

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ISOCALÓRICA DE SACARINA E SACAROSE NO  
GANHO DE PESO, INGESTÃO CALÓRICA, TOLERÂNCIA À GLICOSE E  
CONSUMO BASAL DE OXIGÊNIO EM RATOS WISTAR

DENISE ENTRUDO PINTO

Porto Alegre, 2014

DENISE ENTRUDO PINTO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ISOCALÓRICA DE SACARINA E SACAROSE NO  
GANHO DE PESO, INGESTÃO CALÓRICA, TOLERÂNCIA À GLICOSE E  
CONSUMO BASAL DE OXIGÊNIO EM RATOS WISTAR

Orientador: Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Dal Lago

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Medicina:  
Ciências Médicas da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Entrudo Pinto, Denise

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ISOCALÓRICA DE SACARINA E SACAROSE NO GANHO DE PESO, INGESTÃO CALÓRICA, TOLERÂNCIA À GLICOSE E CONSUMO BASAL DE OXIGÊNIO EM RATOS WISTAR / Denise Entrudo Pinto. -- 2014.  
69 f.

Orientador: Marcello Casaccia Bertoluci.  
Coorientador: Pedro Dal Lago.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Sacarina. 2. Sacarose. 3. Ganho de Peso. 4. Teste de Tolerância à Glicose. 5. Consumo de Oxigênio. I. Casaccia Bertoluci, Marcello, orient. II. Dal Lago, Pedro, coorient. III. Título.

*Dedico este trabalho ao meu amor e à minha família. Aos meus pais, Alcir e Norma, modelos de dedicação, altruísmo, amor, respeito, paciência e tolerância. Pela graça de tê-los comigo, por serem presença em minha vida, pelo amor, carinho e estímulo que sempre me ofertaram e, principalmente, pelos valores morais e éticos que me transmitiram.*

## Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo qualificado ensino e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e aos seus colaboradores pelo valioso aprendizado.

Ao Professor Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pela oportunidade, por acreditar nesta pesquisa e no meu trabalho.

Ao Professor Dr. Pedro Dal Lago, por oportunizar novos aprendizados no Grupo de Pesquisas em Interação Cardiopulmonar e no Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e por acreditar nesta pesquisa.

À UFCSPA por oportunizar o desenvolvimento da pesquisa.

A todos meus colegas do Laboratório de Fisiologia Experimental da UFCSPA que me proporcionaram aprendizado na área da pesquisa e pelo acolhimento.

À Ignês e à Joana do Biotério da UFCSPA que sempre foram atenciosas e prestativas.

À minha colega Me. Kelly Carraro Foletto pelo apoio fundamental durante toda a pesquisa.

Ao meu marido Pedro Ernesto Amaral da Silva pelo amor, apoio incondicional e incentivo em todos os momentos. Com certeza a minha vida fica mais completa ao teu lado.

À minha família de amigos pelo apoio e aos amigos mestres que sempre incentivaram nos momentos difíceis que surgiram no caminho.

Aos meus pais pelo apoio e educação que me proporcionaram. Em especial, ao meu pai Alcir Pereira Pinto, que sempre esteve disponível para me ajudar, me dando suporte logístico, financeiro e psicológico.

“Nós todos somos iguais, o que nos diferencia é a vontade de realizar os nossos desejos”.

Fernando Lúcio Costa (Fernandão)

## Resumo

**Introdução:** O uso de adoçantes não calóricos (ANC) pode interferir na regulação do apetite, promovendo maior ingestão alimentar, maior ganho de peso (GP) e maior adiposidade. Em estudos anteriores, do nosso grupo, os resultados mostraram que os animais que consumiram iogurte com sacarina e aspartame tiveram um maior ganho de peso comparado ao grupo que usou sacarose. Porém, como o consumo calórico total foi semelhante entre os grupos, o aumento de peso não pôde ser explicado pelo aumento de ingestão calórica. Concluímos, então, que o aumento de peso poderia estar associado à redução do gasto energético induzido pelo adoçante artificial. Estudos anteriores já sugeriram que a sacarina poderia induzir um aumento de peso, porém nenhum estudo até o momento avaliou o consumo de oxigênio basal dos animais. Nesse sentido, é possível que a sacarina possa estar determinando a redução do gasto energético e possivelmente contribuindo para um aumento na glicemia. Desse modo, o presente estudo contempla analisar o efeito da sacarina no consumo basal de oxigênio.

**Materiais e Métodos:** Foi realizado um experimento controlado com 37 ratos Wistar machos adultos pesando entre 180 e 220 g, que foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com o tipo de exposição tanto para adoçante não calórico (sacarina-SAC), adoçante calórico (sacarose-SUC) ou controle (CONT). Os suplementos foram oferecidos diariamente durante um período de 12 semanas. O ganho de peso, ingestão calórica e controle hídrico foram determinados semanalmente, o consumo basal de oxigênio determinado em repouso ( $VO_2$ ) e RER foram medidos no início do estudo, 5 e 12 semanas, e o teste de tolerância à glicose oral foi determinada nas semanas 6 e 12.

**Resultados:** O uso de sacarina promoveu maior ganho de peso que a sacarose ( $p=0,031$ ). A ingestão calórica total (kcal/g) diferiu entre os grupos ( $p=0,029$ ). Os animais que consumiram sacarina ingeriram mais ração. Os grupos apresentaram diferenças quanto à ingestão hídrica, sendo o grupo sacarina com o maior consumo (ml/g) ( $p=0,018$ ). Entretanto, o consumo de oxigênio e o quociente respiratório não foram significativos.

**Conclusão:** O ganho de peso cumulativo nos animais que consumiram sacarina não pode ser atribuído a uma redução no dispêndio de energia, medida pelo consumo de oxigênio, mas sim pelo aumento da ingestão alimentar e hídrica.

**Palavras-chave:** sacarina, sacarose, ganho de peso, teste de tolerância à glicose e consumo de oxigênio.



## **Abstract**

**Introduction:** The use of non-caloric sweeteners (ANC) can interfere with the regulation of appetite, promoting greater food intake, greater weight gain (WG) and increased adiposity. In previous data, the results showed that the animals that consumed yogurt saccharin and aspartame had a greater increase in weight compared to the group using sucrose. However, as the total calorie intake was similar between the groups, the weight increase could not be explained by the increase in caloric intake. We concluded that weight gain may be associated with decreased energy expenditure induced by artificial sweetener. Previous studies have suggested that saccharin could induce weight gain, but no study to date has evaluated the consumption of oxygen basal animals. In this sense, it is possible that saccharin may be determining reduction in energy expenditure and possibly contributing to an increase in blood glucose. Thus, this study include saccharin analyze the effect on basal oxygen consumption.

**Materials and Methods:** We conducted a controlled experiment with 37 adult male Wistar rats weighing 180-220 g were randomly divided into three groups according to the type of exposure for both non-caloric sweetener (sugar-SAC), calorie sweetener (sucrose-SUC) or control (CONT). The supplements were given daily over a period of 12 weeks. Weight gain, food intake and water control were determined weekly, basal oxygen consumption determined at rest ( $VO_2$ ) and RER were measured at baseline, 5 and 12 weeks and tolerance test oral glucose was determined at week 6 and 12.

**Results:** The use of saccharin promoted greater weight gain than sucrose ( $p = 0.031$ ). The total caloric intake (kcal/g) differ between the groups ( $p = 0.029$ ), the animals that consumed saccharin ate more food. The groups differed in water intake, and the sugar group with the highest consumption (ml/g) ( $p = 0.018$ ). However, the oxygen consumption and the respiratory exchange ratio were not significant.

**Conclusion:** The cumulative weight gain in the animals fed saccharin can not be attributed to a reduction in energy expenditure, measured by oxygen consumption, but can be explained by increased food and water intake.

**Keywords:** saccharin, sucrose, weight gain, tolerance test glucose and oxygen consumption.

## Lista de Ilustrações

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1:</b> Regulação dos principais componentes na regulação do peso corporal em um ambiente obesogênico .....	18
<b>Figura 2:</b> Regiões em que alguns hormônios gastrointestinais são secretados e suas principais funções.....	21
<b>Figura 3:</b> Linha do tempo e o consumo de adoçantes artificiais .....	24
<b>Figura 4:</b> Estrutura molecular da sacarose.....	27

### ARTIGO

<b>Figure 1A:</b> Cumulative weight gain (g) over the 12 weeks.....	55
<b>Figure 2A:</b> Cumulative of total caloric intake corrected by weight weekly (kcal/g) over the 12 weeks.,.....	56
<b>Figure 3A:</b> Cumulative energy intake of yogurt diets corrected by the weight weekly (kcal/g) over the 12 weeks.,.....	57
<b>Figure 4A:</b> Cumulative energy intake of chow corrected by the weight weekly (kcal/g) over the 12 weeks.....	58
<b>Figure 5A:</b> Cumulative water intake corrected by the weight weekly (ml/g) over the 12 weeks.....	59
<b>Figure 1B:</b> Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) on the 6 week .....	60
<b>Figure 2B:</b> Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) on the 12 week .....	61
<b>Figure 4A:</b> VO <sub>2</sub> conducted on baseline, 5 and 12 week .....	62
<b>Figure 4B:</b> RER conducted on baseline, 5 and 12 week .....	63

## Lista de Tabelas

### ARTIGO

Table 1. Weight, caloric and water intake parameters.....	53
Table 2. VO <sub>2</sub> , RER and OGTT parameters.....	54

## Lista de Abreviaturas

**ANC:** Adoçantes Não Calóricos  
**ARC:** Núcleo Arqueado  
**ATP:** Adenosina Trifosfato  
**BE:** Balanço Energético  
**TRCA:** Transcrito Regulador por Cocaína e Anfetamina  
**CCK:** Colecistoquinina  
**CO<sub>2</sub>:** Gás Carbônico  
**DM2:** Diabetes Mellitus Tipo 2  
**GPP-1:** Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1  
**IA:** Ingestão Alimentar  
**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**NHL:** Hipotálamo Lateral  
**NPY:** Neuropeptídeo Y  
**NTS:** Núcleo do trato solitário  
**O<sub>2</sub>:** Oxigênio  
**OGGT:** Oral glucose tolerance test  
**OMS:** Organização Mundial da Saúde  
**POMC:** Pró-Opiomelanocortina  
**PP:** Polipeptídeo Pancreático  
**PYY:** Peptídeo yy  
**QR:** Quociente Respiratório  
**SGLT1:** Cotransportador Sódio-Glicose1  
**SM:** Síndrome Metabólica  
**SNC:** Sistema Nervoso Central  
**SUS:** Sistema Único de Saúde  
**TG:** Triglicerídeos  
**TGI:** Trato Gastrointestinal  
**VMH:** Hipotálamo Ventromedial  
**α-MCH:** Hormônio α-Melanócito Estimulante

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	16
2.2 Epidemiologia da Obesidade .....	16
2.3 Etiologia da Obesidade .....	17
2.4 Controle Alimentar e Balanço Energético .....	17
2.5 Regulação do Apetite .....	18
2.6 SNC, Trato Gastrointestinal e Saciedade .....	19
<b>3. ADOÇANTES NÃO CALÓRICOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 ANC e Ganho de Peso Corporal .....	23
3.1.2 Mecanismos Intestinais, percepção do sabor e saciedade....	25
3.1.3 Teoria de Pavlov .....	25
3.2 Sacarina .....	26
3.2.1 Sacarina e Ganho de Peso .....	28
3.2.2 Sacarina e Mecanismos Neuroendócrinos .....	29
<b>4.0 CONSUMO DE OXIGÊNIO .....</b>	<b>29</b>
<b>3 MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>31</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Objetivo Geral .....	32
4.2 Objetivos Específicos .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
<b>4 ARTIGO .....</b>	<b>43</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>64</b>

ANEXOS..... 67

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é o resultado de diversos fatores, incluindo hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, alterações hormonais, assim como problemas psicológicos. Um dos métodos para a baixa ingestão calórica e controle do peso corporal é a substituição do açúcar por adoçantes não calóricos (ANC) na dieta (1).

A ingestão de ANC tem aumentado entre pessoas de todas as idades. Estudos populacionais indicam que a ingestão total aumentou em 28% e essa tendência é altamente prevalente entre as crianças, especialmente quando se trata de consumo de bebidas. A análise dos dados da *National Health and Nutrition Examination* (NHNE), entre 1999 e 2008, mostrou que a ingestão de ANC em bebidas aumentou de 6,1% para 12,5% entre as crianças e de 18,7% para 24,1% entre os adultos (2).

Nos últimos anos, alguns estudos epidemiológicos indicaram que a utilização de produtos que contenham adoçantes pode estar associado de forma positiva com a incidência de sobrepeso e obesidade, além de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença cardiovascular e síndrome metabólica (SM) (3-5). Segundo Suez (2014), estudos mostram benefícios para o consumo ANC e a não indução de respostas glicêmicas, enquanto outros demonstram essa associação. Porém, a interpretação dos estudos se torna complexa, tendo em vista que a população que ingere ANC já sofre de alterações metabólicas (6).

Contudo, a hipótese de que o uso de ANC pode interferir no controle de peso, na glicose e induzir ao maior ganho de peso tem sido evidenciada em diversos estudos experimentais e ensaios clínicos randomizados (7, 8).

Swithers e Davidson (2008) conduziram uma série de experimentos controlados em que evidenciaram que o uso de sacarina implicou na menor habilidade de compensar calorias, promovendo maior ingestão calórica total, maior ganho de peso e adiposidade, quando comparado ao uso de glicose (9).

O presente estudo é um seguimento da linha de pesquisa que o nosso grupo está desenvolvendo sobre a ingestão de ANC e ganho de peso. Em um estudo preliminar, realizado em 2012 pelo grupo no Laboratório de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), durante 12 semanas, foi comparado o efeito dos adoçantes (sacarina e aspartame) *versus* sacarose no ganho de peso e

ingestão alimentar em ratos Wistar. Foi observado que a sacarina e o aspartame promoveram maior ganho de peso comparado à sacarose (10).

Foram analisados ratos machos wistar (n=30) pesando em torno de 200 g. Os ratos foram divididos em grupos (n=10): sacarina (SAC), aspartame (ASP) e sacarose (SUC). Foi oferecido ração padrão e água diariamente para todos os grupos. O protocolo utilizado para a preparação das dietas foi do estudo de Swithers & Davidson (2008). Foram oferecidos 20 ml de iogurte com 20% de sacarose, 0,3% sacarina sódica ou 0,4% aspartame. A densidade calórica dos iogurtes era de 0,9 kcal/g adoçado com sacarose e 0,5 kcal/g adoçado com sacarina e aspartame. Foram analisados durante as 12 semanas: peso total dos animais (g), ingestão calórica total (iogurte e ração) e aumento de peso total do período.

Os resultados mostraram que os grupos que consumiram iogurte com sacarina e aspartame tiveram um aumento de peso comparado ao grupo que usou sacarose. Porém, como o consumo calórico total foi semelhante entre os grupos, o aumento de peso não pôde ser explicado pelo aumento de ingestão calórica. Concluímos, então, que o aumento de peso poderia estar associado à redução do gasto energético induzido pelo adoçante artificial. Estudos anteriores já sugeriram que a sacarina poderia induzir um aumento de peso, porém nenhum estudo até o momento avaliou o consumo de oxigênio basal dos animais.

Nesse sentido, é possível que a sacarina esteja determinando a redução do gasto energético e, possivelmente, contribuindo para um aumento na glicemia. Assim, estamos propondo investigar a relação causa-efeito entre adoçantes artificiais, redução do consumo de oxigênio e tolerância à glicose, analisando de forma longitudinal o consumo de oxigênio de ratos, usando sacarina e sacarose em comparação ao placebo. Nossa hipótese, é que a sacarina apresente menor consumo de oxigênio em relação ao placebo e à sacarose, em repouso.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão de literatura está focada nos aspectos relacionados aos principais efeitos da sacarina como adoçante não calórico e a sua relação com o controle de apetite, balanço energético, ganho de peso corporal e consumo de oxigênio. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Pubmed, Scielo, LILACS e banco de teses da UFRGS no período de 1960 a 2014. Foram realizadas buscas através dos seguintes termos “non caloric sweetener”, “saccharin”, “weight gain” and “oxygen consumption”.

