

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NATÁLIA CARDOSO SANTOS

Influência do consumo de aspartame na elasticidade da
pele e em variáveis metabólicas

BRASÍLIA
2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NATÁLIA CARDOSO SANTOS

**Influência do consumo de aspartame na elasticidade da pele e em
variáveis metabólicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Maria de Fátima Borin
Coorientadora: Michella Soares Coelho

Brasília
2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ci Cardoso Santos, Natália
Influência do consumo de aspartame na
elasticidade da pele e em variáveis metabólicas. /
Natália Cardoso Santos; orientador Dra. Maria de
Fátima Borin; co-orientador Dra. Michella Soares
Coelho. -- Brasília, 2016.
170 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências
Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Aspartame. 2. Elasticidade. 3. Pele;
Camundongo. 4. Estresse oxidativo; Obesidade. 5.
Revisão Sistemática. I. Borin, Dra. Maria de Fátima,
orient. II. Soares Coelho, Dra. Michella, co-orient.
III. Título.

NATÁLIA CARDOSO SANTOS

Influência do consumo de aspartame na elasticidade da pele e em
variáveis metabólicas

Tese apresentada ao PPGCF, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Cosméticos.

Aprovada em: 16/09/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Eliete Neves Silva Guerra
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ranieri Rodrigues de Oliveira
Centro Universitário de Brasília

Profa. Dra. Marina Kiyomi Ito (suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à minha família: aos meus pais, Sena e Dilma; aos meus irmãos, André e Eduardo; à minha filha, Mariana; e ao meu namorado, Norberto. Sem eles, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e ter me dado coragem e persistência no desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, Sena e Dilma, por sempre acreditarem que sou capaz e por nunca terem medido esforços para que meus sonhos se tornassem realidade.

Aos meus irmãos: a André, pelo apoio e incentivo; e a Eduardo, por ser meu porto seguro em todas as situações de minha vida.

À minha amada filha Mariana, pela sua presença em minha vida e por compreender minha ausência em vários momentos importantes.

Ao Norberto, minha inspiração de todos os dias, por ter me encorajado nas horas difíceis e me aplaudido nos momentos de glória. Sempre ao meu lado.

Às minhas amigas Ingrid, Aclésia, Joselice e Heloíse que sempre foram minhas incentivadoras.

À minha orientadora, Dra. Maria de Fátima Borin, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança durante toda essa trajetória de pesquisa. Obrigada por sua amizade.

À minha coorientadora, Dra. Michella Soares Coêlho, pelo incentivo e pelo conhecimento transmitido que contribuíram significativamente no processo de desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Alberto Simeoni pela oportunidade de iniciar as pesquisas no Farmol.

Às Professoras Dra. Eliete Neves da Silva Guerra e Dra. Graziela De Luca Canto pelos seus ensinamentos fundamentais e disponibilidade que possibilitaram a realização da nossa revisão sistemática.

Aos meus amigos, companheiros de pesquisa, Ádria do Padro Barros, Laíza Magalhães, Pedro Góes Mesquita, Karina Costa e Daniela Gurgel pelo conhecimento compartilhado e pela ajuda em diversas etapas da pesquisa. Cada um de vocês contribuiu muito para este trabalho.

Às alunas de iniciação científica, Rebecca Rodrigues e Hanna Santana, pela dedicação e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia Molecular, Fernanda Cerqueira, Camila Christi, Sidney Alcântara, Érica Rosa Caldas e todos os outros que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Aos técnicos do Alojamento de Animais das Faculdades de Ciências da Saúde e Medicina da Universidade de Brasília, em especial ao Emiraldo Brito e ao veterinário Rafael Rocha de Andrade que muito colaboraram nos cuidados com os animais.

Ao Hospital Universitário de Brasília (HUB) pela realização das análises bioquímicas.

Ao Laboratório de Histopatologia Oral da Faculdade de Ciências da Saúde pela colaboração em algumas etapas da pesquisa.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento deste projeto e pela bolsa de doutorado.

À Pluryquímica pela gentileza em ceder o aspartame para as análises.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular, em especial ao professor Francisco de Assis Rocha Neves.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

“A coisa principal da vida não é o conhecimento, mas o uso que dele se faz”

Do Talmude. Seleção de Theodore M.R. Von Keller

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Ativador de proteína 1
ATP	Adenosina trifosfato
APM	Aspartame
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
GAL4	Fator de transcrição de leveduras
GRADE	<i>Grading of Recommendation, Assessment, Development and Evaluation</i>
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
IDA	Ingestão diária aceitável
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NEM	N-etilmaleimida

NF-KB	Fator nuclear kappa B
PBS	Tampão fosfato salina
PHE	Fenantrolina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPAR γ	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and MetaAnalysis</i>
PROSPERO	<i>International Prospective Register of Systematic Reviews</i>
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TAB	Ácido tiobarbitúrico
TAB visceral	Tecido adiposo branco visceral
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TAM	Tecido adiposo marrom
UCP1	Proteína desacopladora 1

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química da molécula de aspartame e dos produtos de sua metabolização.	24
Figura 2: Figura representativa da ação da microbiota intestinal.	33
Figura 3: Figura esquemática da ação das fontes de indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus efeitos sobre a pele.	36
Figura 4: Figura representativa da estrutura primária de uma MMP.	38
Figura 5: <i>Pellets</i> de ração produzidos para tratamento dos camundongos.	42
Figura 6: Delineamento experimental. Descrição da divisão dos grupos de animais e tratamento com aspartame ou veículo.	45
Figura 7: Foto ilustrativa representando a mensuração da camada epidérmica de uma lâmina corada com HE para avaliação da espessura.	49
Figura 8: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir de 13 semanas de idade.	60
Figura 9: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão diária de ração em camundongos a partir de 13 semanas de idade.	61
Figura 10: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão hídrica diária em camundongos a partir de 13 semanas de idade.	62
Figura 11: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir de 22 semanas de idade.	63
Figura 12: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão diária de ração em camundongos a partir de 22 semanas de idade.	64
Figura 13: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão hídrica diária em camundongos a partir de 22 semanas de idade.	65

- Figura 14:** Efeito do consumo de aspartame por 70 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir do desmame até 13 semanas de idade.66
- Figura 15:** Efeito do consumo de aspartame por 70 dias sobre ingestão semanal de ração em camundongos a partir de 3 semanas de idade (desmame).....67
- Figura 16:** Efeito do consumo de aspartame por 70 dias sobre ingestão hídrica semanal em camundongos a partir de 3 semanas de idade (desmame)..68
- Figura 17:** Efeito do consumo de aspartame por 140 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir do desmame.69
- Figura 18:** Efeito do consumo de aspartame por 140 dias sobre ingestão semanal de ração em camundongos a partir de 3 semanas de idade.....70
- Figura 19:** Efeito do consumo de aspartame por 140 dias sobre ingestão hídrica semanal em camundongos a partir do desmame.....71
- Figura 20:** Efeito do aspartame sobre a glicemia de jejum dos animais controle e tratados com diferentes doses de aspartame, por diferentes períodos de tempo.72
- Figura 21:** Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 30 dias de tratamento com aspartame em animais com 13 semanas de idade.73
- Figura 22:** Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 30 dias de tratamento com aspartame em animais a partir de 22 semanas de idade.....74
- Figura 23:** Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 70 dias de tratamento com aspartame em animais a partir do desmame.75
- Figura 24:** Massa do tecido adiposo branco subcutâneo coletado dos camundongos tratados com aspartame por 70 dias.....76
- Figura 25:** Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 140 dias de tratamento com aspartame em animais a partir da idade de desmame.....77

Figura 26: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal) após 140 dias de tratamento com aspartame em animais a partir da idade de desmame.....	78
Figura 27: Efeito do aspartame sobre características morfológicas do fígado após 30 dias de tratamento nos camundongos de 13 semanas de idade que receberam ou não tratamento com aspartame.....	79
Figura 28: Efeito do aspartame sobre características morfológicas do fígado após 30 dias de tratamento nos camundongos de 22 semanas de idade que receberam ou não tratamento com aspartame.....	79
Figura 29: Efeito do aspartame sobre características morfológicas do fígado de camundongos após 70 dias de tratamento e nos camundongos após 140 dias de tratamento, controle ou com aspartame	80
Figura 30: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo marrom (depósito interescapular).....	81
Figura 31: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos a partir de 13 semanas de idade, tratados por 30 dias com diferentes doses de aspartame	82
Figura 32: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos tratados por 30 dias, a partir de 22 semanas de idade, com diferentes doses de aspartame.....	83
Figura 33: Efeito do aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos tratados por 70 dias com aspartame.....	84
Figura 34: Efeito do aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos tratados a partir do desmame por 140 dias.....	85
Figura 35: Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele em camundongos a partir de 13 semanas de idade tratados por 30 dias.	89
Figura 36: Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele em camundongos a partir de 22 semanas de idade tratados por 30 dias..	89

- Figura 37:** Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele em camundongos tratados por 70 dias a partir da idade de desmame.90
- Figura 38:** Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele em camundongos tratados por 140 dias a partir da idade de desmame.90
- Figura 39:** Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Hematoxilina-Eosina para verificação da espessura da epiderme dos camundongos de 13 semanas91
- Figura 40:** Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Hematoxilina-Eosina para verificação da espessura da epiderme dos camundongos de 22 semanas92
- Figura 41:** Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Hematoxilina-Eosina para verificação da espessura da epiderme dos camundongos do grupo controle93
- Figura 42:** Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos de 13 semanas.....95
- Figura 43:** Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos de 22 semanas.....96
- Figura 44:** Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos do grupo controle e tratados por 70 dias com aspartame97
- Figura 45:** Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos do grupo controle e tratados por 140 dias com aspartame.98
- Figura 46:** Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos de 13 semanas tratados por 30 dias.99
- Figura 47:** Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos de 22 semanas tratados por 30 dias.100

Figura 48: Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos tratados, a partir do desmame, por 70 dias.....	101
Figura 49: Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos tratados, a partir do desmame, por 140 dias.....	101
Figura 50: Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica na pele dos camundongos de 13 semanas tratados por 30 dias com aspartame.....	102
Figura 51: Avaliação de peroxidação lipídica na pele dos camundongos de 22 semanas tratados por 30 dias..	103
Figura 52: Avaliação da peroxidação lipídica na pele dos camundongos tratados a partir de 3 semanas de vida por 70 dias.....	104
Figura 53: Avaliação nos níveis de peroxidação lipídica na pele dos camundongos tratados por 140 dias a partir de 3 semanas de idade.	104
Figura 54: Avaliação da citotoxicidade do aspartame em células mesangiais.....	105
Figura 55: Ensaio de avaliação da atividade agonista de aspartame em PPAR γ . .	106
Figura 56: Fluxograma.	108
Figura 57: Avaliação do risco de viés utilizando a ferramenta da Colaboração Cochrane.....	117
Figura 58: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame <i>versus</i> controle e aspartame <i>versus</i> sacarose para os níveis de glucose de jejum.	120
Figura 59: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame <i>versus</i> controle e aspartame <i>versus</i> sacarose para a concentração de insulina plasmática	121
Figura 60: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame <i>versus</i> controle e aspartame <i>versus</i> sacarose para as concentrações séricas de colesterol e triglicerídios.	122
Figura 61: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame <i>versus</i> controle e aspartame <i>versus</i> sacarose para as concentrações séricas da lipoproteína de alta densidade	123

Figura 62: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle e aspartame *versus* sacarose para o peso corporal..... 124

Figura 63: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle e aspartame *versus* sacarose para o consumo energético. 125

Lista de Quadros

Quadro 1:	Estratégia PICOS.....	54
Quadro 2:	Estratégia de busca.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Efeito do aspartame nos parâmetros bioquímicos dos camundongos com 13 semanas tratados por 30 dias.	86
Tabela 2: Efeito do aspartame nos parâmetros bioquímicos dos camundongos com 22 semanas tratados por 30 dias.	87
Tabela 3: Efeito do aspartame nos parâmetros bioquímicos dos camundongos tratados por 70 ou 140 dias a partir de 3 semanas de idade (desmame).	88
Tabela 4: Resumo das características descritivas dos artigos incluídos na revisão sistemática	110
Tabela 5: Artigos excluídos e a razão para a exclusão.....	159
Tabela 6: Avaliação do risco de viés dos estudos clínicos randomizados de acordo com a ferramenta da Cochrane Collaboration.....	166
Tabela 7: Avaliação GRADE.....	169

Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Aspartame	23
1.2. Adoçantes artificiais e Manutenção da massa corpórea	27
1.3. Estresse Oxidativo e Envelhecimento da pele	34
2. OBJETIVOS	40
Objetivo Geral.....	40
Objetivos específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Material	41
3.2. Modelo animal	41
3.2.1. Considerações éticas.....	41
3.3. Preparo dos <i>pellets</i> de ração com aspartame	41
3.4. Delineamento experimental - avaliação <i>in vivo</i> da influência do aspartame na elasticidade da pele	42
3.5. Análise bioquímica no soro	46
3.5.1 Glicemia basal	46
3.5.2 Dosagem de enzimas hepáticas e perfil lipídico	46
3.6. Avaliação da elasticidade da pele	47
3.7. Avaliação histológica e morfométrica da pele	47
3.7.1. Fixação dos tecidos	47
3.7.2. Corte no micrótomo e procedimentos de coloração.....	47
3.7.3. Avaliação da espessura da epiderme	48
3.7.4. Avaliação das fibras colágenas.....	49
3.8. Avaliação do estresse oxidativo na pele	49
3.8.1. Preparo das amostras.....	49
3.8.2. Determinação de proteínas.....	50
3.8.3. Avaliação da atividade da enzima catalase	50

3.8.4. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase	51
3.8.5. Ensaio de avaliação da peroxidação lipídica	51
3.9. Avaliação do efeito do aspartame em cultura de células	52
3.9.1. Avaliação da citotoxicidade de aspartame em células mesangiais	52
3.9.2. Investigação do efeito agonista do aspartame em receptores nucleares PPAR γ – ensaio de gene repórter	52
3.10. Análise estatística	53
3.11. Revisão Sistemática	53
3.11.1. Protocolo e Registro	53
3.11.2. Critérios de Elegibilidade	54
3.11.3. Estratégia de busca	55
3.11.4. Seleção dos artigos	57
3.11.5. Análise do risco de viés	57
3.11.6. Medidas de sumarização dos resultados	57
3.11.7. Síntese dos resultados	57
3.11.8. Risco de viés entre os estudos e a qualidade da evidência.....	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Efeito da administração oral diária de aspartame em camundongos fêmeas.....	59
4.1.1. Efeito do consumo de aspartame durante 30 dias sobre a massa corporal, ingestão hídrica e de ração, energia ingerida e eficiência metabólica em camundongos.	59
4.1.2. Efeito do consumo de aspartame na variação da massa corpórea e da ingestão hídrica e de ração dos camundongos tratados por 70 dias com ração suplementada com aspartame.....	65
4.1.3. Efeito do consumo de aspartame na variação da massa corpórea e da ingestão hídrica e de ração dos camundongos tratados por 140 dias com ração suplementada com aspartame.....	68
4.1.4. Efeito do consumo de aspartame na glicemia de jejum dos camundongos submetidos ao tratamento com aspartame.	71
4.1.5. Efeito do aspartame sobre a adiposidade.....	72

4.1.6. Efeito do aspartame sobre as características histológicas do fígado dos camundongos	78
4.1.7. Avaliação da variação da massa do tecido adiposo marrom dos camundongos tratados com aspartame.....	80
4.1.8. Avaliação da variação da massa dos rins e do coração dos camundongos tratados com aspartame.	81
4.1.9. Avaliação das variáveis bioquímicas dos camundongos tratados com aspartame.....	85
4.1.10. Avaliação da elasticidade da pele dos camundongos tratados com aspartame.....	88
4.1.11. Avaliação histológica da pele dos camundongos tratados com aspartame	90
4.1.12. Avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase nas peles dos camundongos.	98
4.1.13. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica na pele	101
4.2. Estudos em cultura de células.....	105
4.2.1. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade de aspartame em células mesangiais	105
4.2.2. Investigação do efeito agonista do aspartame em receptores nucleares PPAR γ – ensaio de gene repórter.	106
4.3. Revisão Sistemática	106
4.3.1. Seleção dos estudos.....	106
4.3.2. Características dos estudos.....	109
4.3.3. Risco de viés entre os estudos	116
4.3.4. Síntese dos resultados	118
4.3.5. Risco de viés entre os estudos	125
4.3.6. Avaliação da qualidade da evidência cumulativa.....	125
5. DISCUSSÃO	126
6. CONCLUSÕES	138
7. REFERÊNCIAS.....	139

Resumo

O aspartame é um adoçante muito consumido em todo mundo e é encontrado em mais de seis mil produtos, como refrigerantes, iogurtes e produtos farmacêuticos. Este adoçante pode ser metabolizado pelo organismo, sendo que cada molécula de aspartame produz duas moléculas de aminoácidos e uma de metanol. O metanol vem sendo associado ao estresse oxidativo, e este é intimamente correlacionado com o envelhecimento precoce da pele. Assim, o objetivo deste trabalho foi (i) avaliar a influência do consumo de aspartame na elasticidade da pele e caracterizar sua influência sobre variáveis metabólicas em camundongos e (ii) realizar um estudo do tipo revisão sistemática para avaliar os efeitos metabólicos do consumo de aspartame na população adulta. Para a primeira etapa do estudo, camundongos *Swiss* fêmeas com 13 ou 22 semanas de idade foram submetidos ao tratamento com aspartame por 30 dias nas doses de 20, 40 ou 80 mg/kg de massa corpórea/dia, ou camundongos em idade de desmame foram tratados por 70 e 140 dias com ração suplementada com aspartame na proporção de 40 mg/kg de massa corpórea/6 g de ração. Para a revisão sistemática, foram seguidas as recomendações do *PRISMA* e foi feito um levantamento de dados nas bases Cochrane, LILACS, Pubmed, Scopus e Web of Science. Os dados obtidos no levantamento foram avaliados estatisticamente pela técnica da metanálise. Os resultados mostraram que o tratamento com aspartame na dose de 40 mg/kg/dia, durante 30 dias, *in vivo*, induziu ganho de peso, promoveu uma tendência de diminuição na elasticidade da pele, diminuição de colágeno e alteração no sistema antioxidante da pele. Os trabalhos analisados na revisão sistemática mostraram que os estudos sobre o efeito do aspartame em variáveis metabólicas relacionadas ao diabetes e à obesidade são limitados e não apoiam ou refutam os benefícios ou malefícios do consumo desse adoçante.

Palavras-chave: aspartame; elasticidade; pele; camundongo; estresse oxidativo; obesidade; revisão sistemática.

Abstract

Aspartame is a sweetener widely consumed worldwide and is found in more than six thousand products such as soft drinks, yoghurts and pharmaceuticals. This sweetener may be metabolized by the body, yielding two molecules of amino acid and methanol. Methanol has been associated with oxidative stress, and this is closely correlated with skin aging process. The objective of this study was (i) to evaluate the effects of aspartame consumption in skin elasticity and characterize its influence on metabolic variables in mice and (ii) to conduct a systematic review in order to evaluate the metabolic effects of aspartame consumption in the adult population. For the first part of this study, Swiss female mice with 13 or 22 weeks of age were treated with aspartame for 30 days at doses of 20, 40 or 80 mg/kg of body weight/day or weaning-age mice were treated by 70 and 140 days with diets supplemented with aspartame at a ratio of 40 mg/kg of body weight/6 g of diet. For the systematic review PRISMA recommendations were followed, and a search was made using the data bases Cochrane, LILACS, Pubmed, Scopus and Web of Science. Data from the survey were statistically evaluated by the technique of meta-analysis. The results showed that treatment with aspartame at a dose of 40 mg/kg/day for 30 days *in vivo* induced weight gain, as well as promoted a decreasing trend in skin elasticity, decreased collagen and changed antioxidade skin system. The results of the systematic review demonstrate that the effect of aspartame on metabolic variables related to diabetes and obesity are limited and do not support or refute the benefits or harms of this sweetener.

Keywords: aspartame; elasticity; skin; mice; oxidative stress; obesity; systematic review.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspartame

De acordo com a *American Dietetic Association* (ADA), o uso de adoçantes artificiais pode trazer uma série de benefícios aos seus consumidores, como diminuição da ingestão calórica e auxílio no controle de doenças crônicas, como o diabetes. Os adoçantes são edulcorantes utilizados como aditivos alimentares, em substituição ao açúcar, por terem a característica de conferir um intenso sabor doce e, por isso, podem ser utilizados em pequenas quantidades. São classificados em nutritivos e não nutritivos, de acordo com a quantidade de calorias que fornecem. Sorbitol e manitol, por exemplo, são considerados adoçantes nutritivos, enquanto os não nutritivos são o acessulfame, aspartame, ciclamato, sacarina e sucralose. Estes últimos, por não serem obtidos de fontes naturais, e sim produzidos de forma semi-sintética ou totalmente sintética também são classificados como adoçantes artificiais (Whitehouse et al., 2008; Ibrahim, 2015; Jain e Grover, 2015).

Um dos fatores históricos que contribuiu para a busca do desenvolvimento e consumo de substâncias com poder adoçante foi a necessidade decorrente da baixa oferta de açúcar para a população durante a Segunda Guerra Mundial (Yang, 2010). Atualmente, inúmeras substâncias com poder adoçante são usadas no mundo todo. No Brasil, além dos adoçantes já citados acima – ciclamato, sorbitol, manitol, acessulfame, aspartame, sacarina e sucralose –, são aprovados ainda para consumo o neotame, o esteviosídeo e a taumatina (Brasil, 2008). Porém, apesar do ciclamato ser aprovado para o uso na União Europeia e em mais de 100 países, nos EUA seu uso foi proibido em 1969 por ter sido correlacionado a casos de câncer de bexiga em ratos (Mattes e Popkin, 2009).

O aspartame, éster metílico da L- α -aspartil-L-fenilalanina, um composto 200 vezes mais doce que o açúcar e considerado de baixo valor calórico (4 kcal/g), é consumido por mais de 200 milhões de pessoas ao redor do mundo e encontrado em mais de 6 mil produtos, como refrigerantes, iogurtes e produtos farmacêuticos (Grembecka e Szefer, 2012). Estima-se que, nos Estados Unidos, este adoçante esteja presente em 77% dos refrigerantes (Abdel-Salam et al., 2012). A produção do aspartame no mundo é muito expressiva, sendo que em 2008 a estimativa era de

que, somente na Europa, eram produzidas mais de 19.000 toneladas por ano (Yagasaki et al., 2008).

