraram conhecimento relativo à ação molecular da insulina foi desenvolvida em tecidos periféricos, tradicionais alvos da ação deste hormônio, como o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Estudos publicados durante as décadas de 1960 a 1980 haviam revelado a presença da insulina e de seu receptor no sistema nervoso central. Outros estudos demonstram que a insulina também atua no sistema nervoso central provocando saciedade e, ainda, para regular a ação da leptina. No entanto, apenas nos últimos 10 anos obtiveram-se avanços importantes no conhecimento da ação central, ou mais especificamente, hipotalâmica da insulina. (Schwartz, 2000; Saltiel, *et. al.*; 2001; Zecchin et al., 2004; Lício, 2006; Pauli et al., 2007; Leite *et al*, 2009).

A insulina regula a homeostase da glicose em vários níveis, bloqueia a gliconeogênese e glicogenólise, produção hepática de glicose, estimula a captação periférica de glicose principalmente nos tecidos muscular e adiposo, auxiliando o transporte de glicose para o músculo e fígado, por meio das reações em cascata promovidas pela ligação ao seu receptor de membrana, envolvendo reações de fosforilação citosólica.

Também altera a quantidade de ácidos graxos livres liberados da gordura visceral através da inibição da lipase hormônio-sensível e estímulo da lipogênese hepática, e ainda aumenta a síntese e a degradação protéica e, dessa forma, se caracteriza como hormônio anabólico (Bergman, 1997; Carvalheira *et al*, 2002; Pereira *et al.*, 2003; Zecchin *et al.*, 2004).

Foi visto que lesões em regiões do hipotálamo podem levar a alterações metabólicas, como hiperinsulinemia e hiperfagia, que culminam na instalação da obesidade hipotalâmica.

Defeitos na sinalização hipotalâmica de insulina e leptina são capazes de causar um aumento no consumo alimentar e adiposidade. Tanto a obesidade hipotalâmica quanto a dietética afeta o peso corporal, embora uma seja resultante da inibição da saciedade e a outra ocorra devido à ingestão de alimentos em excesso pelo indivíduo. Dessa maneira, pode-se observar que a etiologia da obesidade não se torna relevante visto que as conseqüências que a patologia provoca são semelhantes em ambos os casos.

3.2. Agentes moleculares envolvidos com a via de sinalização da insulina

Como visto na figura 3, a insulina atua captando glicose, estimulando a síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, após sua ligação com seu receptor (IR) específico na membrana de tecidos “alvos” periféricos (músculos, fígado e tecido adiposo), bem como no sistema nervoso central. Esses IRs possuem atividade intrínseca tirosina quinase e não existem diferenças estruturais

entre os IRs expressos em tecidos periféricos e no sistema nervoso central (Kahn, White, 1988; Saltei *et al*, 2000; Lício *et al.*, 2006).

Pertencente à família das proteínas heterotetramétrica com atividade quinase, os receptores de membrana iniciam sua atividade de sinalização após sua ligação com a insulina. Estes receptores são compostos de duas subunidades, alfa e beta, nas quais a subunidade alfa inibe a ação da subunidade beta, e são classificadas como enzimas alostéricas por possuírem um sítio regulatório no qual se ligam compostos químicos específicos, e por catalisar vias metabólicas de uma reação irreversível no início da via (Patti *et al.*, 1998; Kahn, 1988; Pi- Sanyer, 2002; Carvalho – Filho *et al.*, 2007).

A ativação conformacional da subunidade beta através da sua atividade quinase se dá pela ligação da insulina nas subunidades alfa do receptor, conduzindo às alterações conformacionais e à autofosforilação do receptor de insulina (IRS) em resíduos de tirosina 1158, 1162 e 1163, que servirão como um sítio de ancoragem para proteínas do tipo Src homology 2 (SH2), potencializando a atividade quinase (Kahn; White, 1988; Czech *et al.*, 1999; Carvalheira *et al.*, 2003). A família das proteínas IRS possui quatro subtipos de moléculas, e cada uma possui uma atividade e função específica que foram elucidadas diante do estudo realizado com camundongos *knockout*.

Assim, ficou comprovado que a diminuição do subgrupo IRS 1 promovia resistência à insulina sem presença de hiperglicemia, enquanto a diminuição na expressão do subgrupo IRS 2 causa hiperglicemia e, em consequência disto, provoca diminuição da atividade da insulina em tecidos periféricos e falência da função secretória pancreática.

Ainda, a expressão diminuída dos subgrupos IRS 3 e IRS 4 pouco altera o metabolismo normal da glicose. A fosforilação de IRS-1 e IRS-2 em resíduo de serina (Ser) e treonina (Thr) diminui a capacidade de IRS-1/2 de se associar ao receptor de insulina e a subsequente fosforilação em tirosina por insulina, levando

a uma possível instalação do quadro de resistência à insulina (Silva et al., 2008; Araki et al., 1994; Zecchin et al., 2004).

Após a ativação do receptor de insulina, outros substratos são fosforilados em tirosina, tais como os da família das proteínas IRS. Ao fosforilar em tirosina, os IRS, criam PI-3 quinase, considerada única molécula intracelular essencial ao transporte de glicose pela insulina e, ainda, possui atividade serina quinase e pode interagir com outras proteínas sinalizadoras.

A PI-3 quinase, por sua vez, fosforila fosfoinosídeos de membrana, gerando a phosphoinositase-dependent kinase 1 (PDK-1), que pode regular, por fosforilar e ativar as proteínas contendo domínio PH, tais quais serina/treonina quinase B ou simplesmente a Akt, e, assim, exerce um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina.

A Akt, quando ativada, tem a função de direcionar a proteína transportadora de glicose GLUT 4 do citosol para a membrana celular e, com isso, promover a captação de glicose (Escobedo et al., 1991; James et al., 1996; Czech et al., 1999; Kane, 2002; Carvalheira *et al.*, 2002; Watson, 2004).

Outras vias independentes da ação da PI-3- quinase também estão envolvidas para que ocorra a translocação de GLUT 4 para a membrana e, conseqüentemente, o transporte adequado de glicose.

Um exemplo são os adipócitos nos quais, ao serem estimulados pela insulina, o protooncogene- c Cbi é fosforilado, se associa a CAP e forma um complexo na membrana conhecido como, Cbi/CAP, que induz o recrutamento de CrKII e C3G, *guanylnucleotide exchange factor*.

A formação desse complexo culmina no segundo sinal essencial para a translocação da proteína GLUT-4 para a membrana e, em conseqüência, aumenta a captação de glicose (Baumann et al., 2000; Pessin et al., 2000; Pi- Sanyer; 2002; Jebailey, 2004).

Tanta a via da PI-3 quinase/Akt, quanto à via do complexo CAP/Cb1 desempenha um papel importante na captação da glicose. Sugere-se que ambas possam determinar a entrada de glicose no tecido adiposo e, assim, contribuir para o aumento de massa adiposa corporal (Pauli et al., 2007).

O transportador de glicose GLUT 4 se torna fundamental no metabolismo da glicose em tecidos como o músculo esquelético e o tecido adiposo. Por isso, se torna fundamental sua ativação a fim de regular a disponibilidade de substratos para a célula.

Uma diminuição na expressão do transportador GLUT 4 pode levar à alteração na captação periférica de glicose e, assim, provocar a intolerância à glicose, ou mesmo diabetes mellitus, em consequência da menor captação de glicose pelo GLUT 4 e maior concentração da glicose no plasma.

Compreender os mecanismo, agentes e etapas que envolvem essa via de sinalização pode promover novas abordagens terapêuticas para patologias associadas ao estado hiperglicêmico (Bergar et al. 19896; Thorens et al., 1990; Saltiel *et al*, 2000, Pereira *et al*. 2003; Lício *et al.*, 2006).

A sinalização da insulina torna-se deficiente na presença da obesidade. A atividade da proteína que promove a autofosforilação em tirosina encontra-se reduzida nestes indivíduos, provocando uma tênue ligação entre obesidade, resistência à insulina e hiperinsulinemia. No entanto, indivíduos obesos com diminuição no transporte de glicose podem recuperar esta resposta após um programa de perda de peso (Caro *et al.*, 1989; Pi-Sanyer, 2002; Carvalheira et al., 2003).

A regulação desses processos ocorre por meio da associação entre nutrientes, sinais dos sistemas neurais e hormonais e, ainda, depende das necessidades energéticas do indivíduo.

A obesidade, o estilo de vida e o consumo de dieta sem a distribuição adequada de nutrientes vêm sendo relacionados à etiologia da resistência à insulina (RI), por serem fatores de risco na via de sinalização intracelular desse hormônio.

Este fenômeno, no hipotálamo, pode influenciar a fosforilação das proteínas envolvidas na sinalização da insulina, tais como IR (receptor de insulina), IRS 1/2 (substrato 1/2 do receptor de insulina), Akt (proteína serina/treonina quinase B) e Foxo1 (fatores de transcrições *Forkhead Box sub-group*) e, conseqüentemente, influenciar positiva ou negativamente na ingestão alimentar.

A resistência à insulina (RI) é definida como uma resposta biológica subnormal a uma determinada concentração da insulina, ou seja, é observada quando a concentração desse hormônio torna-se menos capaz de auxiliar no transporte da glicose da circulação para dentro da célula e favorece o aumento da ingestão alimentar, e a diminuição da termogênese, por aumentar a ação da Foxo1 e favorecer o aumento de neuropeptídios orexigênicos e anti-termogênicos, perpetuando o ciclo vicioso da obesidade e resistência à insulina (Lee *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003; Carvalho – Filho *et al.*, 2007).

O termo “resistência à insulina” muitas vezes é utilizado tendo-se como referência o controle glicêmico, refletindo o efeito inadequado da insulina na homeostase da glicose. No entanto, a insulina tem ações pleiotrópicas, modulando diversas funções celulares citadas anteriormente e envolvendo-se, também, com o transporte de íons e aminoácidos, proliferação do ciclo celular, diferenciação celular, apoptose e a síntese de óxido nítrico (NO).

Assim, a resistência à ação deste hormônio não se deve limitar apenas à ineficácia na regulação da glicose, mas deve-se considerar também toda gama de ações metabólicas e de crescimento da insulina (Carvalho – Filho *et al.*, 2007).

A compreensão minuciosa dos fatores que promovem ou agravam o quadro clínico de RI e obesidade é fundamental para o progresso das intervenções preventivas e terapêuticas nas doenças.

Em 1946, Brobeck demonstrou em estudos experimentais que a indução de lesões hipotalâmicas em animais leva à hiperfagia. Resultado semelhante observa-se em indivíduos que sofreram lesões hipotalâmicas, resultando em obesidade mórbida. Já a estimulação elétrica de regiões hipotalâmicas resulta em anorexia e adpsia (Elias *et al.*, 1998; Costa, *et al.*, 2004).

A perda do controle coordenado entre ingestão alimentar e gasto energético parece representar um mecanismo central no desenvolvimento da obesidade. Os avanços na caracterização dos mecanismos de ação da leptina no hipotálamo revelaram que a transdução do sinal deste hormônio sofre importante controle por vias paralelas de sinalização celular, sendo que, até o presente momento, a insulina se destaca como o principal modulador do sinal da leptina (Tartaglia *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994; Spiegelman *et al.*, 2001; Moyers, 2005).

A leptina e a insulina agem sobre diversas vias de sinalização no hipotálamo, reprimindo os circuitos neuronais anabólicos que estimulam a incorporação de alimento; e inibem o gasto energético, ao passo que, simultaneamente, estimulam os circuitos neuronais catabólicos que inibem a incorporação de alimento e aumentam o gasto energético (Flier, 2004).

Fisiologicamente, o hipotálamo exerce inúmeras funções regulatórias vitais, atuando diretamente sobre a hipófise e indiretamente sobre diversas glândulas como: adrenal, gônadas, tireóide e mamária; e sobre os tecidos muscular, adiposo, ósseo e visceral. Além disso, ele recebe e integra sinais gerados em diferentes partes do organismo, regulando: a temperatura, o comportamento emocional, o comportamento sexual, o ciclo sono-vigília, diurese, ingestão hídrica e alimentar (Guyton, 2002).

Atualmente, é conhecido que no hipotálamo existem os dois grupos de neuropeptídeos envolvidos no processo de regulação da saciedade: neuropeptídeos anorexígeno e orexígenos. O hipotálamo regula a ingestão alimentar e termogênese por estimular ou inibir tais neurotransmissores.

O primeiro grupo de neurotransmissores age não apenas por diminuir a ingestão alimentar, como também por aumentar a termogênese. São eles Pró-Opiomelanocortina (POMC), Hormônio α -Melanócito Estimulante (MSH- α), Transcrito Relacionada à Cocaína e à Anfetamina (CART), Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) e Hormônio Liberador de Tireotrofina (TRH). O segundo grupo age de forma oposta, estimulando a ingestão alimentar e diminuindo a termogênese, tais como: Hormônio de Concentração da Melanina (MCH), orexinas, Neuropeptídeo Y (NPY) e o Peptídeo Relacionado Agouti (AgRP) (Sainsbury *et al.*, 2002; Timofeeva *et al.*, 1999; Hovarth, 2005).

Falhas em alguns dos componentes desse complexo sistema de controle da homeostase energética podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade. A resistência hipotalâmica à ação da insulina e leptina tem um papel central na perda do controle entre ingestão alimentar e gasto energético (Schwartz *et al.*, 2000).

Acredita-se que a resistência central (hipotalâmica) às ações da insulina e da leptina participem da fisiopatologia da obesidade. Assim, a procura por evidências experimentais e clínicas de que o fenômeno de resistência hipotalâmica à ação da insulina e da leptina pudesse existir e compor o quadro da obesidade passou a ser o foco de interesse de vários grupos em atividade nesta área do conhecimento. Existem mais de cem resíduos de serina do IRS-1 que podem ser fosforilados, e muitas proteínas quinases fosforilam este substrato, incluindo JNK, PKC, IKK- β , mTOR, MAP quinase e AMPK. A JNK tem recebido mais atenção recentemente por ser capaz de se associar ao IRS-1 e promover sua fosforilação no resíduo 307 de serina (Ser307), tornando esse substrato mais refratário à associação com o receptor de insulina e, conseqüentemente,

reduzindo sua fosforilação em tirosina, o que pode contribuir para a resistência à insulina durante situações de estresse fisiológico, como inflamação e obesidade (Lee et al., 2003).

O principal mecanismo pelo qual a sinalização da insulina pode ser negativamente regulada na obesidade é, certamente, a fosforilação em resíduos de serina e treonina nas proteínas da via da insulina IR, IRS-1, IRS-2, impedindo a transdução do sinal insulínico nos tecidos alvo da insulina, inclusive no sistema nervoso central.

Diante disso, a proposta deste estudo foi avaliar os efeitos do uso de sacarose, sacarina associada ao ciclamato e sacarina isolada na dieta de ratos *Wistar*, sobre fatores fisiológicos como a ingestão alimentar, o ganho de peso corporal e de tecido adiposo epididimal, taxa de desaparecimento da glicose (Kitt), bem como sobre a expressão molecular de proteínas envolvidas na sinalização hipotalâmica da insulina. Ainda investigamos os efeitos da microinfusão icv da insulina sobre a ingestão alimentar.

Em virtude das limitações éticas relacionadas a pesquisas em seres humanos, as pesquisas com animais apresentam-se como uma alternativa. Tais pesquisas permitem o controle de diversas variáveis, já que os animais podem ser mantidos sob condições ambientais rígidas.

As realizações de pesquisas experimentais podem proporcionar melhoria na saúde humana uma vez que os mecanismos a serem analisados nos animais correspondem aos dos seres humanos, inclusive em relação aos efeitos da insulina sobre tecidos periféricos e no hipotálamo e, ainda, a influência de fatores relacionados com a alimentação sobre a expressão das proteínas que estão envolvidas na sinalização da insulina nesses tecidos e, conseqüentemente, inibindo ou aumentando a fome e a saciedade (Pereira *et al.*, 2003; Luz, 2009).