### 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade representa um importante problema de saúde pública e foi definida como a epidemia do século XXI. Entre os anos de 1980 e 2008, nos Estados Unidos e no Reino Unido as taxas da doença duplicaram entre os adultos (11).

No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), relativos ao biênio 2002-2003, 40% da população apresenta excesso de peso (IBGE, 2004). Em 2010, a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2008-2009) constatou que de 1974-1975 a 2008-2009 a prevalência de excesso de peso em adultos aumentou de 18,5% para 50,1% no sexo masculino e no sexo feminino de 28,7% para 48,0% (12).

Os custos relacionados à obesidade são estimados em milhões de dólares, com um grande impacto em despesas médicas, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, um estudo retrospectivo analisou os gastos que a obesidade gerou no Sistema Único de Saúde (SUS) em um período de três anos, de 2008 a 2010. Foi estimado que em um ano foram gastos mais de US\$ 2 bilhões de dólares em procedimentos ambulatoriais e hospitalizações (13).

O crescimento do sobrepeso e obesidade está relacionado com uma dieta rica em açúcar e gorduras (14,15). Existem duas fortes teorias que podem explicar esse crescimento, conforme alguns estudos, a teoria neoclássica e a comportamental. A teoria neoclássica, defendida por Philipson (2008), é de que as taxas de obesidade estão cada vez maiores pelo progresso da tecnologia que levou à redução da atividade física e diminuição acentuada nos preços dos alimentos (16).

Já a teoria comportamental, relaciona o aumento da ingestão calórica com o acréscimo da melhora na tecnologia e redução dos preços dos alimentos e do tempo de preparação dos mesmos, aumentando, então, o consumo de alimentos industrializados, alta densidade calórica e de fácil preparo (17).

### 2.3 ETIOLOGIA DA OBESIDADE

Nos últimos anos, as pesquisas buscam identificar os fatores que contribuem na obesidade. Existem elementos que estão relacionados à doença e que são influenciados por fatores genéticos, como o balanço energético e fatores ambientais, dieta e sedentarismo (18).

### 2.4 CONTROLE ALIMENTAR E BALANÇO ENERGÉTICO

O consumo de energia e o gasto energético são importantes para o controle de peso corporal, assim como a oxidação de macronutrientes. A obesidade pode ser o resultado desse desequilíbrio. A hiperfagia, a taxa metabólica basal reduzida e baixas taxas de oxidação de gorduras, assim como atividade simpática reduzida podem levar à obesidade em modelos experimentais. Em humanos, foram encontrados fatores similares naqueles que são suscetíveis ao ganho de peso (Figura 1) (19).

#### 2.4.1 Balanço Energético

O balanço energético (BE) é a relação da ingestão de macronutrientes, gasto energético e termogênese. O aumento de peso corporal ocorre quando a ingestão é maior que o gasto energético, resultando em um BE positivo, enquanto o negativo resulta em um efeito oposto (20).

Estudos prospectivos realizados em indígenas do estado do Arizona, onde a população é prevalente à obesidade, foram encontrados quatro fatores metabólicos reduzidos que podem gerar o ganho de peso corporal: taxa metabólica basal, atividade do sistema nervoso simpático, atividade física e oxidação de gordura (21).

A complexidade do BE envolve vários fatores fisiológicos, como os neuronais, endócrinos, adipocitários e entéricos, que atuam em conjunto na regulação da ingestão alimentar (IA). Existem dois mecanismos que interferem na IA, os regulatórios, de curto e longo prazo. Esses sistemas, em condições normais, têm como objetivo a manutenção do peso corporal constante apesar da ingestão

energética diferenciada ao longo do dia, contribuindo, assim, para a homeostase do BE (22).

## 2.5 REGULAÇÃO DO APETITE

Os mecanismos para o controle alimentar e saciedade envolvem a relação entre o trato gastrointestinal (TGI), sistema nervoso central (SNC), parassimpático, simpático e tecido adiposo (23). Os estudos de intervenção nutricional visam a regulação do apetite e a sensação de saciedade para melhorar a aderência dos pacientes ao tratamento, objetivando a manutenção ou a redução de peso corporal (24).

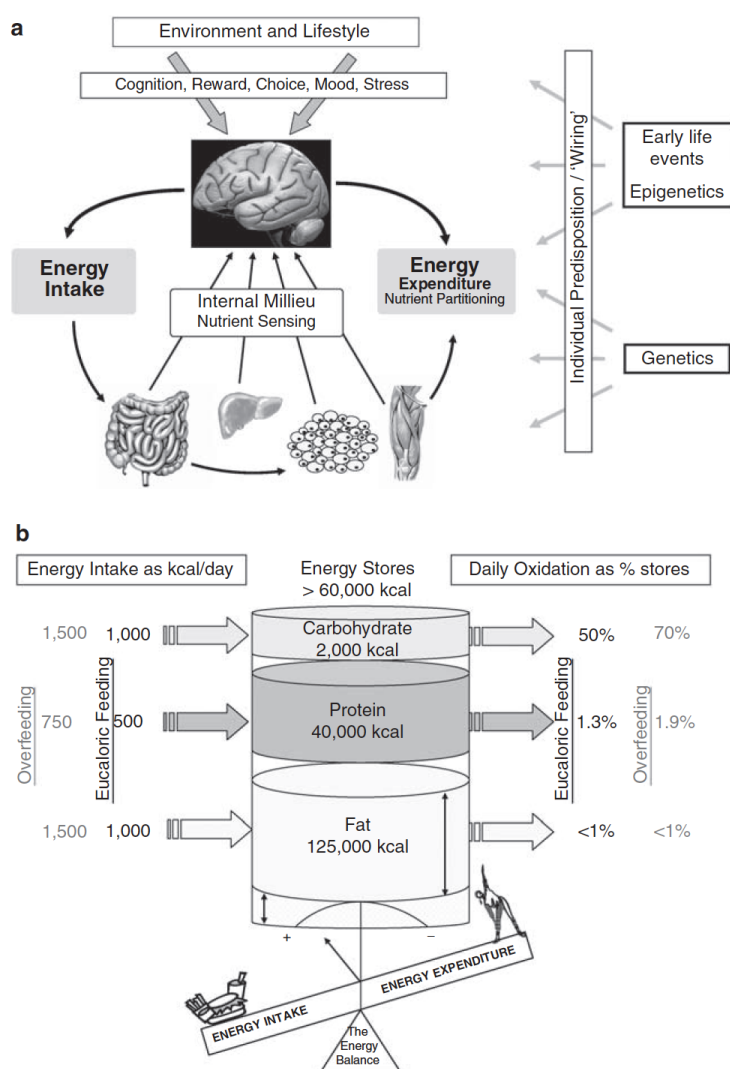


Figura 1. Regulação dos principais componentes na regulação do peso corporal em um ambiente obesogênico (19).

O apetite é definido pela fome, saciedade e saciação. A fome é um estado biológico que induz a ingestão dos alimentos e é controlado por fatores metabólicos, cognitivos e sensoriais (25). Após a IA, ocorre a estimulação da saciedade e isso pode determinar o período entre as refeições. Já a saciação está associada à redução da fome e limita a quantidade de energia consumida durante as refeições (26). Portanto, é fundamental que as considerações sobre o apetite, como um determinante do comportamento alimentar e do BE, contemple tanto a saciedade quanto a saciação (22).

O apetite é regulado por um complexo de sinais centrais e periféricos, que interagem a fim de modular a resposta individual e a IA. Essa regulação periférica inclui sinais de saciedade e de adiposidade, enquanto que o controle central é realizado por diversos fatores, incluindo os sistemas endocanabinoide, neuropeptidérgicos e monoaminérgicos (25).

Evidências recentes demonstram que o início da refeição parece estar associado bioquimicamente em casos graves de privação de energia, pois normalmente é controlada por fatores sociais, culturais e ambientais estritamente relacionados com o estilo de vida (27, 28). O controle bioquímico da ingestão calórica é bastante relacionado com o término da refeição através da modulação do tamanho da refeição e sensação de plenitude, de acordo com as necessidades de energia (25). Conforme a teoria glucostática, o núcleo relacionado com a alimentação está localizado no hipotálamo lateral (NHL), que capta a queda de glicose no período pós-prandial no sangue e estimula a ingestão de alimentos. A hiperglicemia subsequente pós-prandial ativa o núcleo da saciedade no hipotálamo ventromedial (VMH), que inibi o NHL com a supressão do comer (29).

## 2.5 SNC, Trato Gastrointestinal e Saciedade

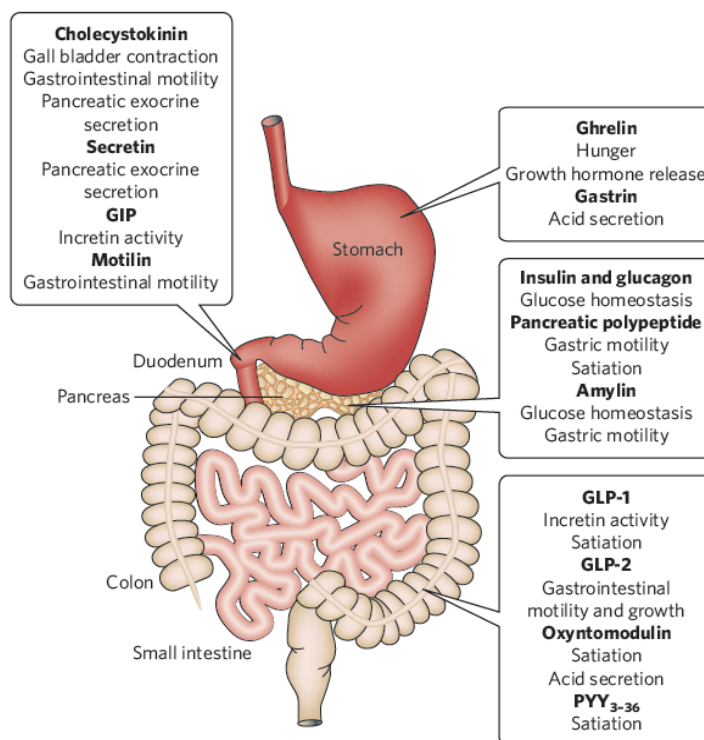
Após o processo de digestão, os nutrientes induzem a liberação dos hormônios intestinais. Esses hormônios juntamente com o tecido adiposo desempenham papel importante na regulação da IA, gasto energético e as respostas relacionadas à saciação e saciedade (30).

As respostas hormonais intestinais que são liberados pelo TGI atingem o núcleo do trato solitário (NTS) por meio do nervo vago. Do NTS, as fibras aferentes são convergidas para o hipotálamo. No hipotálamo, o núcleo arqueado (ARC) possui dois tipos de neurônios que irão atuar no comportamento alimentar, os neurônios

orexígenos na área medial que liberam o neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo Agouti (AgRP) (31). Os neurônios anorexígenos estão localizados na região lateral e secretam o hormônio  $\alpha$ -melanócito estimulante ( $\alpha$ -MSH), derivado do pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulador por cocaína e anfetamina (CART) (32). Assim, no hipotálamo, ocorre a integração entre os sinais periféricos do TGI, participando, dessa forma, na regulação a curto prazo e nos sinais de adiposidade, que atuam na regulação da IA a longo prazo (31).

A composição e a estrutura dos alimentos afeta a liberação dos peptídeos do TGI de diversas formas. Alguns desses estão envolvidos na inibição da motilidade intestinal, especialmente a grelina, colecistoquinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo yy (PYY) (33). Dessa forma, o alimento ingerido promove saciedade especialmente através de dois estímulos originados no TGI: processos mecânicos, através da estimulação de terminações nervosas e pela liberação de peptídeos mediados pelos efeitos químicos dos alimentos (34).

Estudos recentes mostram que o pico de grelina acontece antes da refeição, com quedas significativas após a IA (35, 36). As concentrações do peptídeo estão relacionadas ao tipo de macronutriente ingerido, ou seja, a refeição rica em proteínas e lipídeos apresenta níveis plasmáticos elevados de grelina quando comparado a refeições ricas em carboidratos (35, 37). Apesar de ser sintetizada periféricamente, ela apresenta receptores específicos no núcleo arqueado hipotalâmico e aumenta a atividade dos neurônios NPY/AgRP (35, 38). Em modelos experimentais, a administração de grelina estimula os neurônios orexígenos para a regulação da homeostase energética, podendo aumentar a ingestão energética em até 30% por suprimir a saciedade pós-prandial (39). Em estudos recentes, foi demonstrado que a supressão da grelina pós-prandial não é mediada por nutrientes no estômago ou no duodeno (local em que é produzida), mas, sim, pelo aumento de estímulos pós-ingestivos referentes à menor osmolaridade intestinal (via sinalização do nervo entérico), assim como picos de insulina (40).



**Figura 2. Regiões do TGI em que alguns hormônios são secretados e suas principais funções.** A grelina e a gastrina são liberadas pelo estômago; insulina, glucagon, PP e amilina pelo pâncreas; CCK, secretina, GIP e motilina pelo intestino delgado; GLP-1, GLP-2, oxintomodulina e PYY<sub>3-36</sub> pelo intestino grosso. Esses hormônios periféricos sinalizam o SNC para os processos biológicos envolvidos na IA e no BE (31).

O intestino delgado e o cólon desempenham um papel fundamental na saciedade através da liberação de peptídeos secretados em resposta ao alimento ingerido (34), como a CCK, o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), o GLP-1 e o PYY. A liberação de CCK é intensamente estimulada pela ingestão de lipídios (41), já os carboidratos estimulam menos, e esse aumento persiste pouco, retornando próximo aos valores basais dentro de 1h (42). Em humanos, a administração intravenosa de CCK reduz a IA e aumenta a saciedade (23). A infusão de glicose intragástrica ou intraduodenal também aumenta os níveis plasmáticos de CCK (43). Tanto os lipídios como os carboidratos, com exceção da frutose, aumentam a concentração do hormônio GIP. Quanto ao GLP-1, os carboidratos, principalmente a glicose, estimulam mais que os lipídios (44). Outro hormônio envolvido na saciedade é o PYY, pois sua secreção é proporcional à ingestão de calorias e não é afetada pela distensão gástrica, nem pelo conteúdo de água (45).

Embora a regulação de curto e de longo prazo da IA seja mediada através de mecanismos distintos, há ampla interação entre ambas, garantindo, assim, o

equilíbrio do BE, apesar das variações diárias no consumo de energia (46). Os principais reguladores do BE, a longo prazo são os hormônios adipocitários, leptina e insulina, que modulam a sensibilidade do organismo através da estimulação/inibição dos sinais de saciedade TGI (47).

O complexo sistema neuroendócrino minimiza o impacto das pequenas flutuações do BE promovendo a sua homeostase (34). Em resposta às alterações na adiposidade corporal, o SNC desencadeia adaptações fisiológicas compensatórias que resistem à mudança de peso. Quando há perda de peso, ocorre o aumento da fome e diminuição da taxa metabólica basal, enquanto que o ganho de peso desencadeia respostas opostas (48).

O SNC é informado sobre o *status* de reservas energéticas corporais através de sinais adipocitários. Esses sinais são transmitidos através de hormônios, como a leptina e a insulina, que são secretados em proporção à quantidade de gordura corporal, e atuam no hipotálamo, estimulando o catabolismo, como, por exemplo, POMC/CART, e inibindo o anabolismo, como, por exemplo, NPY/AgRP, por vias efectoras. Essas vias têm efeitos opostos sobre o BE (diferença entre a ingestão calórica e gasto energético) que, por sua vez, determinam a quantidade de combustível armazenado sob a forma de gordura corporal (47). A insulina é secretada a partir das células  $\beta$  pancreáticas nas ilhotas de *Langerhans*. Assim como a leptina, sua concentração plasmática é proporcional à adiposidade. O aumento do tecido adiposo pode evoluir para uma resistência à insulina a partir do aumento da proteína quinase C delta (49). A insulina tem o efeito periférico de aumentar a captação de glicose e o metabolismo de lipídeos, levando à queda da glicemia e à consequente fome rebote, além de favorecer o aumento dos estoques de gordura (50). Também atua estimulando a produção de leptina, que é um hormônio anorexígeno (51, 52). A administração central tanto de insulina como de leptina reduz a IA e o peso corporal (53, 54), e a resistência ou a deficiência hormonal de seus respectivos receptores no SNC resultam em hiperfagia e ganho de peso (55-57).

