

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/02/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Programação Fetal por Sacarina Sódica: Impacto sobre a saúde materna e na capacidade reprodutiva da prole masculina

Alana Rezende Godoi

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

BOTUCATU – SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMAÇÃO FETAL POR SACARINA SÓDICA: IMPACTO

SOBRE A SAÚDE MATERNA E NA CAPACIDADE

REPRODUTIVA DA PROLE MASCULINA

ALANA REZENDE GODOI

PROFA. DRA. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

PROF. DR. LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

**BOTUCATU – SP
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Godoi, Alana Rezende.

Programação fetal por sacarina sódica : impacto sobre a saúde materna e na capacidade reprodutiva da prole masculina / Alana Rezende Godoi. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

Coorientador: Luis Antonio Justulin Junior

Capes: 20100000

1. Desenvolvimento fetal. 2. Glicose. 3. Serviços de saúde à maternidade. 4. Adoçantes artificiais. 5. Saúde reprodutiva. 6. Testículos.

Palavras-chave: Adoçantes; Eficiência reprodutiva; Metabolismo de glicose; Programação fetal; Testículo.

*Aos meus pais,
Isabel e Ronaldo, meu alicerce!
Obrigada por depositarem tanta confiança em mim! Esta conquista é resultado de todos os
esforços que fizeram para que eu tivesse uma boa educação. Vocês são meus maiores
exemplos de família e amor!
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Patricia Fernanda Felipe Pinheiro, que para mim é bem mais que uma orientadora... é amiga, parceira, confidente e, nas horas vagas, segunda mãe. Sempre muito dedicada a tudo que faz, a orientadora mais preocupada com o bem-estar de todos que a cercam. Meus sinceros agradecimentos por aceitar que eu faça parte deste pedacinho da sua história e por querer fazer parte da minha. Pelos conhecimentos e ensinamentos compartilhados, pelo apoio e confiança que deposita em mim! E claro, por aturar minhas maluquices diárias. Você estará eternamente guardada em meu coração. Obrigada!

Ao meu coorientador, Luis Antonio Justulin Junior, por aceitar fazer parte deste trabalho e pela solicitude sempre que precisei.

Ao Francisco Eduardo Martinez, um grande professor no qual tive a sorte e imenso prazer em conhecer. Obrigada pelos diversos ensinamentos que o senhor compartilha conosco, pela ajuda e participação na realização deste trabalho, pelos momentos de descontração, pela imensa paciência e por aquele belo cappuccino da D. Cristiane que alegra nossas tardes. O senhor é exemplo para todas nós!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao meu esposo e parceiro, Raul César Dias Rebeschini, que sempre acreditou na minha capacidade, me apoiou nos momentos difíceis e não permitiu que eu desistisse deste objetivo. Suportou a distância e se dedicou a mim, com muito amor e carinho. Te amo.

À minha irmã Francine de Rezende e meu cunhado, Raphael Kleber Chuilki, sem vocês nada disso seria possível. Pelo apoio e incentivo naquilo que eu acreditava. Pelos lindos sobrinhos terríveis e inquietos, de coração e bondade enorme. Obrigada por tanto! Ao meu gordinho favorito, meu irmão Arthur Rezende Godoi, e cunhada, Kelvia Vigilatto Gouveia, pelo acolhimento e as boas risadas que partilhamos sempre que nos vemos. Pelas preciosidades Luísa, Júlia e Thomas, que grudam em mim a partir do instante em que chego. Obrigada por todos me deixarem com o maior papel de tia aos 25 anos, sendo digna de meros, cinco sobrinhos (risos). Eu amo todos vocês!

Às minhas avós, Gelina Dal Bem Rezende e Geny da Silva Godoi, meus tesouros, amores e rainhas. Minha imensa e eterna gratidão por todo carinho e afeto que mesmo distante, é possível ser sentido. Eu amo, amo, amo vocês!

Aos meus sogros, Sueli Aparecida Dias Rebeschini e Antonio Carlos Rebeschini, por vibrarem comigo todas as minhas conquistas e sempre torcerem pelo meu sucesso.

À Vanessa Caroline Fioravante, como alguns dizem: irmã separada na maternidade, por ser tão parecida comigo. Maluquinha que me tira do sério as vezes e em outras me faz chorar de gratidão. Eu nem preciso expor aqui o quão importante você foi para a realização deste trabalho pois você sabe! Espero que nossa amizade e parceria perdure e que Deus me dê paciência para isso também! (risos)

À Renata, Beatriz e Anna Clara, fiéis parceiras. Obrigada por todos os esforços que fizeram para que tudo desse certo. Por toda a paciência e dedicação. Pelas coletas alegres e pelo trabalho excepcional de todas! Este trabalho tem um pedacinho de cada uma de vocês.

À Veridiana Carvalho dos Santos, amiga que a Anatomia me deu desde 2016 em meu momento mais perdido da vida. Obrigada pelas conversas, ajudas, conselhos e pela sua companhia até hoje, não medindo esforços para estar presente em cada momento importante da minha jornada.

À Maira Smaniotto Cuciello, meu completo oposto! Amiga, companheira, parceira e muito persistente por permanecer e aturar toda a minha frieza, meu ódio por abraços e todos os tipos de carinhos comuns, por saber que nossa amizade é sincera e repleta de sentimentos bons para com a outra. Você é o lado bonzinho e fofo que me falta, obrigada pelo equilíbrio!

Aos fiéis companheiros da salinha dos alunos inquietos da Anatomia, Marília, Talita, Victória, Henrique e Lupi, pelos bons cafés e chás, pela pipoca sagrada, almoços animados, pelas artes que aprontamos sempre ao final de cada semana e por sempre serem solícitos quando precisei de ajuda. Obrigada!

Ao Gelson, o técnico de laboratório mais exigente e perfeccionista que eu conheci! Um excelente profissional, de um coração imenso. Obrigada por me auxiliar nas diversas vezes em que precisei de você!

À Cristiane, Paulo, Luciano e Gustavo, pelas tardes sempre animadas. Pelas conversas de papers que a gente sempre tenta fugir e por toda ajuda em meu estágio docência. Obrigada pela solicitude de todos!

À nossa amada e tão querida Vandinha. Agradeço por sempre ser gentil e brincalhona comigo. Torço para que sua vida seja eternamente repleta de luz! Obrigada por cuidar tão bem de nós!

À Profa. Dra. Arielle, Barbara e Mariana, por compartilharem seus conhecimentos e me auxiliarem na realização de parte deste trabalho. Obrigada!