FIGURA 3: Via de sinalização da insulina

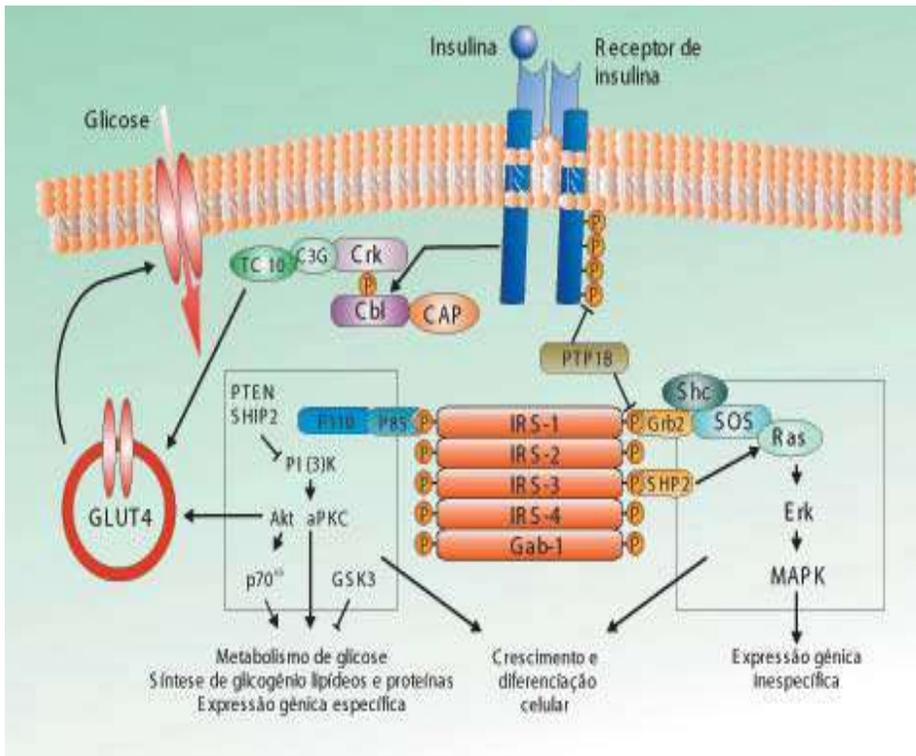


Figura demonstrativa dos mecanismos intracelular das proteínas presentes na via da sinalização insulina.

Fonte: Zecchin et. al., 2004

4. OS EDULCORANTES

4.1. Conceito, finalidade de uso e conseqüências do uso crônico

Seguindo a tendência mundial, aumenta o número de consumidores brasileiros que utilizam produtos *light* e *diet* destinados tanto para dietas restritivas a algum nutriente com, também, para manutenção e perda de peso.

Os termos *light* e *diet* podem confundir os consumidores durante a aquisição, deste modo é importante salientar que existe diferença entre produtos *light* e *diet* e que os consumidores precisam está cientes e esclarecidos sobre o significado desses termos, evitando o consumo inadequado de tais produtos.

Em 1998, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, publicou uma legislação que conceituava os produtos light e diet, com base no *Codex Alimentarius* que tem o objetivo de assegurar as práticas no comércio internacional e proteger a saúde dos usuários

O termo *Light*, deve ser utilizado em alimentos fabricados com redução em, no mínimo 25% o valor calórico e os seguintes nutrientes: açúcares, gordura saturada, gorduras totais, colesterol e sódio quando comparados ao produto tradicional ou similares. Por esta razão, consumidores que têm o objetivos de perder peso recorrem ao uso desses produtos.

Já os produtos *Diet* são produzidos para atender pessoas com exigências físicas e/ou que sofrem de doenças específicas como, por exemplo, Diabetes. Assim, dietas com restrição de nutriente(s) específico(s) devem fazer uso desses tipos de alimentos lembrando que nem sempre esses alimentos têm redução na sua concentração calórica.

Adoçantes ou edulcorantes são substâncias de baixo ou inexistente valor energético que proporcionam ao alimento um gosto doce. Além da sacarose, açúcar natural mais difundido mundialmente, são largamente utilizados para promover a doçura nos alimentos lights e diets.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007), o adoçante comum tem a função de adoçar os alimentos, fornecendo uma percepção do sabor adocicado semelhante ao da sacarose, altamente calórica.

Já os adoçantes dietéticos comercializados são compostos por edulcorantes que adoçam e, por não serem provenientes de carboidratos simples como frutose, glicose, lactose e sacarose, não possuem valor calórico.

Em conseqüência do crescente número de pessoas que apresentam algum tipo de distúrbio metabólico e que recorrem ao uso desses adoçantes como instrumento de terapia, com finalidade de reduzir, ou mesmo cessar, o consumo

de açúcar, muitos centros de pesquisa têm tentado encontrar um substituto do açúcar que seja, ao mesmo tempo, nutritivo e benéfico, e que possa atuar na cura ou na prevenção de doenças.

Consumidores de edulcorantes procuram um produto que, além de reduzir a ingestão de carboidratos simples na forma de sacarose, seja dotado de gosto e características próximas às da sacarose.

A partir do desenvolvimento de novas tecnologias, muitas substâncias foram colocadas no mercado para suprir esta necessidade, mas poucas se apresentam com uma estabilidade satisfatória e como uma alternativa ao açúcar comprovadamente segura para o consumo humano.

A legislação brasileira permite, para utilização em alimentos e bebidas dietéticas, a comercialização dos edulcorantes sacarina, ciclamato, aspartame, sucralose e o extrato de folhas de Stévia, associados ou não. Todos os edulcorantes permitidos devem ser ingeridos em quantidades proporcionais às necessidades do organismo.

Os diversos edulcorantes autorizados para uso em alimentos e bebidas dietéticas possuem características específicas de intensidade e persistência do gosto doce, e de presença, ou não, de gostos residuais. Estes aspectos tornam-se fatores determinantes na aceitação, preferência e escolha de um edulcorante por parte dos consumidores.

O estudo de adoçantes utilizados na formulação de alimentos dietéticos, bem como na de medicamentos, é de fundamental importância, visto que o uso de produtos com acréscimo dessas substâncias é cada vez mais comum.

No entanto, mais informações sobre elas ainda devam ser investigadas e divulgadas a fim de que a população em geral possa decidir que tipo de edulcorante agrega a maior quantidade de características que torne seu uso seguro e prazeroso.

A popularização da sacarina pode ser atribuída a alguns fatores como preço atraente, a ausência de calorias por não ser metabolizada pelo organismo, por não afetar a saúde dos dentes, por ser estável e ter ampla faixa de aplicações.

Já o ciclamato possui a vantagem particular de reduzir o gosto amargo residual da sacarina, quando associado a ela, e de também ser isento de calorias, uma vez que não é metabolizado.

Assim, o uso de sacarina e ciclamato, em associação ou não, costuma ser o mais comum entre a população em geral.

Os edulcorantes podem ser classificados em artificiais ou sintéticos, tais como a sacarina sódica e o ciclamato, que não apresentam valores calóricos; ou em naturais, tais como a frutose e o sorbitol, que possuem menos calorias que a glicose presente na sacarose. Estudos indicam que os adoçantes artificiais são, em muitos casos, nocivos à saúde, mesmo em concentrações preconizadas por órgãos de saúde.

As tabelas 3 e 4 mostram algumas particularidades dos Edulcorantes.

Tabela 3: Edulcorantes sintéticos

Aspartame	Deve ser evitado por pessoas que sofrem de fenilcetonúria, pois contém fenilalanina.
Sacarina	É o mais antigo dos adoçantes e um dos mais utilizados.
Ciclamato	Proibido em alguns países por provocar efeitos cancerígenos, mutantes em células e alérgicos.
Sucralose	É eliminada do organismo pela urina num prazo de 24hrs.
Acessulfame-k	É o mais resistentes ao tempo e altas temperaturas e é eliminada pelo organismo através da urina.

Fonte: Abiad (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos Dietéticos)

Tabela 4: Edulcorantes naturais

Esteviosídeo	É encontrado na planta <i>Stévia Rebaudiana</i> . Não contém calorias
Sorbitol	O uso é restrito a pessoas que não são diabéticas e que não são obesas
Manitol	Não é recomendado a diabéticos e produz efeito laxativo se usado em grandes quantidades.
Frutose	É extraído de frutas, cereais e mel, desaconselhável para regimes de emagrecimento, deve ser usado com moderação, pode provocar cáries e tem consumo limitado para diabéticos.

Fonte: Abiad (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos Dietéticos)

5. A HIPÓTESE DO ESTUDO

Na década de 1980, o consumo de adoçantes dietéticos no Brasil limitava-se aos portadores de patologias, por exemplo, diabetes, às quais há necessidade de restringir o consumo de açúcar. Entretanto, nos últimos anos, o consumo de adoçantes no nosso país se popularizou e expandiu impulsionado por um grande número de consumidores cada vez mais preocupados com a saúde e com o impacto que uma dieta rica em açúcar tem sobre a qualidade de vida.

As controvérsias presentes nos inúmeros estudos em relação ao consumo de adoçantes leva à necessidade de explorar o tema e salientar que consumir com cautela é a melhor estratégia para não se expor, sem necessidade, a essas substâncias ainda não exaustivamente estudadas.

A hipótese deste trabalho é que o consumo de adoçantes, sem a devida orientação nutricional e médica, pode contribuir para um aumento no consumo de calorias e, ao invés de prevenir ou regredir a obesidade, os edulcorantes podem influenciar no aumento do volume de ingestão, além de ocasionar possíveis alterações na expressão de fatores envolvidos na via de sinalização da insulina.

Assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar possíveis efeitos dos edulcorantes em fatores fisiológicos, tais como peso total e epididimal, taxa de

desaparecimento de glicose (Kitt); e na expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no hipotálamo, do consumo de ração com adição de sacarose e dos edulcorantes, ciclamato e sacarina, isolada e associada ao ciclamato, na dieta de ratos, quando comparados ao consumo de ração padrão.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo geral

Investigar se a adição de sacarina, ciclamato e sacarose na dieta de ratos *Wistar* influencia na ingestão alimentar, no peso corporal e ainda na sinalização hipotalâmica da insulina nesses animais.

6.2. Objetivos específicos

- Avaliar os impactos das dietas enriquecidas com sacarose e com os edulcorantes nos parâmetros de peso e ingestão.
- Verificar possíveis modificações no perfil glicêmico de animais controle e tratados.
- Observar se há diferença, entre os grupos, na constante de desaparecimento de glicose (Kitt) por meio do ITT (*Insulin Tolerance Test*).
- Mensurar os efeitos da infusão icv de insulina ou salina na ingestão dos animais controle e tratados;
- Avaliar a expressão molecular, no tecido hipotalâmico, das proteínas envolvidas nas vias de sinalização da insulina, tais como IR (receptor de insulina), IRS 1 (substrato 1/2 do receptor de insulina) e Akt (proteína serina/treonina quinase B).

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. Delineamento da pesquisa

A pesquisa foi realizada com o seguinte delineamento:

a) Os animais, em desmame, foram deixados para adaptação e crescimento (n=40) por duas semanas em uma das salas pertencentes ao Biotério Central – CEMIB, mantendo a dieta padrão da *Nuvilab CR*, comercializado pela Nuvital.

b) Após esse período, os animais foram separados em 04 grupos (n=10 por grupo), de maneira aleatória, para que o tratamento, com dietas específicas fosse iniciado.

c) A cada dois dias, aferiu-se o peso desses animais, bem como o volume de ingestão da ração oferecida, a fim de observar a influência da composição da dieta nesses parâmetros.

d) Após 20 dias do início do tratamento, foi feito o teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT) para verificar se houve alterações na taxa de desaparecimento da insulina em algum dos grupos.

e) Para a injeção de insulina no ventrículo lateral dos animais foi realizada Cirurgia Estereotáxica em todos os animais.

f) Com a finalidade de comprovar que a cânula foi colocada no lugar adequado, após cinco dias de cirurgia foi injetado icv angiotensina II (Ag II) nos animais e, aqueles animais que, logo após a injeção de Ag II, bebem água, têm comprovada a colocação da cânula em local apropriado. Dessa forma, estes animais que responderam positivamente ao estímulo com Ag II receberam infusão de insulina icv na dose/volume de $2 \mu\text{l}/10^{-6} \text{ M}$, ou de solução salina em volume semelhante.

g) Em seguida, os animais receberam solução salina ou insulina, via icv, e foi medida a ingestão desses animais em períodos de 04 e 08 horas.

h) Após os efeitos da insulina terem se anulado, os animais foram deixados em jejum de 12 horas para realizar a extração do tecido hipotalâmico.

i) Nos 15 minutos que antecederam a extração do tecido hipotalâmico, os animais, previamente separados por grupos, receberam a mesma quantidade de insulina ou solução salina via icv.

j) A análise das proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina foi realizada por meio do método *Western blot*.

7.2 Animais experimentais

Todos os animais foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) e mantidos em caixas, 5 animais por caixa, sob condição padronizada de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos a partir de vinte e um dias de idade, sendo que a introdução das diferentes dietas enriquecidas deu-se a partir do vigésimo oitavo dia de vida desses animais.

Todos os experimentos envolvendo animais estavam de acordo com os padrões do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais observados não apresentavam nenhuma patologia que envolvesse o metabolismo de açúcares e, portanto, seus aspectos metabólicos não se encontraram inicialmente prejudicados, o que de nenhuma maneira influenciou na relação entre o uso dos edulcorantes e qualquer eventual distúrbio que surgisse como consequência do tratamento.

7.3. Dieta

Utilizou-se a ração padrão do biotério como base para todos os grupos e a escolha dos grupos foi feita por meio de sorteio.

Para a produção da ração foi necessária a utilização de um processador, um béquer para medir a quantidade de água, borrifador, recipiente plástico para mistura, forma de vidro para a secagem da ração no aparelho de microondas, sacos para armazenamento de alimentos e etiquetas de identificação.

Em média, utilizou-se 200 ml de água para cada 400 gramas da ração, ambos colocados em um processador até obter-se a consistência suficiente para a remodelagem dos os *pellets*, forma na qual a ração é oferecida ao roedor.

Em um borrifador foi colocado 100 ml de água e 30 gramas de cada um dos edulcorantes, um por vez, e agitado para homogeneização da solução, a qual foi borrifada nos *pellets* remodelados.

Os *pellets* foram colocados em uma forma de vidro (marinex) e inseridos no aparelho de microondas a fim de reduzir a atividade de água e evitar a proliferação de microorganismos.

Em seguida, as rações foram expostas à temperatura ambiente para seu resfriamento e, depois, separadas em embalagens identificadas com etiquetas contendo informações do conteúdo e data de processamento da ração.

A ração era refeita a cada cinco dias com o intuito de prevenir eventuais proliferações de microrganismos patogênicos que pudessem comprometer fisiologicamente os animais.

Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 10 por grupo) e, tanto os controles tratados com dieta padrão, quanto os tratados com as dietas acrescidas dos edulcorantes específicos (sacarose a 30%, sacarina associada ao ciclamato a 30% e sacarina a 30%), foram submetidos a esta alimentação durante quarenta dias com a dieta e água *ad libitum*.

Deste modo, obtivemos 4 grupos experimentais distintos, separados aleatoriamente:

Grupo 1: animais tratados com dieta padrão;

Grupo 2: animais alimentados com dieta padrão acrescida de solução com sacarose a 30%;

Grupo 3: animais expostos à dieta padrão enriquecida com solução de sacarina em associação ao ciclamato a 30%;

Grupo 4: animais submetidos à dieta padrão acrescida de solução com sacarina a 30%;

A ração base da *Nuvilab CR* foi utilizada para o experimento e apresenta a seguinte composição química da ração: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bi cálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos; e foi comercializada pela Nuvital.

Os níveis de garantia do produto estão mostrados na tabela 5.

TABELA 5: Níveis de Garantia por Quilograma do Produto:

Umidade (máx)	12,50	%
Proteína Bruta (min)	22,00	%
Extrato Etéreo (min)	4,50	%
Matéria Mineral (máx)	10,00	%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00	%
Cálcio (máx)	1,40	%
Fósforo (min)	0,80	%

Fonte: Rótulo da ração *Nuvilab CR*

O conteúdo nutricional de cada uma das dietas, bem como da dieta padrão, exposta na tabela 6, especifica a composição de cada uma das dietas.

TABELA 6: Composição das dietas de cada um dos grupos estudados:

Componentes	Controle (mg/kg)	Dieta com sacarose (mg/kg)	Dieta com sacarina e ciclamato(mg/kg)	Dieta com sacarina (mg/kg)
Vitamina A	12.000UI	12.000UI	12.000UI	12.000UI
Vitamina E	30	30	30	30
Vitamina K	3	3	3	3
Vitamina B1	5	5	5	5
Vitamina B2	6	6	6	6
Vitamina B6	7	7	7	7
Vitamina B12	20	20	20	20
Niacina	60	60	60	60
Ácido Pantotênico	20	20	20	20
Ácido fólico	1	1	1	1
Biotina	0,05	0,05	0,05	0,05
Colina	600	600	600	600
Ferro	50	50	50	50
Zinco	60	60	60	60
Cobre	10	10	10	10

Iodo	2	2	2	2
Manganês	60	60	60	60
Selênio	0,05	0,05	0,05	0,05
Cobalto	1,5	1,5	1,5	1,5
Lisina	100	100	100	100
Metionina	300	300	300	300
Antioxidantes	100	100	100	100
Sacarose	0	30	0	0
Sacarina Ciclamato	e 0	0	30	0
Sacarina	0	0	0	30

Fonte: Rótulo da ração *Nuvilab CR*

Na ausência de estudos anteriores que auxiliassem na determinação exata da concentração das soluções a serem empregadas no nosso estudo; realizamos um estudo preliminar (estudo piloto) com concentrações inferiores e a partir da concentração das soluções de 30% verificamos que já houve diferença entre os grupos e deste modo foi determinada a concentração a ser utilizada nessa pesquisa

7.4. Avaliação dos parâmetros fisiológicos da ingestão alimentar e a determinação do peso corporal

O volume de ingestão foi obtido por meio do cálculo do volume de ração oferecido (em gramas) para cada grupo de animais, subtraído pelo volume de ração deixado (em gramas), ao final de 48h, pelos animais. Em seguida o valor

obtido foi dividido por 2 para se obter os dados diários, uma vez que a coleta dos dados era realizada a cada 2 dias.