A grelina, que é um hormônio anabólico, atua a longo prazo, promovendo mudanças compensatórias em resposta às alterações do peso corporal tendo em vista que os níveis circulantes são inversamente proporcionais aos estoques de energia (58). A redução do peso aumenta de forma proporcional os níveis de grelina (59) que induz ao aumento da IA e da diminuição da oxidação de gorduras.

Os sinais de longo prazo interagem com os sinais de curto prazo na regulação da homeostase energética e parecem definir a sensibilidade para a saciedade por meio de efeitos de curto prazo, tais como os sinais de estiramento gastrointestinal, estimulação de quimiorreceptores e liberação de peptídeos a partir do TGI (60).

Assim sendo, a IA e o peso corporal são resultantes de uma complexa resposta integrada entre os sinais neurais e hormonais (61), garantindo o preciso equilíbrio entre a ingestão de energia cumulativa e o gasto energético a longo prazo.

### **3.0 ADOÇANTES NÃO CALÓRICOS**

Os ANC oferecem pouca ou nenhuma energia e substituem a doçura da sacarose. Entretanto, eles não têm as mesmas propriedades funcionais, tais como escurecimento, cristalização ou inibição microbiana(62). Eles foram criados com o objetivo de substituir o açúcar nos alimentos, reduzindo a ingestão calórica, prevenindo, dessa forma, o aumento de peso corporal e o descontrole glicêmico em pacientes com DM2 (63). Entretanto, alguns estudos mostram que o consumo de adoçantes pode não estar associado à perda ponderal de peso (64). Segundo Yang (2010), o aumento da obesidade na população americana coincidiu com o aumento da ingestão de ANC e a criação de novos produtos (figura 5) (65).

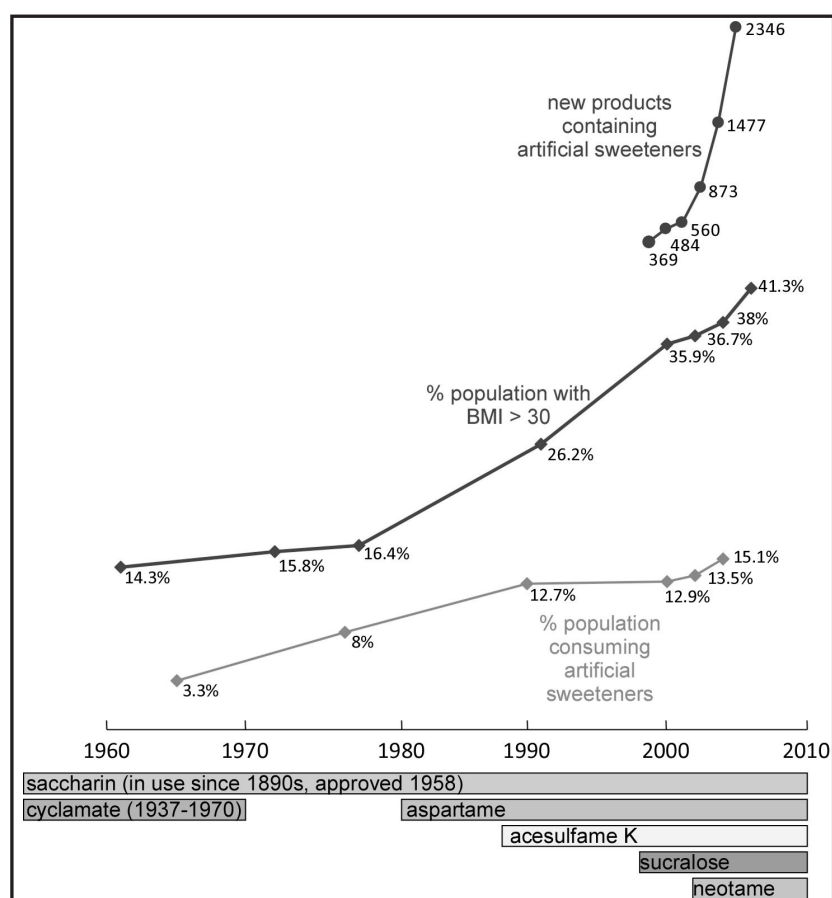
#### **3.1 ANC e Ganho de Peso Corporal**

De forma intuitiva, as pessoas escolhem os ANC para redução e manutenção do peso, pois o açúcar fornece carboidratos que são rapidamente absorvidos, podendo levar à ingestão excessiva de energia, ganho de peso e resultando em síndrome metabólica (65). Desde o surgimento dos ANC, o *marketing* bem-sucedido das empresas que os produzem faz com que a população os classifique como “alimentos saudáveis”(65). Entretanto, os dados epidemiológicos sugerem o contrário. Estudos prospectivos de larga escala encontraram correlação positiva entre o uso de adoçantes artificiais e ganho de peso. O estudo *San Antonio Heart Study* examinou 3.682 adultos durante um período de sete a oito anos na década de 1980 (4). Nesse período foram analisados o índice de massa corporal (IMC) inicial, gênero, etnia e dieta, e os consumidores de bebidas artificialmente adoçadas apresentaram maior incidência de sobrepeso e obesidade. O ganho médio do IMC



no grupo de controle foi de 1,01 kg/m<sup>2</sup> e 1,78 kg/m<sup>2</sup> para aqueles que consumiram as bebidas adoçadas artificialmente (4).

O estudo da *American Cancer Society* realizado no início de 1980, analisou 78.694 mulheres. Em um ano de acompanhamento, os usuários regulares de ANC tiveram aumento de peso corporal maior quando comparados aos não usuários. Já outra análise do *Nurse's Health Study* mostrou significativo ganho de peso com o uso de sacarina em 31.940 mulheres, realizado na década de 1970 (66).



**Figura 3. Linha do tempo e o consumo de adoçantes artificiais desde 1960 a 2010.** Linha média: alteração no percentual da população que são obesos (IMC > 30) de 1961 a 2006. Linha intermediária: mudanças no percentual da população que são usuários de adoçantes artificiais regulares de 1965 a 2004. Linha superior: alterações no número de novos adoçantes artificiais em produtos alimentícios introduzidos no mercado americano de 1999 a 2004. Barras abaixo do eixo do tempo indica quais os tipos e disponibilidade de adoçantes artificiais nos Estados Unidos ao longo do tempo (65).

### 3.1.2 Mecanismos Intestinais, Percepção do Sabor e Saciedade

Apesar dos ANC terem sido considerados metabolicamente inertes, estudos recentes têm demonstrado que eles podem ter efeitos fisiológicos, alterando o apetite e/ou metabolismo da glicose (67).

A língua contém três variedades de papilas, que são: as fungiformes, foliáceas e circunvaladas; e os sabores são detectados através de receptores de proteínas G. Cada célula individual expressa um receptor de tipo único e, assim, é especializada para perceber um sabor único (68). Essas células projetam aos neurônios, permitindo a percepção consciente do sabor. Os receptores doce, amargo e umami são receptores heterodiméricos com combinações de subunidades de transporte e sua especificidade de sabor. O receptor do sabor umami é o T1R1 com uma subunidade T1R3, enquanto que o sabor doce tem receptor T1R3 e uma subunidade T1R2 (67).

O receptor do sabor doce pode ligar-se a produtos químicos de estruturas amplamente variadas, como açúcares que contêm calorias (sacarose, glicose e frutose), proteínas doces (taumatina e monelina) e ANC. Os ANC são caracterizados por serem de "baixas calorias", pois alguns (como o aspartame) têm valor calórico mensurável, ainda que insignificante nas concentrações utilizadas (67).

Todos os ANC têm a capacidade de ativar os receptores de sabor doce, gerando, assim, um sinal de que resulta na percepção consciente de doçura. Após a ligação ao receptor, as proteínas G associadas são ativadas, aumentando a produção de mensageiros. Isso, por sua vez, conduz à ativação do canal de transdução (TRPM5), resultando no aumento do cálcio intracelular e a liberação de neurotransmissores (69).

Os receptores de sabor doce também estão localizados em diferentes regiões do TGI, de forma mais notável nas células L enteroendócrinas e nas células K (70, 71). As células enteroendócrinas são especializadas na secreção de vários hormônios, sendo escassas, pois compreendem menos de 1% das células epiteliais no intestino. Os receptores de sabor doce também foram identificados nas células  $\beta$ -pancreáticas, no trato biliar e nos pulmões.

### 3.1.3 Teoria de Pavlov

Na natureza, o sabor doce pode ser descrito como um estímulo orosensório preditor de consequências calóricas pós-absortivas dos alimentos. Os seres

humanos e outros animais têm contato com esse sabor de forma muito precoce (no primeiro contato com o leite materno). Esses alimentos naturalmente adoçados têm maior densidade calórica do que os menos doces. Com o crescimento da utilização de ANC no atual comportamento alimentar, milhões de pessoas estão sendo expostas a sabores doces que não estão associados com consequências calóricas. (72, 73).

Um dos conceitos fisiológicos mais importantes é de que os animais são capazes de detectar e aprender sobre a relação dos eventos em que eles experimentam. A sensação dessas relações pode ser registrada por mudanças comportamentais e respostas fisiológicas (74-76).

Os estímulos orosensórios (paladar, gosto, textura do alimento) são fortemente associados com as consequências pós-ingestão de alimentos. Por exemplo, o fenômeno de condicionamento aversivo a determinado sabor demonstra que animais irão aprender rapidamente a evitar o consumo de sabores associados ao mal-estar gástrico. Estudos indicam que animais associam rapidamente estímulos orosensórios com as consequências pós-ingestivas calóricas ou nutritivas de alimentos (77, 78).

Alimentos de sabor doce têm sido identificado como sendo um forte iniciador de reflexos pré-ingestivos da fase cefálica (hormônios, termogênese, metabolismo) (79-81). Os reflexos da face cefálica têm como objetivo antecipar e preparar o TGI para a chegada de nutrientes, dessa forma aumentando a eficiência na utilização de nutrientes e minimizando a intensidade com que esses nutrientes alteram a homeostase pela produção de um balanço energético positivo (82). Conforme Woods e Ramsay (2000), pequenas mudanças na evocação das respostas da fase cefálica podem produzir mudanças na eficiência da utilização de energia, podendo levar a longo prazo significativos aumentos na ingestão alimentar e peso corporal (83, 84).

### 3.2 SACARINA

A sacarina é um dos mais antigos ANC aprovados para alimentos e bebidas, sendo descoberta por Remsen e Fahlberg na Universidade John Hopkins em 1879. Na indústria de alimentos, a sacarina é usada em refrigerantes, produtos de panificação, geleias, conservas de frutas, doces, molhos para saladas, coberturas de sobremesa, goma de mascar e como adoçante de mesa (1). Esse ANC provém do

petróleo e do alcatrão (derivado do carvão mineral) e não é muito solúvel em água. É utilizado na forma de sal de sódio ou sal de cálcio.

Em 1977, a *Food and Drug Administration* (FDA) propôs banir o produto, pois estudos relataram o uso com câncer de bexiga em animais. Porém, o *National Health Science* determinou que os mecanismos para a formação de câncer nos animais são diferentes em humanos e liberou a utilização (62).

O seu poder de adoçamento é de 200 a 700 vezes mais doce que o açúcar e a sua ingestão diária estimada (EDI – *estimated daily intake*), segundo a *American Dietetic Association* (ADA) e a FDA, é de 0,1 a 2 mg/kg de peso corporal. De acordo com uma publicação do *Current Oncology* (2010), para atingir as doses que poderiam induzir carcinogênese seria necessário consumir cerca de 800 refrigerantes *diet*, de 350 ml cada (85). No entanto, um levantamento do uso de sacarina em produtos comestíveis na Índia constatou que em todas as faixas etárias o consumo excedeu a ingestão diária recomendada. O grupo mais suscetível foi o das crianças entre 6 a 10 anos, que ultrapassaram em 54% a recomendação pelo consumo de doces de gelo. A ingestão de alimentos contendo a sacarina é alta no país, uma vez que é o produto mais barato. Ademais, a ingestão diária de *masala pan* (alimento típico do país) resultou em um excesso na ingestão diária em 137% (86). Portanto, o consumo excessivo é possível em certas situações, o que justifica estudos mais aprofundados dos seus efeitos.

A sacarina não é metabolizada no trato gastrointestinal e, portanto, não afeta os níveis de insulina no sangue, o que faz com que esse adoçante seja indicado a pacientes diabéticos.

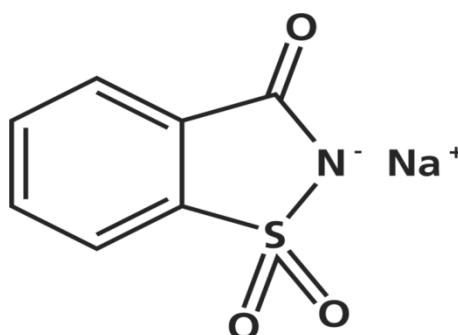


Figura 4. Estrutura molecular da sacarina sódica.

Entretanto, testes experimentais têm contrariado essa indicação, demonstrando que a sacarina pode ter uma influência negativa na flora intestinal de

animais e que, por consequência, ocorrem modificações nas taxas de glicose e insulina em camundongos (6).

### 3.2.1 Sacarina e Ganho de Peso Corporal

O consumo de adoçantes, principalmente na forma de refrigerantes *diet*, têm sido associado em estudos epidemiológicos com o ganho de peso, síndrome metabólica e diabetes (67). Uma explicação para essas associações entre o uso de ANC e ganho de peso, em parte apoiada por dados experimentais, é de que o sabor doce dos alimentos e bebidas com baixas calorias pode aumentar o consumo de alimentos com alto teor de açúcar (87).

Segundo Swithers & Davidson (2008), o consumo de sacarina em ratos está associado ao ganho de peso. O estudo comparou o aumento de peso nos animais que consumiram o adoçante e os mesmos tiveram o aumento de peso 20% maior quando comparado com o grupo que consumiu glicose. A pesquisa baseou-se na teoria do reflexo condicionado de Ivan Pavlov, na qual propõe que todos os animais se condicionam a um determinado estímulo fisiológico após uma experiência sensorial e fisiológica específica (Pavlov, 1927). Outra possibilidade para o aumento de peso é a indução de hiperglicemia pelo uso da sacarina (88).

### 3.2.2 Sacarina e Mecanismos Neuroendócrinos

Os estudos recentes têm sustentado a hipótese de que a sacarina, e os ANC de um modo geral, implica na dissociação entre a percepção do gosto doce e ingestão calórica consequente, induzindo ao maior consumo energético e ganho de peso (89). Diversos estudos constataram que o gosto doce da sacarina pode induzir à secreção de insulina, de forma independente do conteúdo energético ou da glicemia (90-94). Sugere-se que tal efeito seja decorrente da estimulação dos receptores para o gosto doce, T1R2/T1R3 (95, 96).

A sacarina, a sucralose e o aspartame demonstraram aumentar a secreção de insulina basal nas ilhotas pancreáticas de ratos após 30 minutos de incubação estática em soluções contendo 2,5 mM de adoçante. Os resultados adicionais mostraram que a sacarina foi o único adoçante que inibiu a insulina estimulada pela glicose (GSIS), em níveis de concentrações de glicose submáximo e máximo, já os demais não apresentaram esse efeito. Assim, os ANC, de um modo geral, podem afetar a secreção de insulina através da interação com o receptor de sabor doce. No

entanto, a sacarina, em particular, pode afetar outros processos celulares ligados à secreção de insulina (97).