Ao Zé, técnico de laboratório do departamento de Morfologia, por sempre ser tão solícito quando precisei. Obrigada!

Aos professores e colegas do Departamento de Anatomia, pelas risadas a cada café. Obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano de verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1.....	3
Introdução.....	3
Adoçantes.....	6
Estrutura e função do testículo	9
Desenvolvimento do testículo e Síndrome da Disgenesia Testicular (TDS)	11
Justificativa e Objetivos Gerais	11
Objetivos específicos.....	12
Referências	13
CAPÍTULO 2 - <i>Adaptive responses to the intake of sodium saccharin during gestation and lactation: Observations in the maternal and male offspring rats metabolism</i>	20
Abstract.....	21
1. Introduction	22
2. Materials and methods.....	23
3. Results	27
4. Discussion.....	29
5. Conclusion.....	32
Acknowledgments	32
Authors' contributions.....	32
Conflict of interest.....	33
References	33
Legends.....	38
Tables	39
CAPÍTULO 3 - <i>Fetal programming by glucose and sodium saccharin: Impact in the reproductive capacity male offspring Sprague Dawley rats</i>	46
Abstract.....	47
Introduction	48
Materials and methods.....	50
Results	58
Discussion.....	63
Conclusion.....	66
Acknowledgments	66
Authors' contributions.....	66
References	67
Legends.....	75
Tables	76
CONCLUSÕES	89
APÊNDICES	90
Estresse oxidativo.....	90

RESUMO

Introdução: A hipótese da “programação fetal” defende que eventos ocorridos durante a vida intrauterina exerçam influência na patogênese de doenças na vida adulta. Fatores ambientais podem programar no indivíduo o surgimento precoce de doenças cardiovasculares e metabólicas. Atualmente, há um aumento no consumo de adoçantes artificiais associados a tratamentos para a perda de peso e no controle do diabetes, sendo a sacarina sódica um dos mais consumidos. Entretanto, durante a gestação e lactação, o uso de sacarina sódica é restrito, por ser permeável a placenta, interagindo com o conceito e, por compor o leite materno. Embora os efeitos do uso de adoçantes sobre o peso corpóreo e o metabolismo sejam bastante conhecidos, não há relatos de pesquisas que relacionam a programação fetal pelo uso de sacarina sódica com o desenvolvimento pós-natal do testículo. Desta forma, o presente estudo visa investigar a influência do uso da sacarina sódica e da glicose na saúde materna e reprodutiva dos descendentes machos. **Material e métodos:** Ratas *Sprague Dawley* foram alimentadas durante a prenhez e lactação com dieta padrão para roedores, água filtrada *ad libitum* e suplementadas com iogurte natural desnatado (Grupo Controle Iogurte, n= 9); iogurte natural desnatado adoçado com solução de glicose (Dinâmica®) a 5% (v/v) (Grupo Glicose, n= 10); iogurte natural desnatado adoçado com solução de sacarina sódica (Dinâmica®) a 0,3% (v/v) (Grupo Sacarina Sódica, n= 10). As dietas líquidas foram preparadas com a adição de 20mL de iogurte natural desnatado (Nestlé®) a 15mL de água filtrada, para ajuste de viscosidade. Durante a prenhez e lactação, Ratas *Sprague Dawley* receberam dieta líquida por 7 dias por semana. Após o desmame, entre o DPN70 aos DPN120, metade da prole recebeu as mesmas dietas durante 5 dias por semana. A outra metade recebeu dieta padrão para roedores, água filtrada *ad libitum*. Após a eutanásia, o fígado, o pâncreas, os testículos e os depósitos de gorduras foram removidos, dissecados e pesados. Os testículos foram processados de acordo com os protocolos histológicos, imunohistoquímicos e de Western Blotting. O desenvolvimento físico, a glicemia, a tolerância à glicose e à insulina, os níveis de enzimas antioxidantes, as concentrações plasmáticas de hormônios esteroides, a morfologia, produção diária e o tempo de trânsito dos espermatozoides também foram analisados. **Resultados:** Capítulo 2: Ratas *Sprague Dawley* expostas à sacarina sódica exibiram aumento na eficiência alimentar, resistência insulínica após o tratamento, diminuição no peso do fígado e aumento no peso do pâncreas e gorduras retroperitoneais. Os descendentes de mães expostas à sacarina sódica apresentaram adiantamento no crescimento de pêlos, atraso na abertura dos olhos, maior distância anogenital no DPN20, baixo peso do fígado e aumento das gorduras epididimárias, retroperitoneais e cardíaca. Capítulo 3: A exposição dos animais à glicose e à sacarina sódica durante a vida intrauterina resultou na descamação do epitélio seminífero. Animais que foram expostos durante a vida fetal e adulta à glicose apresentaram menor coeficiente de eficácia alimentar, menor depósito de gordura, diminuição do espaço luminal e no diâmetro tubular, aumento do espaço intersticial, do fluído testicular, das concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol, além da expressão aumentada de AR, maior produção espermática, menor contagem de espermatozoides e menor tempo de trânsito no epidídimo. Os animais suplementados com sacarina sódica demonstraram diminuição no coeficiente de eficácia alimentar e no peso das gorduras retroperitoneais, maior depósito de gordura cardíaca, fluído testicular aumentado, diminuição da concentração plasmática de testosterona, aumento da expressão de AR e da quantificação de PCNA, diminuição da expressão de PCNA, aumento da produção espermática e menor tempo de trânsito na região de cabeça e corpo do epidídimo. **Conclusões:** As respostas adaptativas confirmam a existência de programação fetal por consumo de sacarina sódica e glicose. Essas adaptações foram demonstradas pelas alterações metabólicas e morfofuncionais confirmadas pela: predisposição ao diabetes; interferência da sacarina sódica nas alterações dos níveis plasmáticos de testosterona e estradiol; queda na produção espermática nos animais programados com sacarina sódica e glicose.

Palavras-chave: adoçantes não nutritivos, testículo, metabolismo de glicose, desenvolvimento físico, reprodução.