Por fim, dividiu-se esse volume de ração ingerido pelo número de animais presentes em cada grupo de maneira a se conseguir o volume de ingestão por animal por dia.

Foi estabelecido como peso corporal inicial dos animais o valor verificado pela pesagem dos mesmos, já transcorrido o período de adaptação pós-saída dos animais do biotério. Como procedimento de coleta de dados, aferiu-se o peso dos animais a cada dois dias durante todo o período do experimento. Para se obter o ganho ponderal de peso do animal, subtraiu-se do peso corporal de cada animal, ao último dia do experimento, o seu respectivo peso corporal inicial e, a partir destes resultados, foi calculada a média e o desvio padrão de cada um dos grupos.

Para determinação do peso corporal, foi utilizada uma balança com capacidade para 5 Kg.

7.5. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT)

Esse teste tem como objetivo medir a resistência/sensibilidade periférica à ação da insulina. Assim, a constante de desaparecimento da glicose (Kitt) é utilizada como índice do metabolismo da glicose mediado pela insulina. O Kitt corresponde à queda da glicose expressa em porcentagem por minuto, ou seja, quanto maior o Kitt, maior a sensibilidade à insulina (Silva *et al*, 2005; Geloneze *et al.*, 2006; Murali *et al*, 2002).

O teste foi realizado na metade do período experimental, após jejum noturno de 6 horas, por meio de um corte na extremidade da cauda do animal, sem analgesia, pois isso poderia alterar os resultados de glicemia.

Efetou-se assim uma primeira coleta de sangue para dosagem de glicose basal, que equivaleu ao tempo “zero” do teste. Em seguida, foi injetado, via

intraperitoneal, 1,0 U por kg de peso corpóreo do animal de insulina e as amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos para a determinação da glicose sérica.

A velocidade constante do desaparecimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693 \times 100 / t^{1/2}$, onde o $t^{1/2}$ representa a meia-vida do desaparecimento da glicose, e foi determinado a partir do *slope* ou coeficiente angular da reta obtida pela regressão linear do logaritmo natural da glicose versus o tempo (Bonora *et al.*, 1987; Pauli *et al.*, 2007).

7.6. A cirurgia estereotáxica: implantação da cânula intracerebroventricular (icv)

Depois de atingirem 6 semanas de idade, os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica com o objetivo de implantar uma cânula no ventrículo lateral do hipotálamo. Os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal, com uma mistura de cloridrato de ketamina e *Diazepan* (1:1). Após testados os reflexos: corneal e pedal, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico para o início da cirurgia. Após a fixação da cabeça do animal no aparelho, foi feita uma incisão e o periósteo foi aberto, expondo a sutura sagital.

As coordenadas indicadas por (Paxinos *et al.*, 2001) foram usadas como base para a perfuração do osso parietal na junção dessas coordenadas, lateral e posterior, tendo o bregma como ponto de referência.

A cânula foi, dessa maneira, posicionada no orifício central, rebaixada, cuidadosamente, até atingir a coordenada dorsoventral, e fixada no crânio com o auxílio de uma resina. Após a secagem da resina, o animal foi retirado do aparelho e permaneceu de 6 a 7 dias em recuperação do procedimento cirúrgico.

A confirmação da posição das cânulas foi feita através da injeção icv de angiotensina II, que induz efeito dipsinogênico (Prada *et al.*, 2005; Pereira da Silva *et al.*, 2003).

Após o período de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais dos grupos descritos acima foram divididos em subgrupos e receberam infusões de

insulina, na dosagem de 10^{-6} M (2 μ l), ou salina, no mesmo volume e dose. Assim, foi feita a avaliação da ingestão dos animais em períodos de 4 e 8 horas posteriores à infusão icv.

Para o tratamento icv foi utilizada uma seringa Hamilton (50 μ l) acoplada, por meio de uma cânula plástica a uma agulha 30G, de modo que esta ultrapasse o comprimento da cânula metálica (0,1 – 0,2 mm) garantindo a entrada do líquido no ventrículo lateral.

7.7. Avaliação da sensibilidade hipotalâmica à insulina

Sabe-se que a infusão central de insulina promove a redução da ingestão calórica em animais. Para avaliar a sensibilidade hipotalâmica à insulina, os animais, previamente submetidos à cirurgia estereotáxica e em jejum de 12 a 14 horas, receberam injeção icv de insulina (insulina regular humana: *Humulin R, Eli Lilly and Co*; Indianápolis, Indiana, USA), na dosagem de 10^{-6} M (2 μ l) ou de 0.9% solução fisiológica (salina) (2 μ l) (Carvalheira, 2005; Prada et al., 2005; Neto et al., 2006).

Após estas infusões, a ingestão alimentar foi quantificada em gaiolas metabólicas, nos tempos 4, 8 e 12 horas. Em outro grupo de animais, após receberem as infusões icv de insulina ou salina, os hipotálamos foram extraídos após quinze minutos para a avaliação da expressão e regulação das proteínas da via de sinalização de insulina por *Western blot*. As proteínas estudadas foram IR (receptor de Insulina), Akt (proteína serina/treonina quinase B), IRS 1 (substrato do receptor de insulina).

7.8. Determinação da gordura epididimal

Para a determinação do peso da gordura epididimal, os ratos foram anestesiados com anestésico tiopental, tiveram a cavidade abdominal aberta e

toda a massa de tecido adiposo epididimal foi cuidadosamente dissecada e pesada.

7.9. Extração de tecido: dissecação do hipotálamo

Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (*Thiopentax – Cristália*, 15mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneal foram utilizadas como controle da anestesia. O crânio foi aberto, o hipotálamo retirado e em seguida o material extraído foi centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C (*Bioanalytical*) a 12.000 RPM por 40 minutos; parte do sobrenadante é utilizada para determinação da concentração de proteínas por fragmento de tecido extraído e outra para aplicação de *SDS-PAGE*.

A determinação da concentração protéica é feita pelo método foto colorimétrica do biureto em que é utilizado o reagente da *Bio Rad* (Bradford, 1976).

Para aplicação no *SDS-PAGE* (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro phoresis*), armazena-se o sobrenadante em alíquotas com tampão de *Laemmli* (*Laemmli*, 1970) acrescido de DTT 200mM, numa proporção de 1:5 (400 µl do sobrenadante em 100 µl do tampão de *Laemmli* com DTT). Este material será, então, fervido a 100°C por 5 minutos e, imediatamente, aplicado no gel *SDS-PAGE*.

7.10. Western blot: Separação eletroforética de proteína

Este método, descrito por *Laemmli* em 1960, consiste em uma técnica utilizada para análises genética, bioquímica e de biologia molecular a fim de separar as proteínas em função do peso molecular ou de acordo com sua mobilidade eletroforética.

O *SDS-PAGE* foi desenvolvido para que a proteína submetida a um campo elétrico migre unicamente pelo tamanho. O *SDS* é um detergente carregado negativamente que se liga a regiões hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado *SDS*-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Deste modo, a migração das proteínas no método *SDS-PAGE* depende principalmente das suas massas moleculares.

O gel de empilhamento (“*stacking*”) permite que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Após passarem pelo gel de empilhamento as amostras alcançam o gel de resolução “*resolving*” onde as amostras começam a migrar de acordo com a massa molecular. A polimerização desta mistura inicia-se pela adição de persulfato de amônio e TEMED.

A eletroforese é efetuada em cuba de minigel *Mini- PROTEAN® II Cell* da *Bio Rad*, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O *SDS-PAGE* é inicialmente submetido a 20 volts, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento e 100 volts até o final do gel de resolução (“*resolving*”).

7.11. *Western blot*: Transferência para membrana de nitocelulose

As proteínas separadas no *SDS-PAGE* (de 1,5mm, 125µg da *Bio Rad*), do catálogo 161-0324, calibrado em MW (Dalton) em gel Bis-tris e contendo: Miosina (194, 636), β-Galactosidade (109, 993), BSA (58, 133), Anidrase Carbônica (30, 451), Inibidor de tripsina de soja (22, 209), Lisozima (12, 886) e Aprotinina (6 379), são transferidas para membrana de nitocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da *Bio Rad*.

Durante a transferência, a cuba é mantida a 120 volts por 150 minutos. (Towbin *et. al.*, 1979). Para evitar aumento excessivo da temperatura, são efetuadas trocas sucessivas da fôrma de gelo durante a transferência. A

eletroforese é efetuada em cuba de minigel *Mini- PROTEAN® II Cell* da *Bio Rad*, com solução tampão para eletroforese previamente diluída.

Para evitar aumento excessivo da temperatura, são efetuadas trocas sucessivas da fôrma de gelo durante a transferência.

7.12. *Western blot*: Incubação e bloqueio

As membranas com as proteínas transferidas são incubadas em solução bloqueadora por duas horas à temperatura ambiente, e depois lavadas em solução basal por três sessões de dez minutos para subsequente incubação com anticorpo específico.

A seguir as membranas são incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado + solução basal) por duas horas à temperatura ambiente, para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos e depois lavadas em solução basal por três sessões de dez minutos para subsequente incubação com anticorpo específico.

Tal incubação é feita *overnight* a 4°C por 14-16 horas, sob agitação constante e, novamente, as membranas são lavadas com solução basal por quatro sessões de dez minutos.

Depois, as membranas são submetidas à solução de quimiluminescência *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, da *Pierce*, por cerca de três minutos, sob agitação manual constante (movimentos elevação lateral alternado), sendo, posteriormente, expostas ao filme de RX (*Eastman Kodak*, Rochester, NY) com uso de intensificador (*Cronex Lightning Plus intensifying screens* – DuPont, Washington, DE) por cerca de vinte minutos.

Após a primeira revelação, dependendo da qualidade da imagem obtida, novas exposições ao filme de RX são realizadas em intervalos de tempos maiores ou menores do que o primeiro.

Uma vez identificadas as bandas das auto-radiografias, procedeu-se à leitura por densitometria óptica, quantificando suas áreas, utilizando-se, para isso,

o software *Scion*. A partir de então, realizar-se-á a análise dos dados, comparando-se o valor obtido no tecido do animal controle com o experimental, de forma que sempre haja controle dentro do experimento.

7.13. Soluções utilizadas durante a pesquisa:

As soluções empregadas nos experimentos estão descritas abaixo:

Tampão para extrato total

Utilizado na extração total de tecidos (tecido hipotalâmico e adiposo). Contém: trisma base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2mM (diluído em álcool etílico), triton X 100 1%, aprotinina 10 3% (0,1mg/mL). Esta solução deve ser mantida a 4°C. O ortovanadato, PSMF e aprotinina devem ser acrescentados no momento do uso.

Tampão de Laemmli (5x)

Utilizado para estocar o material extraído e para aplicação no gel de poliacrilamida. Contém: Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 20%.

Solução tampão para eletroforese em gel (SDS-PAGE)

Utilizada para a realização da eletroforese das proteínas extraídas no gel *SDS-PAGE*. A solução será diluída em 1:4. Contém: Trisma base 0,2M, glicina 1,52M, EDTA 7,18M e SDS 0,4%.

Solução tampão para transferência

Utilizada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: Trisma base 25mM, glicina 129mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso

molecular. Estocada a 4°C.

Solução tampão para SDS-PAGE, gel de resolução ("*resolving*")

Utilizada para o preparo do SDS-PAGE, gel de resolução. É um tampão composto de: EDTA 4mM, SDS 25% e trisma base 1,5M. O pH da solução deve ser ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução tampão para SDS-PAGE, gel de empilhamento ("*stacking*")

Utilizada no preparo do SDS-PAGE, gel de empilhamento das proteínas. Contém: EDTA 4mM, SDS 2% e trisma base 10mM. O pH será ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

Solução basal

Solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contém: cloreto de sódio 0,12M, trisma base 0,01M, *Tween* 20 0,05%.

Solução bloqueadora

Utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose logo após a transferência. Contém: 5% de leite em pó desnatado (*Molico*®) e azida sódica 0,02% dissolvidas em solução basal.

Solução para anticorpos

Solução em que se diluem os anticorpos específicos. Contém: 0,3% de soro albumina bovino (BSA) e azida sódica 0,02% diluídos em solução basal.

7.14. Anticorpos, reagentes e aparelhos

Todos os anticorpos utilizados são provenientes da *Santa Cruz Technology* (Santa Cruz, CA, USA), exceto o anti-pAkt, que é da *Cell Signaling Technology* (Beverly, MA, USA) Ser 473.

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de dodecil sulfato de

sódio e poliacrilamida (*SDS-PAGE*) são da *Bio-Rad* (Richomond, C.A.). Metanohidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT) foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis Mo). Insulina mista regular (*Biobrás*). A membrana de nitrocelulose BA 85, 0,2 μ m, é proveniente de *Schleider e Schuell*.

7.15. Critérios de inclusão, exclusão e limitações do modelo de pesquisa

Foram excluídos aqueles animais que apresentaram alteração comportamental ou fisiológica que pudesse comprometer a credibilidade dos resultados obtidos, tais como, apatia e distúrbios gástricos.

Adicionalmente, contradições nos resultados aqui mostrados podem ser reflexo do modelo experimental, concentração da solução adicionada na ração ou, ainda, do tempo de tratamento, pois todos esses fatores são limitadores do modelo de pesquisa adotado.

8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados por comparação entre os grupos controle e tratados (dieta acrescida de sacarose, sacarina associada ao ciclamato e sacarina). Todos os resultados numéricos foram demonstrados e expressos com média \pm desvio padrão da média, seguido do número de experimentos. A diferença entre as médias foi testada por meio da análise de variância das médias (ANOVA), seguida do pós-teste de *Tukey*, quando necessário, comparando os grupos controle e experimental. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$.

Os resultados de "*Western blot*" foram apresentados com comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias, foram quantificadas através de densitometria usando o programa "*Scion Image*" (*Scion Corp*).

9. RESULTADOS

9.1. Resultados fisiológicos

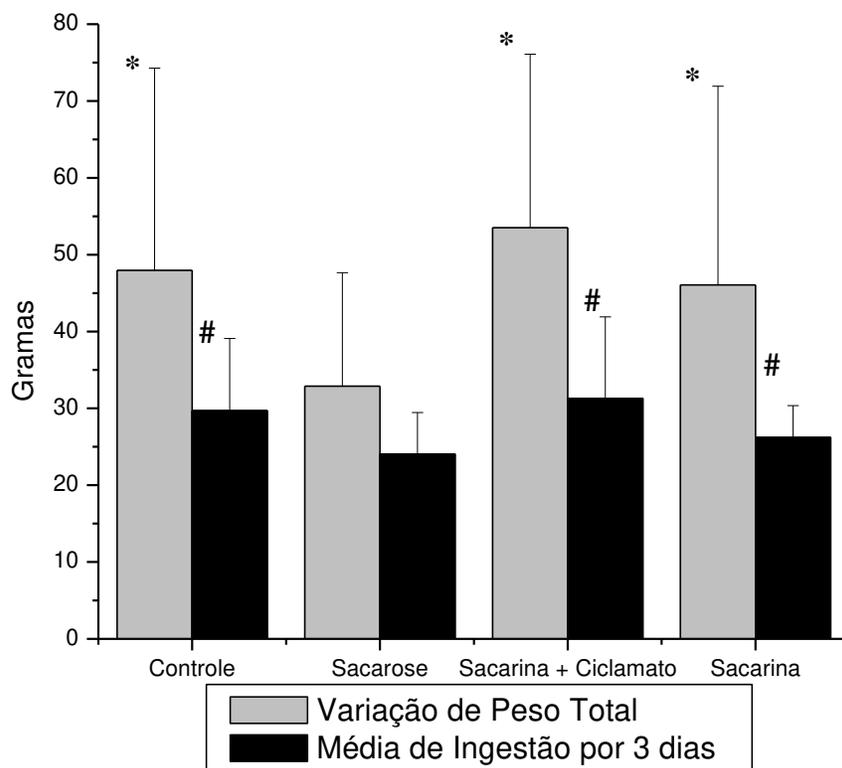
Após o tratamento com as dietas específicas, foram avaliados os parâmetros fisiológicos de peso corporal, tecido adiposo epididimal, ingestão alimentar, ingestão alimentar 4 e 8 horas após injeção icv de insulina e, ainda, taxa de desaparecimento da glicose por meio do ITT.

a) Média de ingestão por grupo

O gráfico 1 representa o volume de ingestão médio entre os grupos de animais. Nele podemos verificar que os animais os quais tiveram em sua ração a adição de edulcorante isolado apresentaram um volume médio de ingestão 30,2% maior em relação àqueles cuja dieta teve um acréscimo de sacarose.