A liberação de insulina pelas células  $\beta$  faz com que glicose circulante seja potencialmente armazenada nos tecidos (incluindo gordura). Assim, o consumo de ANC resultaria em baixos níveis glicêmicos, associados ao aumento da secreção de insulina, o que poderia implicar na incompleta sensação de saciedade, promovendo maior ingestão de alimentos ou ainda potencializando a absorção de glicose.

Estudos recentes demonstraram que a expressão de células enteroendócrinas para o sabor doce também regula a expressão do SGLT1, que é expressa nos enterócitos. Os ativadores do receptor de sabor doce podem induzir a secreção de GLP-1 e GIP, pois ambas são estimuladas pela expressão de SGLT1 nos enterócitos (70).

De acordo com Steinert e cols. (98), em humanos os ANC não estimularam a secreção de GLP-1 e PYY, nem suprimiram a secreção de grelina. Esses dados sugerem que devido à ausência de mecanismos pós-ingestivos os ANC não têm efeito sobre a saciedade, e nem sobre classificações de fome.

Em nível central, outro estudo recente (99) demonstrou que a ingestão de bebidas calóricas contendo sacarose e não calóricas (sacarina, ciclamato, aspartame e acesulfame-K) com a mesma intensidade de sabor afeta distintas regiões cerebrais, sugerindo que a saciedade sensorial e metabólica diferentemente são influenciadas pela ativação do gosto nessas áreas (22).

Entretanto, apesar de não haver consenso e os resultados serem inconclusivos sobre o efeito do uso da sacarina e de outros ANC sobre a regulação fisiológica e metabólica do apetite, recentes revisões sugerem que o uso de ANC não é capaz de promover a redução de peso por si só, sem que haja redução intencional no consumo energético total (100, 101).

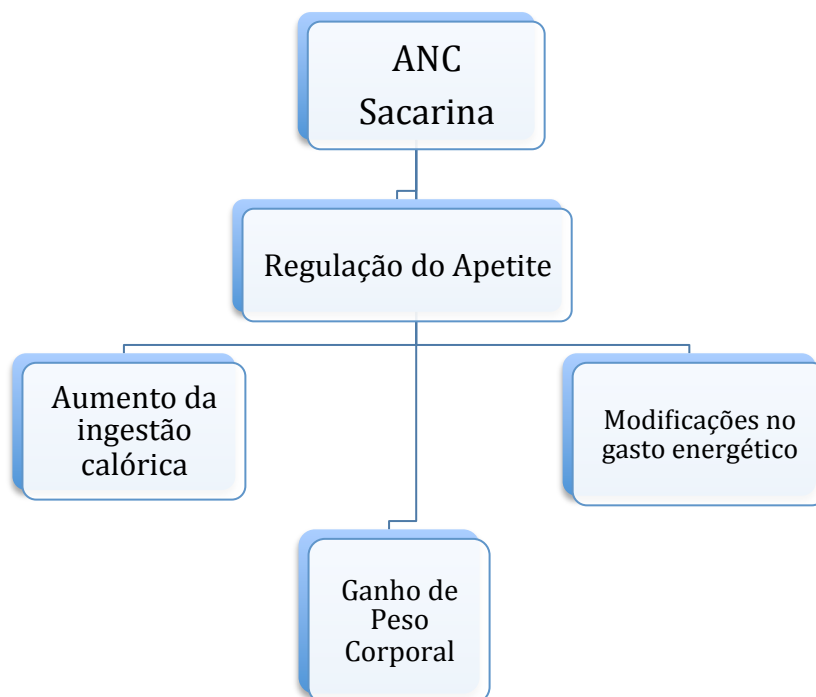
#### 4.0 CONSUMO DE OXIGÊNIO

A energia química contida nos nutrientes é extraída por um processo de oxidação que consome oxigênio ( $O_2$ ) e libera o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e água (102). Essa energia é convertida em moléculas ricas em calorías, principalmente ATP e creatina, que são utilizadas quando existe demanda, como, por exemplo, os processos de síntese e contração muscular. Em torno de 40% da energia da reação

é perdida como calor para manutenção da temperatura corporal que deve permanecer entre 37-39°C. Através da oxidação dos nutrientes é possível, então, medir o consumo de oxigênio e da produção de gás carbônico obtidos por análise do ar inspirado e expirado pelos pulmões (103).

A quantidade de energia produzida, a quantidade de oxigênio consumido ( $VO_2$ ) e a quantidade de gás carbônico produzido ( $VCO_2$ ) por grama de substrato metabólico oxidado no organismo foram determinados de forma experimental por Lusk e outros pesquisadores no início do século passado. A relação entre o  $VCO_2$  e o  $VO_2$  é chamado de quociente respiratório (QR) e pode ser aplicado para conhecer o tipo de substrato energético que está sendo oxidado pelo indivíduo (103).

## 3.0 MARCO TEÓRICO





## 4.0. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar o efeito da suplementação de sacarina no consumo basal de oxigênio em ratos Wistar comparativamente à sacarose e à ausência de suplementação com adoçantes.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o gasto energético em repouso determinado pelo consumo de oxigênio e pela produção de dióxido de carbono após 12 semanas de suplementação com sacarina, sacarose ou não suplementação.
- Avaliar o ganho de peso cumulativo em 12 semanas em ratos Wistar durante suplementação com sacarina comparada à sacarose e à não suplementação.
- Avaliar a ingestão semanal de calorias atribuídas à ração, ao iogurte suplementado com adoçante e à soma de ambos entre os grupos consumindo iogurte com sacarina, sacarose ou não adoçado.
- Avaliar a tolerância à glicose, em resposta a um teste oral à glicose, em 6 e 12 semanas nos grupos usando sacarina, sacarose e sem adoçante.

## REFERÊNCIAS

1. Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*. 2013;29(11-12):1293-9.
2. Sylvetsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;96(3):640-6.
3. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation*. 2007;116(5):480-8.
4. Fowler SP, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity*. 2008;16(8):1894-900.
5. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*. 2008;117(6):754-61.
6. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-6.
7. Polyak E, Gombos K, Hajnal B, Bonyar-Muller K, Szabo S, Gubicsko-Kisbenedek A, et al. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta physiologica Hungarica*. 2010;97(4):401-7.
8. Rogers PJ, Carlyle JA, Hill AJ, Blundell JE. Uncoupling sweet taste and calories: comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake. *Physiology & behavior*. 1988;43(5):547-52.
9. Swithers SE, Davidson TL. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behavioral neuroscience*. 2008;122(1):161-73.
10. Feijo Fde M, Ballard CR, Foletto KC, Batista BA, Neves AM, Ribeiro MF, et al. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 2013;60(1):203-7.
11. Specchia ML, Veneziano MA, Cadeddu C, Ferriero AM, Mancuso A, Ianuale C, et al. Economic impact of adult obesity on health systems: a systematic review. *European journal of public health*. 2014.

12. Viana Luciana Verçoza PTPd, Leitão Cristiane Bauermann, Azevedo Mirela Jobim. Fatores determinantes de perda de peso em adultos submetidos a intervenções dietoterápicas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2013.
13. Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu Gde A, Malhao TA, de Souza CP, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC public health*. 2012;12:440.
14. Bermudez Menendez de la Granda M, Sinclair AJ. Fatty acids and obesity. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(36):4117-25.
15. Tandel KR. Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2011;2(4):236-43.
16. Philipson TJ PR. Is the obesity epidemic a public health problem? A review of Zoltan. *J Econ Lit*. 2008;46.
17. Cutler DM GE, Shapiro JM. Why have americans become more obese? *J Econ Perspect* 2003;8:93-118.
18. Weinsier RL, Hunter GR, Heini AF, Goran MI, Sell SM. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *The American journal of medicine*. 1998;105(2):145-50.
19. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *International journal of obesity*. 2008;32 Suppl 7:S109-19.
20. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104(4):531-43.
21. Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Charles MA, Nelson RG, Howard BV, et al. Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. *The American journal of clinical nutrition*. 1991;53(6 Suppl):1543S-51S.
22. Kelly C, Foletto BAMB, Alice M. Neves , Fernanda de M. Feijó , Cíntia Reis , Maria Flávia M. Ribeiro, Marcello C. Bertoluci. THE CHRONIC USE OF SACCHARIN PROMOTES GREATER WEIGHT GAIN, BEING SIMILAR TO THE USE OF GLUCOSE, FRUCTOSE OR LIPID . In: UFRGS, editor. 2011.
23. Sobrino Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jimenez L, Barrios V, Arilla Ferreira E. Peptides and food intake. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:58.
24. Abete I, Astrup A, Martinez JA, Thorsdottir I, Zulet MA. Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and

specific nutritional components on weight loss and maintenance. *Nutrition reviews*. 2010;68(4):214-31.

25. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2008;18(2):158-68.

26. Mattes RD, Hollis J, Hayes D, Stunkard AJ. Appetite: measurement and manipulation misgivings. *Journal of the American Dietetic Association*. 2005;105(5 Suppl 1):S87-97.

27. Woods SC. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;286(1):G7-13.

28. Blundell JE, Goodson S, Halford JC. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2001;25 Suppl 1:S29-34.

29. Mayer J, Thomas DW. Regulation of food intake and obesity. *Science*. 1967;156(3773):328-37.

30. Feinle-Bisset C. Modulation of hunger and satiety: hormones and diet. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2014;17(5):458-64.

31. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.

32. Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition*. 2000;16(10):866-73.

33. Juvonen KR, Purhonen AK, Karhunen LJ, Herzig KH, Poutanen KS. [Regulation of food intake by gastrointestinal peptides]. *Duodecim*. 2009;125(19):2067-74.

34. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*. 2007;117(1):13-23.

35. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiological reviews*. 2005;85(4):1131-58.

36. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-60.

37. Erdmann J, Topsch R, Lippl F, Gussmann P, Schusdziarra V. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake,

plasma insulin, and glucose. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):3048-54.

38. Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 1998;280(5368):1378-83.

39. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*. 2003;144(4):1506-12.

40. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & behavior*. 2006;89(1):71-84.

41. Pilichiewicz AN, Little TJ, Brennan IM, Meyer JH, Wishart JM, Otto B, et al. Effects of load, and duration, of duodenal lipid on antropyloroduodenal motility, plasma CCK and PYY, and energy intake in healthy men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(3):R668-77.

42. Bowen J, Noakes M, Trenergy C, Clifton PM. Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1477-83.

43. Little TJ, Doran S, Meyer JH, Smout AJ, O'Donovan DG, Wu KL, et al. The release of GLP-1 and ghrelin, but not GIP and CCK, by glucose is dependent upon the length of small intestine exposed. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2006;291(3):E647-55.

44. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*. 1995;56(2):117-26.

45. Oesch S, Rüegg C, Fischer B, Degen L, Beglinger C. Effect of gastric distension prior to eating on food intake and feelings of satiety in humans. *Physiol Behav*. 2006;87(5):903-10.

46. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289-95.

47. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.

48. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med*. 1995;332(10):621-8.

49. Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, et al. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;283(4):E682-91.
50. Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*. 1998;280(5368):1378-83.
51. Morton GJ, Schwartz MW. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev*. 2011;91(2):389-411.
52. Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:267-85.
53. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995;269(5223):546-9.
54. Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*. 1979;282(5738):503-5.
55. Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(1):R87-96.
56. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-71.
57. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
58. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav*. 2006;89(1):71-84.
59. Foster-Schubert KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev*. 2006;27(7):779-93.
60. Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(11):963-77.

61. Karhunen LJ, Juvonen KR, Huotari A, Purhonen AK, Herzig KH. Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regul Pept.* 2008;149(1-3):70-8.
62. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics.* 2012;112:739-58.
63. Harricharan M, Wills J, Metzger N, de Looy A, Barnett J. Dietitian perceptions of low-calorie sweeteners. *European journal of public health.* 2014.
64. Arsenault JE, Cline AD. Nutrient intakes and characteristics of normal weight, female military personnel consuming foods reduced in fat or energy content. *Appetite.* 2000;34(3):227-33.
65. Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: *Neuroscience* 2010. *The Yale journal of biology and medicine.* 2010;83(2):101-8.
66. Colditz GA WW, Stampher MJ, London SJ, Segal MR, Speizer FE. Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women. *The American journal of clinical nutrition.* 1990;51:1100-5.
67. Brown RJ, Rother KI. Non-nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(8):2597-605.
68. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell.* 2001;106(3):381-90.
69. Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature.* 2006;444(7117):288-94.
70. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(38):15075-80.
71. Steinert RE, Gerspach AC, Gutmann H, Asarian L, Drewe J, Beglinger C. The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clinical nutrition.* 2011;30(4):524-32.
72. Swithers SE, Davidson TL. Influence of early dietary experience on energy regulation in rats. *Physiology & behavior.* 2005;86(5):669-80.

73. Davidson TL, Swithers SE. A Pavlovian approach to the problem of obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004;28(7):933-5.
74. Dworkin BR DS. Learning of physiological response: II. Classical conditioning of the baroreflex. . *Behavioral neuroscience*. 1995;109(1119-1136).
75. S. S. Drug tolerance, drug addiction, and drug anticipation. . *Current Directions in Psychological Science*. 2005;14:296-300.
76. I. P. Conditioned reflexes. **New York: Oxford University Press**. 1927.
77. Welzl H DAP, Lipp HP. . Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. . *Behavioural brain research*. 2001;125(205-213).
78. Sclafani A. Learned controls of ingestive behaviour. *Appetite*. 1997;29(2):153-8.
79. Teff KL, Devine J, Engelman K. Sweet taste: effect on cephalic phase insulin release in men. *Physiology & behavior*. 1995;57(6):1089-95.
80. Tordoff MG. How do non-nutritive sweeteners increase food intake? *Appetite*. 1988;11 Suppl 1:5-11.
81. Bruce DG, Storlien LH, Furler SM, Chisholm DJ. Cephalic phase metabolic responses in normal weight adults. *Metabolism: clinical and experimental*. 1987;36(8):721-5.
82. Teff K. Nutritional implications of the cephalic-phase reflexes: endocrine responses. *Appetite*. 2000;34(2):206-13.
83. Woods SC, Ramsay DS. Pavlovian influences over food and drug intake. *Behavioural brain research*. 2000;110(1-2):175-82.
84. Cooling J, Blundell JE. Lean male high- and low-fat phenotypes--different routes for achieving energy balance. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;24(12):1561-6.
85. Touyz LZ. Saccharin deemed "not hazardous" in United States and abroad. *Current oncology*. 2011;18(5):213-4.
86. Tripathi M, Khanna SK, Das M. Usage of saccharin in food products and its intake by the population of Lucknow, India. *Food additives and contaminants*. 2006;23(12):1265-75.
87. Swithers SE, Martin AA, Davidson TL. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & behavior*. 2010;100(1):55-62.



88. Swithers SE, Laboy AF, Clark K, Cooper S, Davidson TL. Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. *Behavioural brain research*. 2012;233(1):1-14.
89. Davidson TL, Martin AA, Clark K, Swithers SE. Intake of high-intensity sweeteners alters the ability of sweet taste to signal caloric consequences: Implications for the learned control of energy and body weight regulation. *Q J Exp Psychol (Colchester)*. 2011;64(7):1430-41.
90. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(38):15069-74.
91. Malaisse WJ, Vanonderbergen A, Louchami K, Jijakli H, Malaisse-Lagae F. Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets. *Cell Signal*. 1998;10(10):727-33.
92. Just T, Pau HW, Engel U, Hummel T. Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation? *Appetite*. 2008;51(3):622-7.
93. Ionescu E, Rohner-Jeanrenaud F, Proietto J, Rivest RW, Jeanrenaud B. Taste-induced changes in plasma insulin and glucose turnover in lean and genetically obese rats. *Diabetes*. 1988;37(6):773-9.
94. Berthoud HR, Trimble ER, Siegel EG, Bereiter DA, Jeanrenaud B. Cephalic-phase insulin secretion in normal and pancreatic islet-transplanted rats. *Am J Physiol*. 1980;238(4):E336-40.
95. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4692-6.
96. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, et al. Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*. 2009;4(4):e5106.
97. Al-Saleh AM, Corkey B, Deeney J, Tornheim K, Bauer E. Effect of artificial sweeteners on insulin secretion, ROS, and oxygen consumption in pancreatic beta cells. *FACEB Journal [Internet]*. 2011; 25:530.1.
98. Steinert RE, Frey F, Töpfer A, Drewe J, Beglinger C. Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br J Nutr*. 2011;105(9):1320-8.