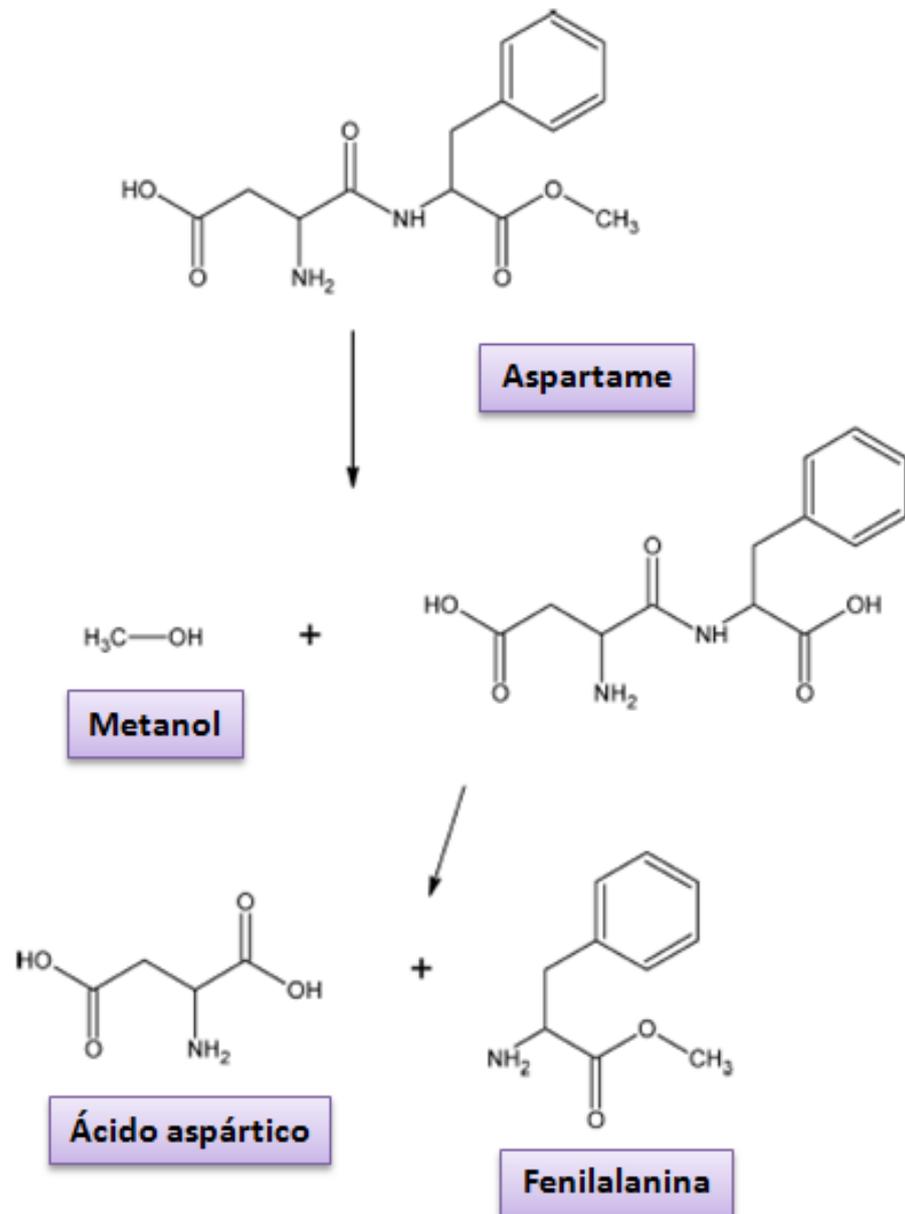


Figura 1: Figura representativa da molécula de aspartame e dos produtos da sua metabolização. Extraído e adaptado de Magnuson et al., 2007.

O aspartame foi descoberto em 1965 por James Schlatter e aprovado para uso em alimentos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1981. Classificado como adoçante artificial e não calórico, produz, em sua metabolização, dois

aminoácidos, fenilalanina (50%) e ácido aspártico (40%), e uma molécula de metanol (10%) (Figura 1) (Humphries et al., 2008). Diferente dos demais adoçantes, o aspartame pode ser rapidamente metabolizado no organismo humano, sendo hidrolisado por esterases e peptidases. Após a hidrólise, ocorre a absorção de seus metabólitos no lúmen do trato gastrointestinal, seguida da entrada na circulação sistêmica (Magnuson et al., 2007; Yang, 2010; Mourad e Noor, 2011). Os aminoácidos produtos dessa metabolização também podem ser encontrados naturalmente em muitos alimentos como carnes e aves (Butchko, 2002). Kroger e colaboradores (2006) relataram que os consumidores de aspartame têm a quantidade diária de fenilalanina e ácido aspártico aumentada em 1 e 2%, respectivamente. O ácido aspártico já foi reportado como sendo relacionado a distúrbios neurológicos como enxaqueca e epilepsia (Humphries et al., 2008). Outros produtos de degradação, ou impurezas derivadas da produção, podem estar presentes no aspartame como a dicetopiperazina da aspartilfenilalanina (DKP) e o β -aspartame (isômero do α -aspartame) (EFSA, 2013).

Estudos em animais de laboratório demonstraram que a dose letal (DL_{50}) do aspartame é de mais de 10 g/kg de massa corpórea por dia (US, 2003). Porém é largamente conhecido o risco que os produtos da metabolização desse adoçante podem causar a indivíduos com fenilcetonúria, que possuem ausência de atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (Williams et al., 2008).

Passados 35 anos desde a aprovação do seu consumo até hoje, o aspartame continua sendo objeto de muitos estudos no que se refere à segurança do seu uso e ao conhecimento de seus efeitos no metabolismo tanto em humanos quanto em modelos animais.

Soffritti e colaboradores (2007) relataram clara correlação entre o uso de aspartame nas doses diárias de 100 mg/kg de peso corpóreo e a incidência do aparecimento de linfoma e leucemia em ratos *Sprague-Dawley* fêmeas.

Outros estudos demonstraram que, ao analisar cérebros de camundongos e ratos que foram tratados com aspartame em curto e longo prazos, em concentrações que variaram de 5,6 mg a 1.000 mg/kg de massa corpórea, foi observado aumento significativo da peroxidação lipídica, assim como da expressão de óxido nítrico (NO) e das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), evidenciando a instalação de um quadro de estresse oxidativo nos tecidos (Abdel-

Salam et al., 2012; Abu-Taweel et al., 2014; Ashok et al., 2015; Adaramoye e Akanni, 2016).

Um estudo avaliando os efeitos da ingestão diária de aspartame na dose de 40 mg/kg de massa corpórea por ratos albinos machos, durante 2, 4 e 6 semanas, permitiu observar o efeito do estresse oxidativo no fígado e nos rins dos animais, sendo proposto que o metanol liberado no metabolismo do aspartame pudesse aumentar a formação de malondialdeído, o que é acompanhado de uma diminuição da glutatona reduzida do sistema antioxidante (Mourad, 2011).

Segundo Abhilash e colaboradores (2011), o consumo de aspartame por longo prazo pode desencadear lesões hepatocelulares e alterações no equilíbrio redox do fígado, em decorrência de intoxicação pelo metanol produzido em seu metabolismo.

Com o objetivo de reduzir o efeito oxidativo causado nos rins de ratos que foram tratados diariamente com aspartame (40 mg/kg de massa corpórea) por seis semanas, Finamor e colaboradores (2014) tiveram resultados positivos ao demonstrar o efeito protetor que a N-acetilcisteína exerceu no aumento da atividade da glutatona peroxidase e da glutatona total nos animais.

Foi comprovado, ainda, que a intoxicação por metanol, em ratos *Wistar* albino, acelerou a ação de espécies reativas de oxigênio, pois ao ser metabolizado, promoveu a formação do ânion radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, gerando um desequilíbrio oxidativo no hipotálamo e na glândula adrenal; aumentou a fragmentação do DNA nesses órgãos; e aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona, sugerindo, assim, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Parthasarathy et al., 2006).

Casos de acidose metabólica e lesões oculares relacionados ao consumo de aspartame também já foram reportados (Rycerz e Jaworska-Adamu, 2013).

O metanol, após ser lançado no intestino delgado, é oxidado em formaldeído e em ácido fórmico. Este último possui meia-vida longa e é considerado como o primeiro composto tóxico do envenenamento por metanol. Acredita-se que 1 litro de bebidas adoçadas com aspartame contenha 56 mg de metanol, lembrando que o limite diário de ingestão de metanol é de 7,8 a 8,0 mg, segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental (Philip, 1995; Dorokhov, 2015).

Spanel e colaboradores (2015) estudaram o efeito da ingestão em dose única de 40 mg/kg de aspartame em 10 voluntários, homens e mulheres, e

observaram aumento de metanol nas concentrações plasmáticas desses voluntários, que variou de 3 a 6 vezes. Marczinski e colaboradores (2013) avaliaram 16 voluntários que receberam bebida alcoólica suplementada com bebida dietética (contendo aspartame) ou que receberam bebida alcoólica suplementada com bebida contendo açúcar e observaram que a concentração de álcool no ar expirado foi maior no grupo que consumiu bebida contendo aspartame.

Por outro lado, Tezvergil-Mutluay e colaboradores (2011) verificaram que o metanol, o etanol e outros álcoois podem também ser responsáveis pela inibição da ação de enzima metaloproteinase de matriz (MMP), que normalmente se encontra mais ativa quando ocorrem desequilíbrios do sistema redox, porém os mesmos autores citam que esta inativação é mais observada para álcoois com mais de quatro carbonos na molécula.

Ainda sobre os metabólitos do aspartame, foram relatados alguns casos nos quais o formaldeído foi associado a processos inflamatórios na pele. Seis pacientes com idade entre 16 e 75 anos que consumiram por dia mais de 2 litros de refrigerante *diet* do tipo cola, contendo aspartame, apresentaram dermatite de contato. Esses mesmos pacientes foram avaliados quanto à sensibilidade ao formaldeído e o resultado foi positivo (Jacob e Stechschulte, 2008).

Além dos efeitos em relação à segurança do uso do aspartame, muitos estudos têm questionado a efetividade do uso desse adoçante em relação à perda e manutenção da massa corpórea. *A priori*, essa preocupação parece infundada, pois seria muito lógico pensar que a substituição do açúcar por adoçantes não calóricos claramente iria contribuir para menor ingestão calórica, o que contribuiria para a perda de peso, mas essa hipótese tem gerado controvérsias (García-Almeida et al., 2013).

1.2. Adoçantes artificiais e Manutenção da massa corpórea

A obesidade tornou-se uma epidemia que afeta diversas partes do mundo e está intimamente relacionada à dieta, ao sedentarismo, a fatores hormonais e a determinantes genéticos e psicossociais (Vasconcelos et al., 2016). Considerando o

IMC (índice de massa corpórea) como parâmetro de avaliação para diagnóstico da obesidade, em 2014, aproximadamente 1,9 bilhão de adultos foram classificados com sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e pelo menos 600 milhões de adultos com obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (WHO, 2015).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 52,5% dos brasileiros estão acima do peso e 17,9% são obesos, com uma prevalência maior na população na faixa etária de 35 a 64 anos (Brasil, 2014).

A obesidade é responsável pela quinta posição nas causas de morte no mundo (COX et al., 2015), devido ao fato de estar relacionada a diversas comorbidades como *diabetes mellitus* tipo 2, dislipidemias, doença cardíaca coronariana e síndrome metabólica. A cada dia que passa, percebe-se o grande impacto de morbi-mortalidade que essa condição crônica causa na saúde individual e pública (Swithers, 2013; Abilash e Augustine, 2014).

A obesidade caracteriza-se como sendo o acúmulo anormal ou excessivo de gordura e uma das causas diretas para atingir esse estado crônico é a ingestão de dietas com alto teor calórico e altas concentrações de açúcar, que podem propiciar o desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico (Roberts, 2015).

Nesse contexto, muitos estudos já foram e estão sendo realizados com o intuito de elucidar a associação entre o consumo de bebidas e alimentos adoçados com açúcar ao ganho de peso ou ao risco de sobrepeso e ao desenvolvimento da obesidade em adultos devido à sua alta quantidade de carboidratos rapidamente absorvíveis, o que gera aumento excessivo da ingestão energética, aumento de peso e síndrome metabólica, além do aumento do risco de diabetes tipo 2 (Basu et al., 2014; Schulze et al., 2004; Saris e Tarnopolsky, 2003). Lana e colaboradores (2014) reportaram em um estudo com 7.842 participantes que o consumo de bebidas adoçadas com açúcar aumentou consideravelmente a concentração plasmática de insulina, leptina e induziu resistência à insulina, avaliado pelo HOMA-IR (primeiros marcadores associados à disfunção metabólica ligada à obesidade). Por isso, a busca por alimentos e bebidas com baixo teor calórico e livres de açúcar tem aumentado.

Espera-se que o uso de adoçantes não calóricos para substituir a adição de açúcar em alimentos e bebidas esteja correlacionado com a redução do consumo energético, porém, recentemente, levantou-se a hipótese de que o consumo de

adoçantes não calóricos pode estar relacionado ao risco de o indivíduo tornar-se obeso ou apresentar sobrepeso (Rogers et al., 2016).

É estimado que o mercado mundial de adoçantes não nutritivos tenha movimentado, em 2014, 9,4 bilhões de dólares e que, em 2016, esses números cheguem a 9,9 bilhões de dólares (Ibrahim, 2015). Porém alguns estudos epidemiológicos sugerem que a tentativa de mudar os hábitos alimentares, com a inserção de adoçantes de baixa ou nenhuma caloria na dieta, não está exercendo um papel crucial para a diminuição das taxas de obesidade e sobrepeso, que continuam a crescer em diversas populações em todo mundo (Yang, 2010).

Em modelos animais, foi demonstrado o efeito do consumo de adoçantes em relação ao ganho de peso. Swithers e Davidson (2008) investigaram a relação entre o gosto doce obtido pelo uso de uma substância calórica (glicose) e outra não calórica (sacarina) e sua influência no consumo energético, no peso corporal e na adiposidade de ratos *Sprague–Dawley*. Nesse estudo, os animais receberam 30 gramas de iogurte de baixo teor de gordura em 6 dias da semana pelo período total de 5 semanas, sendo que o consumo de dieta e água foram livres. Nos primeiros três dias, foi administrado iogurte não adoçado para dois grupos e nos 3 dias seguintes os ratos receberam iogurte adoçado com 20% de glicose ($n = 8$) ou 0,3% de sacarina ($n = 9$). O terceiro grupo não recebeu iogurte durante os 3 primeiros dias de cada semana e recebeu iogurte adoçado com 20% de glicose ($n = 10$) nos 3 dias seguintes. Os resultados desse estudo mostraram que, nas semanas 2, 3 e 5, o grupo que consumiu iogurte adoçado com sacarina apresentou maior peso e adiposidade quando comparado com os ratos dos outros dois grupos, correlacionando, dessa forma, o consumo de um adoçante não calórico ao aumento de peso.

Corroborando esses resultados, o estudo realizado por Folleto e colaboradores (2016) mostrou que ratos *Wistar* (72 dias de vida) que consumiram iogurte adoçado com 0,3% de sacarina em 5 dias da semana pelo período total de 14 semanas apresentaram ganho de peso quando comparados com o grupo controle que recebeu iogurte não adoçado pelo mesmo período de tempo.

O consumo de aspartame também foi correlacionado ao aumento de peso em modelos animais. O estudo realizado por Feijó e colaboradores (2013) avaliou o efeito da suplementação da dieta de ratos *Wistar* com iogurte adoçado com aspartame 0,4%, sacarina 0,3% ou sacarose 20% na massa corpórea e no consumo

energético. Os três tipos de iogurte foram oferecidos para os animais por 5 dias na semana pelo período total de 12 semanas e os resultados obtidos para o consumo calórico total não mostraram diferença entre os grupos. Porém foi observada uma diferença significativa em relação ao ganho de peso ao final das 12 semanas, de modo que os grupos que consumiram iogurte adoçado com aspartame ou sacarina apresentaram ganho de peso maior quando comparados com o grupo que consumiu iogurte adoçado com sacarose.

Ainda em estudos com animais, Von Poser Toigo e colaboradores (2015) mostraram que o consumo de aspartame por ratos fêmeas durante o período gestacional gerou uma prole que, quando adulta, demonstrava grande suscetibilidade para o aumento do consumo de alimentos doces e também com alterações metabólicas que levaram ao aumento da glicose, do colesterol e dos triglicerídeos séricos.

Os resultados a respeito dos efeitos do uso de aspartame sobre o consumo energético e o peso corporal em humanos são controversos. Anton e colaboradores (2010) conduziram um estudo clínico simples cego que incluiu 19 participantes com peso normal, os quais apresentavam índice de massa corporal (IMC) de 20,0 a 24,9 Kg/m², e 12 participantes obesos que apresentavam IMC de 30 a 39,9 Kg/m². O desenho experimental desse estudo incluiu o consumo, 20 minutos antes do almoço ou do jantar, de 400 g de uma refeição composta por chá e biscoitos com *cream cheese* adoçado com aspartame, estévia ou sacarose, sendo que no almoço e no jantar não houve restrição de consumo de alimentos. Os participantes que consumiram aspartame ou estévia apresentaram consumo energético menor que os que consumiram sacarose.

Sathyapalan e colaboradores (2015) realizaram um estudo clínico randomizado duplo cego, no qual 96 voluntários foram recrutados para consumir, uma vez ao dia, barras de cereais que tivessem sido previamente acrescidas, ou não (controle), de 100 mg de aspartame. Os autores concluíram que não foram encontradas diferenças significativas de peso, índice de massa corpórea e circunferência abdominal entre os indivíduos que receberam o aspartame em comparação ao grupo controle.

Sorensen e colaboradores (2014), ao estudar o efeito de adoçantes artificiais (54% de aspartame, 23% de ciclamato, 22% de acessulfame e 1% de sacarina) em

10 indivíduos com sobrepeso, por 10 semanas, observaram que não houve ganho de peso nos participantes que receberam os adoçantes.

O estudo clínico randomizado de Lavin e colaboradores (1997) comparou os efeitos do consumo de bebida adoçada com aspartame ou sacarose no consumo energético e no apetite de 14 mulheres que seguiam uma dieta controlada. Nesse estudo, as participantes ingeriram 330 mL de limonada adoçada com aspartame ou sacarose, e a água foi utilizada como controle. Além disso, houve oferta de alimentos ricos em carboidratos e lipídeos ao longo do dia, sendo que as participantes foram instruídas a consumirem livremente até a obtenção da saciedade. O estudo foi realizado por três dias e mostrou que, no dia posterior ao consumo da limonada adoçada com aspartame, o consumo energético foi maior quando comparado tanto com a água quanto com a sacarose. Esse quadro foi atribuído a um aumento do consumo de carboidratos, porém não houve diferença no consumo de lipídeos e proteínas.

Muitas hipóteses sobre os mecanismos pelos quais os adoçantes artificiais podem modificar o ganho calórico vêm sendo discutidas. Questionamentos já levantados dizem respeito à interferência dos adoçantes não calóricos na secreção de insulina e no metabolismo da glicose (Renwick e Molinary, 2010; Suez et al., 2014).

Em relação ao comportamento alimentar e consumo dietético, já foi descrito que adoçantes artificiais não ativam de forma similar ao açúcar a via de recompensa associada ao consumo de alimentos, o que culmina na ausência de saciedade completa, que estimula o comportamento de busca por alimentos e pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade (Von Poser Toigo et al., 2015).

Uma rede de sinais complexos no cérebro é responsável pela regulação do consumo energético e atua como sistema de homeostase que regula a alimentação com base nas necessidades energéticas. Murray e colaboradores (2016) sugeriram que os adoçantes calóricos e não calóricos podem ser capazes de interferir nos mecanismos neurais associados à homeostase energética e recompensa por diminuir a sensação de saciedade e reforçar o comportamento de maior consumo de alimentos.

Além disso, estudos recentes reportam uma possível relação entre o consumo de adoçantes e o ganho de peso induzida por alterações na fisiologia do intestino, gerando um desequilíbrio da microbiota intestinal. Uma vez que as bactérias que

compõem a microbiota intestinal podem ser capazes de desempenhar várias funções no organismo, como interferir na absorção de nutrientes, alguns autores descrevem que as células microbianas do trato gastrointestinal constituem importantes fatores que podem contribuir com a obesidade (Ley et al., 2005; Gill et al., 2006; Cani e Delzenne, 2009; Ley, 2010).

A microbiota intestinal humana compreende de 10 a 100 trilhões de micro-organismos, pertencentes principalmente aos gêneros bacterianos *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* e cocos gram positivos (Qin et al, 2010). Em humanos adultos, a microbiota intestinal é predominantemente representada por dois filos, *Firmicutes* (79%) e *Bacteroidetes* (16,9%). As outras divisões principais incluem o *Proteobacteria* (1%) e *Actinobacteria* (2,5%) e um número menor de *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* (Dethlefsen et al., 2007; Tap et al., 2009; Harris et al., 2012; Duca e Lam, 2014).

A *Bacteroides fragilis* foi identificada em 46% dos casos de estudos que as relacionam com o metabolismo gastrointestinal de hospedeiros magros (Ley et al., 2006a; Sekirov et al., 2010; Lecomte et al., 2015). Já outros estudos reportam que, em pessoas obesas, as bactérias do grupo *Firmicutes* é que estariam associadas à manifestação desse estado crônico (Ley et al., 2006; Sekirov et al., 2010; Patterson et al., 2014).

Atualmente, uma das hipóteses que está sendo levantada para explicar como a resistência à insulina se instala é a do aumento da permeabilidade aos lipopolissacarídeos, endotoxinas presentes em bactérias, que podem fazer com que ocorra um aumento do influxo de macrófagos para o tecido adiposo visceral e a ativação das células de Kupffer no fígado (Figura 2) (Moreno-Indias et al., 2014).

O consumo de dietas gordurosas e ricas em açúcar já foi associado ao aumento da excreção e absorção de lipopolissacarídeos e teve como consequência o aumento na massa de tecidos adiposos e na glicemia de jejum (Filippo et al., 2010; Van Olden et al., 2015).

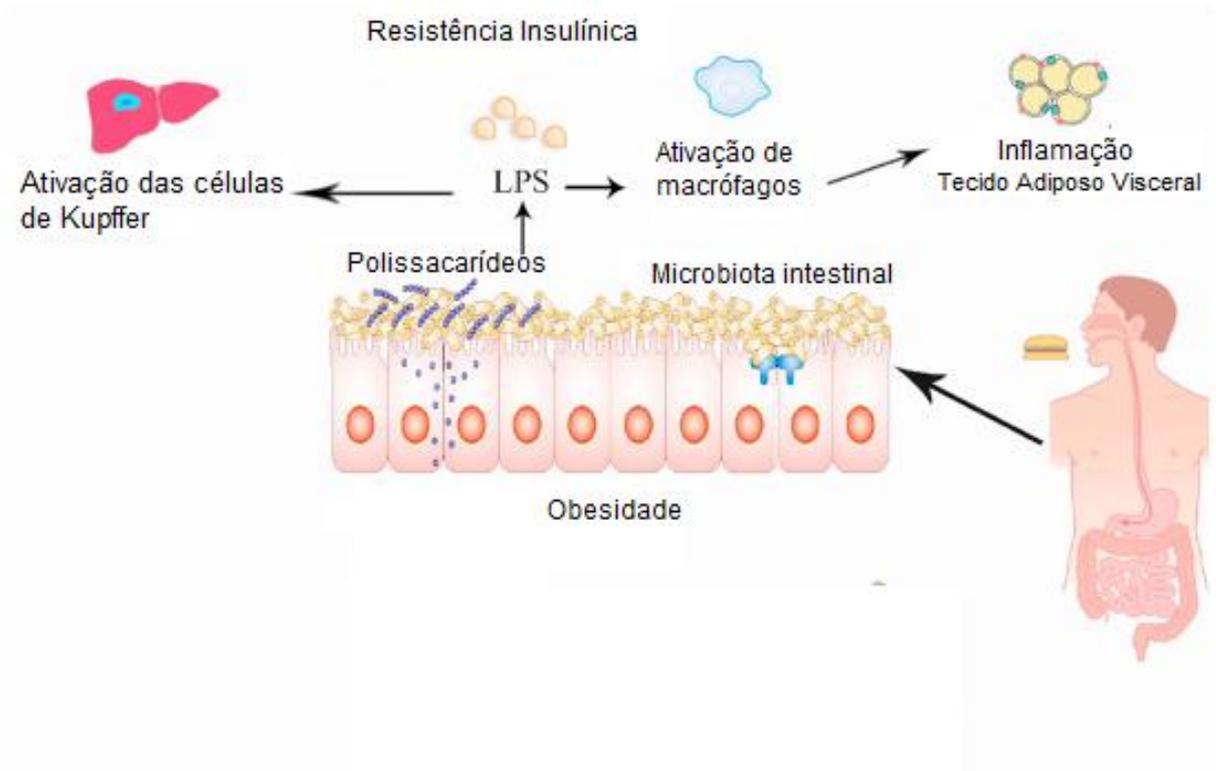


Figura 2: Figura representativa da ação da microbiota intestinal.
Extraída e adaptada de Moreno-Indias et al., 2014.

Para avaliar a relação entre o consumo de adoçantes artificiais e a microbiota intestinal, Frankenfeld e colaboradores (2015), em um estudo transversal, analisaram amostras de fezes de 31 adultos, que consumiram aspartame por 4 dias, e observaram que houve uma diferença significativa na diversidade das bactérias encontradas nas amostras entre os grupos que consumiram aspartame e os que não consumiram.

Esses achados imprimem um grande interesse em elucidar se e como a microbiota intestinal determina seu papel no desenvolvimento de doenças, especialmente as crônicas, como a obesidade e diabetes, e como os adoçantes interferem nessa relação.