Os animais que foram submetidos à dieta acrescida de sacarina associada a ciclamato e de sacarina isolada obtiveram, respectivamente, um volume, em média, de ingestão 9% e 30% maiores que aqueles que foram submetidos à dieta com acréscimo de sacarose.

GRÁFICO 1. Peso Médio Acumulado (g) e Ingestão média (g)



*** Maior Ganho de Peso em Relação ao Grupo Sacarose**
Maior Ingestão em Relação ao Grupo Sacarose

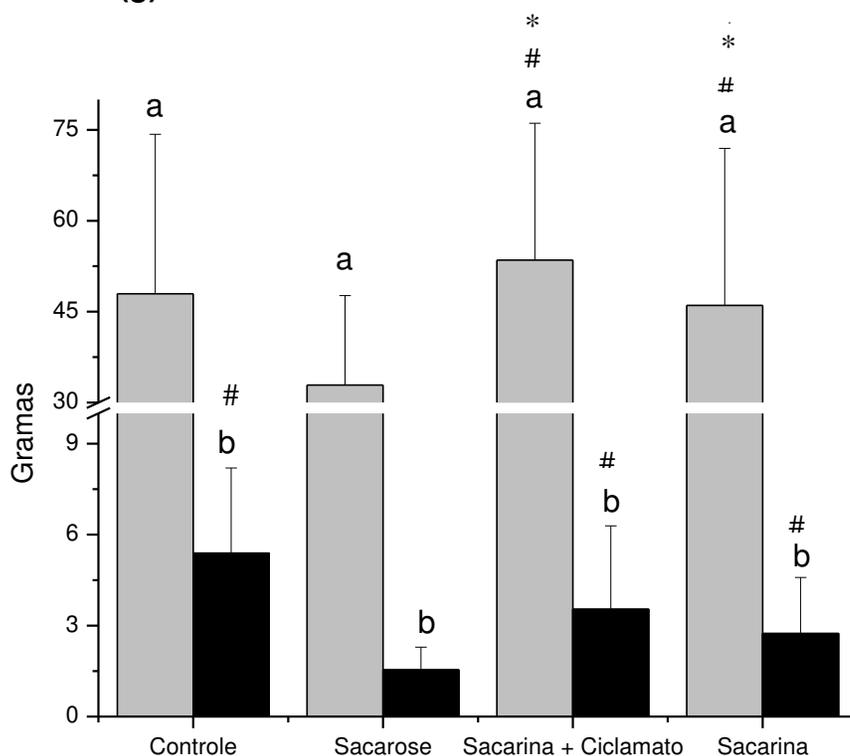
Controle n=6; Sacarose n=7; Sacarina e Ciclamato n =10;
Sacarina n=10 (n=33)

Ainda no gráfico 1, vale destacar que o grupo submetido à dieta acrescida de sacarose foi o que ingeriu, em média, o menor volume de alimento dentre todos os grupos estudados, o que pode explicar o dado obtido no padrão referente ao acúmulo de tecido adiposo epididimal, no qual se observa que esse grupo apresentou um acúmulo de tecido adiposo epididimal médio aproximadamente 6,0% menor que a média do grupo controle, 2,6% menor que a média do grupo exposto à sacarina e 5,8% menor que a média do grupo submetido à dieta enriquecida com sacarina associada a ciclamato.

b) Ganho de peso total e epididimal

Entre os animais avaliados, pudemos observar que aqueles expostos à ração acrescida de sacarina associada a ciclamato obtiveram um ganho de peso em média de 6% maior que o aferido no grupo de animais tratados com sacarose, estatisticamente significativo, comprovado por meio de um $P < 0,05$. Os resultados estão demonstrados no gráfico 2.

GRÁFICO 2. Peso Médio Acumulado (g) e Peso de Tecido Adiposo Epididimal (g)



* Similar em relação ao controle;

Significativo em relação à sacarose.

a. Ganho de Peso Acumulado Total

b. Peso de Tecido Epididimal.

Controle n= 6; Sacarose n=7; Sacarina e Ciclamato n=10 e

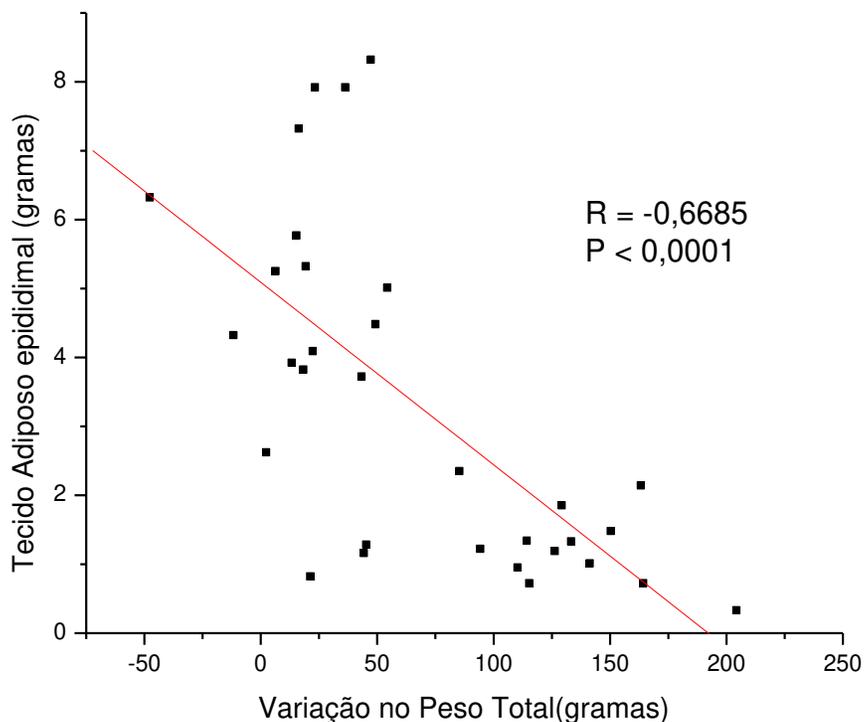
Sacarina n=10 (n=33)

O percentual de ganho de peso ponderal, nesse modelo experimental, durante o tratamento foi muito próximo nos grupos: controle e animais tratados com sacarina associada a ciclamato, mensurada uma diferença de apenas 0,21% entre as médias dos grupos, sugerindo que o uso de edulcorantes pode não exercer influência na regressão do quadro de obesidade.

Após aferir o peso da gordura epididimal e corrigi-lo em relação ao peso total dos animais, observamos que os animais tratados com sacarose obtiveram um peso epididimal médio menor que o mensurado em cada um dos demais grupos estudados. Essa diferença foi de, aproximadamente, 70% a menor de peso aproximado na média que o aferido nos animais controle, 42% menor que o peso epididimal aferido na média dos animais submetidos à dieta acrescida de sacarina e 55% a menor que a média aferida nos animais alimentados com a dieta enriquecida com sacarina e ciclamato.

Referente ao gráfico 3, logo abaixo, correlacionamos a variação de peso médio acumulado e o peso do tecido adiposo epididimal dos animais e observamos que há uma relação inversa ($R^2 = - 0,66$ com $P < 0, 0001$) entre essas variáveis, sugerindo que o ganho de peso dos animais pode está associado a outras formas de reservas energética.

GRÁFICO 3. Correlação Entre a Variação de Peso Médio Acumulado (g) e o Peso do Tecido Adiposo Epididimal (g)



c) Glicemia Basal e Kitt

Foi realizado o teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT) de maneira idêntica para todos os grupos para comprovar o desaparecimento da glicose no vigésimo dia de experimento nos grupos. Utilizou-se o ITT conforme previamente descrito e nota-se que os grupos que consumiram edulcorantes não ocorreu o desaparecimento da glicose na mesma taxa do grupo controle, sugerindo que foi desenvolvida a resistência à insulina nesses animais.

Baseado na evidência de dados já estabelecidos na literatura que o aumento do tecido adiposo pode ser fator para o desenvolvimento da resistência à ação da insulina (Pereira et al., 2003), submetemos os animais a esse teste, a fim de verificar uma possível instalação do quadro de resistência à ação da insulina.

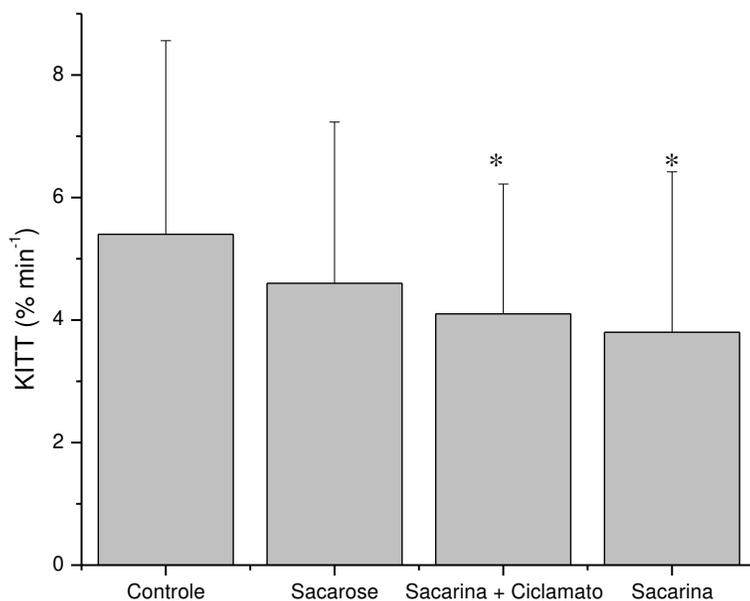
Desde modo, nos resultados obtidos, observou-se uma taxa média de desaparecimento da glicose menor nos animais expostos a dieta acrescida de edulcorante, quando comparados à média dos animais controle ou que receberam dieta acrescida de sacarose.

Visto que a menor taxa de desaparecimento da glicose representa uma menor sensibilidade à ação da insulina, a dieta com adição dos edulcorantes pode ter levado a alterações no(s) mecanismo(s) responsável (is) pela atividade adequada da insulina nesses animais, proporcionando um impacto negativo no perfil glicêmico.

Desta forma, o gráfico 4 sugere que os animais que pertenciam ao grupo dos edulcorantes apresentaram maior predisposição à instalação da resistência à ação da insulina em virtude de um possível comprometimento de elemento(s) quem compõem a via de sinalização desse hormônio.

Os animais do grupo dos edulcorantes apresentaram um Kitt em média 16,70% menor que o verificado no grupo submetido à dieta enriquecida com sacarose, sugerindo uma menor sensibilidade à ação da insulina em tecidos periféricos.

GRÁFICO 4. Resultado do ITT Representado Pela Taxa de Decaimento de Glicose (Kitt) - (% min. -1)

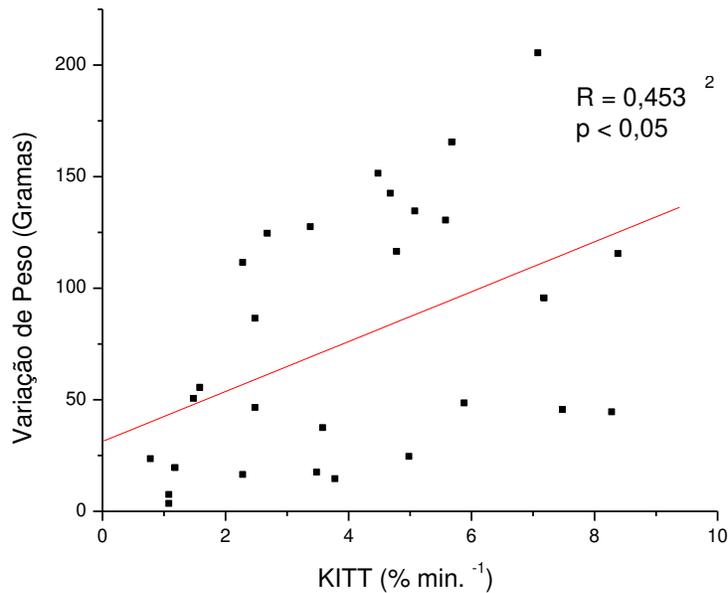


**Barras representam à média n=10
animais/grupo.**

*** Redução mais acentuada da sensibilidade
a ação da insulina.**

Em virtude do conhecimento amplamente difundido em relação à associação de aumento de peso corporal e resistência periférica a insulina, correlacionamos esses índices no gráfico 5 e verificamos que houve correlação significativa ($R^2 = 0,453$ com $P < 0,05$) entre essas variáveis.

GRÁFICO 5. Correlação Entre os Resultados de Kitt (% min. ⁻¹) e o Peso Médio Acumulado (g)



d) Efeito da infusão de insulina icv sobre a ingestão dos animais - ingestão após 4 horas da infusão de insulina icv:

Ao compararmos os resultados dos grupos que receberam infusão icv de insulina, observou-se que, com exceção do grupo alimentado com ração acrescida de sacarina, os demais grupos apresentaram ingestão média no período inferior aos seus grupos análogos que receberam infusão icv de solução salina.

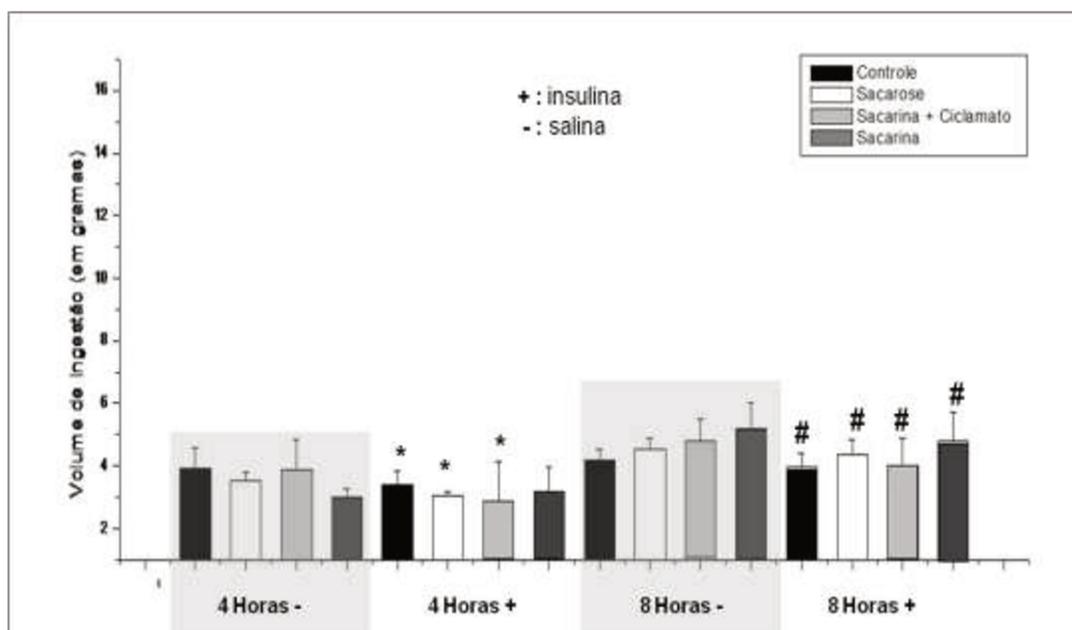
Os animais do grupo controle que receberam infusão de insulina apresentaram um consumo, aproximado de 13 % menor que seus análogos que receberam infusão com solução salina. Esse resultado foi, em média, menor em 12% e 25, % aproximadamente, para os animais tratados com sacarose e sacarina associada a ciclamato, respectivamente, e 6% maior quando observamos os animais submetidos à dieta enriquecida com sacarina.

- ingestão após 8 horas da infusão de insulina icv:

Os dados referentes à ingestão alimentar em um período de 8 horas após a infusão de insulina ou solução salina nos grupos avaliados mostraram que todos os animais estimulados por insulina ingeriram um volume menor de alimento que seus pares que receberam solução salina.

Os resultados mensurados foram, aproximadamente, 4,8%, 5,8%, 15,5% e 7,7% inferiores nos grupos controle, sacarose, sacarina associada a ciclamato e sacarina, respectivamente, para os animais que receberam infusão de insulina quando comparados aos animais análogos que receberam infusão de solução salina.

GRÁFICO 6. Meduração do consumo alimentar em 4h e 8h após a injeção intracerebroventricular (icv) de salina (-) e insulina (+).



Administração de microinjeção, icv, de insulina ou salina 10^{-6} M (2 μ l)

Insulina (n=16) e Salina (n=17)

* Redução da ingestão mais acentuada.

Restauração parcial do padrão alimentar.

9.2. Resultados moleculares

Foi observado, o efeito da infusão icv de insulina nas proteínas da via de sinalização de insulina no hipotálamo de animais controle e tratados. Utilizando o método de *Western blot* avaliando o extrato total dessas proteínas.

a) IR e pIR

Os resultados referentes às variações na expressão de IR quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de insulina, encontram-se sumarizados na tabela 7 (anexo).