99. Smeets PA, Weijzen P, de Graaf C, Viergever MA. Consumption of caloric and non-caloric versions of a soft drink differentially affects brain activation during tasting. *Neuroimage*. 2011;54(2):1367-74.
100. Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):1-14.
101. Brown RJ, de Banate MA, Rother KI. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes*. 2010;5(4):305-12.
102. Frankenfield DC. On heat, respiration, and calorimetry. *Nutrition*. 2010;26(10):939-50.
103. JRC D. Calorimetria indireta. *Revista Associação Médica Brasil*. 1997;43:245-53.
104. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular diabetology*. 2007;6:38.
105. Rolim NP, Mattos KC, Brum PC, Baldo MV, Middlekauff HR, Negrao CE. The decreased oxygen uptake during progressive exercise in ischemia-induced heart failure is due to reduced cardiac output rate. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2006;39(2):297-304.

EFFECT OF SACCHARIN SUPPLEMENTATION ON WEIGHT GAIN, CALORIC INTAKE, GLUCOSE TOLERANCE AND BASAL OXYGEN CONSUMPTION IN WISTAR RATS

Authors:

Denise Entrudo Pinto<sup>a</sup>, Kelly C. Foletto<sup>a</sup>, Pedro Dal Lago<sup>b</sup>, Ramiro Barcos<sup>b</sup>,  
Marcello C. Bertoluci<sup>a c</sup>

<sup>a</sup>[Postgraduate Program in Medicine Sciences: Medical College, UFRGS](#)

2400 Ramiro Barcelos St. Zip Code 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>[Laboratory of Experimental Physiology, UFCSPA](#)

245 Sarmiento Leite St. Zip Code 90050-170. Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>[Internal Medicine Service of HCPA, UFRGS](#)

2350 Ramiro Barcelos St. Zip Code 90035-903. Porto Alegre, RS, Brazil

Word count: 4468

Number of tables: 2

Number of figures: 5

Total pages: 25

Corresponding author: Marcello Casaccia Bertoluci

Internal Medicine Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

2350 Ramiro Barcelos St., Rio Branco, 7th floor, Room 700, Zip Code 90035-903. Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: + 55 51 3359 8152

e-mail address: [mbertoluci@uol.com.br](mailto:mbertoluci@uol.com.br)

Formatado para submissão na revista Appetite.

## Introduction

The increase of non-caloric sweeteners (NCS) has been associated with increasing prevalence of obesity. Epidemiological studies have confirmed that the use of products containing NCS is positively correlated with the incidence of overweight and obesity, and type 2 diabetes mellitus (DM2), cardiovascular disease (Dhingra, Sullivan et al. 2007, Lutsey, Steffen et al. 2008) and metabolic syndrome (MS) (Colditz, Willett et al. 1990, Fowler, Williams et al. 2008).

The theory that the use of NCS, including saccharin, could interfere in the regulation of appetite and induce weight gain has been demonstrated in some experimental studies and randomized clinical trials (Rogers, Carlyle et al. 1988, Polyák, Gombos et al. 2010, Davidson, Martin et al. 2011). Swithers and Davidson (Swithers and Davidson 2008) conducted a series of controlled experiments demonstrating that the use of saccharin resulted in reduced ability to compensate calories, providing a higher total caloric intake, greater weight gain and adiposity, when compared to the use of glucose.

Previous study from our group indicates that saccharin induces greater weight gain than sucrose despite of similar total caloric intake. Using a similar dietary protocol, found that the use of saccharin ( $p = .005$ ) or aspartame ( $p = .048$ ) for 12 weeks led to a greater weight gain when compared to the use of sucrose. Though, in the absence of a control group (inert), it was not possible to determine whether saccharin was contributing to greater weight gain independently or whether this effect was due to lower weight gain of sucrose. Furthermore the chemical composition of sucrose (fructose or glucose) could also be important factors in determining relative less weight gain in relation to saccharin. There was also found that the weight gain was not justified by caloric intake, inasmuch as the groups had the same total caloric intake (Feijo F, Ballard et al. 2013).

Using a rodent model, the intake of foods or fluids containing saccharin was accompanied by increased food intake, body weight gain, accumulation of body fat, and weaker caloric compensation, compared to consumption of foods and fluids containing glucose (Swithers, Martin et al. 2010). This change in the body weight can maybe associated with the increase of water in these studies because the increase in due to sodium containing saccharin.

Recent findings suggest that saccharin may alter gut microbiota influencing the body weight gain. Most NCS can pass through the human gastrointestinal tract without being digested by the host (Byard and Goldberg 1973, Roberts, Renwick et al. 2000) and thus directly encounter the intestinal microbiota, which plays central roles in regulating multiple physiological processes (Clemente, Ursell et al. 2012).

Another hypothesis can be the decreased energetic consumption for explaining saccharin increases in rat body weight. And we also speculate that saccharin could decrease muscle energy expenditure in rodents and this could explain increase in body weight without increase in caloric intake. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the effect of 12 week of saccharin in the oxygen consumption at rest in Wistar rats.

## **Materials and Methods**

### **Design**

In controlled experiment, 37 adult male Wistar rats weighting 180-220 g were randomly divided into 3 groups according to the type of exposition either to non-caloric sweetener (saccharin-SAC), caloric sweetener (sucrose-SUC) or no-sweetener control (CONT). Saccharin and Sucrose were offered as sweeteners in yogurt supplements, while non-sweetened yoghurt was used as the control group. Supplements were offered daily during a period of 12 weeks. Weight gain and caloric intake were determined weekly, basal oxygen consumption determined at rest ( $VO_2$ ) and RER were measured at baseline, 6 weeks and 12 weeks. Oral glucose tolerance test (OGTT) was determined at 6 weeks and 12 weeks.

### **Protocol**

Animals were individually housed in plastic translucent polypropylene cages, with controlled humidity (65–70%) and room temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), maintained through a 12 h light and dark cycle. This project was conducted in the Laboratory of Experimental Physiology at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animal and in accordance with the Brazilian Law for the Scientific Use of Animals. Study

protocols were approved by the Ethics Committee for Experimental Procedures of UFCSPA, Porto Alegre, BR.

#### Dietary manipulation

All rats received daily water and standard chow *ad lib* (Nuvital CR-1, Nuvilab<sup>TM</sup>), every 24h during the 12 weeks of experiment. Based on the Swithers & Davidson protocol (2008) (Swithers and Davidson 2008), the preparation of intervention supplements included 20 ml of standardized low fat yogurt (Nestlé<sup>TM</sup>) which were added sucrose (União<sup>TM</sup>) to perform a 20% sucrose solution or sodium-saccharin (ZeroCal<sup>TM</sup>) to constitute a 0.3% solution. During preparation, 15 ml of pure water was added into yogurt to adjust the viscosity and allow drinking. Yogurt supplements were offered in special bottles with beaks adapted for possible leakage, 7 days a week, approximately at 9:00 AM, leaving the disposition of the animals for a period of 11 hours. The exclusion criterion was ingesting less than 65% of sweetened yogurt offered. The caloric density (CD) of watered down yogurts was  $\pm 0.6$  kcal/g for yogurt sweetened with sucrose and  $\pm 0.3$  kcal/g for yogurt sweetened with saccharin. Throughout each week of testing, SUC group received a total of  $\pm 172$  kcal per week from the yogurt diet, while the SAC and CONT group received  $\pm 60$  kcal per week.

In addition to yogurt diet, standard chow pellet (CD: 2.93 kcal/g, Nuvital CR-1, Nuvilab<sup>TM</sup>) and water were offered *ad libitum* 7 days a week, at 9 am and removed after 24 h. The large solid pellets were deposited in grid feeders, with a bottom crumb collector, on the outside of the cage where the rats were kept.

#### Weight determination

Weight was measured weekly in electronic precision balance, suitable for animals in motion (AS 5500, Marte<sup>TM</sup>). Weight gain was defined as the difference of weight in a period of 7 days.

Cumulative weight gain was calculated by the sum of the differences between the end and the beginning of each week, every week during 12 weeks, and expressed in grams.

#### Caloric yogurt and chow intake determination

##### Yogurt

Yogurt bottles were weighed individually before and after it was offered daily and the difference calculated to determine the weekly intake of yogurt. Calories were calculated by the sum of calories from yogurt with sucrose or saccharin and added with water and divided by the overall density. The measure was kcal/g of yogurt.

#### Chow intake

To determine the caloric intake of chow, once a week, chow intake was determined by the weight difference between the portion offered and the rest, including the residual at the bottom of the cages. Cages were carefully monitored for any evidence of chow spillage and crumbs which were considered for the control of chow intake. Calories from chow were calculated as according to the information provided by the manufacturer and were corrected according to the weight of the animals and presented as kcal/g of chow.

#### Total caloric intake

Total caloric intake was defined as the sum of calories from yogurt plus chow intake. Cumulative caloric intake of yogurt and chow were calculated by the sum of calories ingested along each week, and corrected by the corresponding rat weight at the end of each week. These data were calculated in the cumulative mode for the 12-week period and were expressed as kcal/g of rat.

#### Oral glucose tolerance test (OGTT)

Animals were fasted for 6 hours in daytime. Yogurt and Chow were removed from the cages, all the sawdust was cleaned to avoid ingestion of rest chow or crumbs. After the baseline glucose measurement, rats were given the glucose solution via gavage (0,008 glucose/kg). Blood from the tail was collected at baseline, 30, 60, 90 and 120 minutes after gavage. (UP Gluc 75 NewProv laboratory. Glucose was determined using glucose strips (FreeStyle Lite - Abbott Diabetes Care Inc.)

#### Oxygen (VO<sub>2</sub>) and carbon dioxide consumption (VCO<sub>2</sub>)

The VO<sub>2</sub> and VCO<sub>2</sub> are analyzed from the capture of the concentration of oxygen and carbon dioxide gases in an oxygen chamber at rest. A metabolic chamber was connected into a vacuum pump, which generates an air flow of 2.5 l/min and allow the aspiration of gases to be analyzed by the Analyzer O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>

(AVS Projects, São Carlos/SP). Oxygen consumption ( $VO_2$ ), carbon dioxide production ( $VCO_2$ ) and respiratory exchange ratio (RER) were determined. The values of the following variables were calculated by AQUAD software: oxygen consumption ( $VO_2$  in ml/kg/min), consumption of carbon dioxide ( $VCO_2$  in ml/kg/min) and respiratory exchange ratio (RER in ml/kg/min). The protocol was adapted from Batista et al. (2007) (Rodrigues, Figueroa et al. 2007). Tests were performed immediately before week 0 at 6 weeks and at 12 weeks. All tests were performed in duplicate in the next day. An assessor blinded to the intervention performed the protocol. This experiment was conducted at the Laboratory of Experimental Physiology, at UFCSPA.

Animal were placed on chamber gas stabilization during 15 minutes for adaptation at room temperature of 21°C. After 15 minutes, the software started recording the data. The recording was performed during 5 minutes.  $VO_2$  was then calculated by the software using the measured flow through the metabolic chamber (PF), the expired fraction of effluent oxygen (FEO<sub>2</sub>), the fraction of oxygen in room air (FIO<sub>2</sub>), and animals body weight (BW), by the formula previously described by Rolim et al., 2007 (Rolim, Mattos et al. 2006):  $VO_2 \text{ (mL/Kg-1/min-1)} = PF * (FIO_2 - FEO_2)/BW$

#### Outcomes

##### Variables over time

Cumulative weight gain was calculated by the subtraction of the basal weight from the weight obtained every week, and expressed in grams.

Cumulative total caloric intake (including yogurt and chow), cumulative caloric intake of yogurt and cumulative caloric intake of chow were calculated by the sum of calories ingested along each week, and corrected by the corresponding rat weight at the end of each week. These data were calculated in the cumulative mode for the 12-week period and were expressed as kcal/g of rat.

##### Single variables

The total weight gain was defined by the difference between the basal weight and the final weight, in the 12th week. Mean total caloric intake per week, mean caloric intake from yogurt per week, and mean caloric intake from chow per week



were calculated as the mean of 12 periods of week caloric ingestion corrected by rat weight (g) at the end of each week and expressed as kcal/g/wk.

### Statistics

Linear mixed models (West 2009, Cleophas, Zwinderman et al. 2010, Shek and Ma 2011) with random slopes and weekly measurement as a repeated effect were applied to cumulative weight gain, cumulative water intake, cumulative caloric intake of yogurt, of chow and total over time. All measures of intake were corrected by the corresponding weight of each week.

For single variables, one-way analysis of variance (ANOVA) with the Dunnett's test was used to identify differences between groups and was also used to compare the basal weight and percentage of intake of yogurt diets. The glucose tolerance test, VO<sub>2</sub> and RER were analyzed by ANOVA by repeated measures. Those who did not have a normal distribution, we used the nonparametric Kruskal-Wallis H. Reported values were mean  $\pm$  SE, and  $p < 0.05$  was set for all analyses. We used the SPSS TM software version 17 (IBM Corporation, Somers, NY) for statistical analyses. For calculating the area under the curve the program used was NCSS 18.

## Results

### Cumulative weight gain

At the start of the experiment the body weight was similar between groups,  $F(2,31) = .68$ ,  $p = .51$  ( $215.12 \pm 4.88$ ). There was a significant difference between cumulative weight gain over 12 weeks of the experiment groups  $F(2, 150.45) = 3.55$ ,  $p = .031$  (Table1A, Fig1). The saccharin group gainer more weight than control ( $p=.048$ ). Between saccharin and sucrose there was no significant difference ( $p=.552$ ). The cumulative weight gain showed a linear and quadratic effect over 12 weeks, with significant changes from the initial status ( $p < .001$ ). Regarding the linear slope SAC showed no significant difference from the weight gain velocity when compared to SUC ( $\beta = -1.18$ ,  $t = -.67$ ,  $SE = 1.76$ ,  $p = .50$ ) and CONT groups ( $\beta = 2.75$ ,  $t = 1.64$ ,  $SE = 1.67$ ,  $p < .10$ ). In terms of quadratic growth, the SAC group had a significantly slower rate of deceleration compared with the CONT group ( $\beta = -.20$ ,  $t = -2.00$ ,  $SE = .10$ ,  $p = .048$ ), but not different from SUC group ( $\beta = .06$ ,  $t = .60$ ,  $SE = .10$ ,  $p = .55$ ).

### Total caloric intake

The total caloric intake was higher in saccharin group when compared with control group over the 12 weeks of the experiment,  $F(2, 39.52) = 3.89$ ,  $p = .029$ . The mean total caloric intake in all groups was  $1.98 \pm 0.03$ . (Table1, Fig2A).

### Calories from yogurt

There were significant differences in cumulative intake yogurt calories between the groups SAC and SUC  $F(2, 29) = 260.58$ ,  $p < .001$ . Were included animals had a mean yogurt intake of 60%  $F(2, 31) = .68$ ,  $p = .52$ . (Table1, Fig3A).

### Calories from chow

There was a significant difference between cumulative calories intake from chow in SAC  $F(2, 31) = 4.06$ ,  $p = .03$  ( $1.88 \pm 0.06$ ) and SUC groups ( $1.68 \pm 0.05$ ). And between SAC and CONT group ( $1.73 \pm 0.04$ ) (Table1, Fig4A).