ABSTRACT

Introduction: The "fetal programming" hypothesis argues that events that occur during intrauterine life have an influence on the pathogenesis of diseases in adulthood. Environmental factors can program in the individual the early onset of cardiovascular and metabolic diseases. Currently, there is an increase in the consumption of artificial sweeteners associated with treatments for weight loss and diabetes control, with sodium saccharin being one of the most consumed. However, during pregnancy and lactation, the use of sodium saccharin is restricted, since it is permeable to the placenta, interacting with the conceptus, and for composing breast milk. Although the effects of the use of sweeteners on the body weight and metabolism are well known, there are no reports of researches which relate fetal programming through the use of sodium saccharin to the postnatal development of the testis. Thus, the present study aims to investigate the influence of the use of sodium saccharin and glucose on the maternal and reproductive health of male offspring. **Material and methods:** Dams Sprague-Dawley rats were fed during pregnancy and lactation with a standard chow for rodents, filtered water *ad libitum* and supplemented with low-fat plain yogurt (Yogurt Control Group, n = 9); low-fat plain yogurt sweetened with 5% (v/v) glucose solution (Dinâmica[®]) (Glucose Group, n = 10); low-fat plain yogurt sweetened with 0.3% (v/v) sodium saccharin solution (Dinâmica[®]) (Sodium Saccharin Group, n = 10). The liquid diets were prepared with the addition of 20mL of low-fat plain yogurt (Nestlé[®]) to 15mL of filtered water, for viscosity adjustment. During the pregnancy and lactation, Dams Sprague-Dawley received a liquid diet during 7 days a week. After weaning, between DPN70 to DPN120, half of the offspring received the same diets during 5 days a week. The other half received a standard diet for rodents, filtered water *ad libitum*. After euthanasia, the liver, pancreas, testis and fat deposits were removed, dissected and weighed. The testes were processed according to histological, immunohistochemical and Western Blotting protocols. Physical development, blood glucose, glucose and insulin tolerance, antioxidant enzyme levels, plasma concentrations of steroid hormones, morphology, daily production and sperm transit time were also analyzed. **Results:** Chapter 2: Dams Sprague-Dawley exposed to sodium saccharin exhibited an increase in feed efficiency, insulin resistance after the treatment, a decrease in liver weight and an increase in the weight of the pancreas and retroperitoneal fats. The offspring of mothers exposed to sodium saccharin showed an advancement in hair growth, delayed opening of the eyes, greater anogenital distance in the DPN20, smaller weight of the liver and increased epididymal, retroperitoneal and cardiac fats. Chapter 3: Exposure of animals to glucose and sodium saccharin during intrauterine life resulted in the desquamation of the seminiferous epithelium. Animals which were exposed during fetal and adult life to glucose had a lower coefficient of feed efficiency, smaller fat deposits, decreased luminal space and tubular diameter, increased interstitial space, increased testicular fluid, decreased testosterone and estradiol concentrations, in addition to increased expression of AR, higher sperm production, lower sperm count and shorter transit time in the epididymis. The animals supplemented with sodium saccharin showed a decrease in the coefficient of feed efficiency and in the weight of retroperitoneal fat, a greater deposit of cardiac fat, increased testicular fluid, a decrease in plasma testosterone concentration, an increase in the AR expression and in the quantification of PCNA, a decrease in expression of PCNA, increased sperm production and shorter transit times in the head and body region of the epididymis. **Conclusions:** Adaptive responses confirm the existence of fetal programming due to the consumption of sodium saccharin and glucose. These adaptations were demonstrated by the metabolic and morphofunctional changes confirmed by a predisposition to diabetes; interference of sodium saccharin in the changes in plasma testosterone and estradiol levels; decline in the sperm production in animals programmed with sodium saccharin and glucose.

Key-words: nonnutritive sweeteners, testis, glucose metabolism, physical development, reproduction.

CAPÍTULO 1

Introdução

A hipótese da “programação fetal”, primeiramente apresentada por David Barker, associa o surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas a uma origem fetal. Os estudos de Baker indicaram que regiões que possuíam altas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares, também apresentavam altas taxas de mortalidade entre os recém-nascidos. Assim, foi defendido que eventos ocorridos durante a vida intrauterina influenciam a patogênese de doenças cardiovasculares e metabólicas durante a vida adulta (BARKER, OSMOND, 1986; BARKER, OSMOND, 1987; BARKER et al., 1989; OSMOND et al., 1993; BARKER, 1994).

A falta ou a deficiência nutricional em períodos críticos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos tem consequências a curto e longo prazo alterando o desenvolvimento de tecidos específicos, modificando a secreção ou a sensibilidade destes tecidos a hormônios ao longo da vida. Nessas condições, há um ajuste ou uma resposta adaptativa que otimiza o crescimento dos principais sistemas orgânicos em detrimento de outros conduzindo o organismo a um metabolismo pós-natal alterado, que é projetado para melhorar a sobrevivência na vida pós-natal em condições de nutrição pobre ou intermitente (MCMILLEN & ROBINSON, 2005).

O *imprinting* metabólico é o termo utilizado para descrever essas respostas adaptativas do indivíduo sob condições nutricionais específicas no início da vida que são, sumariamente, caracterizadas pela susceptibilidade limitada do organismo a uma janela ontogênica crítica e pelo surgimento de efeitos duradouros sobre a estrutura ou função do corpo (MCMILLEN & ROBINSON, 2005). Atualmente, as condições relacionadas à programação fetal são apresentadas como “Origens fetais do desenvolvimento da saúde e da doença”, DOHaD (MCMILLEN, ROBINSON, 2005; RINAUDO, WANG, 2012).

Há trabalhos de pesquisa que observaram que filhos de mães expostas a dietas durante o período gestacional podem apresentar alterações morfofuncionais acentuadas quando expostos ao mesmo estímulo durante o desenvolvimento pós-natal (PENNINGTON et al., 2012; TSOULIS et al., 2016). Fatores ambientais, particularmente a má nutrição materna, podem programar no indivíduo o surgimento precoce de doenças cardiovasculares e metabólicas. Associados à estas doenças crônicas não transmissíveis, observa-se o aumento do risco de desenvolvimento de hipertensão arterial, de hiperlipidemia, do diabetes mellitus tipo 2, da resistência à insulina e da obesidade na vida adulta. Essas alterações físicas, metabólicas e teciduais caracterizam a síndrome metabólica humana (OZANNE, 2001; DRAKE & WALKER, 2004; MCMILLEN & ROBINSON, 2005; MCARDLE, 2006; BARKER, 2007; LEANDRO et al., 2009).

Por sua vez, nota-se um aumento exponencial da incidência da obesidade nos últimos anos, bem como a grande preocupação com relação ao aumento na ingestão de alimentos e bebidas com alto teor de açúcares e a possível associação ao ganho de peso e a instalação da obesidade (GUTHRIE, MORTON, 2000; KANT, 2000; KREBS-SMITH et al., 2000; JOHNSON, FRARY, 2001; KREBS-SMITH, 2001; LUDWIG, PETERSON, GORTMAKER, 2001; COULSTON, JOHNSON, 2002; PUTNAM, ALLSHOUSE, KANTOR, 2002). Dietas ricas em açúcares são capazes de elevar a carga glicêmica, uma das principais causas de obesidade e da incidência de síndrome metabólica (BRAND-MILLER et al., 2002; SCHULZE et al., 2004).