Com relação à pele, já foi descrito que dietas ricas em açúcar podem alterar a funcionalidade das estruturas dérmicas por meio de ligação covalente entre frutose e glicose com aminoácidos contidos nas moléculas do colágeno e da elastina (Danby, 2010). Além disso, a obesidade já foi associada a algumas alterações na pele, como a cicatrização deficitária de feridas e o desenvolvimento de dermatite atópica (Nascimento e Costa, 2006; Silverberg et al., 2011).

1.3. Estresse oxidativo e Envelhecimento da pele

O envelhecimento da pele é um processo complexo e contínuo que envolve diferentes mecanismos que ocorrem em sinergismo e como consequência de fatores intrínsecos e extrínsecos. Esse processo afeta as três camadas que constituem a pele (epiderme, derme e hipoderme), que são responsáveis pela proteção contra infecções, regulação da temperatura e detecção de estímulos mecânicos (Al-Nuaimi et al., 2014).

O envelhecimento cutâneo intrínseco, ou cronológico, ocorre de forma inevitável e natural, por variações genéticas individuais, com o passar do tempo; e o envelhecimento extrínseco ocorre principalmente devido a fatores externos como exposição solar, poluição e má nutrição (Hull e Warfel, 1983; Baumann, 2007; Farage et al., 2008). A radiação ultravioleta (UV) é responsável por aproximadamente 80% dos sinais visíveis de envelhecimento na face por regular de forma positiva a atividade das metaloproteases de matriz em fibroblastos e queratinócitos (Fisher et al., 1997).

Tanto os fatores extrínsecos quanto os intrínsecos são capazes de afetar a quantidade e qualidade das fibras colágenas e elásticas e de promover um achatamento da epiderme e a atrofia da derme, tornando a pele mais fina e, assim, instalando um processo de envelhecimento precoce (Fenske e Lober, 1986; El-Domyati et al., 2002).

A ação da radiação UV é umas das primeiras a desencadear a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que causam danos ao sistema antioxidante da pele (Scharffetter-Kochanek et al., 2000; Goukassian e Gilchrest, 2004).

Definidos como espécies químicas que possuem elétrons desemparelhados, os radicais livres são produzidos principalmente dentro de mitocôndrias, organelas cuja principal função é gerar 90% de energia para a célula na forma de adenosina trifosfato (ATP) (Betteridge, 2000; Krutmann e Schroeder; 2009; Birch-Machin et al., 2013). Podem ser considerados exemplos comuns de radicais livres as espécies reativas de oxigênio (ERO), que são formadas no organismo e que podem ser divididas em duas categorias: a primeira, formada pelos radicais, que são representados por ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($OH\cdot$), lipídico ($L\cdot$),

alcoxila ($\text{LO}\cdot$) e peroxila ($\text{LOO}\cdot$); e a segunda categoria são moléculas de oxigênio que estão em seu estado eletricamente excitado como é o caso do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Masaki, 2010; Callaghan e Wilhelm, 2008; Dickinson e Chang, 2011).

Compostos não radicalares, como o peróxido de hidrogênio, e ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico (NO), também podem induzir reações oxidativas no organismo, produzindo outros radicais.

A produção mitocondrial do radical superóxido é uma consequência natural da respiração aeróbia, que ocorre principalmente em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons, são eles: Complexo I (NADH desidrogenase), presente em neutrófilos, macrófagos e células vasculares; e Complexo III (ubiquinona-citocromo C redutase) (Finkel e Holbrook, 2000). Até algumas décadas atrás, acreditava-se que as mitocôndrias eram as principais produtoras de espécies reativas de oxigênio, entretanto, hoje sabe-se que, por diversos estímulos exógenos tóxicos, como a presença de xenobióticos, poluição ambiental e radiação UV, outras duas organelas participam ativamente dessa produção: o retículo endoplasmático e os peroxissomos (Fransen et al., 2012; Bhandary et al., 2012). Independentemente da escolha do sítio de produção, a radiação UV, os xenobióticos e algumas enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, entre outros, são considerados bons indutores da formação de espécies reativas de oxigênio (Poljsak e Dahmane, 2012; Rinnerthaler et al., 2015) (Figura 3).

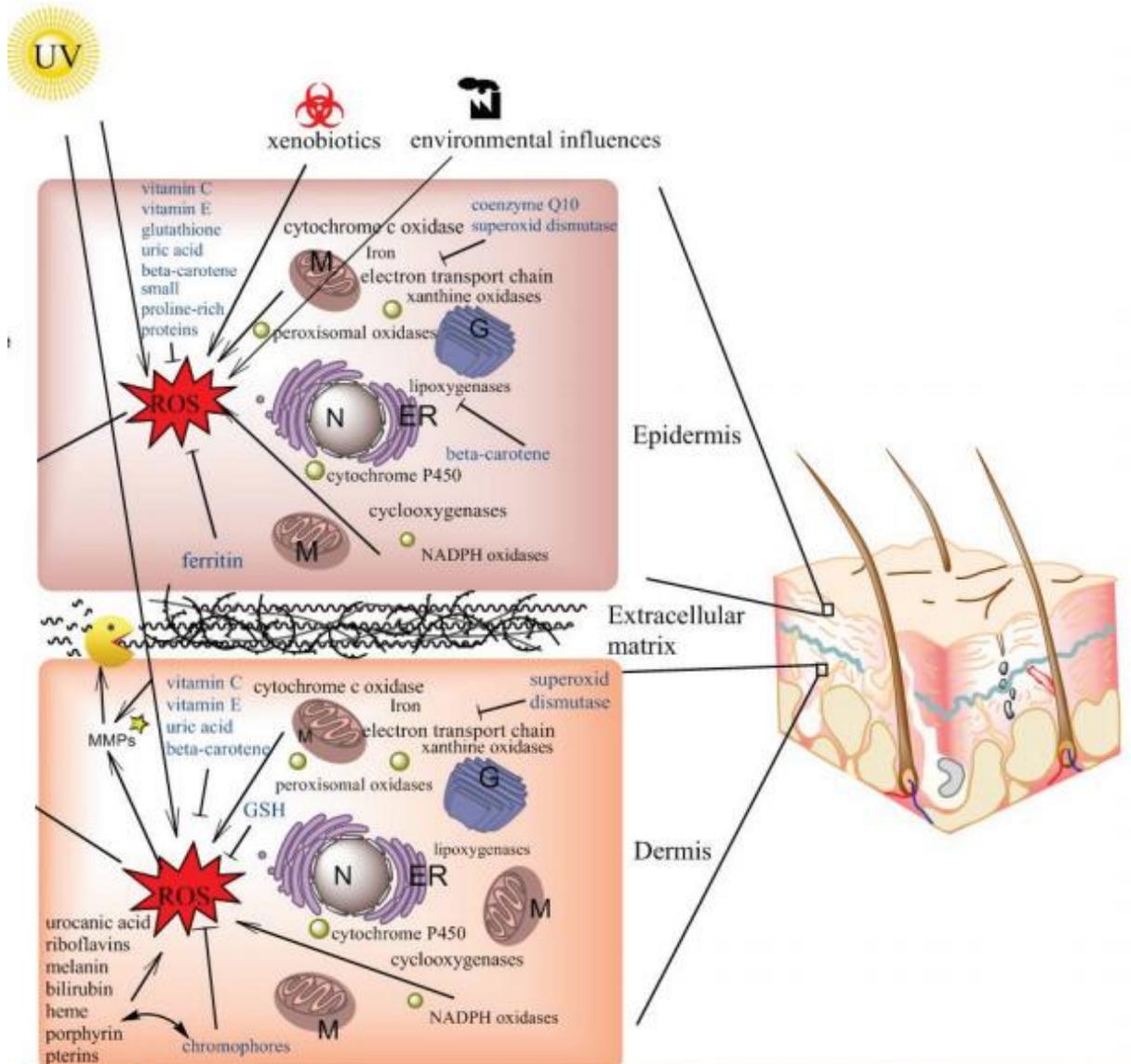


Figura 3: Figura esquemática da ação das fontes de indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus efeitos sobre a pele. Mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (ER), núcleo (N), Complexo de Golgi (G). Extraída de Rinnerthaler et al., 2015.

Quando em excesso, espécies reativas de oxigênio e outras espécies oxidantes promovem um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante do organismo, levando a um estado chamado de estresse oxidativo (Carocho e Ferreira, 2013). Durante esse processo, ocorre uma redução dos níveis de energia e lesões ao metabolismo celular, ocasionando assim, um declínio funcional de células e tecidos, que desencadeia diversas doenças degenerativas, como a arteriosclerose e processos carcinogênicos (Liang et al., 2003; Chen et al., 2013). Esse estado pode

ser desencadeado também pela inativação ou esgotamento das reservas de enzimas antioxidantes ou ainda pela combinação de todos esses fatores (Lushchak, 2014).

Em estado de estresse oxidativo, ocorre a modulação, tanto da expressão quanto da ativação, das metaloproteinases de matriz (MMP), via formação de espécies reativas de oxigênio, que interagem com grupo tiol no domínio catalítico da protease, pela ativação direta de membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ou, ainda, por inativação de fosfatases. Uma vez ativada, a MAPK fosforila fatores de transcrição, como c-Jun, e aumenta a expressão de outro fator conhecido como proteína ativadora-1 (AP-1). A AP-1 aumenta a expressão das MMP, diminuindo a produção do pró-colágeno I. O Peróxido de hidrogênio, o óxido nítrico e o aumento de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), por exemplo, estimulam a expressão de diferentes MMP (Rittié e Fisher, 2002; Reuter et al., 2010).

Na pele, essas espécies reativas ocasionam um processo inflamatório crônico que causa fragmentação de colágeno, com desorganização das fibras colágenas, prejudicando a funcionalidade da pele e podendo até desencadear eritema, reações fotoalérgicas, envelhecimento e câncer (Kruk e Duchnik, 2014). Espécies reativas de oxigênio promovem ativação de fatores, como o fator nuclear KB (NF-KB), que está envolvido na regulação transcricional de diversas moléculas pró-inflamatórias (Bickers e Athar, 2006).

As MMP representam uma família de aproximadamente 24 endoproteases humanas, cujos genes estão localizados em pelo menos 10 cromossomos diferentes. Secretadas em sua forma inativa (pró-MMP), são caracterizadas pelo sinal pepitídeo (SP) e principalmente pela presença de duas regiões altamente conservadas, a região de pró-peptídeo, que contém o grupo tiol (SH), e a região do domínio catalítico, que contém o íon de zinco (Zn^{2+}); pela região em dobradiça “região *hinge*” e ainda pela região “hemopexina-*like* carboxi (C) terminal” (Figura 4) (Parks et al., 2004; Bourbouli e Stetler-Stevenson, 2010; Fanjul-Fernández et al., 2010).



Figura 4: Figura representativa da estrutura primária de uma MMP.
Extraída e adaptada de Parks et al., 2004.

Para haver a ativação das MMP, devem ocorrer alterações conformacionais, que se iniciam com a remoção do pró-domínio da molécula pela clivagem direta por outra endoprotease, seguida da modificação química da cisteína livre pela ação de espécies reativas de oxigênio ou então por ação de ligantes não fisiológicos (Löffek et al., 2011).

Essas enzimas, produzidas por células como fibroblastos e queratinócitos, são responsáveis pelo processo de degradação de fibras colágenas e elásticas, cujas funções são de sustentação e a elasticidade da derme humana. Dentre elas, a collagenase (MMP-1) e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são capazes de iniciar o processo de degradação das fibras de colágeno e são, portanto, de grande importância para a integridade da derme (Kim et al., 2005; Ries et al., 2009; Quan et al., 2009; Moinzadeh et al., 2011; Kohl et al., 2011).

Pelo menos três diferentes metaloproteases de matriz são as primeiras mediadoras das lesões celulares causadas ao tecido conjuntivo da pele quando exposta à radiação UV, indutora de estresse oxidativo, são elas: a collagenase (MMP-1), que degrada o colágeno; a estromelina (MMP-3); e a gelatinase (MMP-9) (Fisher, et al., 1997; Quan et al., 2009). O oxigênio singlete (1O_2), em fibroblastos da derme, estimula a expressão de MMP-1 por meio da secreção de citocinas inflamatórias, interleucina (IL)-1 α e IL-6, diminuindo, assim, a síntese de colágeno (Masaki, 2010).

Segundo Kohl e colaboradores (2011), a formação de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, devido ao estresse oxidativo, pode aumentar a expressão de enzimas MMP-1 e MMP-9. A metaloproteinase de matriz 9 está envolvida na remodelação da matriz e na epitelização. Experimentos feitos com camundongos MMP-9 nulo apresentaram reepitelização comprometida e reduzido *clearance* de fibrinas. Além disso, os camundongos apresentaram deposição anormal de matriz, o que foi evidenciado pelo alinhamento irregular das fibras de colágeno. Nos

camundongos MMP-9 nulo, houve uma desaceleração na taxa de cicatrização e defeito na migração de queratinócitos e fibras colágenas, o que sugere uma reepitelização atrasada e um remodelamento irregular da matriz, respectivamente (Kyriakides et al., 2009).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da administração oral de aspartame na elasticidade da pele e em variáveis metabólicas de camundongos fêmeas. Além disso, fazer uma revisão sistemática da literatura para avaliar os estudos publicados sobre os efeitos metabólicos do consumo de aspartame em adultos.

Objetivos específicos

1. Investigar a influência da administração oral diária de aspartame sobre as seguintes variáveis em camundongos fêmeas:
 - Massa corpórea, consumo de dieta e ingestão hídrica;
 - Massa do coração, rins, tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom;
 - Características histológicas do fígado;
 - Parâmetros bioquímicos: glicemia de jejum, perfil lipídico e enzimas hepáticas;
 - Perfil de elasticidade da pele de camundongos avaliado pela medida da força tênsil;
 - Características histológicas e morfométricas da pele por observação da distribuição das fibras colágenas e da espessura da epiderme;
 - Atividade da enzima catalase na pele;
 - Atividade da enzima superóxido dismutase na pele; e
 - Caracterização do dano lipídico por avaliação da peroxidação lipídica na pele.
2. Investigar o efeito do aspartame *in vitro* sobre as seguintes variáveis:
 - Citotoxicidade em células mesangiais humanas; e
 - Efeito agonista do aspartame em receptores nucleares PPAR γ .
3. Realizar busca de dados na literatura para a revisão sistemática:
Efeitos do consumo de aspartame sobre a glicemia, a insulinemia, o perfil lipídico, o consumo energético e o peso corporal de indivíduos adultos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O aspartame ($C_{14}H_{18}O_5N_2$; 294,31 g/mol) utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Pluryquímica[®].

3.2. Modelo animal

Neste estudo, foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, heterogênicos, mantidos em gaiolas apropriadas em temperatura ambiente e com um ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 18 h e 6 h). O acesso à ração e à água foi livre.

3.2.1. Considerações éticas

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e realizados sob aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (Processo nº 13863/2013 – Anexo I). Após a eutanásia, as carcaças dos animais foram descartadas de acordo com as diretrizes da Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010.

3.3. Preparo dos *pellets* de ração com aspartame

Uma porção da ração de consumo diário dos camundongos foi triturada e umedecida com auxílio de almofariz e pistilo. Logo em seguida, a massa pulverizada de ração foi colocada em um molde e transferida para estufa a 37°C para a secagem da ração. Após 10 minutos, o molde foi retirado da estufa e os *pellets* formados foram retirados do molde e armazenados sob refrigeração a -20°C (Figura 5). Para o tratamento, soluções de aspartame referentes a concentrações de 20, 40 ou 80

mg/kg de massa corpórea dos camundongos foram adicionadas aos *pellets* de ração já produzidos, que foram oferecidos aos camundongos diariamente.



Figura 5: *Pellets* de ração produzidos para tratamento dos camundongos.

3.4. Delineamento experimental - avaliação *in vivo* da influência do aspartame na elasticidade da pele

Neste projeto, foram utilizados 60 camundongos *Swiss*, fêmeas, com 13 ou 22 semanas de idade, que foram tratados por 30 dias com aspartame em doses de 20, 40 ou 80 mg/kg de massa corpórea/dia, ou por 70 e 140 dias com ração suplementada com aspartame na proporção de 40 mg/kg de massa corpórea/6 g de ração. Dessa forma, foram compostos os seguintes grupos de tratamento, nos quais os animais foram divididos de forma aleatória (Figura 6):

Grupo I – grupo de camundongos com 13 semanas de idade que recebeu tratamento diário ofertado no *pellet* de ração por 30 dias. Os animais deste grupo de tratamento foram assim sub-divididos:

I.1 (n=5) – Grupo controle - tratamento somente com água, veículo de diluição do aspartame;

I.2 (n=5) – Grupo que recebeu tratamento com aspartame na concentração de 20 mg/kg de massa corpórea;

I.3 (n=5) – Grupo que recebeu tratamento com aspartame na concentração de 40 mg/kg de massa corpórea; e

I.4 (n=5) – Grupo que recebeu tratamento com aspartame na concentração de 80 mg/kg de massa corpórea.

Grupo II – grupo de camundongos com 22 semanas de idade que recebeu tratamento diário ofertado no *pellet* de ração por 30 dias. Os animais deste grupo de tratamento foram assim sub-divididos:

II.1 (n=5) – Grupo controle - este grupo de animais recebeu tratamento somente com água, veículo de diluição do aspartame;

II.2 (n=5) – Grupo que recebeu tratamento com aspartame na concentração de 20 mg/kg de massa corpórea;

II.3 (n=5) – Grupo que recebeu tratamento com aspartame na concentração de 40 mg/kg de massa corpórea; e

II.4 (n=5) – Grupo que recebeu tratamento com aspartame na concentração de 80 mg/kg de massa corpórea.

Os *pellets* com os tratamentos foram consumidos na íntegra pelos camundongos dos grupos I e II que, após o consumo, foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum*, sob condições controladas de luz e à temperatura ambiente.

Grupos III e IV – grupos de camundongos com 3 semanas de idade que receberam tratamento diário ofertado na ração suplementada com aspartame de modo que cada 6 g de ração (consumo diário médio calculado) contivesse a dose de aspartame correspondente ao IDA (40 mg/kg de massa corpórea), ou ração padrão,

oferecidas *ad libitum*. Os animais deste grupo de tratamento foram assim subdivididos:

Grupo III – os animais foram tratados por 70 dias:

III.1 (n = 5) – Grupo controle – recebeu ração padrão, não suplementada, *ad libitum*;

e

III.2 (n = 5) – Grupo de animais que recebeu tratamento diário com ração suplementada com aspartame (40 mg/kg de massa corpórea/6 g de ração), *ad libitum*.

Grupo IV – os animais foram tratados por 140 dias:

IV.1 (n = 5) – Grupo controle – recebeu ração padrão, não suplementada, *ad libitum*;

e

IV.2 (n = 5) – Grupo de animais que recebeu tratamento diário com ração suplementada com aspartame (40 mg/kg de massa corpórea/6 g de ração), *ad libitum*.

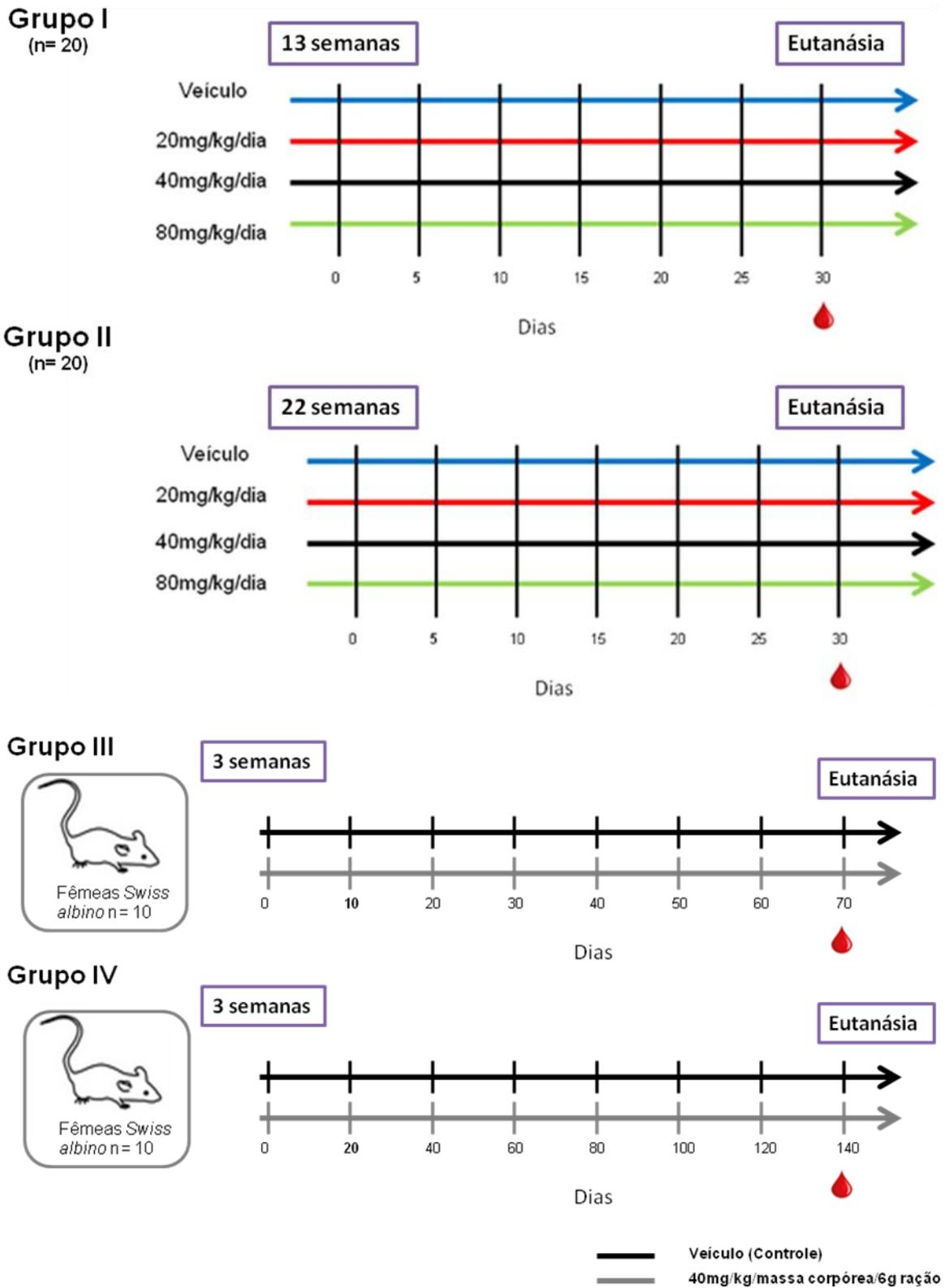


Figura 6: Delineamento experimental. Descrição da divisão dos grupos de animais e tratamento com aspartame ou veículo.

Durante o estudo, a massa corpórea dos camundongos foi monitorada, assim como o consumo de ração, a energia ingerida, a eficiência metabólica (determinada pela razão entre o ganho de peso e a energia ingerida) e a ingestão de água dos mesmos durante todo o tratamento.

Após o período de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de dióxido de carbono. Foi, então, realizada uma tricotomia da região ventral e amostras de pele, de aproximadamente 3 cm², foram coletadas do animal. Em seguida, foram dissecados os depósitos de tecido adiposo branco visceral (periovariano), tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal) e tecido adiposo marrom (interescapular), além do coração, fígado e rins. Depois desse procedimento, suas massas foram aferidas. Fragmentos de tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior análise. Outros fragmentos desses tecidos foram imersos em solução de formol a 10%, onde permaneceram por 48 h e, após esse período, receberam os procedimentos de rotina para posterior análise histológica com coloração com hematoxilina e eosina para observação da morfologia geral do tecido e, no caso da pele, também com Tricrômio de Masson para observação das fibras de colágeno.

3.5. Análise bioquímica no soro

3.5.1. Glicemia basal

Após 12 horas de jejum noturno, a glicemia dos animais foi aferida utilizando fitas reativas (Accuhek Performa, Roche, USA) analisadas em glicosímetro (Accuhek Performa, Roche, USA), com limites de detecção entre 10 e 600 mg/dL.