### Total water intake

There was a significant difference in total water intake between SAC and SUC groups  $F(2, 33.07) = 4.45$ ,  $p = .018$ . The SAC group ( $0.57 \pm 0.01$ ) drank more water than the SUC group ( $0.50 \pm 0.02$ ). However between SAC and CONT ( $0.54 \pm 0.02$ ) groups was not statistically significant (Table1, Fig5A).

### OGTT

There was no significant difference between groups in the OGTT at 6 week  $H(2) = .768$ ,  $p = .68$  (Table2, Fig1B). In the 12 week there was no difference between groups in the OGTT  $F(2, 31) = .222$ ,  $p = .13$ . However, was a difference intergroup in time 90' between SAC and SUC groups ( $p = .037$ ). A Kruskal-Wallis H test showed that there was no statistically significant difference in the AUC (Area Under Curve) between the groups  $H(2,31) = 2.22$ ,  $p = .13$  (Table2, Fig2B).

### VO<sub>2</sub> measures

There was no significant difference between the VO<sub>2</sub> measures in baseline  $F(2,31) = .03$ ,  $p = .97$ , 5 week  $F(2,31) = .03$ ,  $p = .97$  and 12 week  $F(2,31) = .73$ ,  $p = .49$ . There was no difference between in the AUC for VO<sub>2</sub> (Table2, Fig3B).

### RER values

There was no significant difference between the RER values over the weeks (baseline, 5 and 12 week). A Kruskal-Wallis H test showed that there was no statistically significant difference in the RER at baseline between the groups  $H(2) = .739$ ,  $p = .69$ . In the weeks 5 and 12, there was no significant difference between the groups after the ANOVA analysis  $F(2,31) = .42$ ,  $p = .66$  and  $F(2,31) = .77$ ,  $p = .47$ , respectively. There was no difference between in the AUC for RER (Table2, Fig4B).

### Discussion

In the present study, as we saw in previous studies, Wistar rats receiving yogurt with saccharin for 12 weeks present increased cumulative weight gain compared to rats receiving yogurt without sweetener, although they do not differ from rats receiving sucrose. These animals also differ in relation to total caloric intake despite caloric compensation in chow in the saccharin group. Interestingly, energy expenditure was similar between all groups all along the study, not supporting the concept that saccharin might induce energy economy.

These findings corroborate previous studies of our study group in which there was a significant difference in weight gain in animals consuming saccharin, aspartame compared with sucrose (Feijo F, Ballard et al. 2013). Another data of our group (unpublished data) responded similarly, the saccharin group promoted greater gain weight than the control, being similar to the use of glucose, lipid and fructose. The saccharin has gained more weight and the total caloric intake was different from the control and sucrose groups. Total caloric intake of yogurt and chow was higher in the saccharin group.

In recent studies, rats that consumed saccharin sweetened liquids had an increased food intake and gained more body weight than rats that consumed glucose sweetened liquids (Shankar, Ahuja et al. 2013). In our data, the gain weight of SAC group was higher than control group and the results agree with the study of Swithers and Davidson (Swithers and Davidson 2008). They found that reducing the correlation between sweet taste and the caloric content of foods using artificial sweeteners in rats resulted in increased caloric intake, increased body weight, and increased adiposity. There are possible causes of the increase in weight of the animals, because exists a possible coupling between sweet taste and caloric content can lead to compensatory overeating and positive energy balance (Yang 2010).

We observed significantly greater weight gain among Wistar rats diets supplemented with saccharin compared with sucrose and control. This increase was not the result in reduction of basal oxygen consumption nor due to changes in RER or increased total caloric intake. Our initial hypothesis for explaining weight gain in animals supplemented with saccharin was that non-caloric sweetener could have an effect in reducing the basal metabolic rate, and by this way decreasing caloric expenditure. However, we found no significant difference in neither oxygen consumption, or in RER determination all along the 12 weeks of study. There are few studies in the literature that have made this association. In the study of Suez (2014) comparing different non-caloric sweeteners, including saccharin, they found no difference between energy expenditure and RER (Suez, Korem et al. 2014).

Other possibility for weight gain, could be explained by saccharin induced hyperglycemia and hyperinsulinemia with consequent weight gain. In 2012, Swithers *et al.* conducted a series of experiments relating the weight gain with changes in blood glucose and insulin. The results of this experiment indicated that animals with experience consuming saccharin-sweetened yogurts showed hyperglycemic responses, and these differences appeared during the first blood sample, collected 15 min following delivery of the test meal. These data suggested that exposure to saccharin-sweetened diets may have resulted in altered cephalic phase responses, such as a diminished cephalic phase insulin release (CPIR), when sweet-tasting diet that delivered energy was consumed (Swithers, Laboy et al. 2012). Another important data publish in this year, suggest that NAS consumption in both mice and humans enhances the risk of glucose intolerance and that these adverse metabolic effects are mediated by modulation of the composition and function of the microbiota (Suez, Korem et al. 2014). The OGTT was performed in our animals, at weeks 6 and 12. There was difference in AUC at week 6 in time 120 and at week 12, the difference was at 90 minutes of the test against findings of these studies. This suggests that the use of saccharin may change the blood sugar level in order that the population has been using an uncontrolled manner throughout the day. But new studies need to be performed.

Although there is no consensus or conclusive results on the effects of saccharin in regulating physiological and metabolic energy balance, recent reviews suggest that its isolated use could not promote weight reduction, without intentional reduction of total energy intake (Mattes and Popkin 2009, Brown, de Banate et al.

2010). However, this study showed that weight gain promoted by the use of saccharin might involve factors independent of caloric intake.

Our study has important strengths in the determination of the main outcome. First, we observed an adaption period before starting the supplementation rats in which they were analyzed for oxygen consumption. This procedure reduces the biological variation of oxygen consumption due to animal stress. Second, we use analysis oxygen consumption data in duplicate in different days to minimize bias in oxygen consumption determination, even though the observed variation was small. Third, we made a sequential analysis of oxygen consumption to understand the time variation along the rat ageing process. By this way we can be sure that our results are quite consistent.

## **Conclusion**

The cumulative weight gain in the animals fed saccharin can not be attributed to a reduction in energy expenditure, measured by oxygen consumption, but can be explained by increased food and water intake.

Table 1. Weight, caloric and water intake parameters.

	SAC (n = 12)	SUC (n = 10)	CONT (n = 12)	p value
Yogurt Intake (%)	76.10 ± 1.41	74.35 ± 2.18	73.26 ± 1.81	p = .52.
Basal Weight (g)	207.33 ± 9.48	219.00 ± 6.74	219.67 ± 8.53	p = .51
Total Weight Gain (g)	135.92 ± 8.89	117.00 ± 7.05	131.00 ± 7.51	p = .26
Mean Total Caloric Intake (kcal/g/wk) <sup>#</sup>	2.02 ± 0.06	2.08 ± 0.06	1.87 ± 0.04	p = .03
Mean Calories from Yogurt (kcal/g/wk) <sup>#</sup>	0.14 ± 0.003	0.40 ± 0.01***	0.14 ± 0.01	p < .001
Mean Calories from Chow (kcal/g/wk) <sup>#</sup>	1.88 ± 0.06	1.68 ± 0.05*	1.73 ± 0.04	p = .03
Mean Water intake (ml/g/wk) <sup>#</sup>	0.57 ± 0.01	0.50 ± 0.02*	0.54 ± 0.02	p = .02

<sup>#</sup> Mean intake of 12-weeks period, corrected by weekly weight rat.

Data are mean ± SE. Analysis by ANOVA with Dunnett's test. Asterisks indicate comparison with CONT: \*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.005 and \*p < 0.05. Group labels: SAC (Saccharin), SUC (Sucrose) and CONT (Control)

Table 2. VO<sub>2</sub>, RER and OGTT parameters.

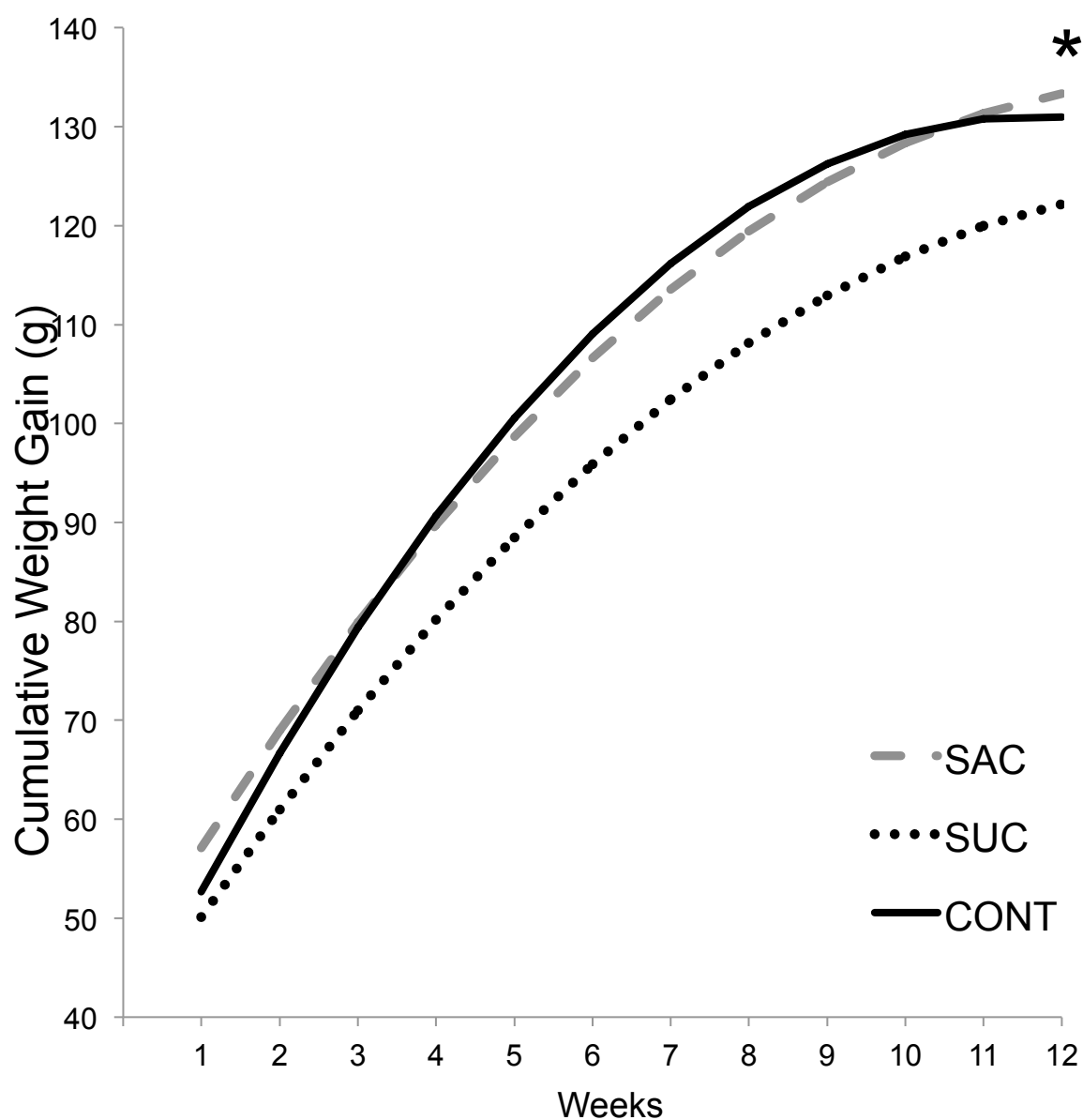
	SAC (n = 12)	SUC (n = 10 <sup>a</sup> )	CONT (n = 12)	Test value
VO <sub>2</sub> baseline (ml/kg/min)	27.72 ± 1.91	28.66 ± 3.08	28.15 ± 2.53	p = .97
VO <sub>2</sub> wk 5 (ml/kg/min)	28.39 ± 1.96	29.35 ± 3.16	28.83 ± 2.59	p = .97
VO <sub>2</sub> wk 12 (ml/kg/min)	27.16 ± 0.87	29.08 ± 1.61	27.58 ± 0.97	p = .49
AUC VO <sub>2</sub>	334.71 ± 18.80	349.53 ± 30.78	339.91 ± 23.56	p = .91
RER baseline (VCO <sub>2</sub> /VO <sub>2</sub> )	0.63 ± 0.21	0.74 ± 0.38	0.64 ± 0.31	p = .69
RER wk 5 (VCO <sub>2</sub> /VO <sub>2</sub> )	0.74 ± 0.07	0.72 ± 0.04	0.67 ± 0.03	p = .66
RER wk 12 (VCO <sub>2</sub> /VO <sub>2</sub> )	0.65 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.71 ± 0.03	p = .47
AUC RER	8.51 ± 0.56	8.66 ± 0.33	8.28 ± 0.36	p = .83
AUC of OGTT wk 6	10665 ± 284.64	10894.50 ± 321.18	10153 ± 330.94	p = .68
AUC of OGTT wk 12	10665 ± 284.64	10894.50 ± 321.18	10153 ± 330.94	p = .13

<sup>a</sup>n = 9 for "AUC of TOTG wk 6"

Data are mean ± SE for Analysis by ANOVA with Dunnett's test; or median ± Interquartile Range for independent-sample Kruskal-Wallis test.

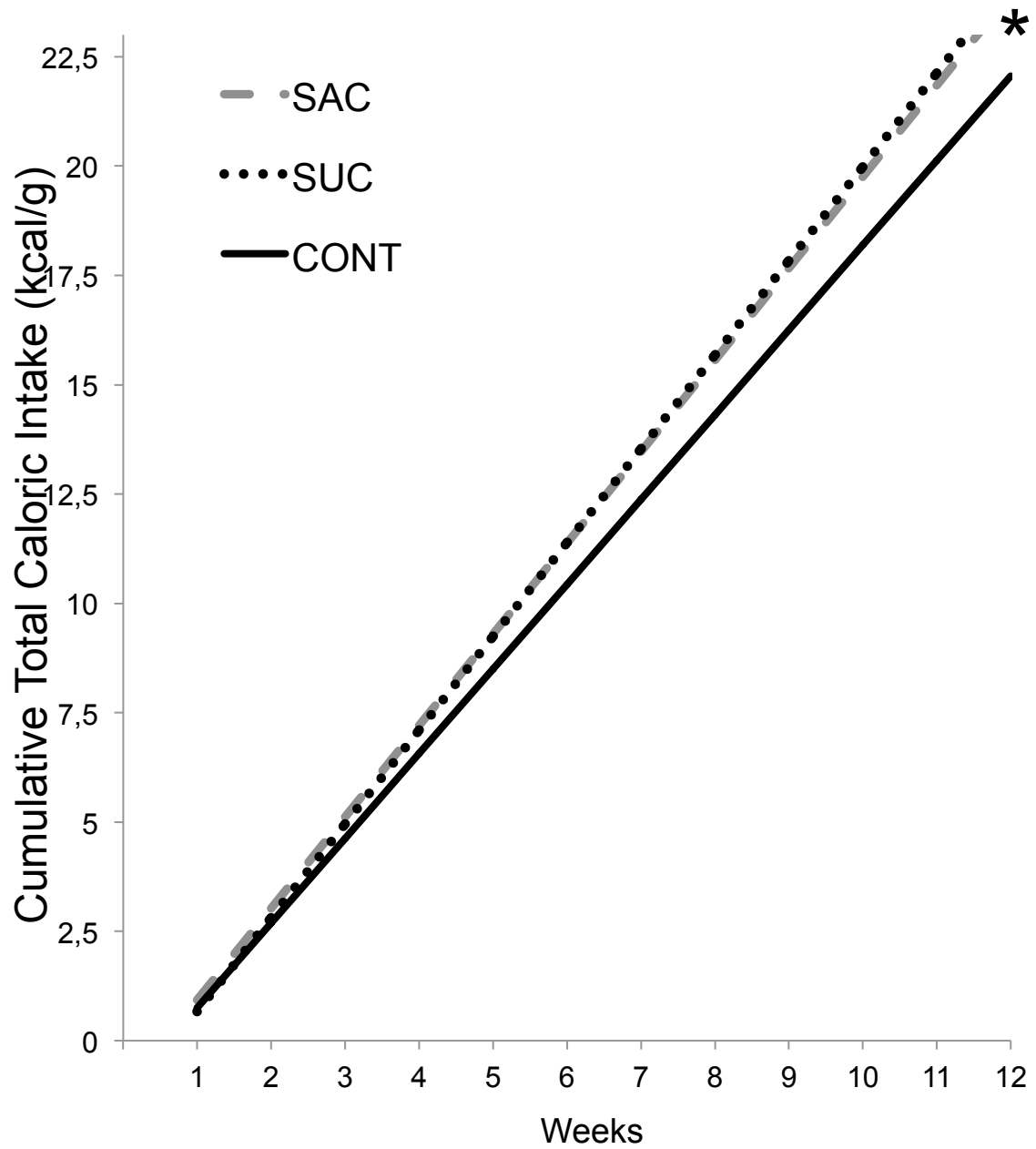
Group labels: SAC (Saccharin), SUC (Sucrose) and CONT (Control).