Açúcares simples, como a sacarose e a frutose, são encontrados em muitos produtos industrializados como refrigerantes e sucos. Além disso, seu consumo aumentado na adolescência e vida adulta (DANYLIW et al., 2012; JENSEN et al., 2012; NIKPARTOW et al., 2012) está relacionado ao surgimento e a prevalência da obesidade e do diabetes (MORENO & RODRIGUEZ, 2007; NIKPARTOW et al., 2012).

Neste sentido, com o intuito de auxiliar indivíduos em tratamentos para a perda de peso e no controle do diabetes, observa-se que nos últimos anos, o consumo de adoçantes artificiais, substitutos do açúcar de mesa, aumentou e ganhou popularidade em todo o mundo (CUMMINGS & OVERDUIN, 2007; POLYÁK et al., 2010). No entanto, surpreendentemente, verifica-se na literatura científica especializada relatos de estudos epidemiológicos e clínicos que associam o uso de adoçantes não nutritivos ao aumento de adiposidade (COLDITZ et al., 1990; FOWLER et al., 2008), ao surgimento do diabetes mellitus tipo 2, da síndrome metabólica e de doenças cardiovasculares (DHINGRA et al., 2007; LUTSEY, STEFFEN, & STEVENS, 2008). Parte dessas alterações orgânicas está relacionada ao fato dos adoçantes não nutritivos interferirem nos mecanismos reguladores do apetite promovendo o ganho de peso (ROGERS et al., 1988; POLYÁK et al., 2010; DAVIDSON et al., 2011). Esses adoçantes são pouco calóricos ou efetivamente não calóricos e, normalmente, excedem ao poder adoçante da sacarose (açúcar de mesa) por um fator adoçante entre 30 a 13.000 vezes (WHITEHOUSE, BOULLATA, MCCAULEY, 2008).

Há o entendimento de que o consumo dos adoçantes não nutritivos estimula a ingestão alimentar compensatória em resposta a consequente ausência de calorias associadas aos estímulos gustativos doces. Esta resposta estaria relacionada a percepção do sabor doce que envolve a ação de receptores gustativos doces orais e intestinais que, por meio de impulsos vagais aferentes levam esta informação ao tálamo e ao sistema de recompensa (BERTHOUD, 2002; SARIS, 2003; BELLISLE & DREWNOWSKI, 2007; CUMMINGS & OVERDUIN, 2007; RENWICK & MOLINARY, 2010; SMEETS, ERKNER, & DE GRAAF, 2010; YANG, 2010).

Adoçantes

Os adoçantes são compostos por edulcorantes (substâncias que adoçam) e por um agente de corpo. Grande parte dos adoçantes comercializados combinam dois ou mais edulcorantes. Essa combinação potencializa as propriedades de cada edulcorante e minimiza as desvantagens dos mesmos, principalmente a existência de sabor residual (TORLONI et al., 2007; BRUGNERA, BARUFFI, PANATTO, 2012).

Os agentes de corpo constituem substâncias derivadas do álcool ou do amido e sua associação com os adoçantes ajuda a disfarçar o sabor residual dos edulcorantes, melhorando a palatabilidade do produto final. Os agentes de corpo ainda inibem a cristalização, além de serem espessantes e anticongelantes (TORLONI et. al., 2007).

Os agentes de corpo derivados do álcool são chamados de polióis. Os mais usados são: manitol, sorbitol, xilitol, eritrol, lactilol, isomalte e maltitol. Os derivados do amido são carboidratos naturais sendo a lactose, a frutose, a maltodextrina, a dextrina e o açúcar invertido os mais utilizados (TORLONI et. al., 2007).

A Agência Regulatória de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos da América (*U.S. Food and Drug Administration - FDA*) apresenta uma lista de adoçantes nutritivos e não nutritivos de alta intensidade, classificados como reconhecidamente seguros, são eles: a sacarina, o aspartame, o acesulfame-potássio, a sucralose, o neotame, o advantame, a estévia (*Stevia rebaudiana*) e o fruto monge (*Luo Han Guo fruit extracts ou monk fruit*) (SHARMA et al., 2016; FDA, 2020).

Dos adoçantes não nutritivos, a sacarina sódica é um dos mais consumidos em todo o mundo (Figura 1). A sacarina sódica, descoberta em 1878, foi o primeiro adoçante não nutritivo comercializado. Amplamente utilizada como substituto ao açúcar em dietas para diabéticos, entre os anos de 1970 a 1981, a sacarina sódica foi o único adoçante disponível nos Estados Unidos (KROGER, MEISTER, KAVA, 2006). Atualmente, o seu uso é destinado para adoçar vários produtos como refrigerantes, pães, geleias, goma de mascar, frutas em conserva, doces, coberturas de sobremesa e saladas, bem como produtos cosméticos (creme dental e enxaguante bucal), vitaminas e medicamentos (WHITEHOUSE, BOULLATA, MCCAULEY, 2008). Devido ao seu sabor amargo, passou a ser associada a outros edulcorantes, principalmente após a descoberta do ciclamato de sódio em 1950 (TORLONI et al., 2007).

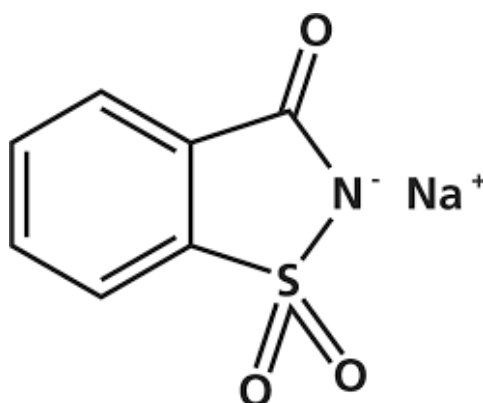


Figura 1: Estrutura química da sacarina sódica.

Em 1958, com a aprovação da *Emenda de Aditivos Alimentares* à Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (*Federal Food, Drug and Cosmetic – FDC*), iniciou-se o processo de regulamentação do uso de sacarina sódica. Embora considerada como uma substância reconhecidamente segura, em 1972 estudos associaram o seu uso ao surgimento de câncer de bexiga em ratos (TISDEL et al., 1974; TAYLOR et al., 1980; SCHOENIG et al., 1985). Dessa forma, a FDA removeu a sacarina sódica da lista de substâncias reconhecidamente seguras. Mesmo assim, este aditivo dietético nunca foi retirado do mercado (KROGER, MEISTER, KAVA, 2006).