Podemos observar que os animais controle e estimulados com insulina, apresentam um aumento de 55% na expressão da proteína IR, quando comparados aos animais que consumiram dieta com sacarose e que também tiveram estímulo de insulina.

Em relação aos que foram submetidos à dieta adicionada de sacarina e ciclamato e sacarina isolada esse aumento foi de 140% e 130% respectivamente.

Ao observarmos os animais tratados com sacarose e estimulados com insulina, notamos um aumento de aproximadamente 55% na expressão da proteína IR ao ser comparado com sacarina e ciclamato e 48% maior quando comparado com o grupo cuja dieta teve acréscimo de sacarina e o mesmo estímulo.

Adicionalmente, os resultados referentes às variações na expressão de IR quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de solução salina, encontram-se sumarizados na tabela 8 (anexo).

Do mesmo modo, nos animais controle e estimulados com salina, foi observado aumento na expressão da proteína IR de 18% ao serem comparados com o grupo sacarose, um aumento de 108% comparando com sacarina e ciclamato e, ainda, 39% maior que os animais que tiveram em suas rações a adição de sacarina isolada.

Ao compararmos o grupo sacarose e aqueles o qual a dieta foi acrescida dos edulcorantes sacarina e ciclamato e sacarose isolada, foi visto um aumento de 76% e 17% respectivamente no grupo tratado com sacarose.

Também, em nossos estudos, comparamos os resultados referentes às variações na expressão de IR quando comparamos os animais submetidos à infusão icv de insulina com seus pares submetidos à infusão de solução salina. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 9 (anexo).

Os resultados referentes às variações na expressão de pIR quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de insulina, encontram-se sumarizados na tabela 10 (anexo).

Ao compararmos os grupos submetidos a diferentes dietas e estimulados com insulina, observamos que houve uma maior expressão de pIR, 37%, no grupo controle em relação aos submetidos à dieta com sacarina isolada, embora o mesmo não tenha sido observado nos animais submetidos à dieta com ciclamato e sacarina os quais foi observado uma expressão 10% dessa proteína em relação ao grupo controle.

Já nos animais cuja dieta teve acréscimo de sacarose, observamos que a expressão de pIR foi maior que todos os outros grupos analisados, sendo 17% maior que o controle, aproximadamente 6% maior que o grupo com adição de sacarina e ciclamato e 61% maior que aqueles animais cuja dieta foi adicionada apenas sacarina.

Adicionalmente, os resultados referentes às variações na expressão de pIR quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de solução salina, encontram-se sumarizados na tabela 11 (anexo).

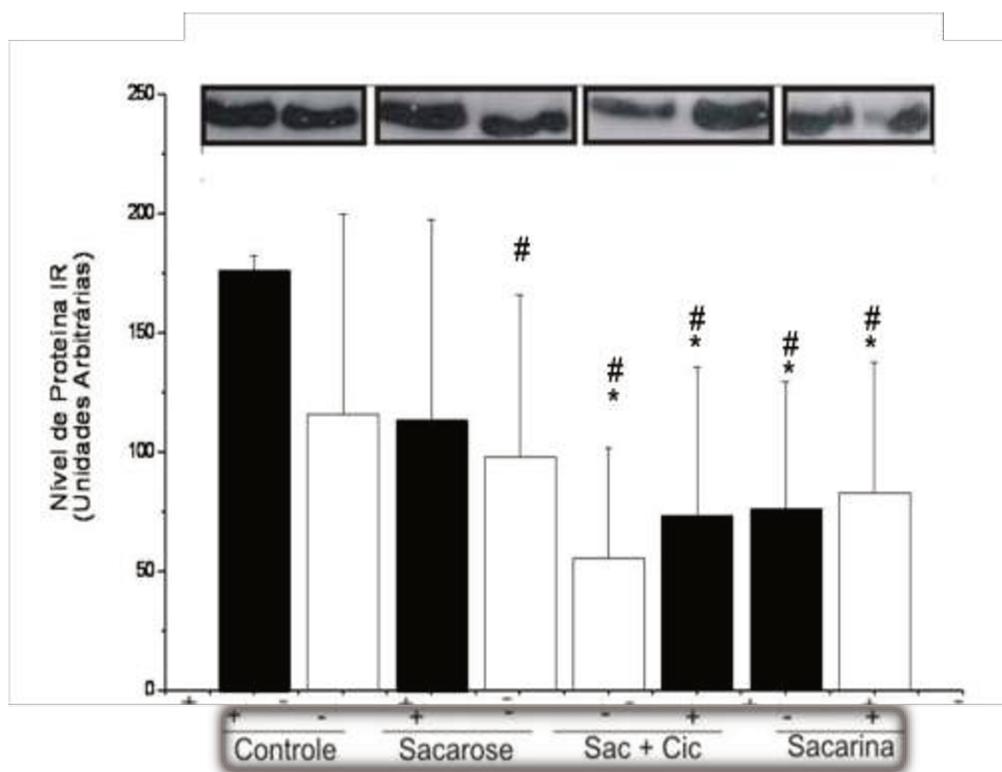
Observamos tanto nos animais controle como naqueles que foram submetidos à dieta com sacarose e, não tiveram infusão icv de insulina, um aumento na expressão da proteína IR na sua forma fosforilada, pIR, quando comparados aos que foram tratados com edulcorante e da mesma forma não tiveram o estímulo de insulina.

Deste modo, vimos que, em animais controle, a expressão de pIR, foi 73% maior que o grupo sacarina e ciclamato e 24% maior que os tratados com dieta adicionada de sacarina isolada.

Já nos animais que tiveram, em sua ração, a adição de sacarose, foi visto um aumento na expressão em 19% ao serem comparados com o controle, 106% e 48% maior que os grupos expostos a dieta acrescida de sacarina e ciclamato e apenas sacarina, respectivamente.

Também, em nossos estudos, comparamos os resultados referentes às variações na expressão de pIR quando comparamos os animais submetidos à infusão icv de insulina com seus pares submetidos à infusão de solução salina. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 12 (anexo).

Gráfico 7 – Expressão da proteína IR nos grupos estudados

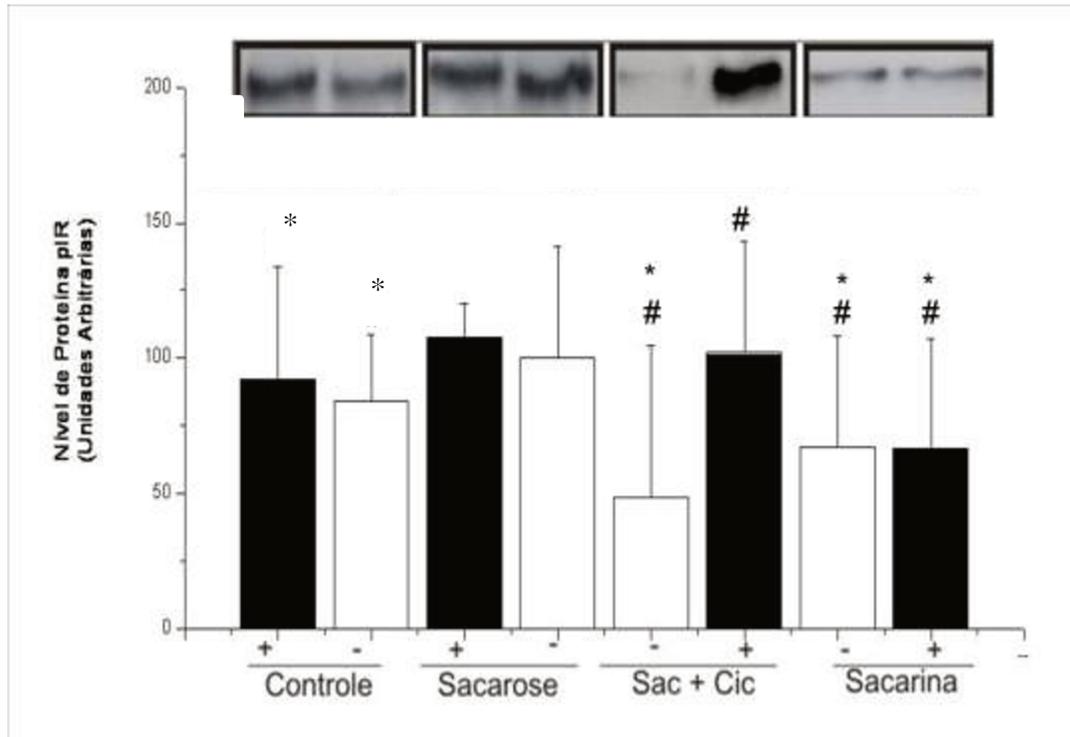


Estímulo, icv, de insulina (+) ou salina (-) (10^{-6} M (2 μ l); (n =1-3)

* Redução na expressão em relação ao Controle.

Redução na expressão em relação à Sacarose

Gráfico 8 – Expressão da proteína pIR nos grupos estudados



Estímulo, icv, de insulina (+) ou salina (-) 10^{-6} M (2 μ l); (n= 1-3)
 * Redução na expressão em relação ao Controle
 # Redução na expressão em relação à Sacarose

Gráficos (7)-(8) *Western blot* de extrato hipotalâmico de animais controles e tratados submetidos à dieta padrão, com adição de sacarose, com adição de sacarina e ciclamato e com adição de sacarina isolada.

(7) Expressão de IR em Hipotálamo de rato. (8) Expressão de pIR em Hipotálamo de rato.

(-) Estímulo de Salina (+) Estímulo de Insulina.

Barras representam a média das observações, nas quais o (n = 1-3).

b) IRS 1 e pIRS 1

Os resultados referentes às variações na expressão de IRS1 quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de insulina, encontram-se sumarizados na tabela 13 (anexo).

Verificamos que, nos animais que tiveram adicionados à ração os edulcorantes sacarina e ciclamato e que foram estimulados com insulina uma expressão de IRS1, 79% menor que o grupo controle e 83% menor que os submetidos à dieta com sacarose. Aqueles que a dieta foi acrescida de sacarina observamos uma redução na expressão de IRS 1 de 41% e 51% ao serem comparados, respectivamente, com o grupo controle e sacarose.

Adicionalmente, os resultados referentes às variações na expressão de IRS 1 quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de solução salina, encontram-se sumarizados na tabela 14 (anexo).

Nos animais que não foram estimulados com insulina, verificamos que, também, houve redução na expressão da proteína IRS1 nos grupos tratados com edulcorante, associado ou não, em relação aos animais controle e tratados com sacarose.

Foi observada uma redução de 51% na expressão de IRS no grupo submetido à dieta com sacarina e ciclamato em relação ao grupo controle e 43% menor que o grupo sacarose.

Verificamos, ainda, uma menor expressão dessa proteína no grupo submetido à dieta acrescida de sacarina isolada, sendo 60% menor que o grupo controle e 53% menor que o grupo que a dieta teve adição de sacarose.

Também, em nossos estudos, comparamos os resultados referentes às variações na expressão de IRS 1 quando comparamos os animais submetidos à infusão icv de insulina com seus pares submetidos à infusão de solução salina. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 15 (anexo).

Já os resultados referentes às variações na expressão de pIRS 1 quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de insulina, encontram-se sumarizados na tabela 16 (anexo).

Vimos, no grupo que consumiu o edulcorante sacarina e ciclamato e que foi submetido à injeção, icv, de insulina, uma redução na expressão em 33% ao ser comparado ao grupo controle e 30% menor que os animais do grupo sacarose.

Ao analisarmos a expressão da forma fosforilada da proteína, ou seja, pIRS verificamos uma menor expressão ao ser comparado ao grupo controle (66%) e sacarose, 65%.

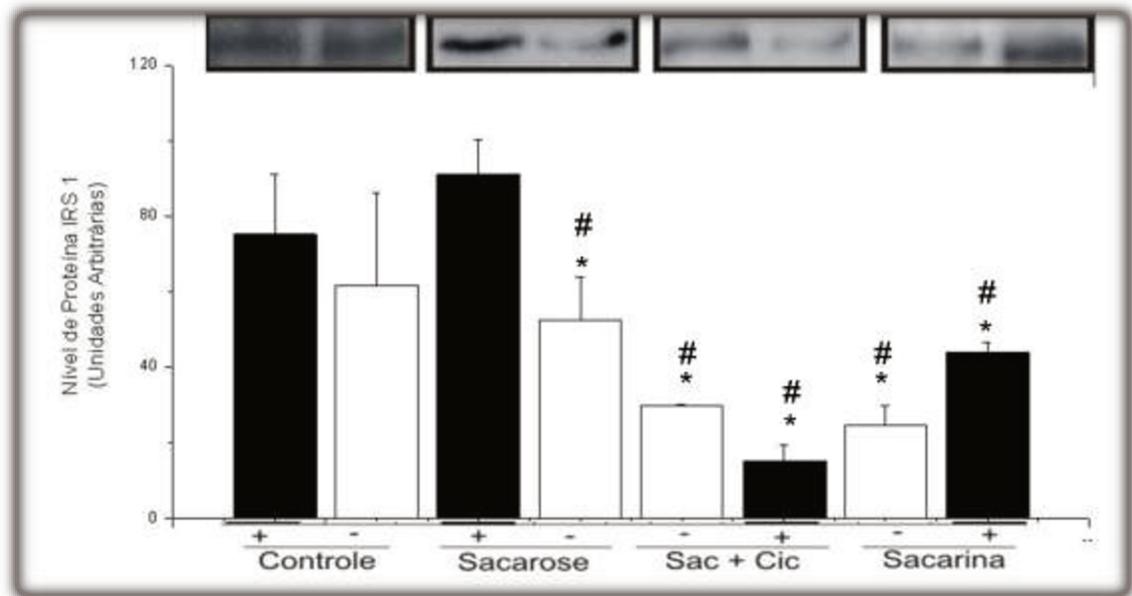
Adicionalmente, os resultados referentes às variações na expressão de pIRS 1 quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de solução salina, encontram-se sumarizados na tabela 17 (anexo).

Nestas tabelas, verificamos nos animais alimentados com dieta acrescida de sacarina e ciclamato e não estimulados com insulina uma redução em 75% na expressão de pIRS1 em relação ao controle e de 69% em relação aos animais que tiveram alimentação acrescida de sacarose.

Nos animais pertencentes ao grupo que a ração teve adição de sacarina e da mesma forma não tiveram estímulo de insulina, observamos uma expressão de pIRS1, 60% menor que os animais do grupo controle e 51% menor que os animais submetidos à ração com sacarose.

Também, em nossos estudos, comparamos os resultados referentes às variações na expressão de pIRS 1 quando comparamos os animais submetidos à infusão icv de insulina com seus pares submetidos à infusão de solução salina. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 18 (anexo).

Gráfico 9 – Expressão da proteína IRS 1 nos grupos estudados

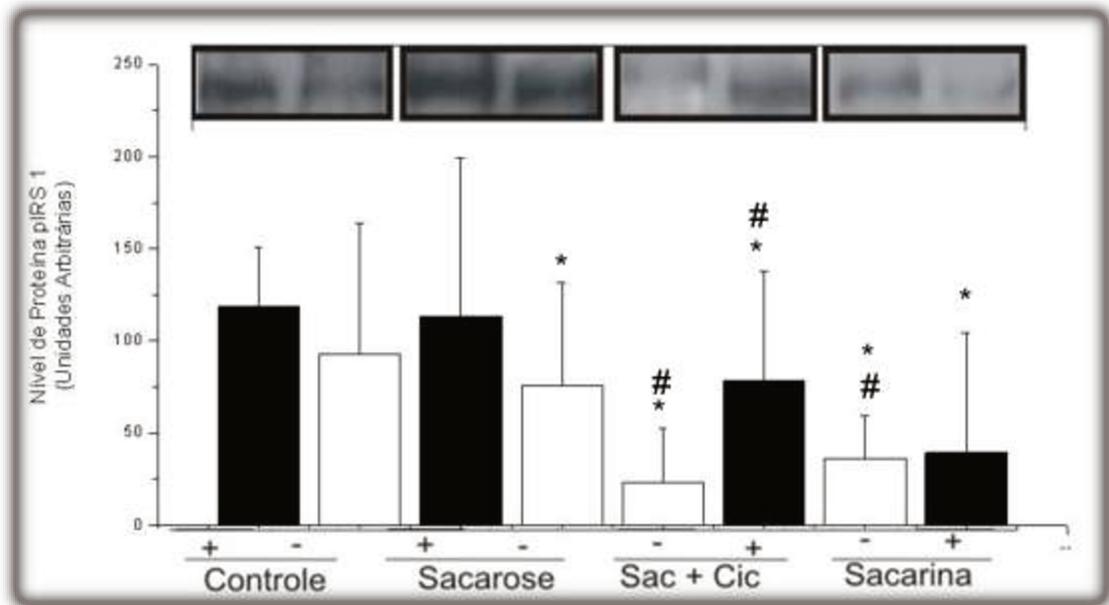


Estímulo, icv, de insulina (+) ou salina (-) 10^{-6} M (2μ l); ($n=1-3$).