Abbreviations: RER (respiratory exchange ratio), AUC (area under curve), OGTT (oral glucose tolerance test).



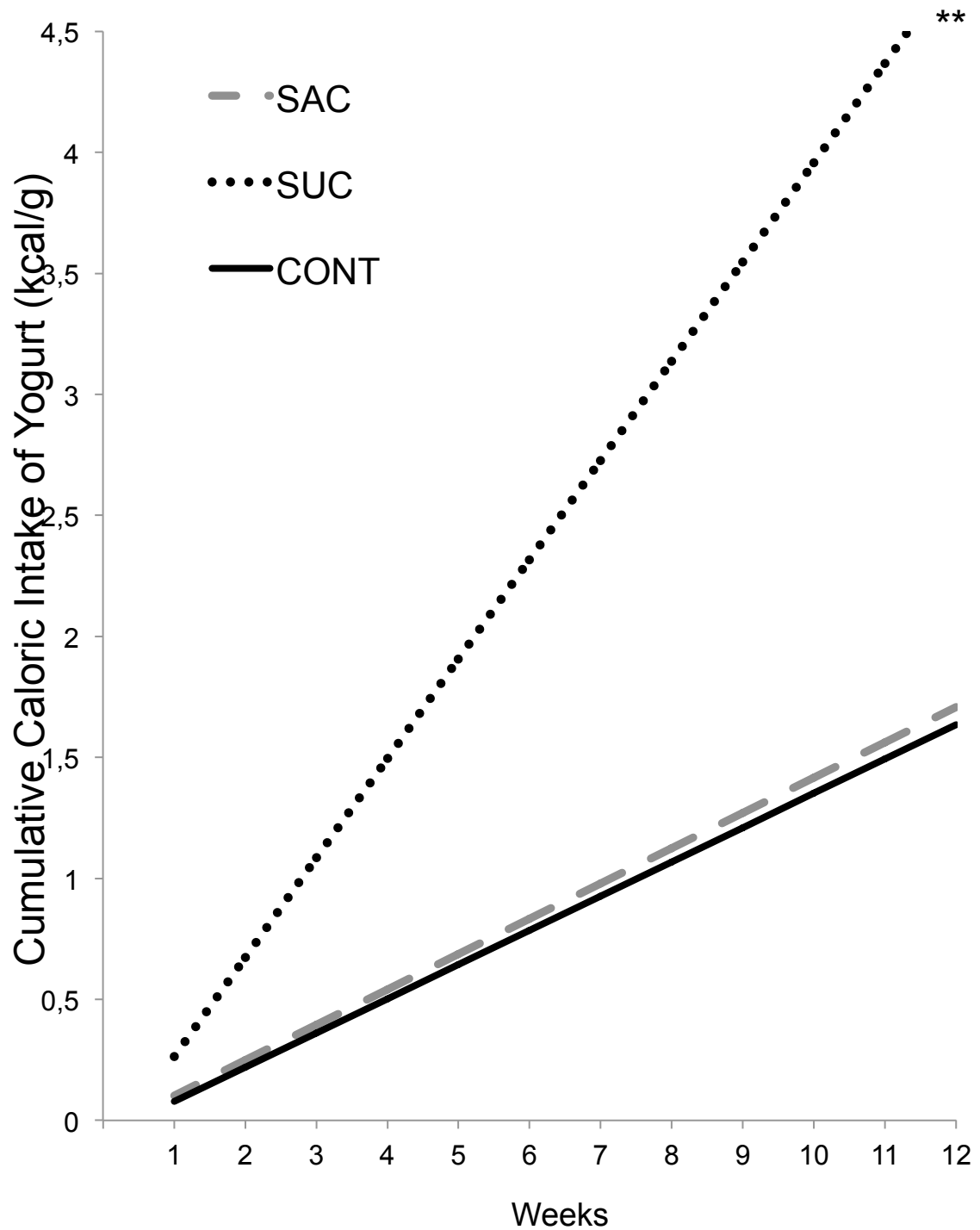
**Figure 1A:** Cumulative weight gain (g) over the 12 weeks, determined by linear mixed model with random effects (slope and intercept) for groups and controlling for time, using a quadratic model. Asterisks indicate comparisons in relation to SAC: \*,  $p < .05$  SAC in relation to CONT. Group labels: SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 10$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ )  $F(2, 150.45) = 3.55, p = .031$



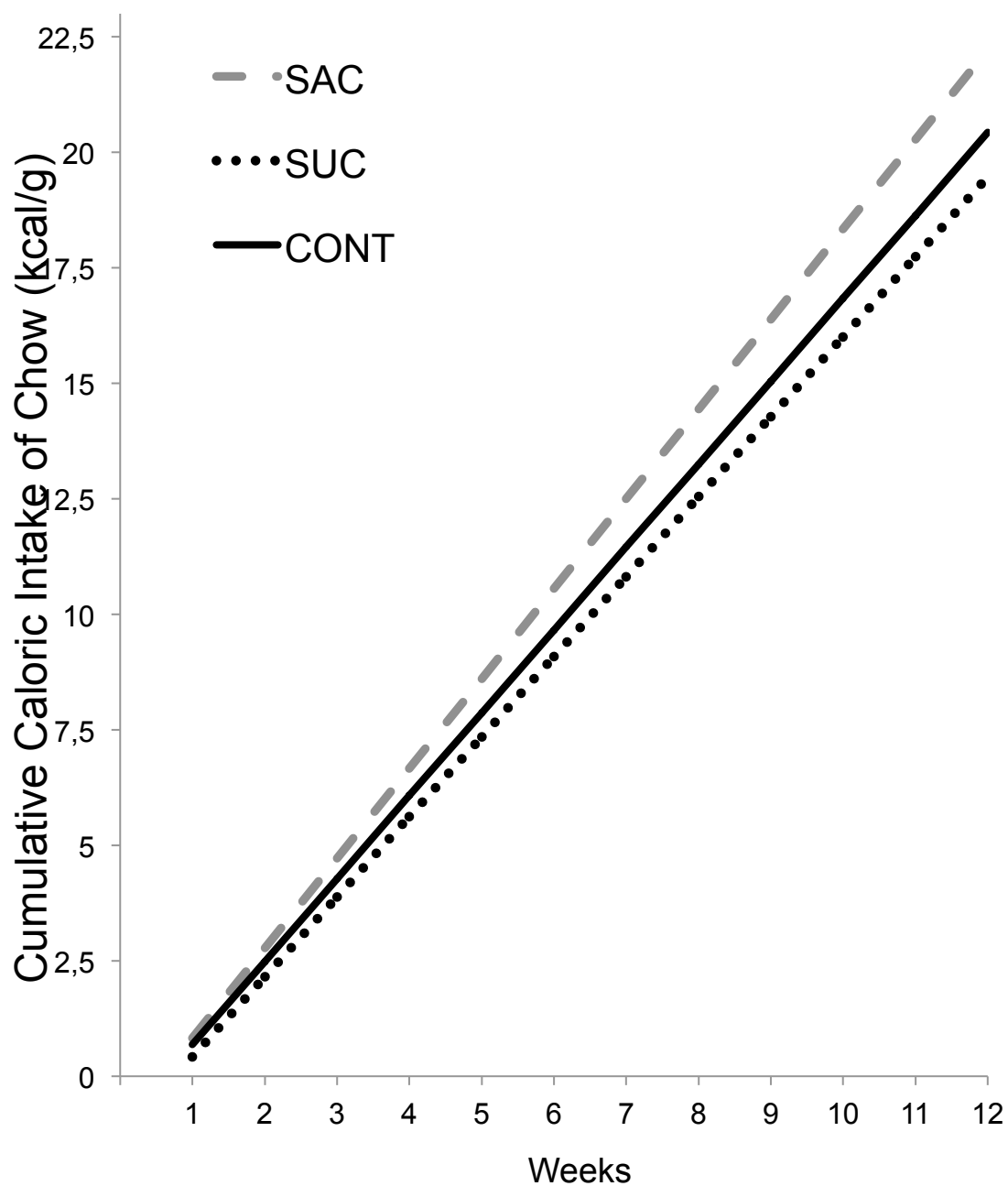


**Figure 2A:** Cumulative of total caloric intake corrected by the weight weekly (kcal/g) over the 12 weeks, determined by linear mixed model. Asterisks indicate comparisons in relation to SAC: \*,  $p < .05$  SAC in relation to CONT. Group labels: SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 10$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ )

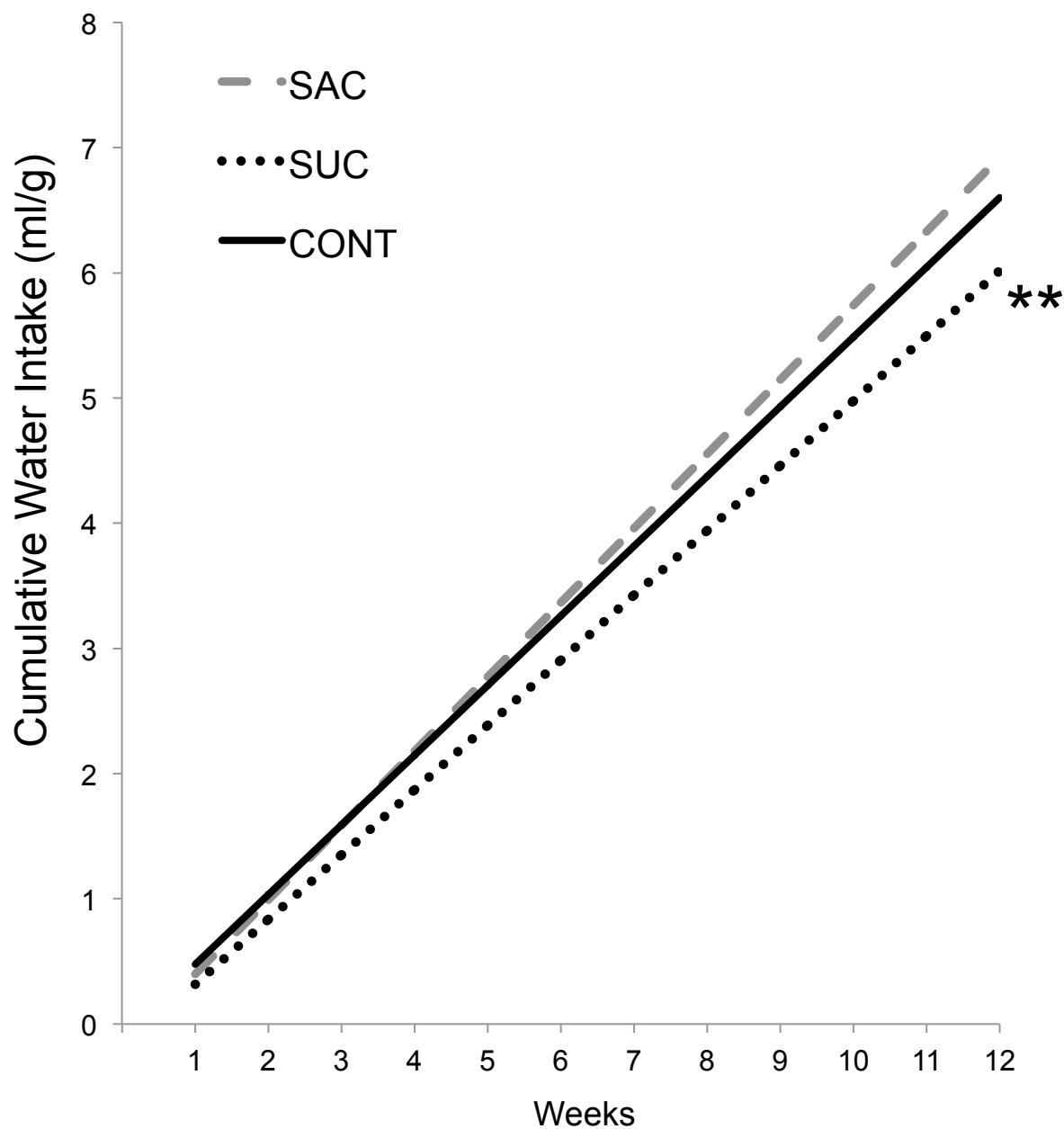
$F(2, 39.52) = 3.89, p = .029$



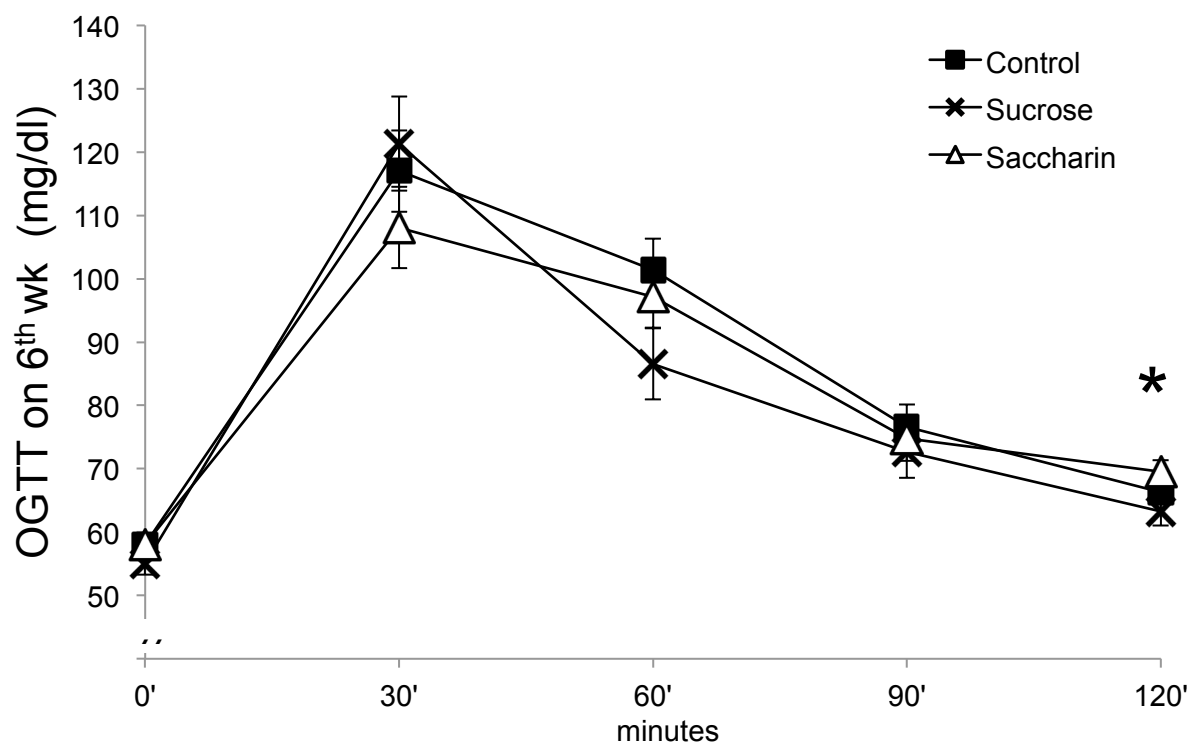
**Figure 3A:** Cumulative caloric intake of yogurt corrected by the weight weekly (kcal/g) over the 12 weeks, determined by linear mixed model. Asterisks indicate comparisons in relation to SAC: \*\*\*,  $p < .001$  SAC vs SUC. Group labels: SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 10$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ ).  $F(2, 35.29) = 270.08$ ,  $p > .001$