Após ameaças da FDA em proibir o consumo de sacarina sódica, foi aprovada uma lei que determinou a adoção de etiquetas de advertência em embalagens de alimentos e bebidas que continham sacarina sódica. Outros estudos em animais somados à relatos de caso não haver associações entre o consumo de sacarina sódica e o risco de câncer de bexiga em humanos (MORGAN, WONG, 1985; ELCOCK, MORGAN, 1993). Dessa forma, a sacarina sódica foi removida da lista de compostos cancerígenos e, uma nova legislação determinou a retirada dos avisos nos rótulos de produtos alimentares (KROGER, MEISTER, KAVA, 2006).

Atualmente, a FDA considera sacarina sódica um composto seguro, pois é excretada pelos rins de maneira inalterada (WHITEHOUSE, BOULLATA, MCCAULEY, 2008). A FDA recomenda para humanos (adultos ou crianças) a ingestão máxima de 15mg/kg corpóreo de sacarina sódica como dose diária aceitável (IDA) (FDA, 2020). Entretanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil), indica que a IDA de sacarina sódica deve ser 0,08g/100mL (líquido) e 0,50g/100g (sólido) (Resolução RDC n°24, de 15 de fevereiro de 2005).

Durante o período gestacional, indica-se a restrição ao seu uso, pois a placenta é permeável a sacarina sódica, podendo interagir com o concepto, permanecendo assim nos tecidos fetais devido a sua menor capacidade de excreção. Esta também pode compor o leite materno se ingerida durante a lactação (BRUGNERA, BARUFFI, PANATTO, 2012).

Embora os efeitos do uso de adoçantes sobre o peso corpóreo e sobre o metabolismo sejam bastante conhecidos, não há relatos de pesquisas que relacionam a programação fetal pelo uso destes adoçantes, incluindo a sacarina sódica, com o desenvolvimento pós-natal do testículo.

Estrutura e função do testículo

No desenvolvimento de parte do sistema genital masculino é importante considerar a existência de uma janela de “programação fetal masculinizante” (MPW), que nos ratos está compreendida entre o 15,5 – 18,5 dias pós-concepção. Neste período, os andrógenos atuam na formação, na proliferação e no crescimento normal dos órgãos e estruturas masculinas (Figura 1). A atuação dos andrógenos continua ao longo da vida reprodutiva dos machos. Em humanos e em primatas não-humanos (PRAHALADA et al., 1997; HERMAN et al, 2000) a MPW está compreendida entre a 8ª e 14ª semana de gestação (WELSH et al., 2008) (Figura 2).

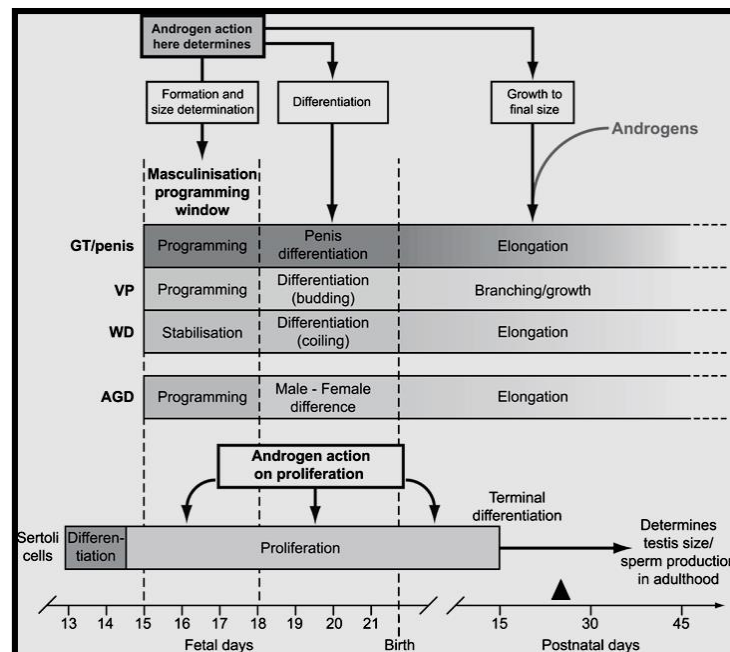


Figura 2: Esquema sobre a atuação dos andrógenos (tempo-dependente) na determinação da diferenciação, formação e crescimento dos órgãos do sistema genital masculino. Em ratos, a MPW ocorre entre 15,5 e 18,5 dias pós-concepção. Note que, nos períodos da MPW e pós-natal, os andrógenos atuam no desenvolvimento dos órgãos. GT, tubérculo genital; VP, próstata ventral; WD, duto de Wolff; AGD, distância anogenital (WELSH et al., 2008).

Os testículos se originam da crista genital, que sob estímulo adequado promove a programação de genes, a organização e a regulação celular distinta (SVIGEN AND KOOPMAN, 2013).

Sabe-se que o gene *Sry* é o fator determinante para o desenvolvimento do testículo em mamíferos, a partir da crista genital (GUBBAY, et al, 1990; SINCLAIR, et al.,1990; KOOPMAN, et al., 1991). De acordo com pesquisadores, o testículo é formado a partir da

associação de células precursoras inatas e de células migrantes, incluindo as células germinativas. Entretanto, a diferenciação das linhagens de células que formam o testículo não ocorre de forma independente, mas segue através da diferenciação das células de Sertoli, que em seguida orquestra o comportamento de todos os outros tipos de linhagens de células do testículo (BURGOYNE, et al. 1995).

No rato, ao redor do 12º dia pós-natal (DPN), observa-se que o desenvolvimento dos túbulos seminíferos inicia quando as células de Sertoli fetais e as células mióides peritubulares cercam as células germinativas masculinas primordiais, determinando a formação de cordões sexuais primitivos e a migração de células germinativas primordiais para eles (SHARPE et al., 2003). Posteriormente ao período de diferenciação das células de Sertoli, as células de Leydig fetais e as células mióides peritubulares se diferenciam e ocorre a formação dos compartimentos do testículo com o estabelecimento dos túbulos testiculares e do espaço intersticial. Os túbulos testiculares, uma vez formados, constituem-se de células germinativas em mitose e ao seu redor as células de Sertoli. Os túbulos também apresentam uma camada de células mióides peritubulares e matriz extracelular que dá suporte estrutural (SVINGEN & KOOPMAN, 2013). Para proteger o testículo que está em desenvolvimento e estender essa proteção pós-natal, ainda na fase fetal, é formada a túnica albugínea que se constitui de membrana basal fibrosa que envolve o testículo. Além de proteção, a túnica contribui para cessar a migração das células extragonadais colaborando para a diferenciação precoce do testículo (KARL & KARPEL, 1998, citado por SVINGEN & KOOPMAN, 2013).