3.5.2. Dosagem de enzimas hepáticas e perfil lipídico

As dosagens séricas das enzimas alanina amino transferase (ALT), do aspartato amino transferase (AST) e do perfil lipídico [triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL)] foram obtidas por meio do analisador bioquímico automático OLYMPUS AU680®

(Beckman Coulter, Brea, CA, USA). As análises foram realizadas na Unidade do Laboratórios de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Brasília.

3.6. Avaliação da elasticidade da pele

Fragmentos da pele dos animais em estudo, coletados após a eutanásia, foram mantidos úmidos por adição de solução fisiológica. Em seguida, tiveram sua elasticidade avaliada por medida da força tênsil, com auxílio do equipamento de ensaio vertical, VersaTest[®] (Mecmesin *Versa Test*, United Kingdom) acoplado a um dinamômetro digital AGF (Panambro Indústria Técnica S.A.). As amostras, com aproximadamente 0,25 cm², foram estendidas até sua ruptura e, assim, a força de tração máxima tolerada pelo fragmento de pele foi determinada.

3.7. Avaliação histológica e morfométrica da pele

3.7.1. Fixação dos tecidos

Os fragmentos da pele da região ventral e o tecido adiposo coletados dos animais após o tratamento foram imersos em solução fixadora de formol 10% (v/v), onde permaneceram por 48 h. Os fígados foram transportados em formol a 10% e, em seguida, foram incubados em solução de Bouin por 2 horas. Após esse período, receberam os procedimentos de rotina histológica para inclusão em parafina.

3.7.2. Corte no micrótomo e procedimentos de coloração

Os blocos com os fragmentos de fígado e pele foram cortados em micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha), em cortes com espessura de 5 e 7 µm, respectivamente. As amostras dos tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram 30 minutos a -20°C antes da microtomia, para evitar possível enrugamento do tecido durante o corte. Os fragmentos obtidos foram transferidos para banho-maria (40°C), distendidos com o auxílio de pinça e aderidos em lâminas histológicas. As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até a coloração.

Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (solução de hematoxilina de Harris), para a análise morfológica geral e determinação da espessura da epiderme; e Tricrômio de Masson (Hotchkiss, 1948), para a análise das fibras de colágeno.

A análise histológica foi realizada por imagens dos cortes de tecidos digitalizadas no equipamento *Aperio ScanScope Slide Scanner* (Aperio Technologies, Vista, CA, EUA), com aumento de 20 vezes. As análises foram baseadas nas características histológicas do tecido comparadas às do tecido do grupo controle. As imagens foram analisadas no *software* de imagens interativo ImageJ[®].

A confecção e coloração das lâminas foram realizadas nos Laboratórios de Histopatologia Oral da Faculdade de Ciências da Saúde e no Laboratório de Histologia/Embriologia da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, e contou com o auxílio técnico da funcionária Maria da Glória da Silva.

3.7.3. Avaliação da espessura da epiderme

Os cortes de pele foram montados em lâminas de vidro para serem corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), para a análise morfológica geral do tecido e espessura da epiderme. Abaixo segue foto ilustrativa de como foi realizada a medida da espessura da epiderme das fotomicrografias das lâminas coradas. As marcações da figura abaixo foram realizadas no *Aperio ScanScope*[®] (lente objetiva com aumento de 20x) e as espessuras mensuradas no programa ImageJ[®] (aumento de 20x) seguidas das análises no programa Excel (Microsoft). Foram obtidas cinco medidas de pontos equidistantes, de aproximadamente 100 μm , de cada corte histológico (Figura 7).

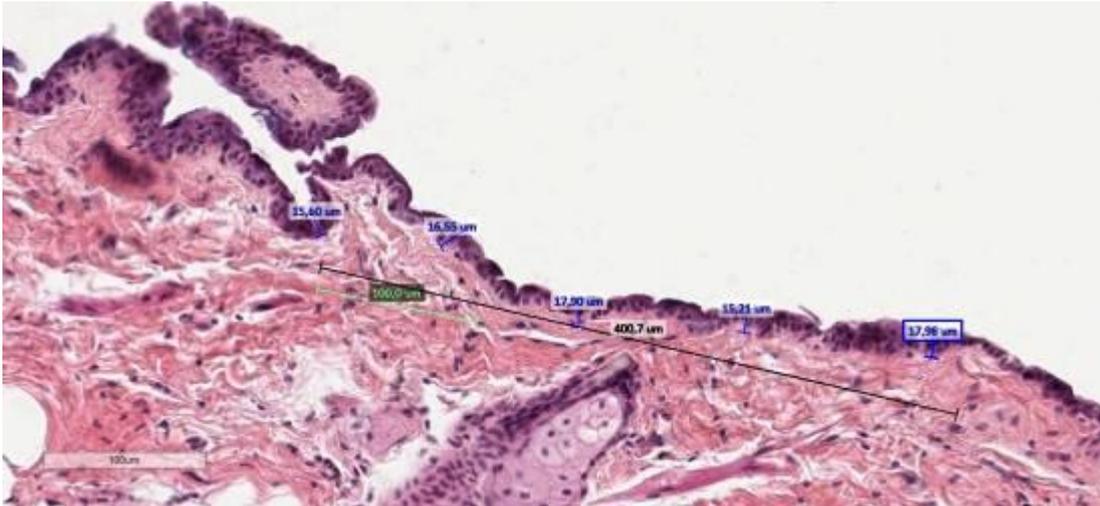


Figura 7: Foto ilustrativa representando a mensuração da camada epidérmica de uma lâmina corada com HE para avaliação da espessura. Escala: 100 µm; objetiva de 20x com aumento de 20x.

3.7.4. Avaliação das fibras de colágeno

Os cortes de pele foram montados em lâminas de vidro para serem corados pelas técnicas de Tricrômio de Masson para visualização das fibras de colágeno. A quantificação do colágeno foi realizada por meio do *Pluggin* “*Color Segmentation*” do *software* ImageJ®. Os resultados foram expressos em porcentagem de colágeno baseados na segmentação de cores do tecido. Para cada imagem, foram selecionados cinco campos de observação.

3.8. Avaliação do estresse oxidativo na pele

3.8.1. Preparo das amostras

Os fragmentos de pele dos camundongos, tratados ou não com aspartame, mantidos sobre refrigeração a -80°C foram pesados e picotados. Para cada 1 g de pele, foi adicionado 4 mL do tampão Tris 50 mM, com 10 mM de CaCl_2 , pH 7,4, adicionado do inibidor de proteases composto por 0,2 M de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 0,2 M de fenantrolina (PHE) e 0,2 M de N-etilmaleimida (NEM). Os fragmentos de pele adicionados do tampão com os inibidores foram homogenizados em ultra-turrax (IKA, Alemanha) e mantidos a 4°C *overnight*. As

amostras foram centrifugadas duas vezes por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para análises posteriores.

3.8.2. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas do sobrenadante da pele foi feita pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), usando a soro albumina bovina (BSA) como padrão.

A amostra do sobrenadante foi diluída com água na proporção de 1:10. A essa amostra foi adicionado 1 mL da solução II e após 10 minutos de reação foi adicionado 100 µL de Folin Ciocalteu, diluído em água na proporção de 1:1. Depois de ter reagido por 30 minutos, a densidade óptica da amostra foi avaliada em espectrofotômetro a 660 nm.

- Solução I: 50 µL CuSO_4 25% em 2,5 mL de tartarato de potássio a 1%.
- Solução II: 1 mL da solução I em 50 mL de solução a 2% de Na_2CO_3 em NaOH 0,1 N.

3.8.3. Avaliação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase foi avaliada pela conversão do peróxido de hidrogênio em moléculas de água e oxigênio. Essa reação foi medida pela diminuição da absorbância do H_2O_2 no comprimento de onda de 240 nm (Aebi, 1984). Foram utilizados 300 µL de solução de H_2O_2 30 mM e 600 µL de tampão fosfato 50 mM, pH 7. Em seguida, foi adicionado o sobrenadante obtido dos fragmentos de pele, volume equivalente a 50 µg de proteína, e realizada a leitura em espectrofotômetro em modo cinético por 150 segundos em intervalos de 15 segundos.

3.8.4. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada pela converção do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). Ela foi realizada pelo método bioquímico que utiliza o sistema xantina/xantina oxidase como fonte de $O_2^{\cdot-}$. A redução do reagente *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), com a consequente formação de cristais de formazana, foi utilizada para medir a formação do ânion radical superóxido. Uma solução de NBT na concentração de 60 μM e xantina na concentração de 100 μM foi preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, contendo 0,1 mM de EDTA. Quantidade de amostra do sobrenadante da pele correspondente a 100 μg de proteína foi adicionada a 700 μL da solução de NBT 60 μM e xantina 100 μM . O volume foi completado para 950 μL com tampão fosfato de potássio. A enzima xantina oxidase (0,075 U/mL) foi adicionada às amostras no momento imediatamente anterior à leitura da absorbância em espectrofotômetro, que foi realizada no modo cinético, por 300 segundos em intervalos de 15 segundos, no comprimento de onda de 560 nm.

3.8.5. Ensaio de avaliação da peroxidação lipídica

A avaliação do nível de peroxidação lipídica do sobrenadante obtido da pele foi realizada de acordo com o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). Volume do sobrenadante da pele equivalente a 40 μg de proteínas foi adicionado a 100 μL de duodecil sulfato de sódio (SDS), 750 μL de ácido acético 20% e 750 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA), e o volume de reação foi completado para 4 mL com água deionizada. O meio reacional foi incubado por 1 h em estufa a 95°C e, após esse período, a reação foi resfriada em banho de gelo. A fluorescência da amostra foi medida em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 550 nm. O 1,1,3,3-tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich) foi utilizado na construção da curva padrão e os resultados foram expressos como nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteína. O ensaio de avaliação das TBARS quantifica hidroperóxidos de lipídeos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA), no sobrenadante da pele.

3.9. Avaliação do efeito do aspartame em cultura de células

3.9.1. Avaliação da citotoxicidade de aspartame em células mesangiais

Com o objetivo de definir a viabilidade das células mesangiais expostas ao tratamento com aspartame, para realização do ensaio de gene repórter, foi utilizado o ensaio colorimétrico segundo o método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). O anel de tetrazólio presente no sal brometo de MTT, de coloração amarelada, é clivado por desidrogenases presentes na mitocôndria das células viáveis, formando cristais de formazana, de coloração azulada (Mosmann, 1983). No ensaio, as placas de 96 poços foram semeadas com 30.500 células mesangiais por poço, suspensas em meio de cultura DMEM, exceto no poço utilizado como branco da reação, que continha somente o meio de cultura, sem células. O volume final foi de 100 µL. Após incubação de 24 horas a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 10 µL de MTT [5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS)] em todos os poços das placas e as mesmas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Para a dissolução do sal de formazana, 100 µL de solução reveladora de MTT (solução de HCl 0,04 M em isopropanol absoluto) foram adicionados aos poços. As placas foram deixadas sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de placas (Beckman Coulter DTX 800). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis nos poços tratados com o aspartame (20 a 100 µM) em relação ao controle (veículo) (100%). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição.

3.9.2. Investigação do efeito agonista do aspartame em receptores nucleares PPAR γ – ensaio de gene repórter

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção transiente. Esse método consiste na aplicação de pulso de corrente elétrica a uma suspensão de células para gerar poros na membrana plasmática e nuclear e assim permitir a entrada do DNA plasmidial de interesse. Para o ensaio da transfecção, células mesangiais foram coletadas por meio da centrifugação (2.000 rpm por 5 minutos) e ressuspendidas em solução PBS contendo 0,1% de dextrose e 0,1% de cloreto de cálcio para obtenção de uma concentração de 10⁷ células/mL. Uma alíquota

contendo 500 µL da solução de células foi transferida para uma cubeta e submetida à eletroporação (Gene Pulser II - Bio-Rad®) nas condições de 350 mV e 700 µF. Após a eletroporação, as células foram transferidas para o meio de cultura, distribuídas em placas de 12 poços (1 mL por poço) e tratadas. Para transfecções com PPAR γ -GAL4 e o plasmídeo repórter GAL-Luc, as células foram tratadas com o veículo EtOH:DMSO (1:2), com 10⁻⁵ M do controle positivo rosiglitazona ou com aspartame nas concentrações de 1, 500 e 1.000 µM, e mantidas por 24 horas de incubação a 37°C e CO₂ 5%. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e a cada poço foi adicionado 100 µL tampão de lise 1X (Promega®). A taxa de ativação da transcrição é a razão entre a atividade (luciferase) das células tratadas com a rosiglitazona (controle positivo), o aspartame e a atividade do controle, que são as células tratadas com o veículo [EtOH:DMSO (1:2)], convencionando a taxa de ativação das células tratadas com veículo igual a um.

3.10. Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism® 5.0. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O teste t de Student não pareado foi utilizado para comparar a média entre dois grupos; a análise de variância de um fator (*one way* ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls ou de Tukey foi utilizada para comparar as médias entre múltiplos grupos; e a análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni foi utilizada, quando pertinente, para comparar as médias entre múltiplos grupos em relação ao tratamento ao longo do tempo.

3.11. Revisão Sistemática

3.11.1. Protocolo e Registro

A revisão sistemática foi reportada seguindo as diretrizes para elaboração de revisões sistemáticas e meta-análises descritas no *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (Moher et al., 2009) (Anexo B).

O protocolo da revisão sistemática foi registrado no *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO) sob o número de registro CRD42016038073 (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>).

3.11.2. Critérios de Elegibilidade

3.11.2.1. Critérios de inclusão

Todos os artigos incluídos foram escritos em linguagem do alfabeto latino (Romano). A pesquisa foi conduzida sem restrições de tempo. O formato PICOS (população, intervenção, comparação, resultado, delineamento do estudo) foi usado para construir a questão da pesquisa com os seguintes critérios de inclusão (Quadro1):

Quadro 1. Estratégia PICOS

Sigla	Significado	Critérios de inclusão
P	População	Adultos
I	Intervenção	O consumo de aspartame
C	Comparação	Os que não consomem aspartame
O	Resultados (<i>Outcome</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ● Níveis de glicose no sangue; ● Teste de tolerância à glicose; ● HOMA-IR; ● Hiperglicemia; ● HbA1c; ● IMC; ● Sobrepeso; ● Consumo de energia; ● HDL, LDL e Triglicerídeos.
S	Tipo de estudo (<i>Study Design</i>)	Ensaio clínico randomizado

3.11.2.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos: 1) estudos que não se encaixavam na estratégia PICOS; 2) comentários, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e resumos de

conferências; 3) estudos *in vitro* ou em animais; 4) artigos em língua que não baseada no alfabeto latino (Romano); 5) estudos que não tinham cópia completa disponível; e 6) estudos observacionais ou ensaios clínicos não randomizados.

3.11.3. Estratégia de busca

As buscas foram realizadas no dia 13 de abril de 2016 utilizando as seguintes bases de dados bibliográficas eletrônicas: Cochrane, LILACS, PubMed, Scopus e Web of Science (Quadro 2). Buscas na literatura cinzenta foram realizadas utilizando OpenGrey, Google Acadêmico e ProQuest Teses e Dissertações. As referências duplicadas foram removidas com a utilização do *software* EndNote® (Thomson Reuters). Dos artigos escolhidos, os dados extraídos foram: nome do primeiro autor, ano de publicação, país, desenho do estudo, tamanho da amostra, características dos participantes, principais resultados e conclusões.

Quadro 2. Estratégia de busca

Base de dados	Busca (13/04/2016)
Cochrane PubMed Web of Science	#1 aspartame; #2 NutraSweet; #3 Methyl Aspartylphenylalanine; #4 hyperglycemic; #5 hyperglycemia; #6 glucose levels; #7 insulin resistance; #8 glucose intolerance; #9 HOMA-IR; #10 type 2 diabetes; #11 HbA1C; #12 hyperinsulinemia; #13 insulin levels; #14 metabolic disease; #15 obesity; #16 body weight, #17 fat mass; #18 overweight; #19 body mass index; #20 energy intake; #21 (#1 or #2 or #3); #22 (#4 or #5 or #6 or #7 or #8 or #9 or #10 or #11 or #12 or #13 or #14 or #15 or #16 or #17 or #18 or #19 or #20); #23 (#21 and #22)
LILACS	#1 aspartame.mp.; #2 type 2 diabetes.mp.; #3 obesity.mp.; [mp=title, abstract, subject headings, heading word, drug trade name, original title, device manufacturer, drug manufacturer, device trade name, keyword] #1 and #2 or #3
Scopus	(aspartame) AND (hyperglycemic OR hyperglycemia OR "glucose levels" OR "insulin resistance" OR "glucose intolerance" OR HOMA-IR OR "type 2 diabetes" OR HbA1C OR hyperinsulinemia OR "insulin levels" OR "metabolic disease") OR (obesity OR "body weight" OR "fat mass" OR overweight OR "body mass index" OR "energy intake")
Google scholar	(aspartame) AND (hyperglycemic OR hyperglycemia OR glucose levels OR insulin resistance OR glucose intolerance OR HOMA-IR OR type 2 diabetes OR HbA1C OR hyperinsulinemia OR insulin levels OR healthy individuals OR diabetic individuals) AND (obesity OR body weight OR fat mass OR overweight OR body mass index)
Open Grey	aspartame AND "glucose levels" AND "body mass index"
Proquest	aspartame AND "glucose levels" AND "body mass index"

3.11.4. Seleção dos artigos

Os artigos foram selecionados em duas fases. Na primeira fase, duas pessoas, de forma independente (Natália Cardoso Santos e Laíza Magalhães de Araújo), revisaram os títulos e resumos de todas as referências coletadas nas bases de dados. Os artigos que cumpriram os critérios de inclusão foram selecionados para posterior leitura completa dos textos (segunda fase). Quando não houve consenso entre as leitoras, uma terceira pessoa (Michella Soares Coelho) foi envolvida para tomar uma decisão final. Quaisquer estudos que não cumpriram os critérios de inclusão foram descartados.

3.11.5. Análise do risco de viés

Para avaliar o risco de viés e os desfechos dos estudos clínicos randomizados, foi aplicada a ferramenta da Colaboração Cochrane, *Review Manager*[®] 5.2 *program* (Rev-Man 5.2, The Nordic Cochrane Centre, Copenhagen, Denmark) (Higgins e Green., 2011). Os critérios para avaliar a qualidade incluíram itens como a geração da sequência aleatória, ocultação da alocação, cegamento de participantes e dos profissionais, cegamento de avaliadores do desfecho, relato dos desfechos incompletos e outras fontes de viés (Carvalho et al., 2013). O risco de viés foi avaliado como baixo, alto ou incerto (Apêndice B).

3.11.6. Medidas de sumarização dos resultados

Os níveis de glicose em jejum, peso corporal, consumo de energia, níveis de insulina, colesterol, HDL e triglicerídeos foram considerados como os principais resultados em indivíduos que consumiram aspartame comparados com o controle ou sacarose.

3.11.7. Síntese dos resultados

A influência do consumo de aspartame sobre os resultados foi avaliada por meio de uma meta-análise seguindo as orientações apropriadas da Cochrane. O *Review Manager® 5.2 program (Rev-Man 5.2, The Nordic Cochrane Centre, Copenhagen, Denmark)* foi usado para construir os gráficos do tipo floresta (Deeks et al., 2011).

3.11.8. Risco de viés entre os estudos e a qualidade da evidência

Foram consideradas a heterogeneidade clínica (por comparação das variabilidades entre as características dos participantes e os resultados estudados), a heterogeneidade metodológica (pela comparação da variabilidade do desenho do estudo e o risco de viés) e a heterogeneidade estatística.

O instrumento *Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE)* foi utilizado para julgar a qualidade de evidências e a classificação de força de recomendação nos 12 estudos incluídos na síntese quantitativa. Essa avaliação baseou-se no desenho do estudo, no risco de viés, na inconsistência, nas evidências indiretas, na imprecisão e no viés de publicação. A qualidade da evidência foi classificada como alta, moderada, baixa e muito baixa. O GRADE foi acessado pelo site <http://gradepro.org> (Apêndice C).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da administração oral diária de aspartame em camundongos fêmeas

4.1.1. Efeito do consumo de aspartame durante 30 dias sobre a massa corpórea, ingestão hídrica e de ração, energia ingerida e eficiência metabólica em camundongos

No grupo I, os animais com 13 semanas de idade receberam o tratamento com aspartame nas diferentes doses durante 30 dias. Foi observado que os camundongos que foram tratados com 40 mg/kg/dia de aspartame apresentaram maior ganho de peso ($12,75 \pm 1,94$ g) em comparação ao grupo que recebeu água como controle ($5,06 \pm 0,76$ g) (Figura 8). Com relação ao consumo diário de ração, foi possível observar que todos os grupos que receberam aspartame apresentaram um maior consumo de ração em comparação ao grupo que recebeu apenas ração padronizada (Figura 19A). A energia ingerida foi maior no grupo que recebeu 80 mg/kg/dia de aspartame ($95,44 \pm 5,49$ KJ) comparado com o controle ($2,92 \pm 0,09$ KJ) (Figura 9C). Para avaliar a relação entre o ganho de massa corpórea e a ingestão de energia, em resposta ao tratamento com aspartame, foi calculada a eficiência metabólica. Foi observado um aumento significativo da eficiência metabólica dos animais que receberam 40 mg/kg/dia ($1,50 \pm 0,24$ g/kJ) de aspartame quando comparados ao grupo controle ($0,67 \pm 0,11$ g/KJ) (Figura 9D). Quanto ao consumo hídrico, pode-se observar que os grupos que receberam 20 e 80 mg/kg ($8,45 \pm 0,27$ mL e $7,33 \pm 0,18$ mL, respectivamente) foram os que mais consumiram água em relação ao grupo controle (Figuras 10 A e B).