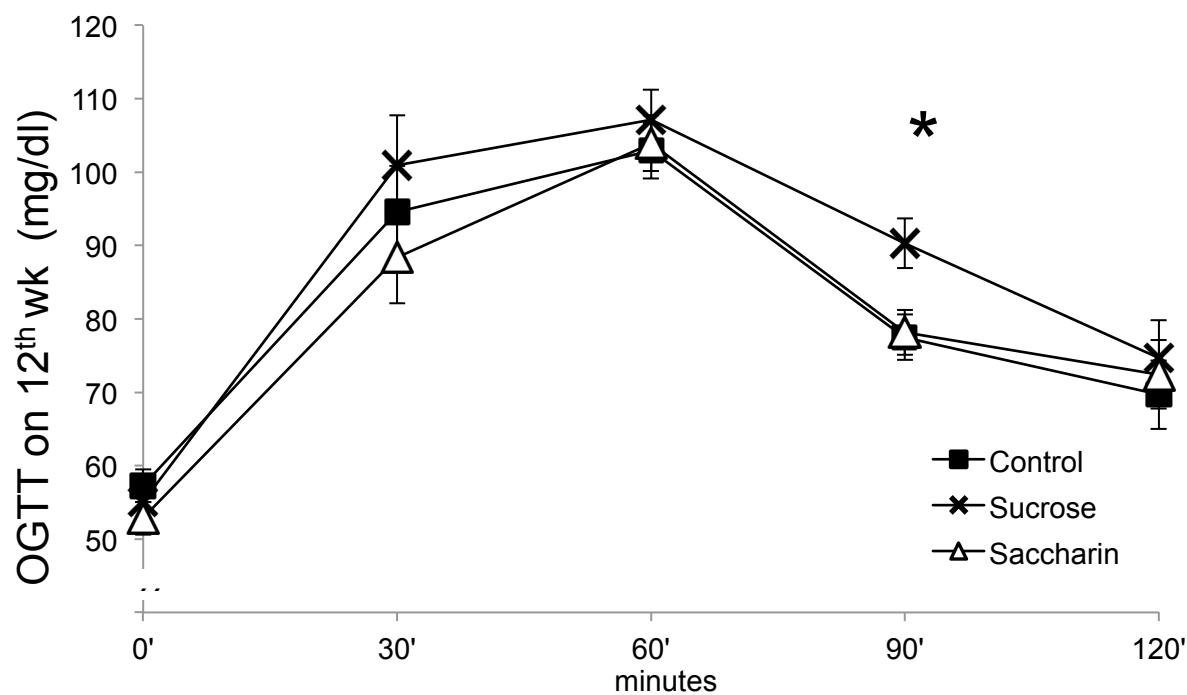
**Figure 4A:** Cumulative caloric intake of chow corrected by the weight weekly (kcal/g) over the 12 weeks, determined by linear mixed model. Asterisks indicate comparisons in relation to SAC: \*,  $p < .05$  SAC in relation to SUC and CONT. SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 10$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ )  $F(2, 41.65) = 4.39$ ,  $p = .019$ .



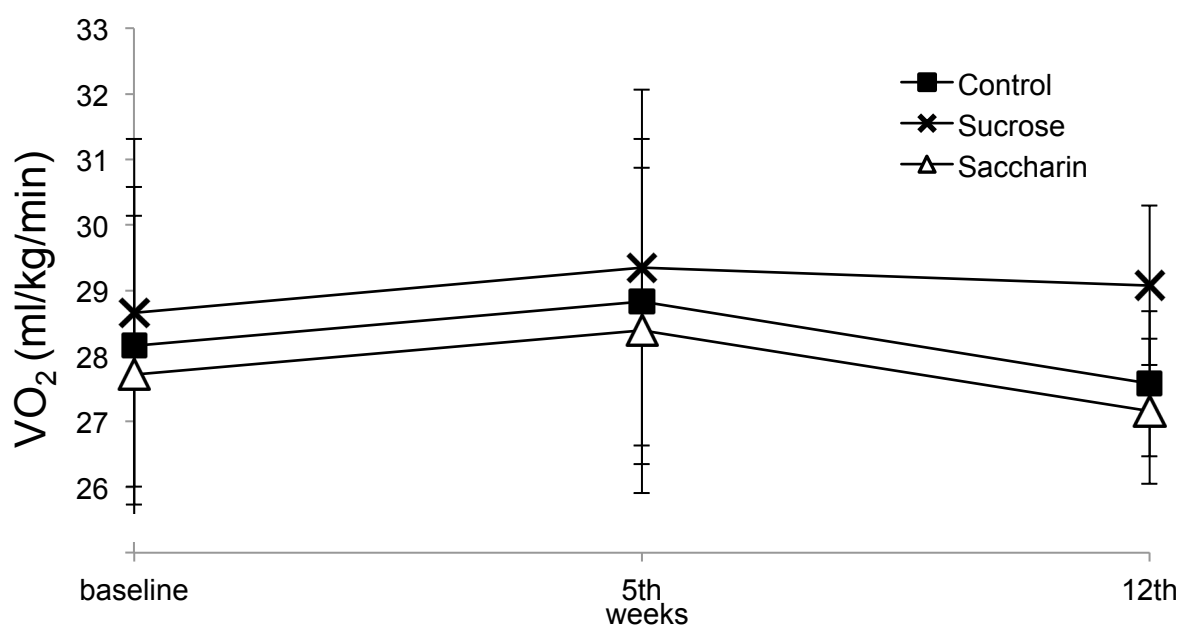
**Figure 5A:** Cumulative water intake corrected by the weight weekly (ml/g) over the 12 weeks, determined by linear mixed model. Asterisks indicate comparisons in relation to SAC: \*\*,  $p < .005$  SAC in relation to SUC. Group labels: SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 10$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ )  $F(2, 33.07) = 4.45$ ,  $p = .018$



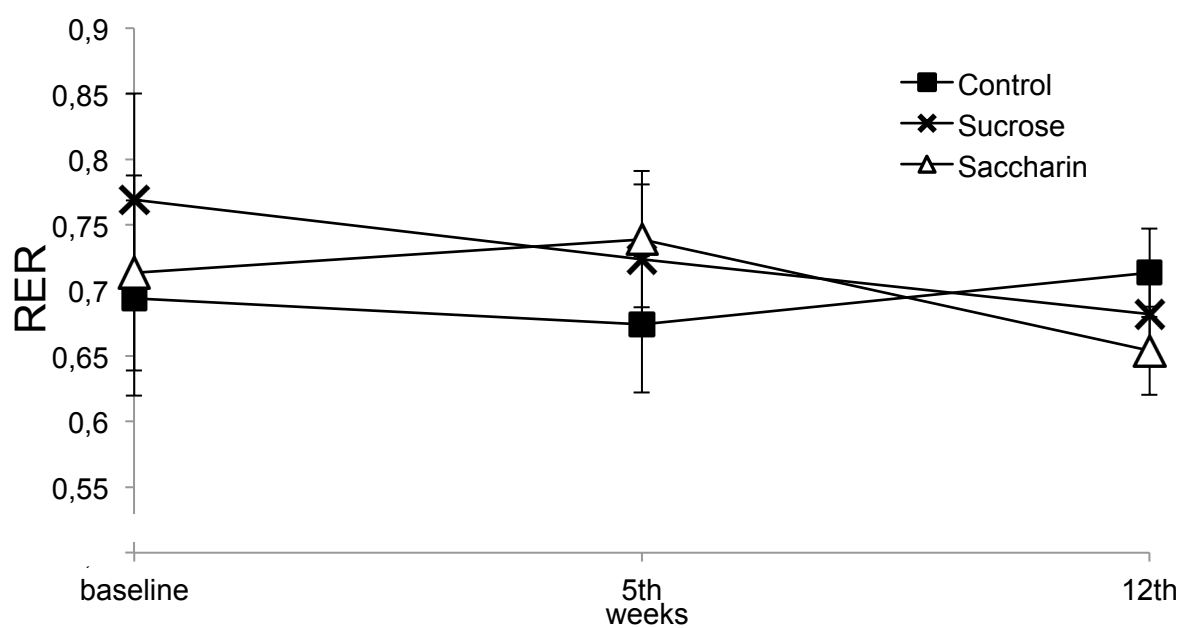
**Figure 1B:** Oral glucose tolerance test (OGTT) on 6<sup>th</sup> wk conducted. Analyzed by ANOVA of repeated measures. Asterisk indicate \*,  $p < .05$ : SAC in relation to SUC in time 120'. Group labels: SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 9$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ )  $F(3.89, 58.34) = 1.34, p = .27$



**Figure 2B:** Oral glucose tolerance test (OGTT) on 12<sup>th</sup> wk conducted. Analyzed by ANOVA of repeated measures. Asterisk indicate \*,  $p < .05$ : SAC in relation to SUC in time 90'. Group labels: SAC (Saccharin,  $n = 12$ ), SUC (Sucrose,  $n = 10$ ) and CONT (Control,  $n = 12$ ).  $F(5.91, 91.53) = .70, p = .64$



**Figure 3B:** VO<sub>2</sub> conducted on baseline, 5<sup>th</sup> wk and 12<sup>th</sup> wk . Analyzed by ANOVA of repeated measures. Group labels: SAC (Saccharin, n = 12), SUC (Sucrose, n = 10) and CONT (Control, n = 12) .  $F(2, 31.01) = .07, p = .93$



**Figure 4B:** RER (respiratory exchange ratio) conducted on baseline, 5<sup>th</sup> wk and 12<sup>th</sup> wk . Analyzed by ANOVA of repeated measures . Group labels: SAC (Saccharin, n = 12), SUC (Sucrose, n = 10) and CONT (Control, n = 12) .  
 $F(2.87, 44.48) = .48, p = .69$



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível relacionar o aumento de peso cumulativo das 12 semanas de estudo nos grupos controle, sacarina e sacarose com as modificações do consumo de oxigênio em repouso antes e durante a intervenção dietética.

Através da análise da ingestão cumulativa corrigida pelo peso semanal, o presente estudo demonstrou que o aporte calórico, independente do tipo de suplemento avaliado (sacarina, sacarose e controle) exerce papel fundamental na modulação do apetite.

No grupo sacarina e controle ocorreu compensação calórica em relação a ração ofertada, pois o iogurte suplementado possuía menos calorias quando comparados àqueles que consumiram iogurte com sacarose.

Dessa forma, houve respectivas diferenças entre a ingestão dos suplementos de iogurte e de ração, de modo que a ingestão calórica total (iogurte mais ração) demonstrou ser diferente naqueles animais que consumiram a sacarina. Adicionalmente, a ingestão hídrica também demonstrou ser superior no grupo sacarina e essa porção diferiu de forma significativa entre os grupos.

Em relação ao teste de tolerância de glicose e as AUC's, a sacarina mostrou diferença significativa em relação a sacarose nas semanas 6 e 12 nos tempos 120 e 90 minutos, respectivamente.

Com base nos resultados apresentados, concluímos que o uso de sacarina como alternativa adjuvante no controle do peso deve ser medido, tendo em vista que, em ratos, seu uso pode levar ao ganho de peso excessivo. Perspectivas futuras que contemplem avaliar os mecanismos fisiológicos pelo qual a sacarina induz ao maior ganho de peso, devem ser consideradas.

## REFERENCES

- Brown, R. J., M. A. de Banate and K. I. Rother (2010). "Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth." Int J Pediatr Obes **5**(4): 305-312.
- Byard, J. L. and L. Goldberg (1973). "The metabolism of saccharin in laboratory animals." Food Cosmet Toxicol **11**(3): 391-402.
- Clemente, J. C., L. K. Ursell, L. W. Parfrey and R. Knight (2012). "The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view." Cell **148**(6): 1258-1270.
- Cleophas, T. J., A. H. Zwinderman and B. van Ouwerkerk (2010). "Clinical Research: A Novel Approach to the Analysis of Repeated Measures." Am J Ther.
- Colditz, G. A., W. C. Willett, M. J. Stampfer, S. J. London, M. R. Segal and F. E. Speizer (1990). "Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women." Am J Clin Nutr **51**(6): 1100-1105.
- Davidson, T. L., A. A. Martin, K. Clark and S. E. Swithers (2011). "Intake of high-intensity sweeteners alters the ability of sweet taste to signal caloric consequences: Implications for the learned control of energy and body weight regulation." Q J Exp Psychol (Colchester) **64**(7): 1430-1441.
- Dhingra, R., L. Sullivan, P. F. Jacques, T. J. Wang, C. S. Fox, J. B. Meigs, R. B. D'Agostino, J. M. Gaziano and R. S. Vasan (2007). "Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community." Circulation **116**(5): 480-488.
- Feijo F, M., C. R. Ballard, K. C. Foletto, B. A. Batista, A. M. Neves, M. F. Ribeiro and M. C. Bertoluci (2013). "Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels." Appetite **60**(1): 203-207.
- Fowler, S. P., K. Williams, R. G. Resendez, K. J. Hunt, H. P. Hazuda and M. P. Stern (2008). "Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain." Obesity (Silver Spring) **16**(8): 1894-1900.
- Lutsey, P. L., L. M. Steffen and J. Stevens (2008). "Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study." Circulation **117**(6): 754-761.
- Mattes, R. D. and B. M. Popkin (2009). "Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms." Am J Clin Nutr **89**(1): 1-14.

- Polyák, E., K. Gombos, B. Hajnal, K. Bonyár-Müller, S. Szabó, A. Gubicskó-Kisbenedek, K. Marton and I. Ember (2010). "Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake." Acta Physiol Hung **97**(4): 401-407.
- Roberts, A., A. G. Renwick, J. Sims and D. J. Snodin (2000). "Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man." Food Chem Toxicol **38 Suppl 2**: S31-41.
- Rogers, P. J., J. A. Carlyle, A. J. Hill and J. E. Blundell (1988). "Uncoupling sweet taste and calories: comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake." Physiol Behav **43**(5): 547-552.
- Shankar, P., S. Ahuja and K. Sriram (2013). "Non-nutritive sweeteners: review and update." Nutrition **29**(11-12): 1293-1299.
- Shek, D. T. and C. M. Ma (2011). "Longitudinal data analyses using linear mixed models in SPSS: concepts, procedures and illustrations." ScientificWorldJournal **11**: 42-76.
- Suez, J., T. Korem, D. Zeevi, G. Zilberman-Schapira, C. A. Thaiss, O. Maza, D. Israeli, N. Zmora, S. Gilad, A. Weinberger, Y. Kuperman, A. Harmelin, I. Kolodkin-Gal, H. Shapiro, Z. Halpern, E. Segal and E. Elinav (2014). "Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota." Nature **514**(7521): 181-186.
- Swithers, S. E. and T. L. Davidson (2008). "A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats." Behav Neurosci **122**(1): 161-173.
- Swithers, S. E. and T. L. Davidson (2008). "A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats." Behav Neurosci **122**(1): 161-173.
- Swithers, S. E., A. F. Laboy, K. Clark, S. Cooper and T. L. Davidson (2012). "Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats." Behav Brain Res **233**(1): 1-14.
- Swithers, S. E., A. A. Martin and T. L. Davidson (2010). "High-intensity sweeteners and energy balance." Physiol Behav **100**(1): 55-62.
- West, B. T. (2009). "Analyzing longitudinal data with the linear mixed models procedure in SPSS." Eval Health Prof **32**(3): 207-228.
- Yang, Q. (2010). "Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010." Yale J Biol Med **83**(2): 101-108.

## ANEXOS

## Fluxograma CONSORT 2010