* Redução na expressão em relação ao Controle.

Redução na expressão em relação à Sacarose

Gráfico 10 – Expressão da proteína pIRS 1 nos grupos estudados



Estímulo, icv, de insulina (+) e salina (-). 10^{-6} M (2μ l); (n=1-3)

* Redução na expressão em relação ao Controle.

Redução na expressão em relação à Sacarose

Gráficos (9)-(10) *Western blot* de extrato hipotalâmico de animais controles e tratados submetidos à dieta padrão, com adição de sacarose, com adição de sacarina e ciclamato e com adição de sacarina isolada.

(9) Relação IRS 1 em Hipotálamo de rato.

(10) Expressão de pIRS1 em Hipotálamo de rato.

(-) Estímulo de Salina (+) Estímulo de Insulina

Barras representam a média das observações, nas quais o n = 1-3.

c) Akt e pAkt

Os resultados referentes às variações na expressão de Akt quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de insulina, encontram-se sumarizados na tabela 19 (anexo).

Nesses animais que receberam estímulo de insulina podemos observar que houve diferença entre os animais submetidos a dietas com edulcorante e os que não receberam esse tipo de dieta na expressão da proteína Akt.

Ao compararmos os animais que consumiram a dieta com sacarina e ciclamato com os controles, notamos que houve uma redução de 67% na expressão de Akt e de 52% quando comparamos com o grupo que consumiu a dieta com sacarose.

Ainda, nos animais estimulados com insulina e submetidos à dieta com sacarina notamos que houve uma expressão 59% menor que o grupo controle e uma redução de 40% que aqueles tratados com a dieta acrescida de sacarose.

Adicionalmente, os resultados referentes às variações na expressão de Akt quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de solução salina, encontram-se sumarizados na tabela 20 (anexo).

Deste modo, os animais controle que tiveram a infusão de salina, icv, apresentaram uma expressão 28% menor que os animais do grupo sacarose, mas uma expressão 34% e 10%, respectivamente, maior que aqueles animais cuja dieta teve adição de sacarina e ciclamato e apenas de sacarina.

Notamos, também, que comparando os animais estimulados com salina e que consumiram sacarose com os submetidos à dieta com edulcorante sacarina associada ao ciclamato um aumento na expressão da proteína Akt de 86% e 53% maior que os animais do grupo sacarina.

Também, em nossos estudos, comparamos os resultados referentes às variações na expressão de Akt quando comparamos os animais submetidos à infusão icv de insulina com seus pares submetidos à infusão de solução salina. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 21 (anexo).

Já os resultados referentes às variações na expressão de pAkt quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de insulina, encontram-se sumarizados na tabela 22 (anexo).

Percebemos, no grupo controle, que houve uma redução na expressão da pAkt de 13% ao compararmos com os animais do grupo da sacarose e ainda uma menor expressão ao comparar com os animais cuja dieta teve adição de sacarina e ciclamato e sacarina, essa redução foi de 46% e 20%, respectivamente.

Comparando o grupo que consumiu sacarose aos que consumiram edulcorantes e do mesmo modo tiveram o estímulo, icv, de insulina, notamos uma

expressão de pAkt 38% menor que os animais que ingeriram sacarina e ciclamato e uma redução de apenas 7% em relação aos que consumiram sacarina isolada.

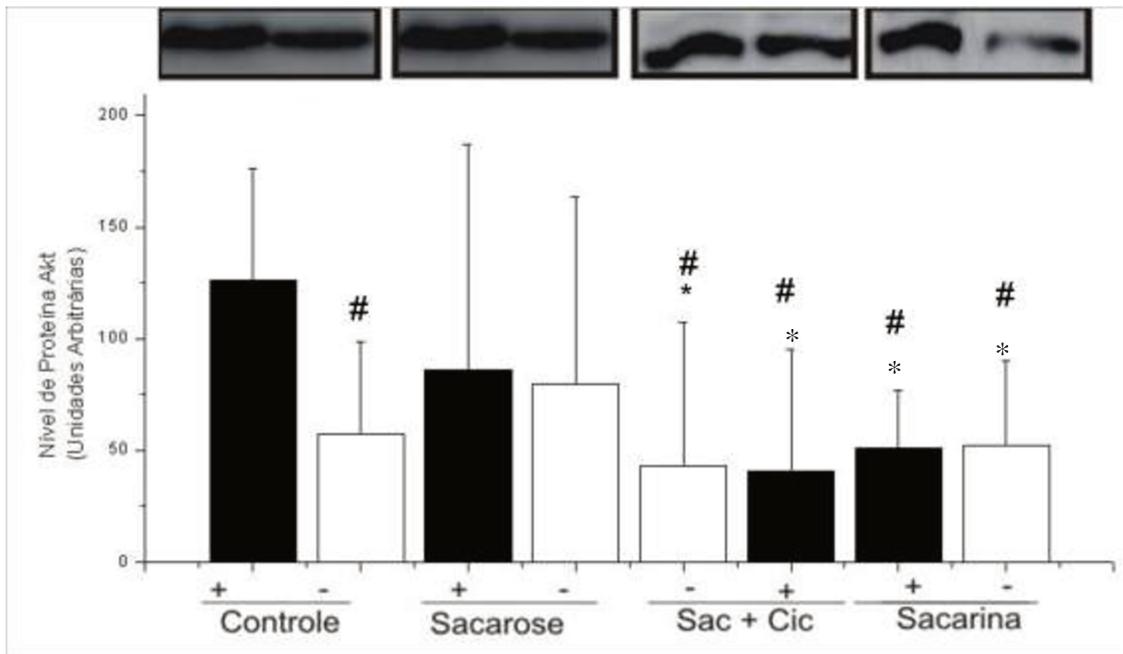
Adicionalmente, os resultados referentes às variações na expressão de pAkt quando comparamos, entre os grupos estudados, os animais submetidos à infusão icv de solução salina, encontram-se sumarizados na tabela 23 (anexo).

Assim, nos animais controles que não receberam estímulo de insulina verificamos uma redução na expressão de pAkt de 90% ao comparamos com os animais do grupo submetido à dieta com sacarose, 92% menor que os que pertenciam ao grupo sacarina e ciclamato e, ainda, uma menor expressão, 88%, que os que ingeriam a dieta adicionada apenas de sacarina.

Já nos animais que também, não receberam estímulo de insulina e consumiram dieta adicionada de sacarose, observamos uma redução na expressão da forma fosforilada de Akt de 13% ao comparamos com os animais do grupo sacarina e ciclamato, mas um aumento de 28% naqueles cuja dieta teve acréscimo apenas de sacarina.

Também, em nossos estudos, comparamos os resultados referentes às variações na expressão de pAkt quando comparamos os animais submetidos à infusão icv de insulina com seus pares submetidos à infusão de solução salina. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 24 (anexo).

Gráfico 11 – Expressão da proteína Akt nos grupos estudados

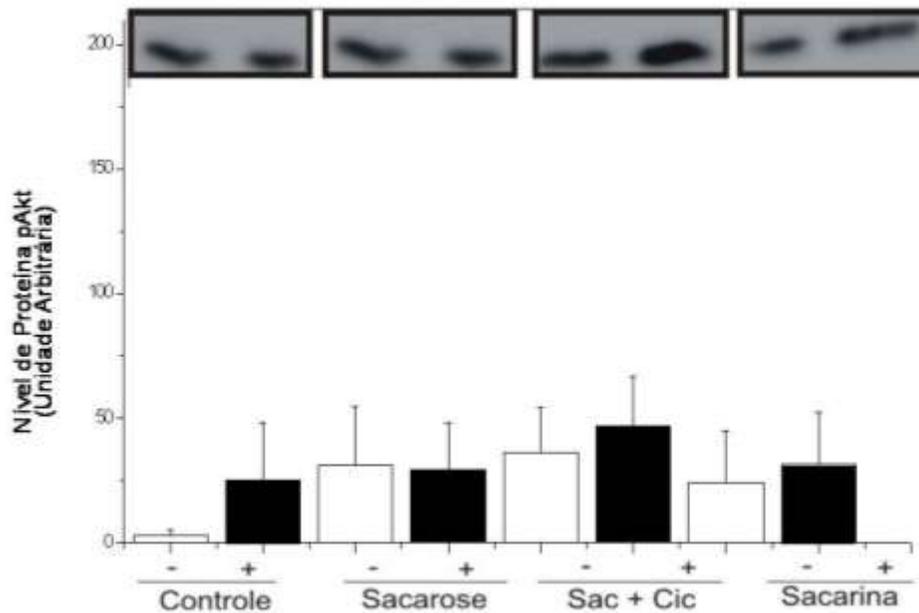


Estímulo, icv, de insulina (+) e salina (-). 10^{-6} M (2μ l); ($n=1-3$)

* Redução na expressão em relação ao Controle.

Redução na expressão em relação à Sacarose

Gráfico 12 – Expressão da proteína pAkt nos grupos estudados



Estímulo, icv, de insulina (+) e salina (-). $10^{-6}M$ ($2\mu l$); ($n=1-3$)

Gráficos (11)-(12) *Western blot* de extrato hipotalâmico de animais controles e tratados submetidos à dieta padrão, com adição de sacarose, com adição de sacarina e ciclamato e com adição de sacarina isolada.

(11) Expressão de Akt em Hipotálamo de rato.

(12) Expressão de pAkt em Hipotálamo de rato.

(-) Estímulo de Salina (+) Estímulo de Insulina

Barras representam a média das observações, nas quais o $n = 1-3$.

10. DISCUSSÃO

10.1. Discussão dos resultados fisiológicos

Neste trabalho de investigação procurou-se avaliar diferentes parâmetros que evidenciassem as alterações no volume de ingestão, peso, acúmulo de tecido adiposo epididimal e a sensibilidade à insulina para, posteriormente, correlacioná-los com o consumo de edulcorantes e sacarose.

Deve-se considerar que a gênese da resistência à insulina não é decorrente de um único agente causal. Muito provavelmente essa patologia é um fenômeno complexo no qual vários defeitos genéticos, alterações fenotípicas, presença de patologias (obesidade), estilo de vida (padrão alimentar inadequado e inatividade física) e, ainda, stress ambiental (uso de medicamentos) se combinam para gerar o quadro de resistência.

Diante das mudanças no padrão alimentar e no estilo de vida da sociedade moderna, torna-se cada vez mais comum a instalação da síndrome plurimetabólica e o surgimento de diversas situações clínicas que podem ser prejudiciais ao organismo. Com isso, relacionar os fatores capazes de evitar ou auxiliar na prevenção e tratamento dessa patologia é de grande interesse para pesquisadores do mundo inteiro a fim de tornar as conseqüências do quadro algo menos prevalente na população (Pauli et al., 2008; Pereira et al. 2003; Pi-Sunyer, 2002).

Assim, por meio da análise dos dados referentes aos padrões fisiológicos obtidos durante a pesquisa, podemos perceber que os mesmos confirmam achados prévios existentes na literatura.

Segundo Blundellet et al. 1996, os adoçantes podem ser adicionados a materiais não doces com função de prover doçura sem alterar o valor energético (procedimento aditivo) ou para substituir o carboidrato doce, com o objetivo de manter o nível equivalente de doçura, enquanto reduz o consumo energético

(procedimento substitutivo), sendo o primeiro relatado como estimulador do apetite.

O uso de adoçantes no intuito de perder ou manter o peso corporal tem desencadeado aumento no número de consumidores, tornando seu uso cada vez mais comum, por esses acreditarem que os adoçantes artificiais sejam classificados como “alimentos saudáveis”.

Vários dados epidemiológicos sugerem o contrário já que demonstram uma correlação positiva entre o uso desses adoçantes e o ganho de peso e há indicações na literatura científica de que o uso de adoçantes artificiais isolados não auxilia na perda de peso.

De acordo com Picardi, 2007, diversos grupos tem procurado caracterizar os defeitos da transdução do sinal da insulina no hipotálamo e relacioná-los a alterações no controle de eventos fisiológicos controlados pelo mesmo como, por exemplo, a fome.

Evidências atuais sugerem que adoçantes artificiais não ativam as vias responsáveis pela saciedade da mesma forma que os adoçantes naturais e, ainda, ativam ramos diferentes do paladar, podendo agir como agentes estimulantes do apetite.

Dessa maneira, a não ativação das vias para recepção de alimentos doces após a ingestão de adoçantes pode aumentar o apetite, visto que a ingestão do mesmo não está associada a nenhum tipo de nutriente.

Sabe-se que o aumento do peso corporal pode diminuir a sensibilidade à ação da insulina, aumentando o risco de desenvolvimento da resistência à insulina (RI), capaz de iniciar uma cascata de reações metabólicas, que culmina na instalação de dislipidemias, diabetes, aumento nos níveis de ácidos graxos livres na circulação, dentre outros danos ao organismo. A esse conjunto de patologias dá-se o nome de “Síndrome Metabólica” ou “Síndrome “X” (Pi-Sunyer, 2002; Pereira-da-silva, 2003; Silva, 2005).

Foi possível verificar em nosso estudo o efeito do consumo de edulcorantes sobre o peso, ingestão alimentar e taxa de desaparecimento da glicose (Kitt), quando presentes na dieta de ratos *Wistar*.

O grupo controle apresentou um ganho de peso corporal médio de 359,3 gramas, resultado semelhante ao grupo de animais submetidos à dieta adicionada de sacarina associada a ciclamato, que foi de 358,6 gramas. O percentual de ganho de peso ponderal durante o tratamento foi muito próximo nesses grupos, observando-se uma diferença de apenas 0,21% entre as médias desses grupos, sugerindo que o uso de edulcorantes pode não exercer influência na regressão do quadro de obesidade.

Por não haver em sua dieta a presença em nível elevado de glicose ou outra substância capaz de alterar o metabolismo desse nutriente, não havia fator que justificasse uma alteração na ação da insulina nesse grupo, comprovados pelos resultados do Kitt médio de $5,36\%/min^{-1}$, maior em 16%, do que o valor encontrado no grupo sacarose, 30% a mais que o grupo sacarina e ciclamato e 39% maior que aqueles tratados com sacarina.

Adicionalmente, os dados do gráfico 4 sugerem que os animais que pertenciam ao grupo dos edulcorantes apresentaram uma menor sensibilidade à ação da insulina, quando comparados aos grupos controle e sacarose, verificado a partir de uma menor taxa de desaparecimento da glicose.

Também, conforme indicado no gráfico 5, observou-se que os animais com maior peso corporal médio apresentaram, também, uma maior tendência ao desenvolvimento do quadro de resistência ao hormônio.

Em relação ao grupo tratado com adição de sacarose em sua dieta, podemos observar uma ingestão 19 % em média menor que o valor encontrado no grupo controle, 23 % menor que os pertencentes ao grupo sacarina e 8,36% inferior ao grupo sacarina e ciclamato. Este resultado pode estar relacionado com o fato de que a sacarose, em resposta fisiologicamente adequada, estimula a secreção de insulina e aumenta seus níveis no período pós-prandial,

proporcionando um aumento na saciedade e, conseqüentemente, um menor volume de ingestão.

Esses dados corroboram estudos anteriores na literatura de que a secreção de insulina é capaz de reduzir a ingestão alimentar (Carvalho et al., 2005).

O valor médio de Kitt nos animais submetidos à dieta com sacarose foi de 4,61%/min⁻¹. Dessa forma, esses animais apresentaram uma taxa de desaparecimento da glicose 13% inferior em média ao grupo controle, porém 11% e 20% maior em média que os grupos tratados, respectivamente, com edulcorantes associados ou não.

Hipótese levantada por Oliveira, 2011, indica que adoçantes artificiais promovem este aumento de ingestão por meio de uma falha na diminuição da atividade do hipotálamo, centro da fome no cérebro, e de uma baixa ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico, responsável pela sensação de satisfação.

Assim, a falta da saciedade, juntamente com a constante estimulação da fome, manteria o comportamento por procura de alimento no indivíduo, aumentando sua ingestão alimentar e o risco de desenvolvimento da obesidade, o qual representa um fator de risco para a instalação da resistência à insulina.

Como visto em nossos estudos, o ganho de peso dos animais tratados com sacarina e ciclamato foi em média 6,22% maior que o dos grupos analisados com sacarose (337,6 gramas), e 3,45% maior que o do grupo analisado com sacarina (346 gramas).

Ainda, o volume de ingestão dos animais alimentados com ração adicionada de sacarina foi em média de 26,2 gramas, representando um valor 30,2% maior em média que aqueles cuja dieta foi acrescida de sacarose, corroborando dados da literatura que indicam que os adoçantes podem atuar como estimuladores do apetite.

O mesmo se aplica em relação aos dados apresentados no estudo de Swithers e Davidson, 2008 de que o consumo de alimentos com menos calorias

pode levar a um maior ganho de peso do que o consumo de alimentos semelhantes, porém na versão mais calórica.