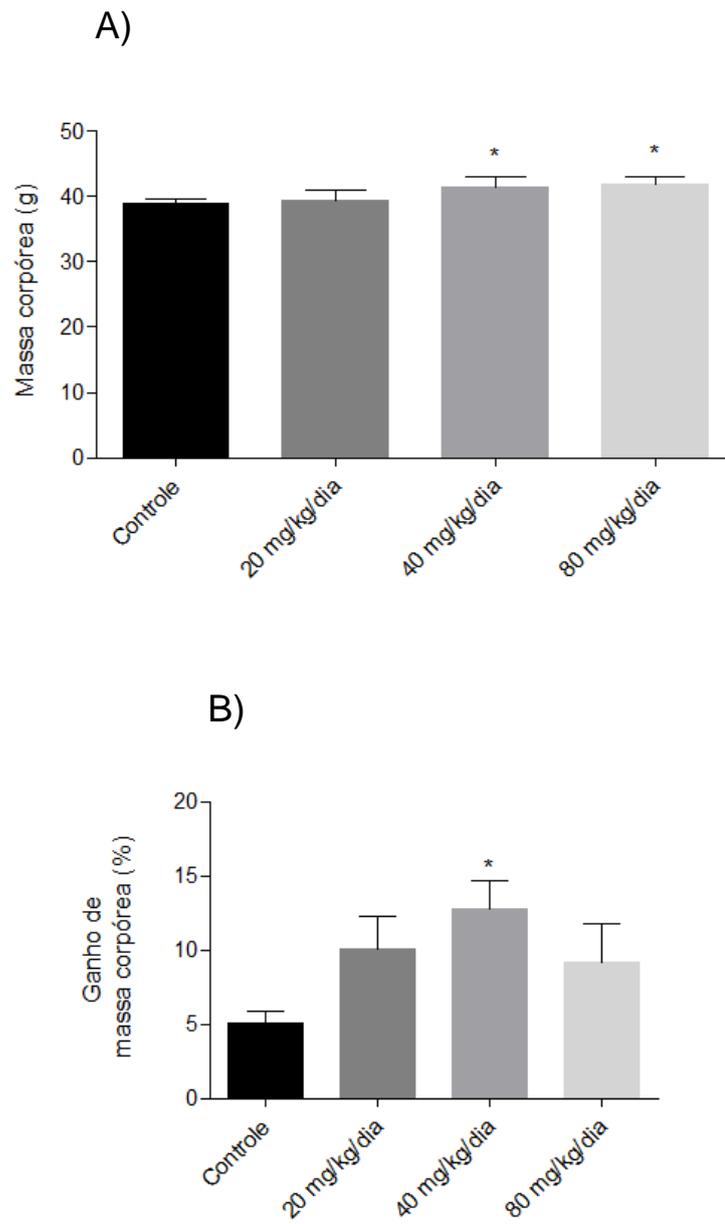


Figura 8: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir de 13 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Ganho de massa corpórea expresso em massa e (B) em porcentagem relativa à massa inicial do animal, durante o período de tratamento. * $p < 0,05$, vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

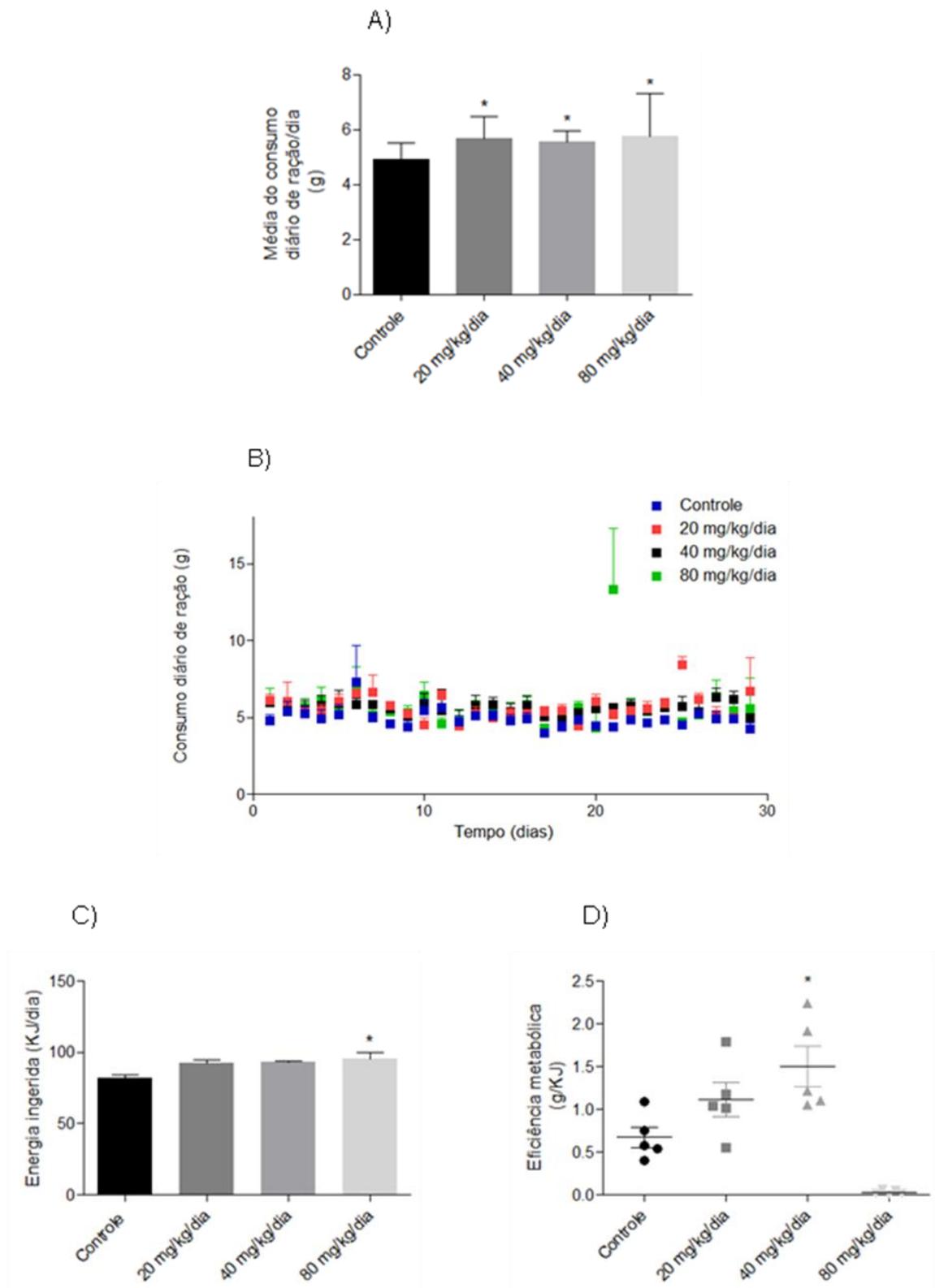


Figura 9: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão diária de ração em camundongos a partir de 13 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Consumo diário de ração por cada grupo de camundongos, (B) Consumo de ração ao longo do tempo de tratamento, (C) Energia ingerida e (D) Eficiência metabólica. * $p < 0,05$, vs. grupo controle (análise de variância two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

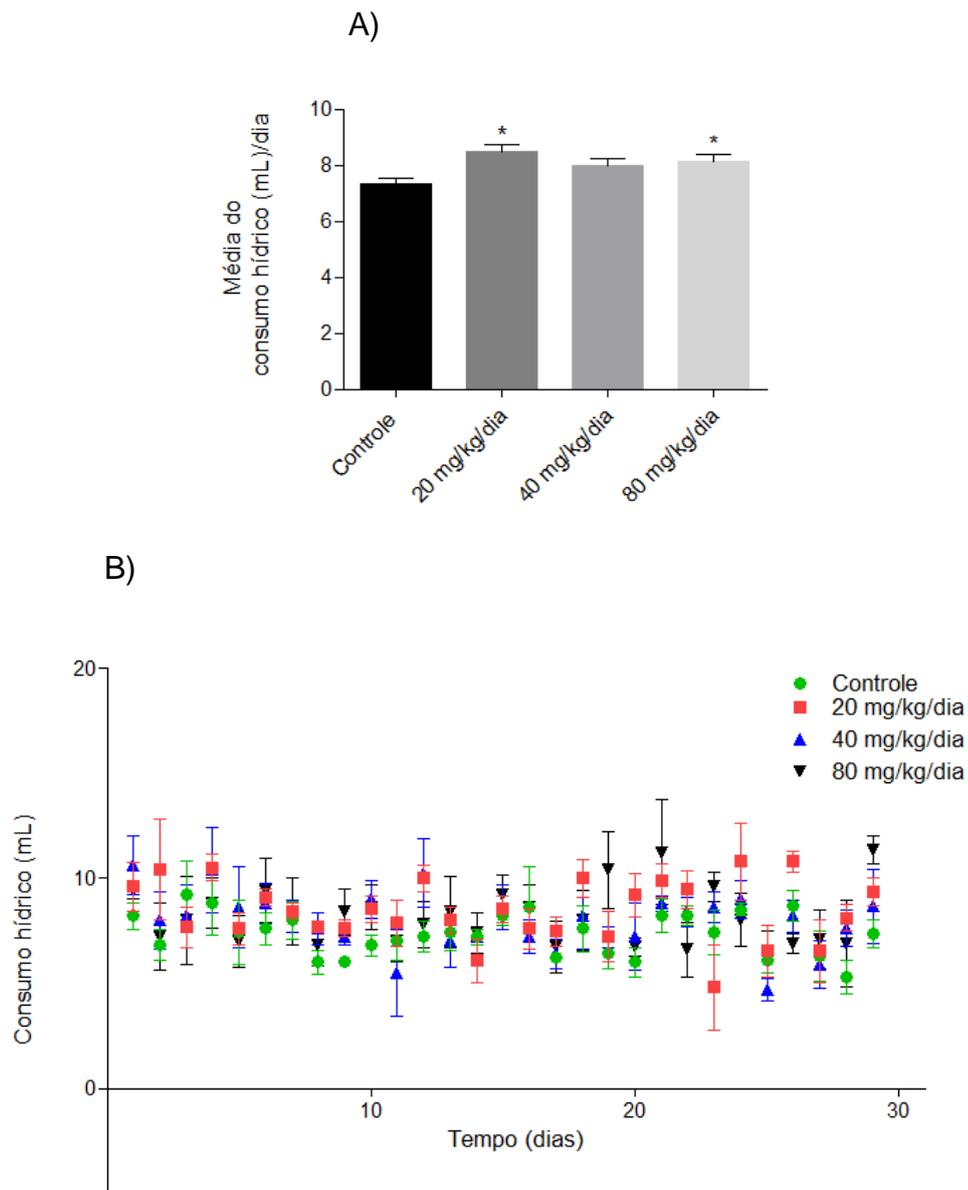


Figura 10: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão hídrica diária em camundongos a partir de 13 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Ingestão hídrica diária por cada grupo de camundongos e (B) Ingestão hídrica ao longo do tempo de tratamento. * $p < 0,05$, vs. grupo controle (análise de variância *two-way ANOVA*, seguida de pós-teste de Bonferroni).

No grupo II, os animais com 22 semanas de idade receberam o tratamento com aspartame, nas diferentes doses, por 30 dias. Não foi observado ganho de peso nos animais tratados com aspartame quando comparados com os animais do grupo controle. Foi observado o contrário, os animais que receberam aspartame na dose de 40 mg/kg/dia perderam peso ($0,67 \pm 3,33$ g) em comparação ao grupo controle ($3,25 \pm 0,97$ g) (Figura 11B). O consumo de ração foi maior no grupo de animais que recebeu 80 mg/kg/dia de aspartame ($5,27 \pm 0,28$ g) quando comparado ao controle

($4,57 \pm 0,11$ g) (Figura 12A). Em relação à energia ingerida pelos animais, todos os animais que receberam aspartame, independente da dose, apresentaram um consumo energético maior em comparação ao grupo controle (Figura 12C). A eficiência metabólica não apresentou diferença significativa entre os grupos, mas teve uma tendência de diminuição nos animais que receberam aspartame na dose de 40 mg/kg/dia ($-0,13 \pm 0,42$ g/kJ) em relação ao grupo controle ($0,54 \pm 0,16$ g/kJ) (Figura 12D).

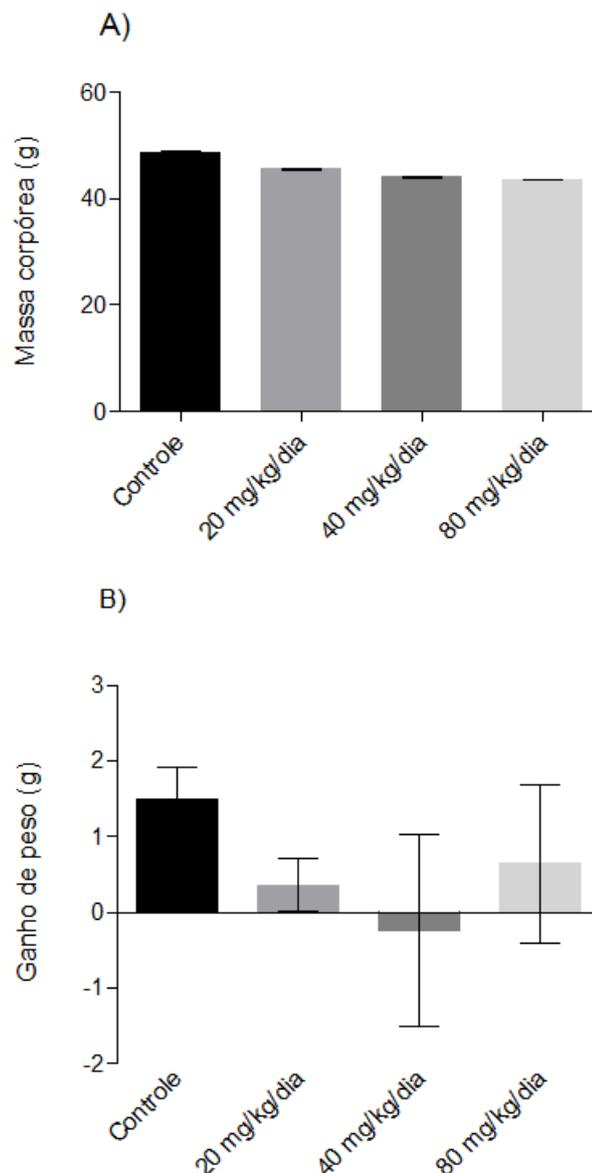


Figura 11: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir de 22 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Ganho de massa corpórea expresso em massa e (B) em porcentagem relativa à massa inicial do animal, durante o período de tratamento vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

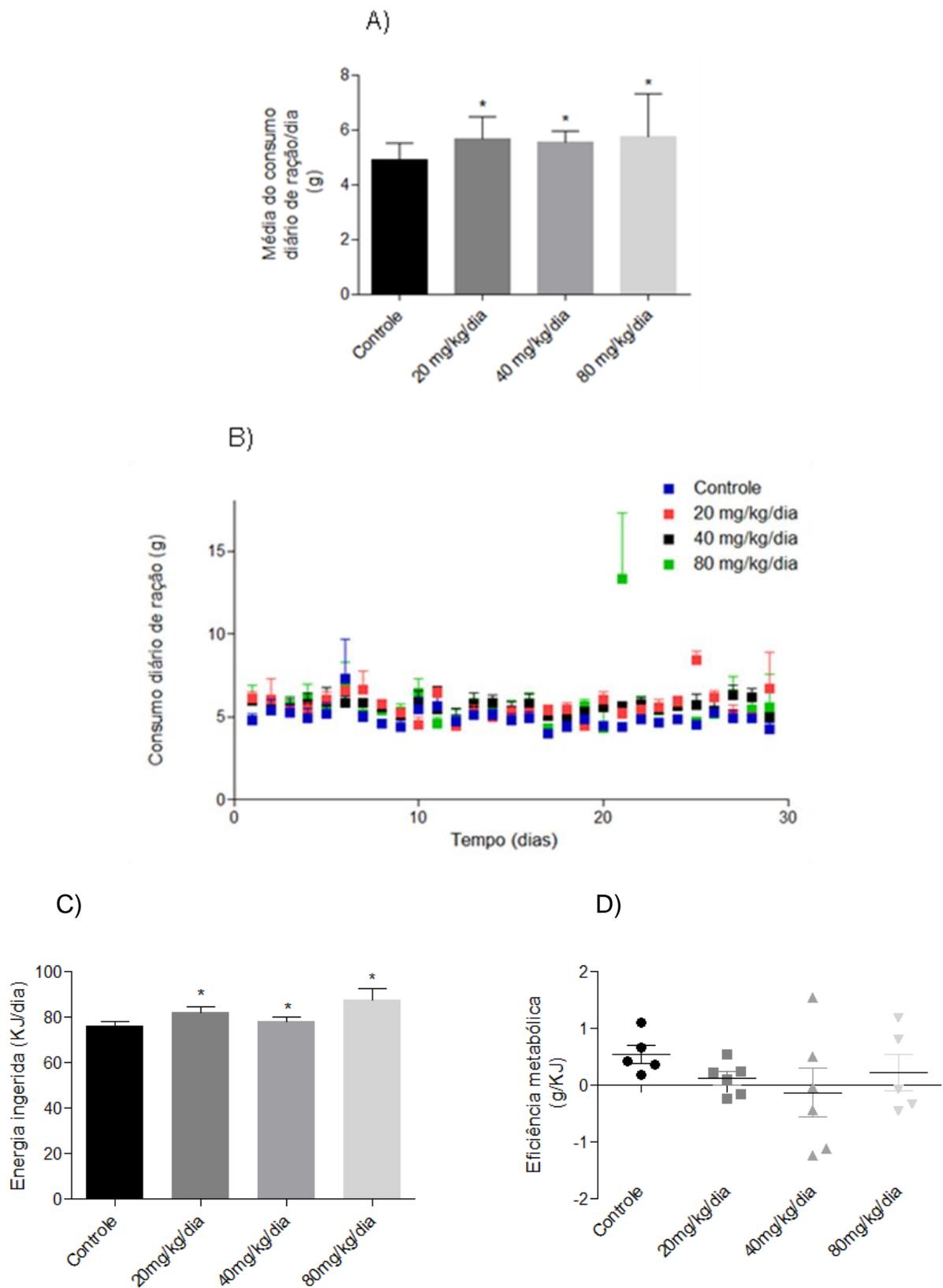


Figura 12: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão diária de ração em camundongos a partir de 22 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Consumo diário de ração por cada grupo de camundongos, (B) Consumo de ração ao longo do tempo de tratamento, (C) Energia ingerida e (D) Eficiência metabólica. * $p < 0,05$, vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

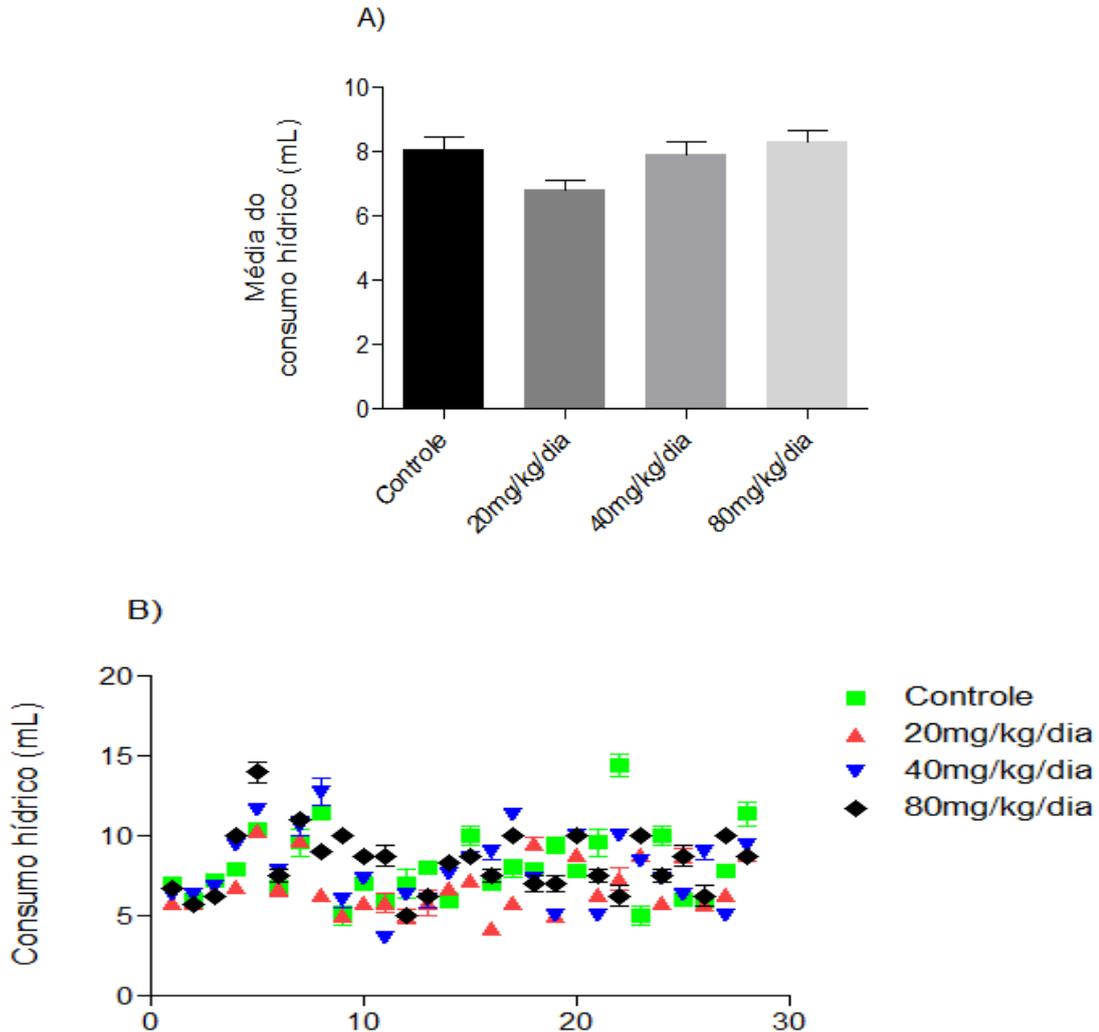


Figura 13: Efeito do consumo de aspartame por 30 dias sobre ingestão hídrica diária em camundongos a partir de 22 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Ingestão hídrica diária por cada grupo de camundongos e (B) Ingestão hídrica ao longo do tempo de tratamento vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.1.2. Efeito do consumo de aspartame na variação da massa corpórea e da ingestão hídrica e de ração dos camundongos tratados por 70 dias com ração suplementada com aspartame

O grupo III foi composto de animais com 3 semanas de vida (idade de desmame) que receberam o tratamento com ração suplementada com aspartame por 70 dias. A massa corpórea e o ganho de massa corpórea não apresentaram diferença significativa após o tratamento com aspartame na dose de 40 mg/kg/dia

em comparação ao grupo controle (Figura 14A e B). No entanto, houve uma tendência de aumento de consumo de ração pelos animais que receberam aspartame ($41,33 \pm 1,64$ g) quando comparado ao dos animais do grupo controle ($39,45 \pm 1,76$ g) (Figura 16B). Com o valor do consumo de ração, foi possível estimar que a quantidade de aspartame diária consumida pelos animais foi de aproximadamente $39,36 \pm 1,56$ mg/kg/dia (Figura 15B). A ingestão hídrica não foi diferente entre os animais do grupo controle e aqueles tratados com aspartame (Figura 16).

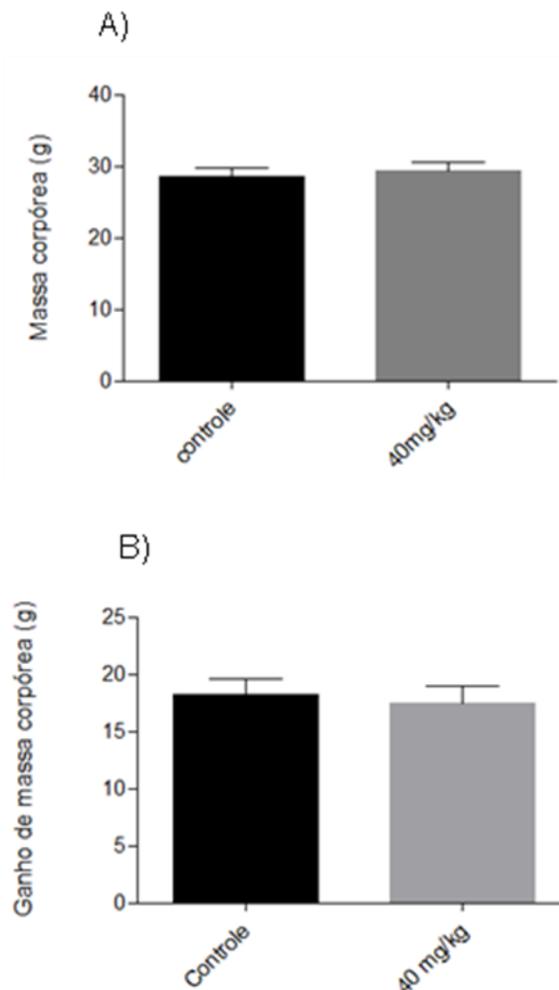


Figura 14: Efeito do consumo de aspartame por 70 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir de 3 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Ganho de massa corpórea expresso em massa e (B) em porcentagem relativa à massa inicial do animal, durante o período de tratamento vs. grupo controle (análise pelo teste t de Student não pareado).