O desenvolvimento pós-natal dos testículos de ratos inclui vários estágios, com início no dia do nascimento, dia zero, até 70 DPN. Os estágios são: neonatal (0 a 7 DPN), infantil (8 a 20 DPN), juvenil (21 a 32 DPN), peripuberal (33 a 55 DPN) e “adolescência” (pós-puberal/adulto jovem) (56 a 70 DPN). A partir de 70 DPN, os ratos machos são considerados sexualmente adultos (PICUT, et al. 2014).

Desenvolvimento do testículo e Síndrome da Disgenesia Testicular (TDS)

Distúrbios na saúde reprodutiva masculina, em resposta à níveis anormais de andrógenos na MPW, podem se manifestar no nascimento (criptorquidia e hipóspadia) ou até mesmo na idade adulta jovem (câncer de células germinativas e baixa contagem de espermatozoides) compreendendo a Síndrome da Disgenesia Testicular (TDS) (SCOTT et al., 2008; SHARPE & SKAKKEBAEK, 2008; MACLEOD et al., 2010).

A incidência destas desordens muda conforme a região geográfica, afetando parte população do Ocidente, particularmente os caucasianos, sendo relacionadas à fatores ambientais e/ou estilo de vida. Além disto, têm-se notado que em regiões que possuem baixa ocorrência de casos, o desenvolvimento testicular é mais rápido quando comparado a locais de alta incidência de casos de TDS, indicando que os distúrbios podem ter origem na vida fetal (SHARPE & SKAKKEBAEK, 2008).

Sendo assim, o desenvolvimento anormal do testículo, que por sua vez pode possuir diversas causas primárias, leva, secundariamente, a uma disfunção das células de Leydig e de Sertoli, aumentando as chances de evolução das desordens que compreendem a TDS (SCOTT et al., 2008; SHARPE & SKAKKEBAEK, 2008; MACLEOD et al., 2010).

Referências

- ANDERSEN JM, HERNING H, ASCHIM EL, HJELMESÆTH J, MALA T, HANEVIK HI, BUNGUM M, HAUGEN TB, WITCZAK O. Body Mass Index Is Associated with Impaired Semen Characteristics and Reduced Levels of Anti-Müllerian Hormone across a Wide Weight Range. **PLoS One**. v. 12;10(6):e0130210, jun, 2015.
- BARKER DJ, OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**. n.1, v.8489, p. 1077-81, mai, 1986.
- BARKER DJ, OSMOND C. Death rates from stroke in England and Wales predicted from past maternal mortality. **Br Med J (Clin Res Ed)**, n.295, v.6590, p. 83-6, jul, 1987.
- BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, p. 564- 567, 1989.
- BARKER DJ. Mothers, babies and disease in later life. London: **BMJ Publishing Group**. 1994.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J. Intern. Med.**, v.261, p.412-7, 2007.
- BELLISLE, F.; DREWNOWSKI, A. Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p. 691–700, 2007.
- BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosci. Biobehav. Rev.**; v. 26(4), p. 393-428. Review, 2002.
- BINDER NK, MITCHELL M, GARDNER DK. Parental diet-induced obesity leads to retarded early mouse embryo development and altered carbohydrate utilisation by the blastocyst. **Reprod Fertil Dev**. v.24(6):804-12, 2012.
- BINDER NK, BEARD SA, KAITU'U-LINO TJ, TONG S, HANNAN NJ, GARDNER DK. Paternal obesity in a rodent model affects placental gene expression in a sex-specific manner. **Reproduction**. v.149(5), p.435-44, mai, 2015.
- BRAND-MILLER JC, HOLT SH, PAWLAK DB, MCMILLAN J. Glycemic index and obesity. **Am J Clin Nutr**. v.76(1), p.281S-5S, jul, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº24, de 15 de Fevereiro de 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao%2BRDC%2Bn%2B24%2Bde%2B15%2Bde%2Bfevereiro%2Bde%2B2005.pdf/a1a7283d-4354-4958-aa6e-a3bbb903f122>. Acesso em: 28 jan. 2020.
- BRUGNERA, V. F.; BARUFFI, V.; PANATTO, E. Utilização dos adoçantes durante a gestão e lactação. **Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia**, Nº 02 – Ano 3 – junho/2012 – p. 6-13.

- BURGOYNE, P. S.; THORNHILL, A. R.; BOUDREAN, S.K.; DARLING, S.M.; BISHOP, C. E.; EVANS, E. P. The genetic basis of XX–XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 350, p. 253–260, 1995.
- CHAVARRO JE, TOTTH TL, WRIGHT DL, MEEKER JD, HAUSER R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. **Fertil Steril.** v.93(7), p.2222-31, mai, 2010.
- COLDITZ, G. A.; WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; LONDON, S. J.; SEGAL, M. R.; SPEIZER, F. E. Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, p. 1100–1105, 1990.
- COULSTON AM, JOHNSON RK. Sugar and sugars: myths and realities. **J Am Diet Assoc.** v.102(3), p.351-3, 2002.
- CUMMINGS, D. E., & OVERDUIN, J. Gastrointestinal regulation of food intake. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 13–23, 2007.
- DANYLIW AD, VATANPARAST H, NIKPARTOW N, WHITING SJ. Beverage patterns among Canadian children and relationship to overweight and obesity. **Appl Physiol Nutr Metab.** v.37(5), p.900-6, out, 2012.
- DAVIDSON, T. L.; MARTIN, A. A.; CLARK, K.; SWITHERS, S. E. 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. (Hove)**, v. 64(7), p. 1430-41, 2011.
- DHINGRA, R.; SULLIVAN, L.; JACQUES, P. F.; WANG, T. J.; FOX, C. S.; MEIGS, J. B.; D'AGOSTINO, R. B.; GAZIANO, J. M.; VASAN, R. S. Soft drink consumption and risk of developing cardio metabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**; v. 116, p. 480–488, 2007.
- DING GL, WANG FF, SHU J, TIAN S, JIANG Y, ZHANG D, WANG N, LUO Q, ZHANG Y, JIN F, LEUNG PC, SHENG JZ, HUANG HF. Transgenerational glucose intolerance with Igf2/H19 epigenetic alterations in mouse islet induced by intrauterine hyperglycemia. **Diabetes.** v.61(5), p.1133-42, mai, 2012.
- DRAKE, A. J.; WALKER, B.R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. **J. Endocrinol**, v.180, p.1–16, 2004.
- ELCOCK M, MORGAN RW. Update on artificial sweeteners and bladder cancer. **Reg Toxicol Pharmacol**, v.17:35–43. 1993.
- FOWLER, S. P.; WILLIAMS, K.; RESENDEZ, R. G.; HUNT; K. J.; HAZUDA, H. P.; STERN, M. P. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16(8), p. 1894-900, 2008.