Uma alteração na palatabilidade pode ter interferido no volume de ingestão dos animais submetidos à dieta enriquecida com sacarina associada a ciclamato, dado o sabor residual presente nesse tipo de edulcorante, justificando, com isso, que os animais com esse tipo de alimentação tenham ingerido, em média, aproximadamente 11% a menor que o grupo controle.

O teste de tolerância intraperitoneal à ação da insulina nesses animais demonstrou, por meio do *Kitt*, a presença de resistência à ação desse hormônio, por meio de uma taxa média de desaparecimento de $4,12\%/min^{-1}$, ou seja, 23% menor que a verificada no grupo controle, e, aproximadamente 10% maior que o valor verificado no grupo tratado com sacarose, sugerindo que o consumo dessas substâncias pode influenciar negativamente na ação da insulina em tecidos periféricos.

Nossos resultados apontaram que os animais que consumiram a dieta rica em sacarina tiveram um ganho de peso em média 2,6% maior que os tratados com sacarose. Tais dados também foram encontrados por Feijó, 2010 comprovando que, ao invés de exibir em média menor ganho de peso por consumir menos calorias que o grupo testado com a sacarose, os animais que pertenciam ao grupo testado com sacarina ganharam em média mais peso que os animais submetidos à sacarose.

Este mesmo grupo (sacarina) apresentou um volume de ingestão em média 5%, maior que o grupo controle, sugerindo uma ação estimuladora do apetite diante do consumo desse adoçante.

O efeito inibidor da ação da insulina também foi verificado nesse grupo que apresentou a menor taxa de desaparecimento da glicose, em média, dentre os grupos estudados.

Percebe-se, então, por meio desse dado, a existência do efeito estimulador do apetite por parte dos edulcorantes e a inibição na ação da insulina após o uso dessas substâncias, vistos previamente em dados apresentados na literatura.

Também verificou-se uma menor taxa média de desaparecimento da glicose, pelo ITT, nos grupos submetidos às dietas: enriquecida com sacarina, aproximadamente, 28% menor que o valor encontrado no grupo controle, sacarina associada a ciclamato, 23% menor que o resultado do grupo controle, e sacarose, 13% menor que o dado observado no grupo controle, que foi de $5,36\%/min^{-1}$.

Isso evidencia que há um maior risco para o desenvolvimento da resistência à ação da insulina nos animais submetidos à ração com adição de alguma das substâncias estudadas, quando comparados aos animais controle.

Vale salientar que o consumo de açúcar deve ser feito com cautela dado que seu excesso está associado a uma série de patologias, por ser um alimento altamente calórico, não possuindo quase nenhum nutriente.

Conforme indicado por Oliveira, 2011, alguns estudos verificam a hipótese de que o açúcar apresenta um potencial viciante, já que ao ser ingerido desencadeia uma série de alterações neuroquímicas no corpo.

Em relação aos resultados de volume de ingestão alimentar após infusão icv de insulina ou solução salina, os resultados sugerem a presença do efeito anorexígeno da insulina nesses grupos, a partir de 4 horas após a infusão icv para os grupos de animais controle, alimentados com dieta acrescida de sacarose e de sacarina associada a ciclamato. Para os animais submetidos à dieta enriquecida com sacarina isolada, esse efeito apenas pode ser verificado 8 horas após a infusão icv.

Esse padrão diferente percebido nos animais que consumiram dieta acrescida de sacarina sugere uma possível redução da atividade desse hormônio, nesses animais, também em nível hipotalâmico, uma vez que esse mesmo grupo havia demonstrado uma maior resistência periférica à ação da insulina em seus resultados de ITT.

10.2. Discussão dos resultados moleculares

No hipotálamo de ratos submetidos aos edulcorantes, houve um decréscimo na expressão do receptor de insulina (IR), na sua forma total e na fosforilação em tirosina, mesmo pode ser visto, também, em relação ao seu substrato (IRS1).

Ao analisarmos a expressão de IR, verificamos nos grupos tratados com edulcorantes uma menor presença de receptores de insulina (IR) quando comparados ao grupo controle, independente da estimulação de solução salina ou insulina.

Dentre os grupos estudados, os animais submetidos à dieta acrescida de sacarina, quando estimulados com insulina, não apresentaram um aumento no número de IR, podendo indicar a presença, nesses animais, de resistência à ação desse hormônio no hipotálamo.

Na via clássica de sinalização da insulina, receptor de insulina (IR) recruta os substratos 1 (IRS1) e 2 (IRS2), ativando a PI3-quinase. A PI3-quinase tem papel importante na sobrevivência celular, mitogênese, migração, proliferação, e diferenciação celular, e, ainda, no transporte de glicose estimulado pela insulina. Atualmente, a PI-3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose (Velloso *et al*, 1996; Czech *et al*, 1999; Velloso *et al*, 2002).

Quanto à expressão do receptor de insulina na sua forma fosforilada, pIR, constatamos que os animais que consumiram edulcorantes, mas que não foram estimulados com insulina apresentaram uma expressão dessa proteína menor que os grupos: controle e animais submetidos à dieta rica em sacarose.

Observamos também que os animais que receberam dieta acrescida de edulcorantes, mas que foram estimulados com insulina, com exceção do grupo de animais alimentados com dieta enriquecida de sacarina, apresentaram um aumento na expressão dessa proteína, quando comparados aos seus pares que receberam infusão icv de solução salina.

Esses dados validam estudos anteriores (Ropelle et al., 2009) que sugerem que a insulina na dose estudada promove um aumento na fosforilação das proteínas de via de sinalização da insulina.

A maior expressão dessa proteína nos animais que consumiram o edulcorante sacarina associado ao ciclamato se deu, provavelmente, em resposta ao estímulo recebido pela infusão icv de insulina, quando comparados a seus pares que não receberam este estímulo, padrão semelhante ao apresentado pelos grupos que não receberam dieta acrescida de edulcorantes.

No hipotálamo, a insulina promove a ativação de pelo menos duas vias distintas de sinalização. A primeira depende do recrutamento e fosforilação em tirosina de substratos clássicos do IR, os IRSs, incluindo IRS-1 e IRS-2 (Carvalho et al., 2001; Picardi, 2007).

Em nossa pesquisa, constatamos que a expressão de IRS 1 nos grupos submetidos à dieta acrescida de edulcorantes foi menor que a verificada nos grupos: controle e sacarose, independente da estimulação de solução salina ou insulina.

Notadamente, os animais tratados com sacarina e ciclamato, quando estimulados com solução com insulina, não apresentaram um aumento na expressão de IRS 1, indicando uma possível resistência hipotalâmica à ação da insulina nesses animais.

De forma semelhante, os resultados analisados referentes à expressão da proteína pIRS 1 também indicam que o grupo de animais tratados com edulcorantes expressaram menor quantidade dessa proteína do que os grupos: controle e animais tratados sacarose, reforçando a idéia de comprometimento da via de sinalização da insulina nesses animais.

Em relação aos resultados da expressão da Akt, podemos observar que os animais tratados com edulcorantes apresentaram uma menor expressão dessa proteína quando comparados aos grupos: controle e sacarose, independente da estimulação de solução salina ou insulina.

Também se observou que os animais estimulados com solução de insulina e tratados com edulcorantes não apresentaram aumento na expressão da Akt, indicando que o estímulo desse hormônio não foi suficiente para que houvesse aumento na ativação da via sinalizadora de insulina, podendo sugerir nesses animais uma maior tendência à resistência desse hormônio a nível hipotalâmico.

Os resultados de expressão da pAKT obtidos indicam que esta proteína encontram-se aumentadas nos grupos submetidos às dietas acrescidas de edulcorantes quando comparados ao grupo controle, o que diverge da literatura revisada e sugere uma análise mais detalhada dos fatores que possam influenciar nessa via.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas houve um progresso científico considerável na compreensão dos mecanismos moleculares da ação da insulina. No entanto, é necessário elucidar outras possíveis inter-relações entre mecanismos, patologias e a sinalização da insulina a fim de proporcionar uma melhor abordagem terapêutica para os portadores de patologias, e de maneira a contribuir na prevenção das mesmas.

Sabemos que prejuízos na via de sinalização da insulina podem conduzir os animais a uma resposta hiperfágica, estimulando centros que controlam o apetite e resultando em um aumento no volume de alimento que é ingerido (Carvalho, 2003).

É possível que falhas em qualquer sistema de sinalização da insulina, ou em algum de seus elementos, resultem na menor eficiência no acoplamento das proteínas dessa via de sinalização, resultando em uma transdução de sinal fraca e insuficiente para gerar a resposta completa da captação da glicose.

Deve-se considerar que a gênese da resistência à insulina não é decorrente de um único agente causal. Muito provavelmente, a resistência à insulina é realmente um fenômeno complexo o qual ocorre combinação de diferentes situações sejam, defeitos genéticos, alterações fenotípicas e, ainda, stress ambiental (obesidade, infecções, padrão alimentar) para gerar o quadro de resistência.

A resolução destas questões exige uma compreensão completa de todo o itinerário e conseqüências funcionais da sinalização da insulina, bem como do transporte de glicose e, por esta razão, demonstra-se um campo fértil para futuras pesquisas.

12. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo sugere que a adição dos edulcorantes sacarina e ciclamato, na dieta de ratos *Wistar*, pode estimular um aumento no volume de ingestão, bem como no ganho de peso, nesses modelos de animais.

O consumo de edulcorantes pode, ainda, reduzir a ação da insulina nos tecidos periféricos desses grupos de animais, além de predispor um risco aumentado para instalação da resistência à ação da insulina nesses animais, conforme observado nos resultados do ITT.

Deste modo, a adição dos edulcorantes, sacarina e ciclamato, à dieta de ratos, pode refletir em prejuízo no perfil glicêmico do modelo experimental estudado, contribuindo para a redução na sensibilidade periférica à ação da insulina.

Nosso estudo também relacionou a adição desses edulcorantes e sacarose na dieta de ratos *Wistar* a uma possível alteração, na expressão de proteínas responsáveis pela via de sinalização de insulina, nesses animais.

Os dados sugerem uma redução na expressão das proteínas de sinalização da via da insulina, no modelo animal utilizado, cuja dieta foi adicionada de edulcorantes e, desta forma, o consumo de tais edulcorantes pode ser fator que conduz a um prejuízo na ação da insulina, também no hipotálamo.

Por fim, os resultados obtidos sugerem que a adição desses edulcorantes na dieta de ratos *Wistar* pode refletir numa menor ação do hormônio insulina, em tal modelo experimental, podendo contribuir à instalação de um quadro de resistência periférica e/ou central à ação da insulina.

13. REFERÊNCIAS

1. ABIAD. Diet e Light. Disponível em <http://www.abiad.gov.br>. Acessado: em todo decorrer da pesquisa.
2. Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994; 372: 186-90.
3. Asante-appiah, E.; Kennedy, B. P. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, v. 284, n.4, 2003, p.663-670.
4. Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos – ABIAD. Hábitos e atitudes do consumidor de produtos dietéticos e de baixo teor de gordura. São Paulo:
5. Baumann CA, Ribon V, Kanzaki M, et al. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*. 2000; 407:202-7.
6. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab.* 2000;11:351-6.
7. Blundell, J.E., Green, S.M. Effects of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *International journal of Obesity*. London: v.20, n.2, p.125-17S, 1996. Supplement.
8. Blundell, J.E., Stubbs, R.J. Diet composition and control of food intake in humans. In: Bray, G.A., Bouchard, C., James, W.P.T. *Handbook of Obesity*. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 243-272.
9. Bonora, E.; Manicardi, V.; Zavaroni, I.; Coscelli, C.; Butturini, U.

Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes and Metabolism*, v.2, p.116-21, 1987.

10. Bouchard C., Despres JP., Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocrinology Review*, Baltimore, v.14, n.1, p.72-93, 1993.
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia Alimentar para a População Brasileira: promovendo uma alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
12. Cândido, L.M.B.; Campos, A.M., Alimentos para fins especiais: dietéticos. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 423p.
13. Caputo FA, Mattes RD. Human dietary responses to perceived manipulation of fat content in a midday meal. *Int J Obes* 1993;17:241-4.
14. Carvalheira, José B.C.; Zecchin, Henrique G. and Saad, Mario J.A.. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2002, vol.46, n.4, pp. 419-425.
15. Carvalheira, José B. C.; Zecchin, Henrique G.; Saad, Mario J. A. Bases moleculares e fisiológicas da resistência à insulina, *Biologia Molecular*, v.5, n.1, 2003.
16. Carvalheira JB, Ribeiro EB, Araujo EP, *et al.* Selective impairment of insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia*. 2003.
17. Carvalheira JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ 2003 Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol*

Chem.

18. Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ, 2001. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 500:119-24.
19. Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus [letter]. *FEBS*. 2001;500:119-24.
20. Carvalheira JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, *et al.* Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res*. 2005;13(1):48-57.
21. Carvalho, Kênia Mara Baiocchi. Obesidade. *In: CUPPARI, Lilian. . Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto*. 2. ed Barueri, SP: Manole, 2005. p.149-160. *Cell* 2004; 116:337-50.
22. Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, et al. p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol*.
23. Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*. 2004;145(6):2607-12.
24. Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, *et al.* Oxymodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4696-701.
25. Coutinho W. Disponível em: www.abeso.com.br. Acessado em: 23, 24, 30 de julho de 2011.

26. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem.* 1999; 274:1865-8.
27. De angels, R. C., Tirapegui, J. *Fisiologia da Nutrição Humana: aspectos básicos, aplicados e funcionais.* 2a ed. Sao Paulo: Atheneu, 2007.
28. Dominiczack, M. H.. *Bioquímica Médica.* 2^a ed. Sao Paulo: Elsevier, 2005.
29. Elias, C. F.; Saper, C. B.; Maratos-Flier, E.; Tritos, N. A.; Lee, C.; Kelly, J.; Tatro, J. B.; Hoffman, G. E.; Ollmann, M. M.; Barsh, G. S.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.J. K. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Journal Complementation Neurology*, v. 402, p. 442-459, 1998.
30. Ferreira, F. A. G. *Nutrição humana.* 2. ed. Lisboa: Edição da Fundação *Calouste Gulbenkian*, 1994.
31. Flatt, J.P., Tremblay, A. Energy expenditure and substrate oxidation. In: Bray, G.A., Bouchard, C., James, W.P.T. *Handbook of Obesity.* New York:
32. Flier JS 2004 Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337-50.
33. Foreyt J, Goodrick K. The ultimate triumph of obesity. *Lancet.* 1995;346:134 -135.
34. Francischi, Rachel Pamfilio Prado de *et al* . Obesity: updated information about its etiology, morbidity and treatment. *Rev. Nutr.* , Campinas, v. 13, n. 1, 2000.
35. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395:763-70.

36. Friedman, J.M. Obesity in the new millennium. *Nature*, v. 404, p.632-634, april, 2000.
37. Guyton, Arthur C.; HALL, John E. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
38. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*.1998; 280:1371–1374.
39. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF)*, 2002-2003, 2004.
40. IMETRO. *Produtos Diet e Light – parte I e II*. Disponível em: <http://www.imetro.gov.br/consumidor/produtos>. Acessado em: 08 out. 2008.
41. IOTF. International Association for the Study of Obesity. *The Global epidemic*. Disponível em: <http://www.ietf.org/globalepidemic.asp>. Acessado em: out./2010.
42. Jacoby ER. PAHO regional consultation of the Americas on diet, physical activity and health. *Food Nutr Bull* 2004; 25; 2: 172-4.
43. Kahn CR, Flier JS, Bar RS, et al. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. *Insulinreceptor disorders in man*. *N Engl J Med*. 1976;294:739-45.
44. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest*. 2001;108:437-46.
45. Kopelman, Peter G. Obesity as a medical problem, *Nature*, v. 404, 2000.
46. Krause, M.V., Mahan, L. K., Escott-stump, S. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 11 ed. Sao Paulo: ROCA, 2005.