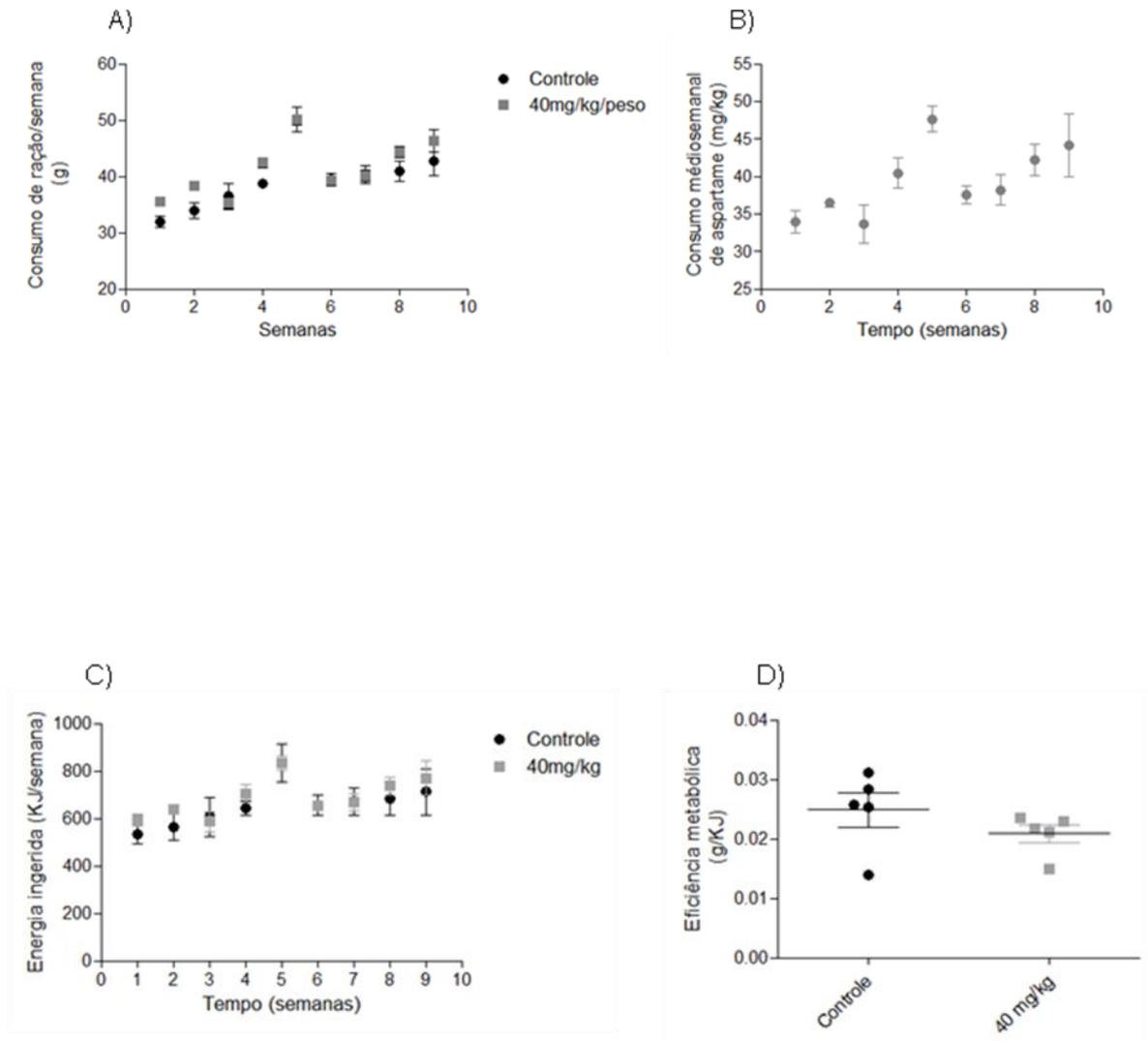


Figura 15: Efeito do consumo de aspartame por 70 dias sobre ingestão semanal de ração em camundongos a partir de 3 semanas de idade (desmame). Resultados representados como média \pm EPM. (A) Consumo semanal de ração por cada grupo de camundongos, (B) Consumo semanal de aspartame, (D) Energia ingerida e (D) Eficiência metabólica. Análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni.

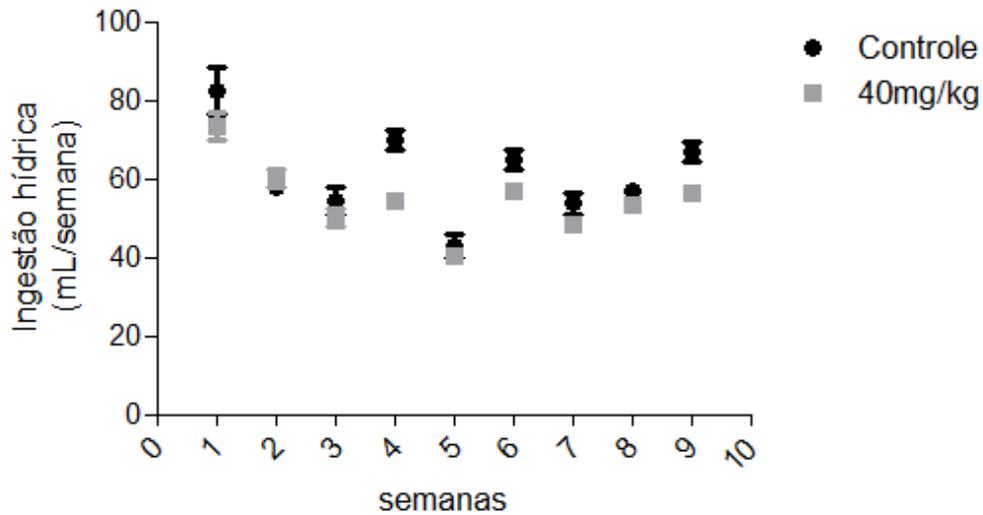


Figura 16: Efeito do consumo de aspartame por 70 dias sobre ingestão hídrica semanal em camundongos a partir de 3 semanas de idade (desmame). Resultados representados como média \pm EPM. Ingestão hídrica semanal ao longo do tempo de tratamento vs grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.1.3. Efeito do consumo de aspartame na variação da massa corpórea e da ingestão hídrica e de ração dos camundongos tratados por 140 dias com ração suplementada com aspartame

O grupo IV foi composto de animais com 3 semanas de vida (idade de desmame) que receberam a ração suplementada com aspartame por 140 dias. Não houve diferença no ganho de peso entre os grupos estudados (Figura 17). Foi possível observar que não houve alteração no consumo de ração, na energia ingerida, na eficiência metabólica e nem na ingestão hídrica entre os grupos estudados (Figuras 18 e 19).

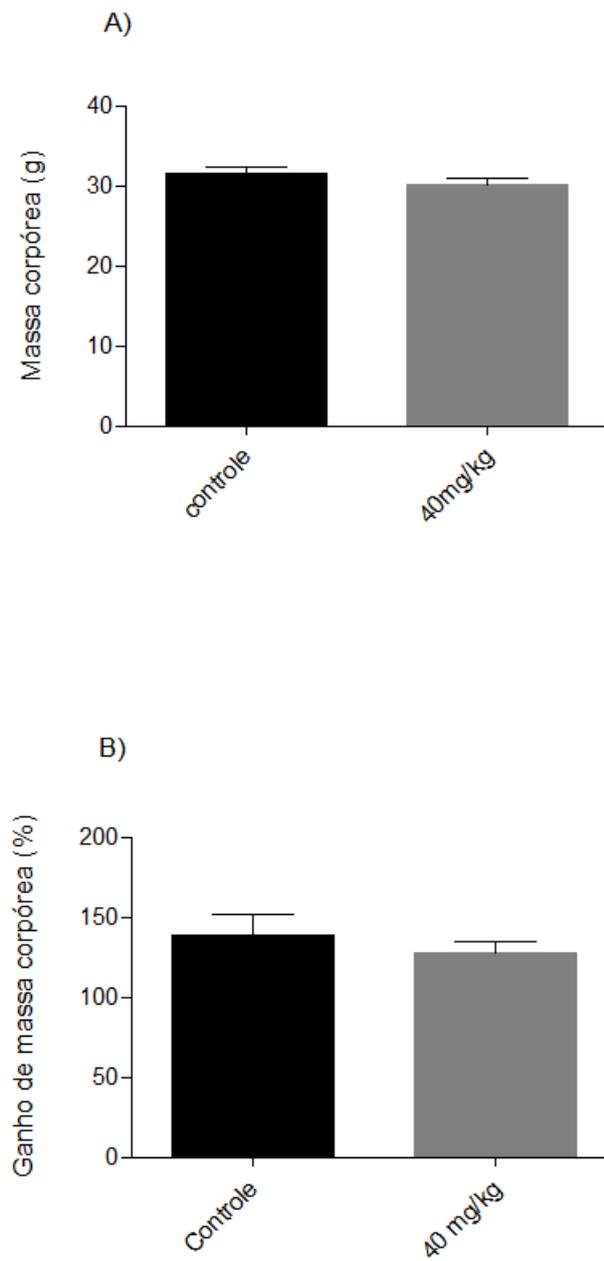


Figura 17: Efeito do consumo de aspartame por 140 dias sobre o ganho de massa corpórea em camundongos a partir de 3 semanas de idade (desmame). Resultados representados como média \pm EPM. (A) Ganho de massa corpórea expresso em massa e (B) em porcentagem relativa à massa inicial do animal, durante o período de tratamento vs. grupo controle (análise pelo teste t de Student não pareado).

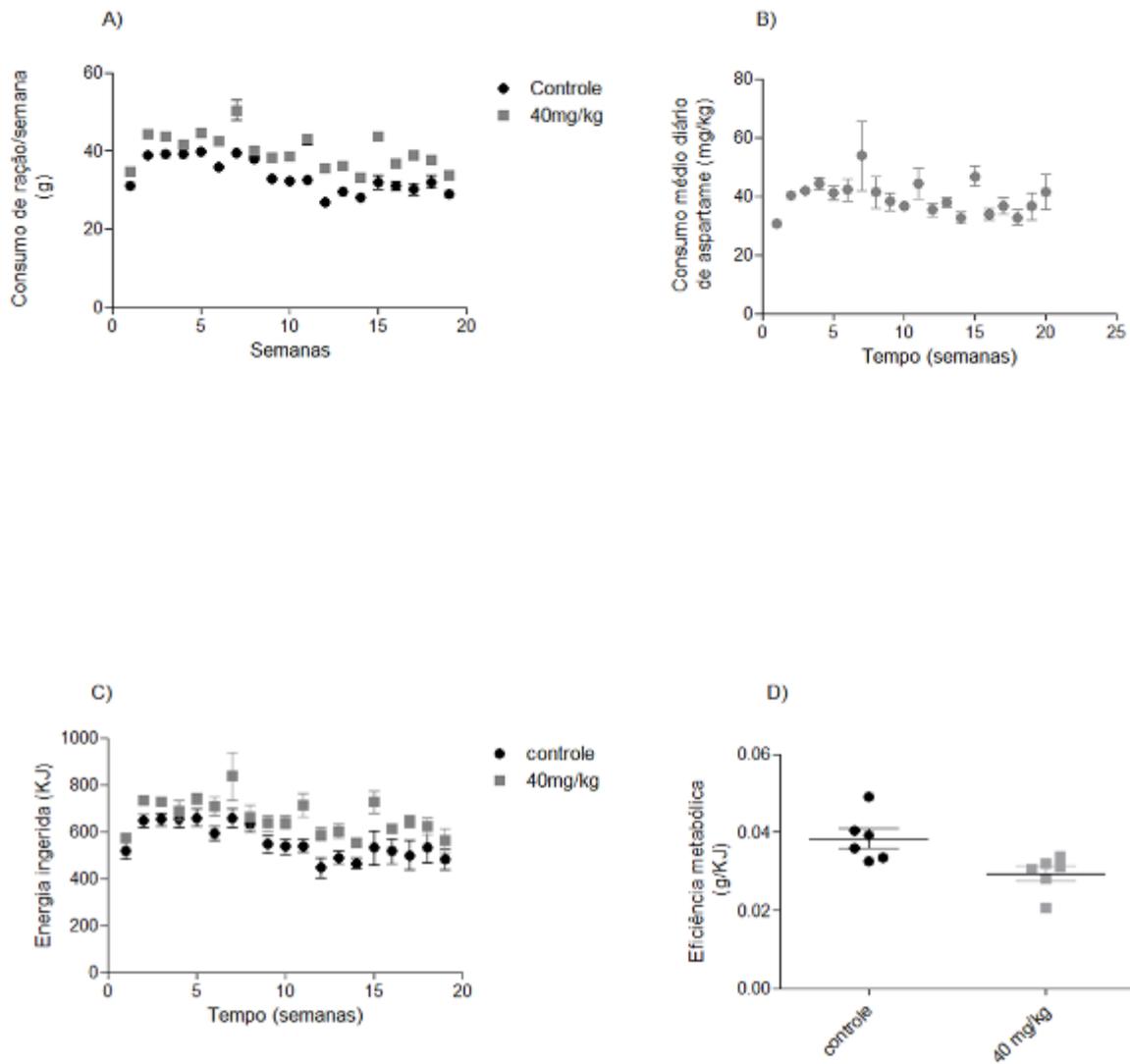


Figura 18: Efeito do consumo de aspartame por 140 dias sobre ingestão semanal de ração em camundongos a partir de 3 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Consumo semanal de ração por cada grupo de camundongos, (B) Consumo de aspartame, (C) Energia ingerida e (D) Eficiência metabólica. Grupo tratado vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

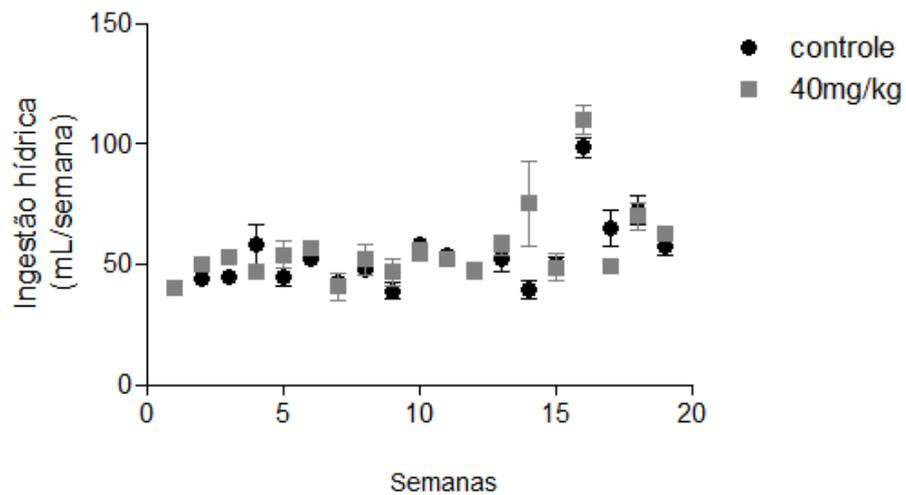


Figura 19: Efeito do consumo de aspartame por 140 dias sobre ingestão hídrica semanal em camundongos a partir de 3 semanas de idade (desmame). Resultados representados como média \pm EPM. Ingestão hídrica semanal ao longo do tempo de tratamento vs grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.1.4. Efeito do consumo de aspartame na glicemia de jejum dos camundongos submetidos ao tratamento com aspartame

Para os animais que receberam o tratamento por 30 dias, no grupo I, foi verificado que não houve diferença na glicemia de jejum dos animais que receberam aspartame quando comparados com o controle (Figura 20A). No grupo II, também não houve diferença da glicemia basal entre os animais que receberam aspartame ou o controle (Figura 20B). No tratamento crônico, foi observada diminuição na glicemia dos animais que receberam aspartame na dose de 40 mg/kg/dia por 140 dias (Grupo IV) ($83,80 \pm 3,42$ mg/dL) em relação ao grupo controle ($110,3 \pm 6,58$ mg/dL) (Figura 20D) e não houve diferença significativa entre os grupos que receberam tratamento por 70 dias (Figura 20C).

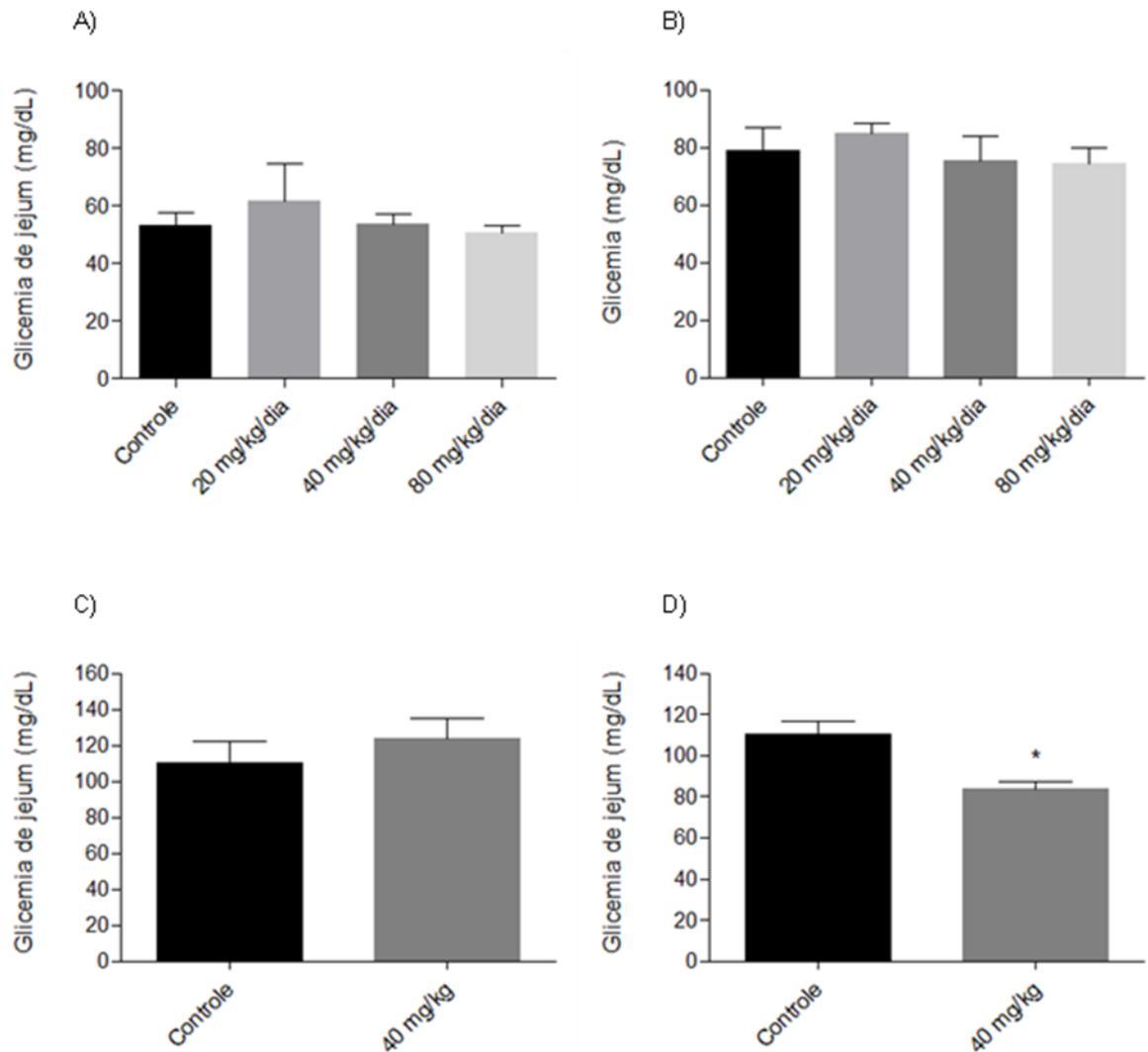


Figura 20: Efeito do aspartame sobre a glicemia de jejum dos animais controle e tratados com diferentes doses de aspartame, por diferentes períodos de tempo. (A) Camundongos fêmeas *Swiss* com 13 semanas de idade tratados por 30 dias com diferentes doses diárias de aspartame (GRUPO I), (B) Camundongos fêmeas *Swiss* com 22 semanas de idade tratados por 30 dias com diferentes doses diárias de aspartame (GRUPO II), (C) Camundongos fêmeas *Swiss* tratados a partir do desmame com ração suplementada com aspartame por 70 dias (GRUPO III) e (D) Camundongos fêmeas *Swiss* tratados a partir do desmame com ração suplementada com aspartame por 140 dias (GRUPO IV). * $p < 0,05$ vs. grupo controle (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls, para A e B, e teste t de Student não pareado para C e D).

4.1.5. Efeito do aspartame sobre a adiposidade

Ao final do tratamento com aspartame nas diferentes doses durante 30 dias, a massa do tecido adiposo branco visceral foi determinada após a eutanásia. Foi observada uma tendência de aumento da massa do tecido adiposo branco visceral

(TAB visceral) no grupo de animais de 13 semanas de idade que receberam aspartame em comparação ao grupo controle (Figura 21).

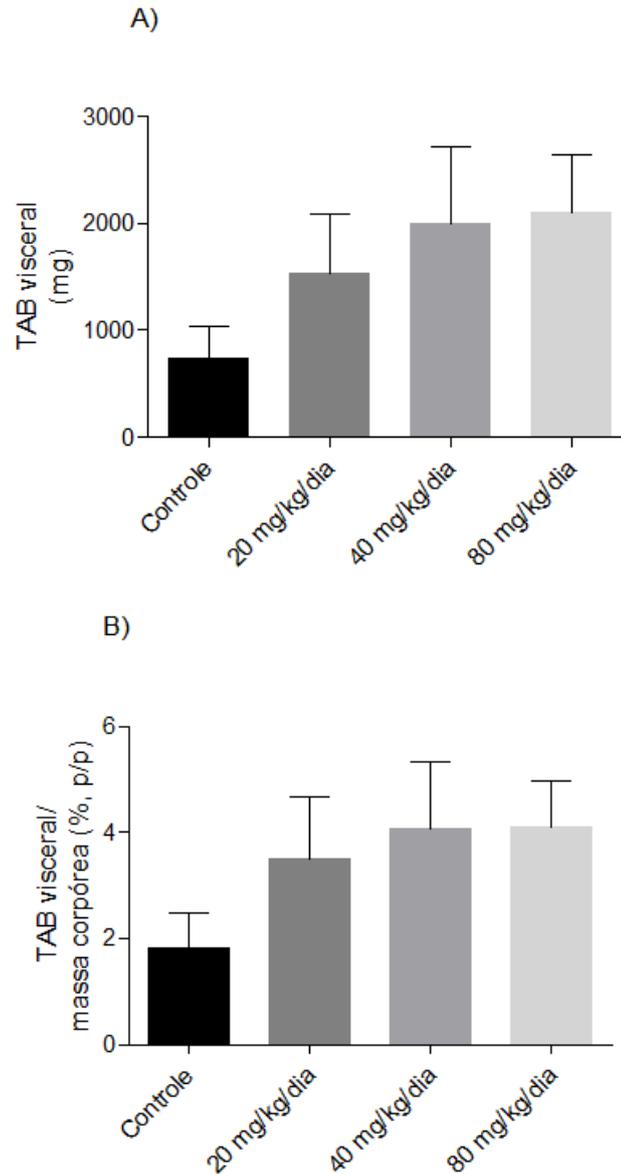


Figura 21: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 30 dias de tratamento com aspartame em animais com 13 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa absoluta e (B) Massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. Os dados foram analisados pelo teste de variância *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

No grupo II, dos animais com 22 semanas de idade que receberam o tratamento com aspartame nas diferentes doses durante 30 dias, a massa do TAB visceral não apresentou diferença entre os grupos (Figura 22).