FULLSTON T, PALMER NO, OWENS JA, MITCHELL M, BAKOS HW, LANE M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. **Hum Reprod.** v.27(5), p.1391-400, mai, 2012.

GE ZJ, LIANG QX, HOU Y, HAN ZM, SCHATTEN H, SUN QY, ZHANG CL. Maternal obesity and diabetes may cause DNA methylation alteration in the spermatozoa of offspring in mice. **Reprod Biol Endocrinol.** v.12, p.29, abr, 2014.

GUBBAY J, KOOPMAN P, COLLIGNON J, BURGOYNE P, LOVELL-BADGE R. Normal structure and expression of Zfy genes in XY female mice mutant in Tdy. **Development,** v.09, p. 647–653, 1990.

GUTHRIE JF, MORTON JF. Food sources of added sweeteners in the diets of Americans. **J Am Diet Assoc.** v.100(1), p.43-51, 2000.

HERMAN, R. A.; JONES, B.; MANN, D. R.; & WALLEN, K. Timing of prenatal androgen exposure: anatomical and endocrine effects on juvenile male and female rhesus monkeys. **Hormones and Behaviour,** v.38, p.52-66, 2000.

JENSEN TK, ANDERSSON AM, JØRGENSEN N, ANDERSEN AG, CARLSEN E, PETERSEN JH, SKAKKEBAEK NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. **Fertil Steril.** v.82(4), p.863-70, out, 2004.

JENSEN BW, NICHOLS M, ALLENDER S, DE SILVA-SANIGORSKI A, MILLAR L, KREMER P, LACY K, SWINBURN B. Consumption patterns of sweet drinks in a population of Australian children and adolescents (2003-2008). **BMC Public Health.** v.12, p.771, set, 2012.

JOHNSON RK, FRARY C. Choose beverages and foods to moderate your intake of sugars: the 2000 dietary guidelines for Americans--what's all the fuss about? **J Nutr.** v.131(10), p.2766S-2771S, 2001.

KANT AK. Consumption of energy-dense, nutrient-poor foods by adult Americans: nutritional and health implications. The third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Am J Clin Nutr.** v.72(4), p.929-36, 2000.

KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature,** v. 351, p. 117–121, 1991.

KREBS-SMITH SM, GRAUBARD BI, KAHLE LL, SUBAR AF, CLEVELAND LE, BALLARD-BARBASH R. Low energy reporters vs others: a comparison of reported food intakes. **Eur J Clin Nutr.** v.54(4), p.281-7, 2000.

KREBS-SMITH SM. Choose beverages and foods to moderate your intake of sugars: measurement requires quantification. **J Nutr.** v.131(2S-1), p.527S-535S, 2001.

KROGER, M.; MEISTER, K.; KAVA, R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. **Comprehensive reviews in food science and food safety,** v.5, p.35-47, 2006.

LEANDRO, C. G.; AMORIM, M. F.; HIRABARA, S. M.; CURI, R.; MANHÃES DE CASTRO, R. Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição? **Rev. Nutr.**, v.22, p.559-569, 2009.

LUDWIG DS, PETERSON KE, GORTMAKER SL. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. **Lancet**. v.357(9255), p.505-8, 2001.

LUTSEY PL, STEFFEN LM, STEVENS J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Circulation**, v. 117, p. 754–761, 2008.

MACLEOD, D. J.; SHARPE, R. M.; WELSH, M.; FISKEN, M.; SCOTT, H. M.; HUTCHISON, G. R.; DRAKE, A. J.; DRIESCHE, S. van den. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. 279-287, 2010.

MCARDLE, H. J. Fetal programming causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. **Placenta**, v.27, p.56-60, 2006.

MCMILLEN I. C.; ROBINSON J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol. Rev.**, v.85, p.571-633, 2005.

MITCHELL M, BAKOS HW, LANE M. Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. **Fertil Steril**. v.95(4), p.1349-53, mar, 2011.

MORENO LA, RODRÍGUEZ G. Dietary risk factors for development of childhood obesity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v.10(3), p.336-41, mai, 2007.

MORGAN RW, WONG O. A review of epidemiological studies on artificial sweeteners and bladder cancer. **Food Chem Toxicol**, v. 23:529–33. 1985.

NAVYA H, YAJURVEDI HN. Obesity causes weight increases in prepubertal and pubertal male offspring and is related to changes in spermatogenesis and sperm production in rats. **Reprod Fertil Dev**. v.29(4), p.815-823, abr, 2017.

NGUYEN RH, WILCOX AJ, SKJAERVEN R, BAIRD DD. Men's body mass index and infertility. **Hum Reprod**. v.22(9), p.2488-93, set, 2007.

NIKPARTOW N, DANYLIW AD, WHITING SJ, LIM H, VATANPARAST H. Fruit drink consumption is associated with overweight and obesity in Canadian women. **Can J Public Health**. v.103(3), p.178-82, mai-jun, 2012.

OSMOND C, BARKER DJ, WINTER PD, FALL CH, SIMMONDS SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. **BMJ**, n.307, v.6918, p.1519-24, dec, 1993.

OZANNE, S. E. Metabolic programming in animals. **Br. Med. Bull.**, v.60, p.143-52, 2001.

PENNINGTON KA, HARPER JL, SIGAFOOS AN, BEFFA LM, CARLETON SM, PHILLIPS CL, SCHULZ LC. Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice. **Endocrinology**. v. 153(9), p. 4556-67, set., 2012.

PICUT; C. A.; REMICK; A. K.; RUK, E. P. C. T.; SIMONS, M. L.; STUMP, D. G.; PARKER, G. A. Postnatal development of the testis in the rat: I. morphologic study and II. Correlation of morphology to neuroendocrine parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 43, p. 326-42, 2014.