47. Cuppari, L.; *Nutrição Clínica no Adulto*. Unifesp. São Paulo. SP.
48. Lee G, Li C, Montez J, Halaas J, Darvishzadeh J, Friedman JM. Leptin receptor mutations in 129 db3J/db3J mice and NIH facp/facp rats. *Mamm Genome*.1997;8:445-7.
49. Lee Y, Wang MY, Kakuma T, et al. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem*. 2001;276:5629-35.
50. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*. 2003;278:2896-902.
51. Seidell, J.C. The impact of obesity on health status: some implications for health care costs. *Int. J. Obesity* 19 (Suppl.6), 13-16.
52. Velloso, L.A. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese – implicações no desenvolvimento da obesidade. *Arq. Bras Endocrinol Metab* vol 50 no. 2; Abril, 2006.
53. Lee, Y.H.; Giraud, J.; Davis, R.J.; WHITE, M.F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *Journal Biological Chemistry*, v.278, p.2896-2902, 2003.
54. Nandi A., Kitamura Y., Kahn CR., Accili D., Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 2004; 12:369-439.
55. Thorens B., Charron M.J., Lodish H.F.. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care*. 1990; 13(3):209-218.
56. Nelson, L. A.; *Sweeteners: Alternative*, USA: Eagan Press,1999.
57. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor - a critical link in glucose

- homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998;9:89-109.
58. Pauli, J.R; Ropelle, E.R; Cintra, D.E.; Carvalho-Filho, M.A.; Moraes, J.C.; DE Souza, C.T.; Velloso, L.A.; Carvalheira, J.B.; Saad, M.J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *Journal of Physiology*, v. 586, p.659–671, 2008.
59. Pereira-da-silva, M.; Torsonl, M.A.; Nourani, H.V.; August, V.D; Souza, C.T.; Gasparetti, A.L.; Carvalheira, J.B.; Ventrucci, G.; Marcondes, M.C.; Cruz-Neto, A.P.; Saad, M.J.; Boschero, A.C.; Carneiro, E.M.; Velloso, L.A. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology*, v. 144, p.4831–4840, 2003.
60. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:165-9.
61. Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *J Biol Chem.* 1999.
62. Philippi, Sônia Tucunduva. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos. *Revista de Nutrição, Puccamp:* v.12, n.1, p.65-80, jan./abr.,1999.
63. Pinheiro, M. V. S. *et al.* The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts - a review. *International Journal of Dairy Technology*, v. 58, n. 4, p. 193-199, 2005.
64. Pi-Sunyer, F.Xavier. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity Research*, v. 10, p. 97–104, 2002.
65. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.

Nature 1994; 372:425-32.

66. Prada, P.O.; Zecchin, H.G.; Gasparetti, A.L.; Torsoni, M.A.; Ueno, M.; Hirata, A.E.; Corezola, D.O.; Amaral, M.E.; Hoer, N.F.; Boschero, A.C.; Saad, M.J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*, v.146, p.1576–1587, 2005.
67. Programa Nacional de Combate à obesidade. Direcção Geral da Saúde. Divisão de Doenças Genéticas. Lisboa: DGS, 2005, pp 24
68. Proserpi C., *et. al.* *Ad libitum* intake of a high-carbohydrate or high-fat diet in young men: effects on nutrient balances. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.66, n.3, p.539-545, 1997.
69. Ravussin E. *et. al.* Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body weight gain. *New England Journal of Medicine*, Boston, v.318, n.8, p.467- 472,1998.
70. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease - 1988. *Nutrition*. 1998;13:65.
71. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Ann Rev Med*. 1993;44:121-31.
72. Rondó, J. W. *Prevenção: a medicina do século XXI*. São Paulo: Tenopress, 1998. p. 238-247.
73. Ropelle, E.R; Pauli, J.R; Prada, P.; DE Souza, C.T.; Picardi, P.K.; Faria, M.C.; Cintra, D.E.; Fernandes, M.F.; Flores, M.B. Velloso, L.A.; Saad, M.J.; Carvalheira, J.B. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *Journal of Physiology*, v. 577, p.997–1007 ,2006.

74. Rosado, Eliane Lopes; Monteiro, Josefina Bressan Resende. Obesity and diet macronutrients substitution. *Rev. Nutr.* , Campinas, v. 14, n. 2, 2000.
75. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA 1996 Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem* 271:22100-4
76. Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest.* 1993;92:2065-72.
77. Saltiel AR, Kahn CR 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806
78. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-71.
79. Stein, C.J; Colditz, G.A. The epidemic of obesity. *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism*, v. 89, p.2522–2525, 2004.
80. Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol.* 2003;23(22):7973-81.
81. Swithers SE, Davidson TL. A role for sweet taste: calorie Predictive relations in energy regulation by rats. *Behavioral Neuroscience*, 122(1): 161-173,2008.
82. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI 1995 Identification and expression cloning of a leptin

receptor, OB-R. Cell 83:1263-71.

83. Torsoni MA, Carvalheira JB, Pereira-Da-Silva M, de Carvalho-Filho MA, Saad MJ, Velloso LA 2003 Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. Am J Physiol Endocrinol Metab 285:E216-23
84. Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ. Insulin signaling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. Cardiovasc Res. 1998;40:96-102.
85. Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ. Insulin signaling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. Cardiovasc Res. 1998;40:96-102.
86. Velloso, L. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese implicações no desenvolvimento da obesidade, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo, São Paulo, v.50, n.2, abr. 2006.
87. Venable CL, Frevert EU, Kim YB, Fischer BM, Kamatkar S, Neel BG, Kahn BB. (2000). Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. J. Biol Chem.
88. Vilela, E.R. alimentos dietéticos e alternativos. Textos acadêmicos. Lavras: UFLA, 2000.
89. White MF, Haring HU, Kasuga M, Kahn CR. Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells. J Biol Chem. 1984;259:255-64.

90. White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem.* 1988;263:2969-80.
91. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem.* 1998;182:3-11.
- 92.
93. WHO. World Health Organization Expert Committee. *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry*, Geneva: WHO Technical Reports, n.854, 1995.
94. Willet, W. C., *Composição corporal e controle de peso*. Rio de Janeiro: 1999. p. 140-148. *Conscientiae saude. Rev. Cient., UNINOVE - Sao Paulo.* v.2, p. 104.
95. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 1997; 391:900 - 4.
96. Yang YK, Harmon CM. Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake. *Obes Rev.* 2003; 4 (4): 239 - 48.
97. Yeo GS, Farooqi is, aminian, et al. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 1998;20.
98. Zecchin HG, Bezerra RM, Carvalheira JB, et al. Insulin signaling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance - the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia.* 2003; 46: 479-91.
99. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM

1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372:425-32

100. Zhang Y, Provenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.

ANEXOS

Anexo 1 – Tabela Resumo das Distribuições Estatísticas

Tabela Resumo das Distribuições Empíricas				
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Peso	Grupo Controle	359,35	26,33	20,00
	Grupo Sacarose	337,59	19,77	20,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	358,60	22,59	20,00
	Grupo Sacarina	346,65	25,88	20,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Ingestão	Grupo Controle	55,71	104,38	16,00
	Grupo Sacarose	45,07	84,30	16,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	49,18	91,89	16,00
	Grupo Sacarina	58,68	110,02	16,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Ingestão - icv Insulina - 4 horas	Grupo Controle	3,41	0,43	3,00
	Grupo Sacarose	3,06	0,13	4,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	2,84	1,32	4,00
	Grupo Sacarina	3,19	0,78	5,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Ingestão - icv Salina - 4 horas	Grupo Controle	3,93	0,64	3,00

	Grupo Sacarose	3,51	0,27	3,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	3,83	1,02	6,00
	Grupo Sacarina	3,00	0,26	3,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Ingestão - icv Insulina - 8 horas	Grupo Controle	3,97	0,42	3,00
	Grupo Sacarose	4,35	0,50	4,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	4,02	0,86	4,00
	Grupo Sacarina	4,78	0,93	5,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Ingestão - icv Salina - 8 horas	Grupo Controle	4,17	0,38	3,00
	Grupo Sacarose	4,55	0,35	3,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	4,77	0,73	6,00
	Grupo Sacarina	5,18	0,83	3,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Kitt	Grupo Controle	5,36	3,16	10,00
	Grupo Sacarose	4,61	2,63	10,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	4,12	2,12	10,00
	Grupo Sacarina	3,84	2,62	10,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
Peso Epididimal Corrigido	Grupo Controle	5,39	2,81	6,00
	Grupo Sacarose	1,59	0,75	7,00

	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	3,54	2,75	10,00	
	Grupo Sacarina	2,74		1,85	10,00
		Média		Desvio-padrão	Número de observações
Akt - icv Insulina	Grupo Controle	126,20		49,91	9,00
	Grupo Sacarose	86,20		100,83	7,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	40,68		54,72	9,00
	Grupo Sacarina	51,00		25,98	9,00
		Média		Desvio-padrão	Número de observações
Akt - icv Salina	Grupo Controle	57,47		41,01	9,00
	Grupo Sacarose	80,04		83,23	7,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	42,89		64,29	9,00
	Grupo Sacarina	52,00		38,01	9,00
		Média		Desvio-padrão	Número de observações
pAkt - icv Insulina	Grupo Controle	25,07		23,33	3,00
	Grupo Sacarose	29,04		19,22	3,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	47,01		19,65	3,00
	Grupo Sacarina	31,50		21,09	3,00
		Média		Desvio-padrão	Número de observações
pAkt - icv Salina	Grupo Controle	2,83		2,31	3,00
	Grupo Sacarose	31,14		23,63	3,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	35,99		18,18	3,00
	Grupo Sacarina	24,23		20,58	3,00

		Média	Desvio-padrão	Número de observações
IR – icv Insulina	Grupo Controle	176,46	6,34	6,00
	Grupo Sacarose	113,84	83,69	9,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	73,45	62,23	9,00
	Grupo Sacarina	76,54	53,31	9,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
IR - icv Salina	Grupo Controle	116,12	83,86	9,00
	Grupo Sacarose	98,19	67,77	9,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	55,76	46,33	9,00
	Grupo Sacarina	83,29	54,32	9,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
pIR - icv Insulina	Grupo Controle	92,03	41,88	7,00
	Grupo Sacarose	107,78	12,42	7,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	102,00	41,51	7,00
	Grupo Sacarina	66,76	40,48	7,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
pIR - icv Salina	Grupo Controle	84,05	24,79	7,00
	Grupo Sacarose	100,00	41,33	7,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	48,43	56,51	7,00
	Grupo Sacarina	67,38	40,72	7,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
IRS1 - icv Insulina	Grupo Controle	75,18	15,76	4,00
	Grupo Sacarose	91,10	9,00	4,00

	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	15,16	4,21	4,00
	Grupo Sacarina	43,96	2,47	4,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
IRS1 - icv Salina	Grupo Controle	61,49	24,73	4,00
	Grupo Sacarose	52,45	11,33	4,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	29,82	0,20	4,00
	Grupo Sacarina	24,4	5,42	4,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
pIRS1 - icv Insulina	Grupo Controle	118,78	32,25	4,00
	Grupo Sacarose	113,28	85,69	6,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	78,57	59,07	6,00
	Grupo Sacarina	39,33	64,89	6,00
		Média	Desvio-padrão	Número de observações
pIRS1 - icv Salina	Grupo Controle	93,01	70,90	6,00
	Grupo Sacarose	75,40	56,52	6,00
	Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	23,08	29,34	6,00
	Grupo Sacarina	36,47	22,79	6,00

Anexo 2 – Tabelas referentes as variações (em percentuais), entre os grupos, na expressão das proteínas analisadas.

Tabela 7: Resumo das variações, entre grupos, na expressão de IR, em animais estimulados com infusão icv de insulina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	55,0%	140,3%	130,6%
Grupo Sacarose	-35,5%	0,0%	55,0%	48,7%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-58,4%	-35,5%	0,0%	-4,0%
Grupo Sacarina	-56,6%	-32,8%	4,2%	0,0%

Tabela 8: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de IR, em animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	18,3%	108,3%	39,4%
Grupo Sacarose	-15,4%	0,0%	76,1%	17,9%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-52,0%	-43,2%	0,0%	-33,1%
Grupo Sacarina	-28,3%	-15,2%	49,4%	0,0%

Tabela 9: Resultados das variações na expressão de IR, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao grupo análogo estimulado com solução salina
Grupo Controle estimulado com solução Insulina	52,0%
Grupo Sacarose estimulado com solução Insulina	15,9%
Grupo Sacarina associada ao ciclamato estimulado com solução Insulina	31,7%
Grupo Sacarina estimulado com solução Insulina	-8,1%

Tabela 10: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de pIR, em animais estimulados com infusão icv de insulina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	-14,6%	-9,8%	37,9%
Grupo Sacarose	17,1%	0,0%	5,7%	61,4%
Grupo Sacarina Associada a	10,8%	-5,4%	0,0%	52,8%

Ciclamato				
Grupo Sacarina	-27,5%	-38,1%	-34,5%	0,0%

Tabela 11: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de pIR, em animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	-16,0%	73,5%	24,7%
Grupo Sacarose	19,0%	0,0%	106,5%	48,4%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-42,4%	-51,6%	0,0%	-28,1%
Grupo Sacarina	-19,8%	-32,6%	39,1%	0,0%

Tabela 12: Resultados das variações na expressão de pIR, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao grupo análogo estimulado com solução salina
Grupo Controle estimulado com solução Insulina	9,5%
Grupo Sacarose estimulado com solução Insulina	7,8%

Grupo Sacarina associada ao ciclamato estimulado com solução Insulina	110,6%
Grupo Sacarina estimulado com solução Insulina	-0,9%

Tabela 13: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de IRS 1, em animais estimulados com infusão icv de insulina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	17,5%	395,8%	71,0%
Grupo Sacarose	21,2%	0,0%	500,9%	107,2%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-79,8%	-83,4%	0,0%	-65,5%
Grupo Sacarina	-41,5%	-51,7%	189,9%	0,0%

Tabela 14: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de IRS 1, em animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	17,2%	106,2%	152,1%
Grupo Sacarose	-14,7%	0,0%	75,9%	115,0%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-51,5%	-43,1%	0,0%	22,2%
Grupo Sacarina	-60,3%	-53,5%	-18,2%	0,0%

Tabela 15: Resultados das variações na expressão de IRS 1, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao grupo análogo estimulado com solução salina
Grupo Controle estimulado com solução Insulina	22%
Grupo Sacarose estimulado com solução Insulina	74%
Grupo Sacarina associada ao ciclamato estimulado com solução Insulina	-49%
Grupo Sacarina estimulado com solução Insulina	80%

Tabela 16: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de pIRS 1, em animais estimulados com infusão icv de insulina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	4,8%	51,2%	202,0%
Grupo Sacarose	-4,6%	0,0%	44,2%	188,1%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-33,8%	-30,6%	0,0%	99,8%
Grupo Sacarina	-66,9%	-65,3%	-49,9%	0,0%

Tabela 17: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de pIRS 1, em animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	23,3%	302,9%	155,0%
Grupo Sacarose	-18,9%	0,0%	226,7%	106,8%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-75,2%	-69,4%	0,0%	-36,7%
Grupo Sacarina	-60,8%	-51,6%	58,0%	0,0%

Tabela 18: Resultados das variações na expressão de pIRS 1, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao grupo análogo estimulado com solução salina
Grupo Controle estimulado com solução Insulina	27,7%
Grupo Sacarose estimulado com solução Insulina	50,2%
Grupo Sacarina associada ao ciclamato estimulado com solução Insulina	240,4%
Grupo Sacarina estimulado com solução Insulina	7,8%

Tabela 19: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de Akt, em animais estimulados com infusão icv de insulina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	46,4%	210,2%	147,4%
Grupo Sacarose	-31,7%	0,0%	111,9%	69,0%

Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-67,8%	-52,8%	0,0%	-20,2%
Grupo Sacarina	-59,6%	-40,8%	25,4%	0,0%

Tabela 20: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de Akt, em animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	-28,2%	34,0%	10,5%
Grupo Sacarose	39,3%	0,0%	86,6%	53,9%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	-25,4%	-46,4%	0,0%	-17,5%
Grupo Sacarina	-9,5%	-35,0%	21,2%	0,0%

Tabela 21: Resultados das variações na expressão de Akt, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao grupo estimulado com solução salina
Grupo Controle estimulado com solução Insulina	119,6%
Grupo Sacarose estimulado com solução Insulina	7,7%
Grupo Sacarina associada ao ciclamato estimulado com solução Insulina	-5,1%
Grupo Sacarina estimulado com solução Insulina	-1,9%

Tabela 22: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de pAkt, em animais estimulados com infusão icv de insulina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	-13,7%	-46,7%	-20,4%
Grupo Sacarose	15,8%	0,0%	-38,2%	-7,8%
Grupo Sacarina Associada a	87,5%	61,9%	0,0%	49,2%

Ciclamato				
Grupo Sacarina	25,6%	8,5%	-33,0%	0,0%

Tabela 23: Resultados das variações, entre grupos, na expressão de pAkt, em animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao Grupo Controle	Comparado ao Grupo Sacarose	Comparado ao Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	Comparado ao Grupo Sacarina
Grupo Controle	0,0%	-90,9%	-92,1%	-88,3%
Grupo Sacarose	999,1%	0,0%	-13,5%	28,5%
Grupo Sacarina Associada a Ciclamato	1170,1%	15,6%	0,0%	48,5%
Grupo Sacarina	755,1%	-22,2%	-32,7%	0,0%

Tabela 24: Resultados das variações na expressão de pAkt, em cada grupo estudado, entre animais estimulados com infusão icv de solução insulina e animais estimulados com infusão icv de solução salina

Grupos	Comparado ao grupo análogo estimulado com solução salina
Grupo Controle estimulado com solução Insulina	784,8%
Grupo Sacarose estimulado com solução Insulina	-6,8%
Grupo Sacarina associada ao ciclamato estimulado com solução Insulina	30,6%
Grupo Sacarina estimulado com solução Insulina	30,0%