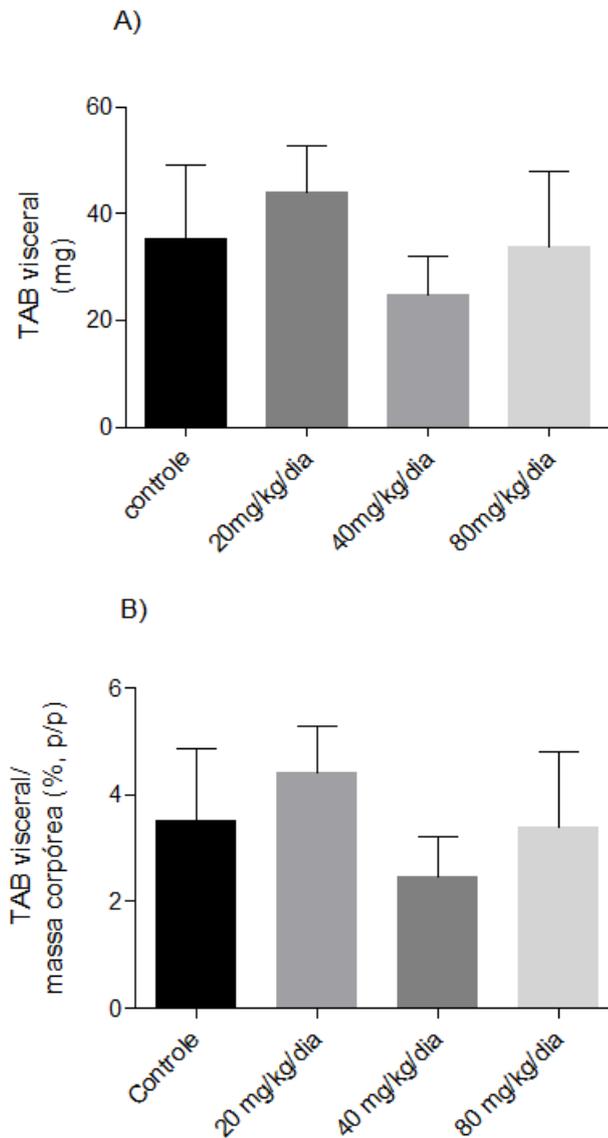


Figura 22: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 30 dias de tratamento com aspartame em animais a partir de 22 semanas de idade. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa absoluta e (B) Massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. Dados analisados pelo teste de variância *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

No grupo III, composto de animais com 3 semanas de vida que receberam o tratamento com aspartame por 70 dias, não foram observadas diferenças estatísticas entre as massas de TAB visceral dos animais que receberam aspartame ($2,82 \pm 0,35\%$) comparadas com as dos tecidos dos animais do grupo controle ($2,48 \pm 0,20\%$) (Figura 23).

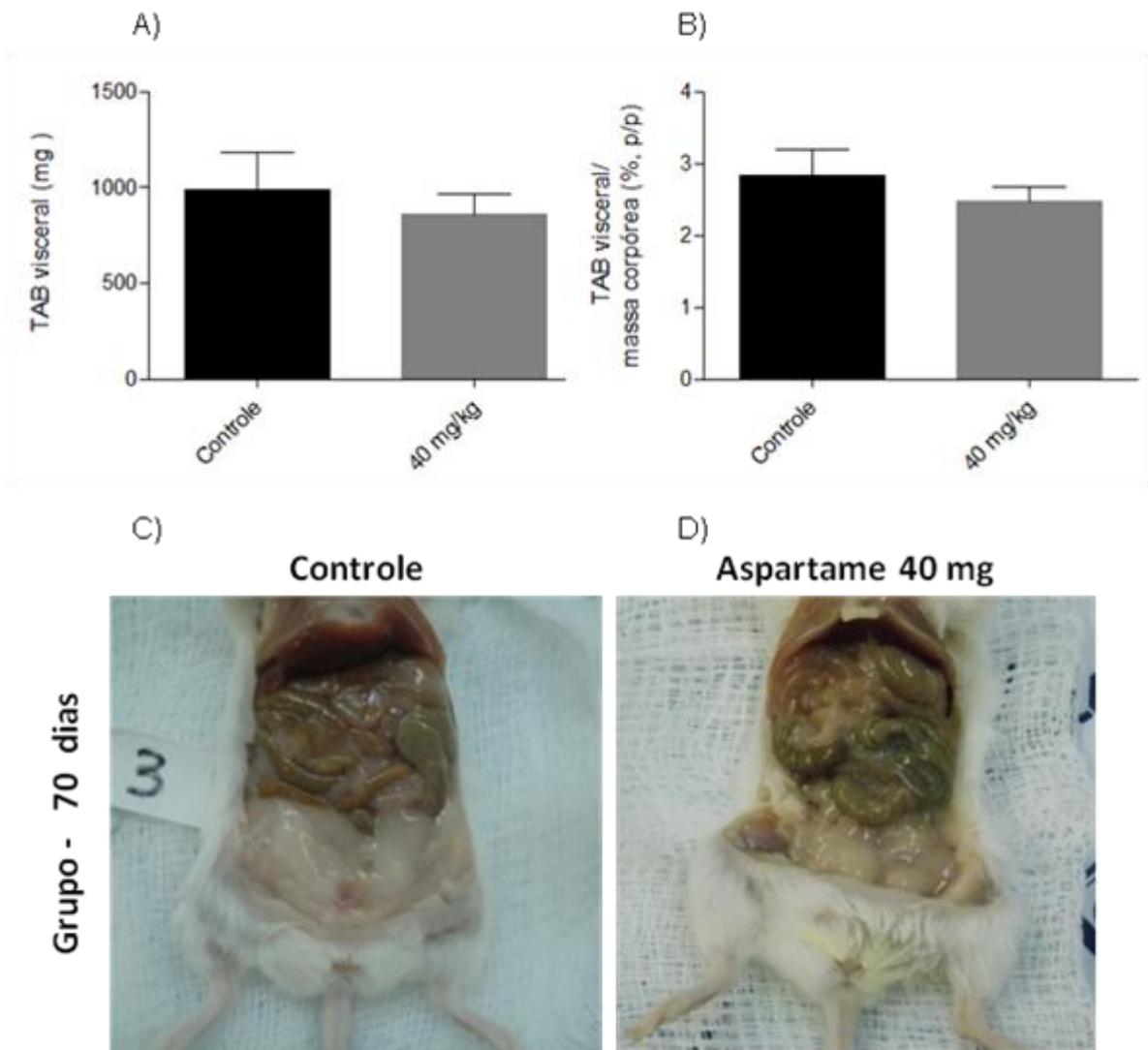


Figura 23: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 70 dias de tratamento com aspartame em animais a partir do desmame. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa absoluta e (B) Massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. (C) e (D) Fotografia ventral representativa do tecido adiposo branco visceral (TAB) de camundongos Swiss, fêmeas, tratados ou não. Dados analisados pelo teste t de Student não pareado.

Em relação à massa do tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal), não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 24).

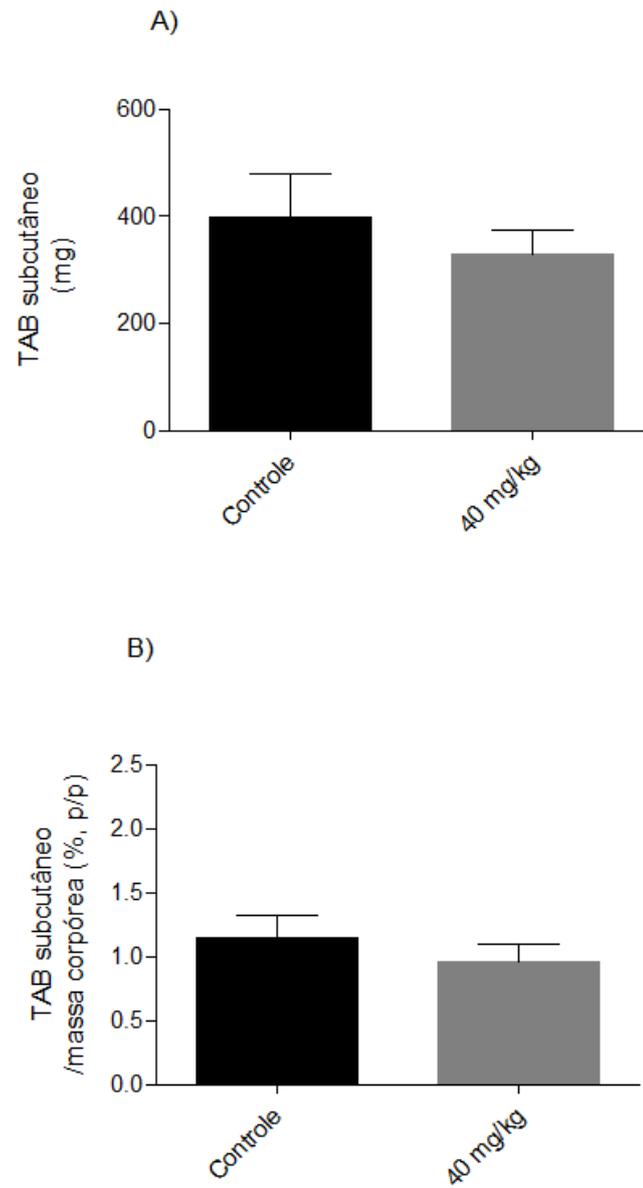


Figura 24: Massa do tecido adiposo branco subcutâneo coletado dos camundongos tratados com aspartame por 70 dias. (A) Massa absoluta e (B) Massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. Dados analisados pelo teste t de Student não pareado.

No grupo IV, composto de animais com 3 semanas de vida que receberam o tratamento com aspartame por 140 dias, foi observado que a massa do tecido adiposo branco visceral não teve diferença significativa entre os grupos (Figura 25).

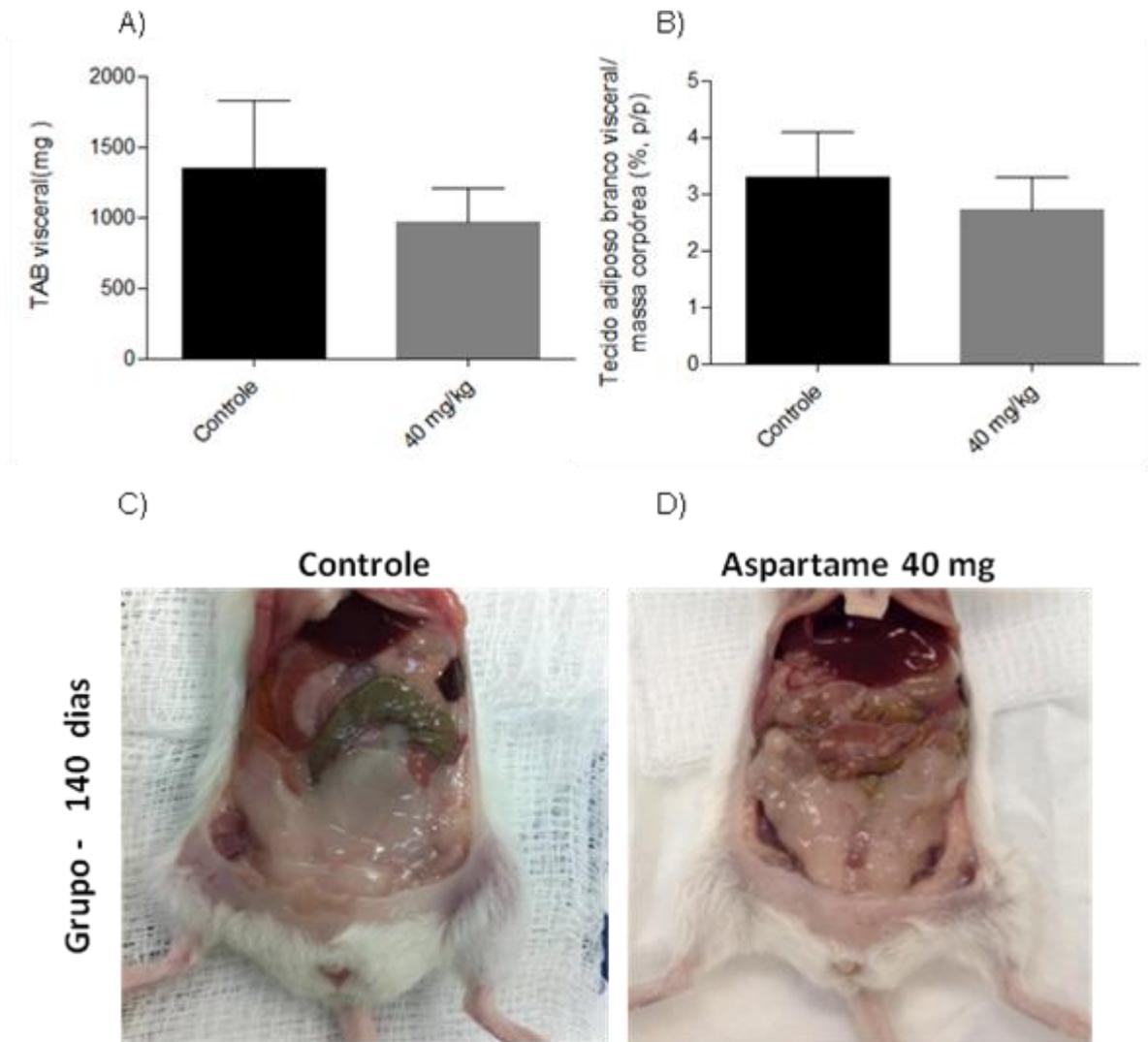


Figura 25: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo visceral (depósito periovariano) após 140 dias de tratamento com aspartame em animais a partir da idade de desmame. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa absoluta e (B) Massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. (C) e (D) Fotografia ventral representativa do tecido adiposo branco visceral (TAB) de camundongos Swiss, fêmeas, tratados ou não. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado.

Em relação à massa do tecido adiposo branco subcutâneo (TAB subcutâneo), foi observada uma diminuição significativa entre o grupo que recebeu aspartame ($1,00 \pm 0,11\%$) e o controle ($1,52 \pm 0,32\%$) (Figura 26).

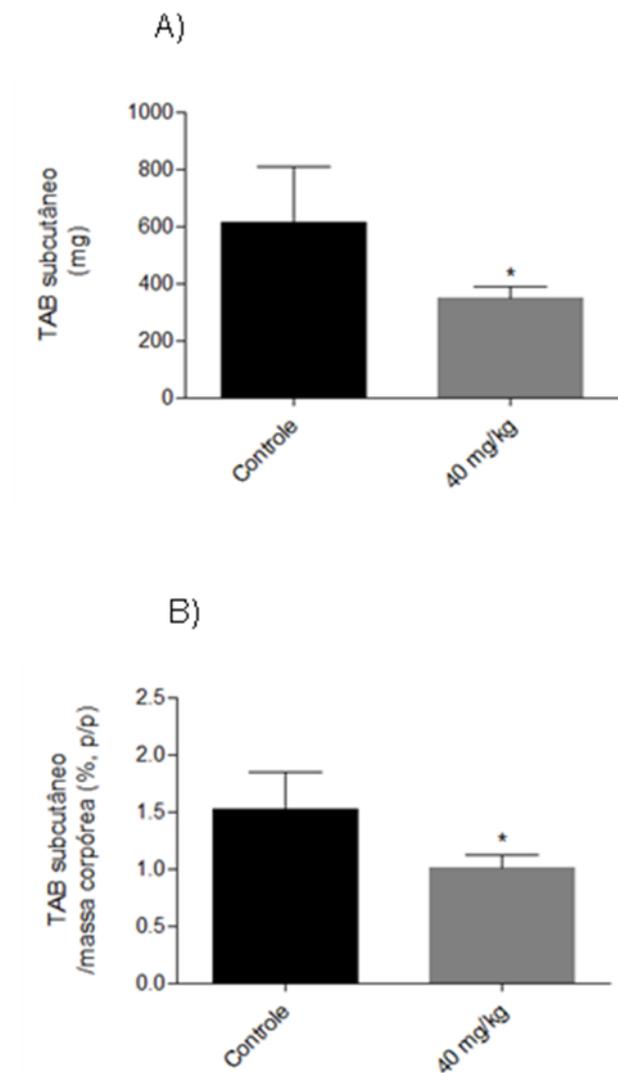


Figura 26: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo branco subcutâneo (depósito inguinal) após 140 dias de tratamento com aspartame em animais a partir da idade de desmame. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa absoluta e (B) Massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (análise pelo teste t de Student não pareado).

4.1.6. Efeito do aspartame sobre as características histológicas do fígado dos camundongos

Após a eutanásia dos animais, os fígados foram coletados para serem analisados histologicamente. Os tecidos hepáticos não apresentaram diferenças morfológicas entre os grupos (Figuras de 27 a 29).

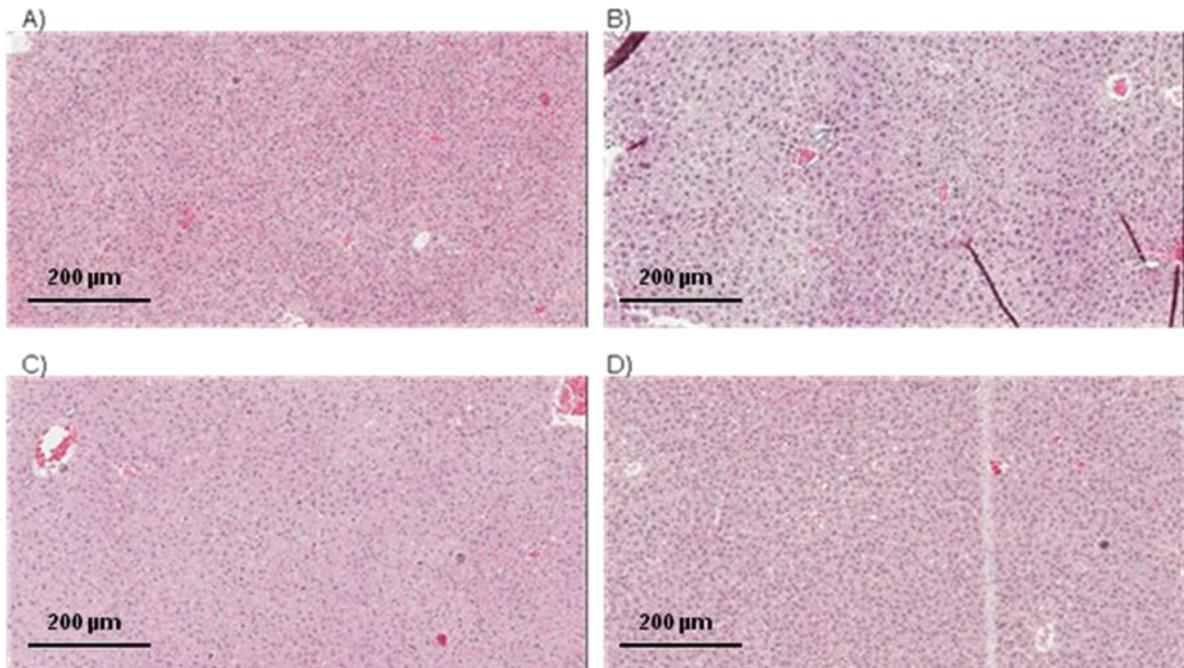


Figura 27: Efeito do aspartame sobre características morfológicas do fígado após 30 dias de tratamento nos camundongos de 13 semanas de idade que não receberam tratamento (A) ou receberam tratamento com aspartame nas doses de 20 mg/kg/dia (B), 40 mg/kg/dia (C) e 80 mg/kg/dia (D). Imagens representativas de um animal por grupo, coradas com hematoxilina e eosina, objetiva de 20x com aumento de 10 vezes e escala de 200 µm.

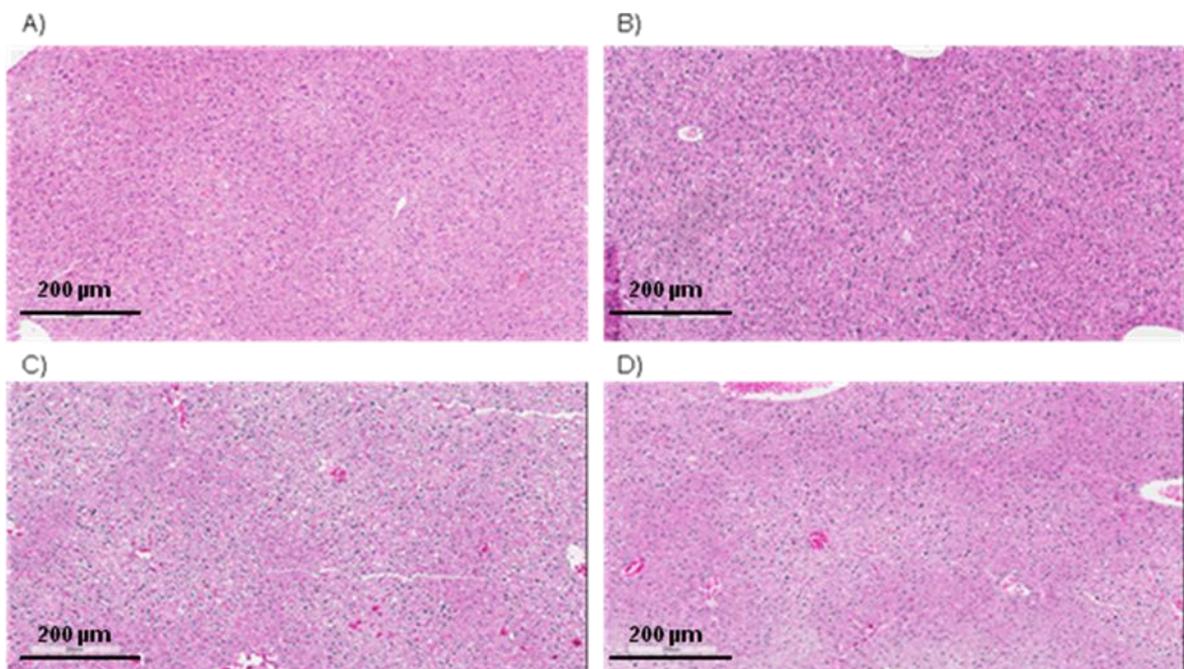


Figura 28: Efeito do aspartame sobre características morfológicas do fígado após 30 dias de tratamento nos camundongos de 22 semanas de idade que não receberam tratamento (A) ou receberam aspartame nas doses de 20 mg/kg/dia (B), 40 mg/kg/dia (C) e 80 mg/kg/dia (D). Imagens representativas de um animal por grupo, coradas com hematoxilina e eosina, objetiva de 20x com aumento de 10 vezes e escala de 200 µm.

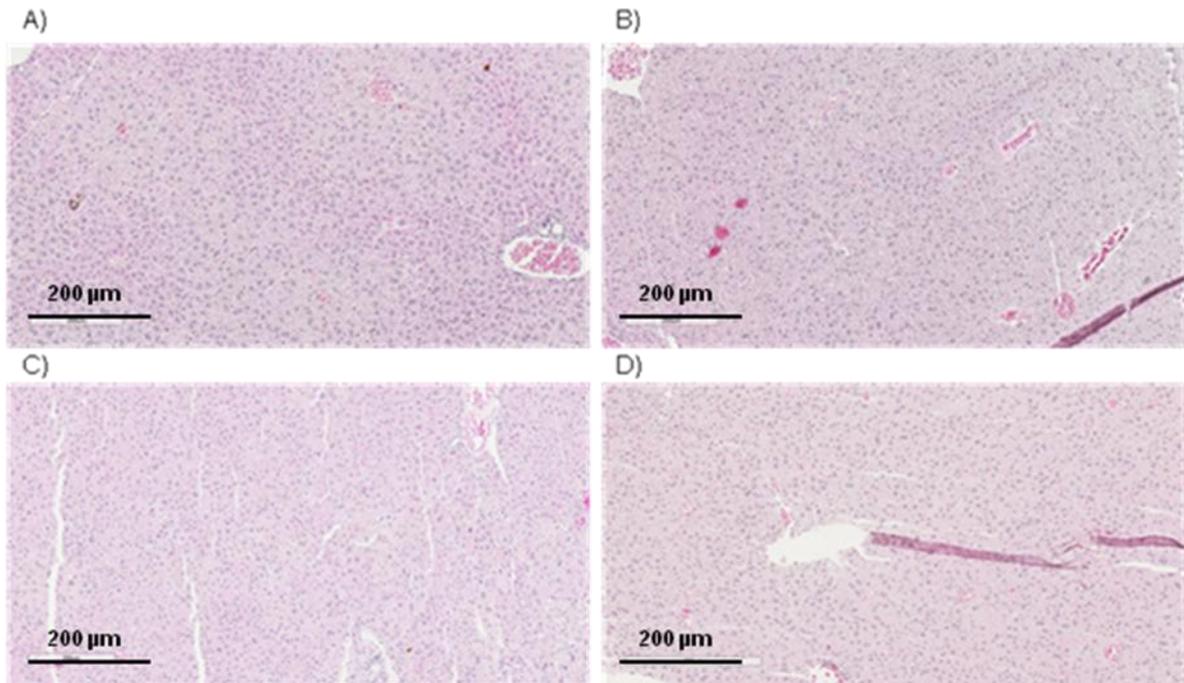


Figura 29: Efeito do aspartame sobre características morfológicas do fígado de camundongos após 70 dias de tratamento, controle (A) ou com aspartame na dose de 40 mg/kg/dia (B); e nos camundongos após 140 dias de tratamento, controle (C) ou com aspartame na dose de 40 mg/kg/dia (D). Imagens representativas de um animal por grupo, coradas com hematoxilina e eosina, objetiva de 20x com aumento de 10 vezes e escala de 200 µm.