POLYÁK, E.; GOMBOS, K.; HAJNAL, B.; BONYÁR-MÜLLER, K.; SZABÓ, S.; GUBICKSKÓ-KISBENEDEK, A.; MARTON, K.; EMBER, I. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 97(4), p. 401–407, 2010.

PRAHALADA, S.; TARANTAL, A. F.; HARRIS, G. S.; ELLSWORTH, K. P.; CLARKE, A. P.; SKILES, G. L. et al. Effects of finasteride, a type 2 5-alpha reductase inhibitor, on fetal development in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Teratology**, v.55, p.119-131, 1997.

PUTNAM J., ALLSHOUSE J., KANTOR L. U.S. per capita food supply trends: More calories, refined carbohydrates, and fats. **Food Rev.** v.25, p.2-15, 2002.

RAMLAU-HANSEN CH, THULSTRUP AM, NOHR EA, BONDE JP, SØRENSEN TI, OLSEN J. Subfecundity in overweight and obese couples. **Hum Reprod**. v.22(6), p.1634-7, jun, 2007.

RENWICK, A. G.; MOLINARY, S. V. Sweet-taste receptors, low-energy sweeteners, glucose absorption and insulin release. **Br. J. Nutr.** v. 104(10), p. 1415-20, 2010.

RINAUDO P, WANG E. Fetal programming and metabolic syndrome. **Annu Rev Physiol**. v. 74, p. 107-30, 2012.

ROGERS, P. J., CARLYLE, J. A., HILL, A. J., BLUNDELL, J. E. Uncoupling sweet taste and calories. Comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake. **Physiology and Behavior**, v. 43(5), p. 547–552, 1988.

ROONEY K, OZANNE SE. Maternal over-nutrition and offspring obesity predisposition: targets for preventative interventions. **Int J Obes (Lond)**. v.35(7), p.883-90, jul, 2011.

SALLMÉN M, SANDLER DP, HOPPIN JA, BLAIR A, BAIRD DD. Reduced fertility among overweight and obese men. **Epidemiology**. v.17(5), p.520-3, set, 2006.

SARIS, W. H. Sugars, energy metabolism, and body weight control. **Am. J. Clin. Nutr.**, p. 78(4), p.850S–857S, 2003.

SERMONDADE N, FAURE C, FEZEU L, SHAYEB AG, BONDE JP, JENSEN TK, VAN WELY M, CAO J, MARTINI AC, ESKANDAR M, CHAVARRO JE, KOLOSZAR S, TWIGT JM, RAMLAU-HANSEN CH, BORGES E JR, LOTTI F, STEEGERS THEUNISSEN RP, ZORN B, POLOTSKY AJ, LA VIGNERA S, ESKENAZI B, TREMELLEN K, MAGNUSDOTTIR EV, FEJES I, HERCBERG S, LÉVY R,

CZERNICHOW S. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. **Hum Reprod Update**. v.19(3), p.221-31, mai-jun, 2013.

SCOTT, H. M.; HUTCHISON, G. R.; JOBLING, M. S.; MCKINNELL, C.; DRAKE, A. J.; SHARPE, R. M. Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. **Endocrinology**, v. 149(10), p. 5280-5287, 2008.

SCHOENIG GP, GOLDENTHAL EI, GEIL RG, FRITH CH, RICHTER WR, CARLBORG FW. Evaluation of the dose response and in utero exposure to saccharin in the rat. **Food Chem Toxicol**, v.23:475–90. 1985.

SCHULZE MB, MANSON JE, LUDWIG DS, COLDITZ GA, STAMPFER MJ, WILLET WC, HU FB. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in Young and middle-aged women. **JAMA**. v.292(8), p.927-34, ago, 2004.

SHARMA, S.; WALIA, S.; SINGH, B.; KUMAR, R. Comprehensive review on agro technologies of low-calorie natural sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a boon to diabetic patients. **J Sci Food Agric.**, v. 96(6), p.1867-79, 2016.

SHARPE R.M., MCKINNELL C., KIVLIN C., FISHER J.S. Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v.125(6), p.769– 84, 2003.

SHARPE R.M.; SKAKKEBAEK N. E. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. **Fertility and Sterility**, v. 89(1), p. 33-38, 2008.

SINCLAIR, A.H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHAUF, A.M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. **Nature**, v. 346, p. 240–244, 1990.

SMEETS, P. A.; ERKNER, A.; DE GRAAF, C. Cephalic phase responses and appetite. **Nutr. Rev.**, v. 68(11), p.643-55, 2010.

SVINGEN T, KOOPMAN P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. **Genes & Development**, v. 27, p.2409–2426, 2013.

TAMASHIRO KL, MORAN TH. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. **Physiol Behav**. v.100(5), p.560-6, jul, 2010.

TAYLOR JM, WEINBERGER MA, FRIEDMAN L. Chronic toxicity and carcinogenicity to the urinary bladder of sodium saccharin in the in utero-exposed rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.54:57–75. 1980.

TISDEL MO, NEES PO, HARRIS DL, DERSE PH. Long-term feeding of saccharin in rats. **Symposium: sweeteners. Inglett GE**. p.145–58. 1974.

TORLONI, M. R.; NAKAMURA, M. U.; MEGALE, A.; SANCHEZ, V. H. S.; MANO, C.; FUSARO, A. S.; MATTAR, R. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 267–75, 2007.

TSOULIS MW, CHANG PE, MOORE CJ, CHAN KA, GOHIR W, PETRIK JJ, VICKERS MH, CONNOR KL, SLOBODA DM. Maternal High-Fat Diet-Induced Loss of Fetal Oocytes Is Associated with Compromised Follicle Growth in Adult Rat Offspring. **Biol Reprod**. v.94(4), p. 94, abr, 2016.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States. **Silver Spring**, Maryland, 26 mai. 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397725.htm>. Acesso em: 28 jan. 2020.

WELSH, M.; SAUNDERS, P. T. K.; FISKEN, M.; SCOTT, H. M.; HUTCHISON, G. R.; SMITH, L. B.; SHARPE, R. M. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **The Journal of Clinical Investigation**, v 118, p.1479-1490, 2008.

WHITEHOUSE, C. R.; BOULLATA, J.; MCCAULEY, L. A. The potential toxicity of artificial sweeteners. **Journal of the American Association of Occupational Health Nurses**, v. 56, p. 251–259, 2008.

WILLIAMS L, SEKI Y, VUGUIN PM, CHARRON MJ. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. **Biochim Biophys Acta**. v.1842(3), p.507-519, mar, 2014.

YANG, Q. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. **Neuroscience**. Yale Journal of Biology Medicine, v. 83(2), p. 101–108, 2010.