4.1.7. Avaliação da variação da massa do tecido adiposo marrom dos camundongos tratados com aspartame

Não foi observada alteração na massa do tecido adiposo marrom interescapular entre os grupos que receberam aspartame e o grupo controle (Figura 30). Nos grupos que receberam tratamento por 30 dias (Grupos I e II), foi observado que os animais que tinham 13 semanas de vida apresentaram uma tendência de aumento da massa do tecido adiposo marrom após tratamento com aspartame nas doses 20 ($0,37 \pm 0,03\%$), 40 ($0,49 \pm 0,08\%$) e 80 mg/kg/dia ($0,47 \pm 0,04\%$) quando comparados com o grupo controle ($0,33 \pm 0,05\%$) (Figura 30A).

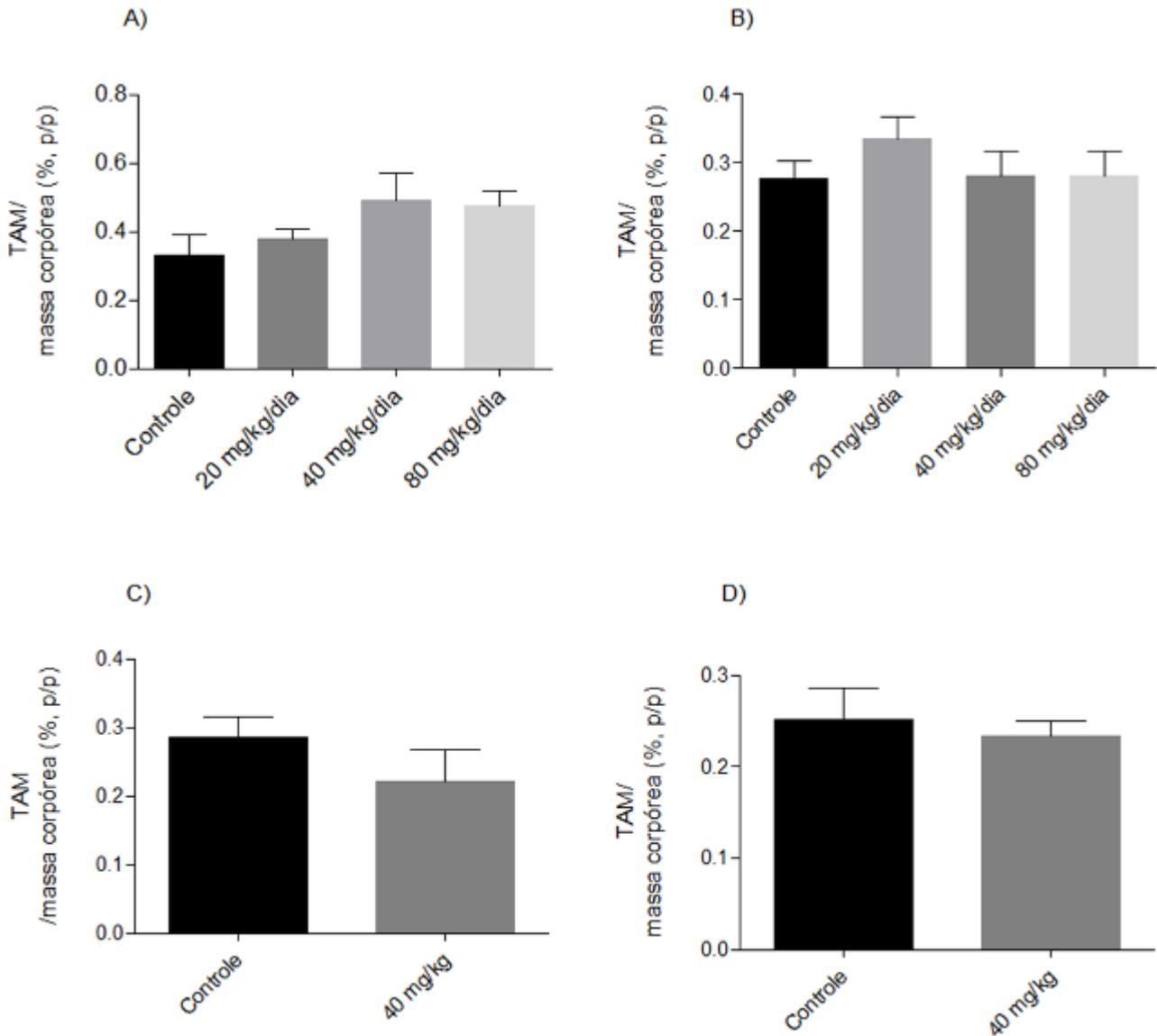


Figura 30: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa do tecido adiposo marrom (depósito interescapular). (A) Camundongos de 13 semanas de idade tratados com aspartame por 30 dias, (B) camundongos de 22 semanas de idade tratados com aspartame por 30 dias, (C) Camundongos de 3 semanas de idade tratados com aspartame por 70 dias e (D) Camundongos de 3 semanas de idade tratados com aspartame por 140 dias. Resultados representados como média \pm EPM da massa em porcentagem relativa ao peso inicial do animal. Dados analisados pelo teste variância *two-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls (A e B) ou análise pelo teste t de Student não pareado (C e D).

4.1.8. Avaliação da variação da massa dos rins e do coração dos camundongos tratados com aspartame

No grupo I, não houve diferença na massa do coração dos animais que foram tratados com aspartame em relação ao grupo controle, porém foi observada

uma diminuição na massa dos rins dos animais que receberam aspartame nas concentrações de 40 mg/kg/dia ($1,01 \pm 0,06\%$) e 80 mg/kg/dia ($1,04 \pm 0,03\%$) comparados com o controle ($1,19 \pm 0,02\%$) (Figura 31A e B).

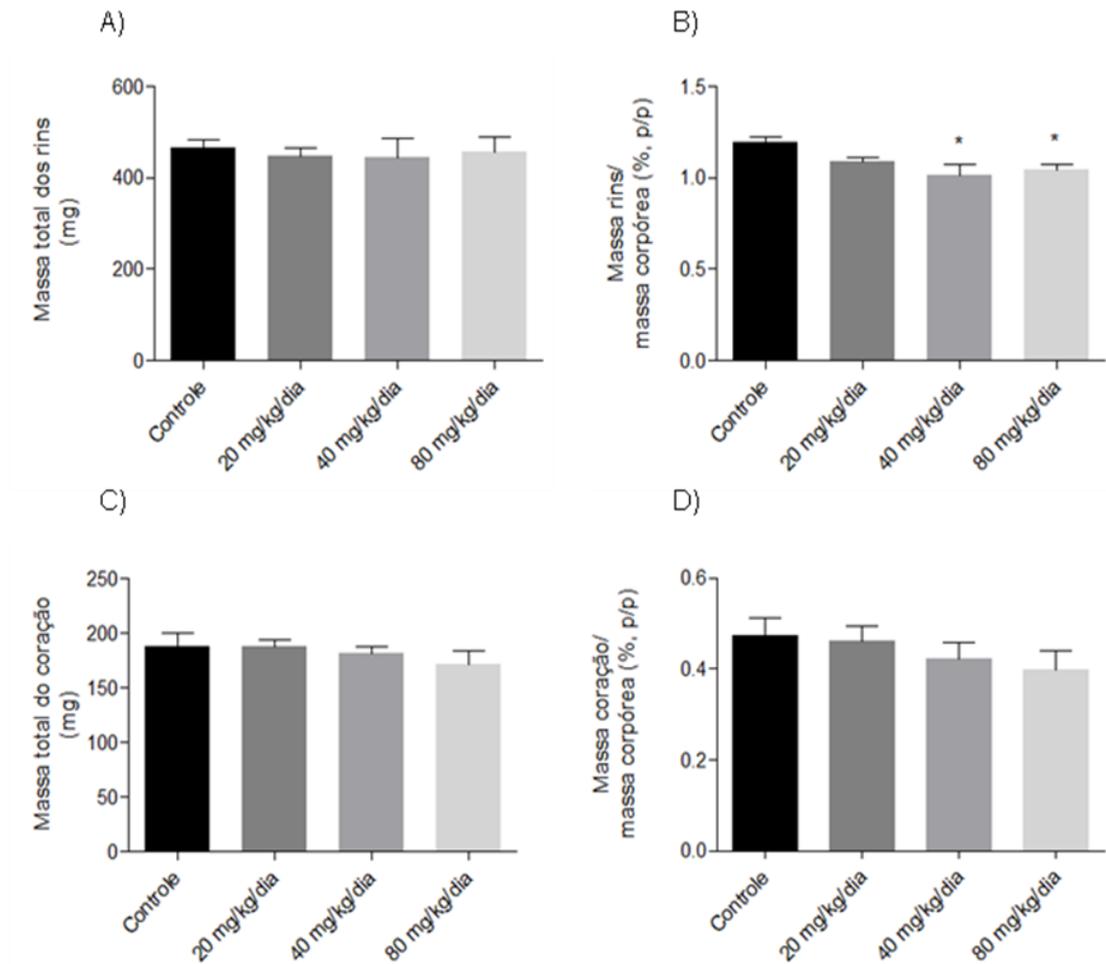


Figura 31: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos a partir de 13 semanas de idade, tratados por 30 dias com diferentes doses de aspartame. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa dos rins, (B) Massa dos rins em relação ao peso do animal, (C) Massa do coração e (D) Massa do coração em relação ao peso do animal. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

No grupo II, foi observada uma tendência de aumento da massa do coração dos animais que receberam aspartame comparados ao controle. Nas massas dos rins, foi observado aumento significativo nos grupos que receberam aspartame nas concentrações de 20 ($0,96 \pm 0,07\%$) e 80 mg/kg/dia ($1,08 \pm 0,06\%$) quando comparados ao controle ($0,66 \pm 0,04\%$) (Figura 32).

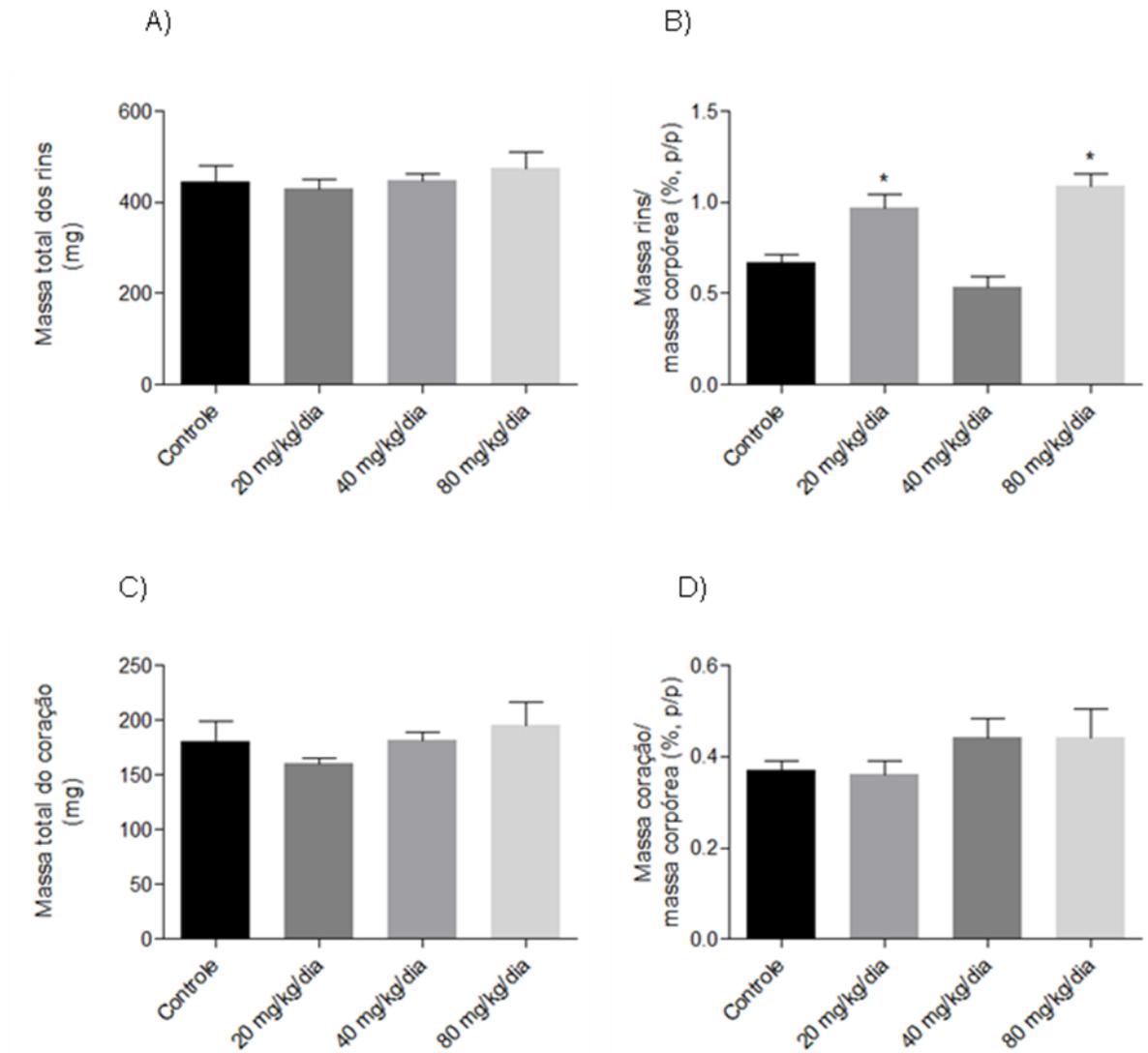


Figura 32: Efeito do consumo de aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos tratados por 30 dias, a partir de 22 semanas de idade, com diferentes doses de aspartame. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa dos rins, (B) Massa dos rins em relação ao peso do animal, (C) Massa do coração e (D) Massa do coração em relação ao peso do animal. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (análise de variância *two-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

No grupo III, a massa dos rins não foi diferente entre os grupos que ingeriram aspartame e o controle. Na massa do coração, foi observada uma diminuição significativa no grupo que recebeu tratamento com aspartame ($0,366 \pm 0,07\%$) comparado ao controle ($0,447 \pm 0,02\%$) (Figura 33D).

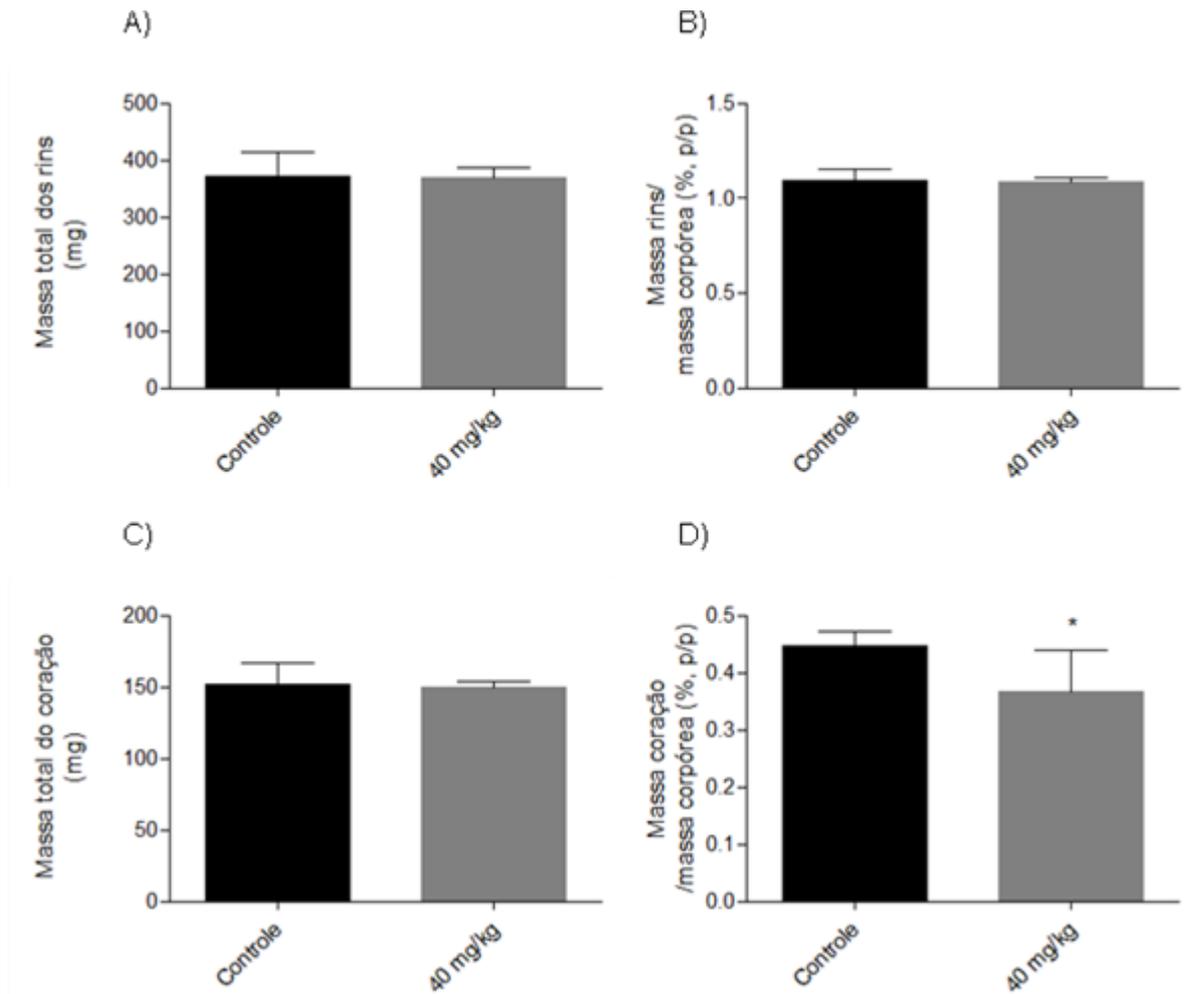


Figura 33: Efeito do aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos tratados por 70 dias com aspartame. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa dos rins, (B) Massa dos rins em relação ao peso do animal, (C) Massa do coração e (D) Massa do coração em relação ao peso do animal. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (teste t de Student não pareado).

No grupo IV, as massas dos rins apresentaram diferenças entre o grupo tratado com aspartame e o grupo controle. Na massa do coração, foi observada uma diminuição significativa no grupo que recebeu tratamento com aspartame (Figura 34).

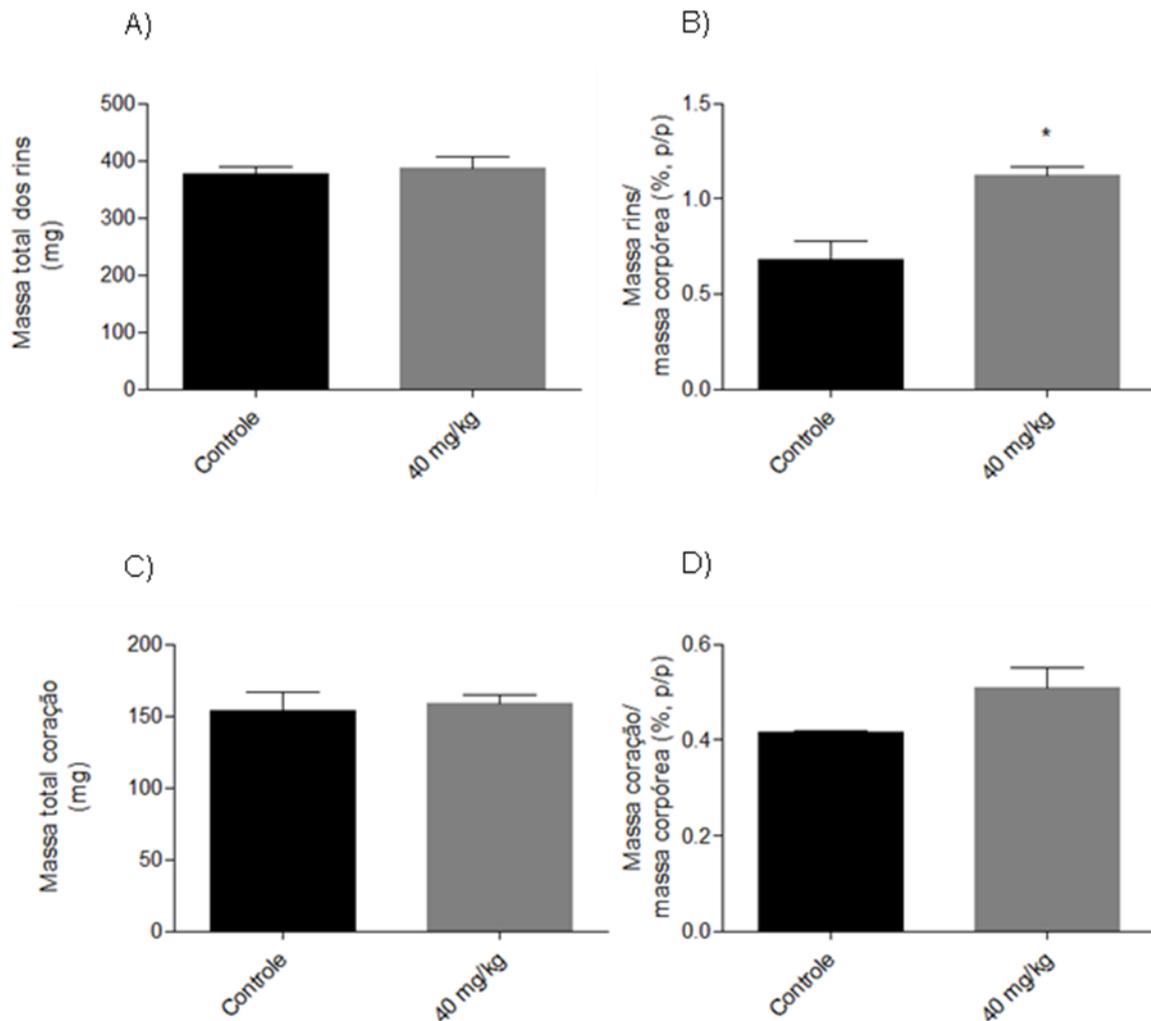


Figura 34: Efeito do aspartame sobre a massa dos órgãos coletados de camundongos tratados a partir do desmame por 140 dias. Resultados representados como média \pm EPM. (A) Massa dos rins, (B) Massa dos rins em relação ao peso do animal, (C) Massa do coração e (D) Massa do coração em relação ao peso do animal. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (teste t de Student não pareado).

4.1.9. Avaliação das variáveis bioquímicas dos camundongos tratados com aspartame

No grupo I, não foi observada nenhuma alteração da concentração sérica de triglicerídeos e lipoproteína de alta e baixa densidade (HDL e LDL) entre os grupos estudados (Tabela 1). As concentrações séricas da transaminase aspartato aminotransferase (AST) e da transaminase alanina aminotransferase (ALT) não foram diferentes entre os grupos, em resposta aos tratamentos.

Tabela 1: Efeito do aspartame nos parâmetros bioquímicos dos camundongos com 13 semanas tratados por 30 dias

	Grupos experimentais			
	Controle	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
AST (U/L)	120,25 ± 70,88	150,33 ± 74,44	140,50 ± 19,00	289,33 ± 95,11
ALT (U/L)	17,75 ± 5,63	16,67 ± 10,89	15,50 ± 4,50	50,67 ± 24,22
AST/ALT (U/L)	6,38 ± 1,78	10,08 ± 1,42	9,91 ± 2,30	6,07 ± 0,78
Colesterol total (mg/dL)	97,00 ± 20,50	59,67 ± 29,56	102,50 ± 13,50	105,00 ± 11,33
Triglicerídeos (mg/dL)	136,50 ± 36,50	110,33 ± 45,56	165,75 ± 30,63	89,33 ± 15,11
HDL (mg/dL)	67,00 ± 9,00	58,00 ± 19,33	68,75 ± 5,25	44,00 ± 24,67
LDL (mg/dL)	11,60 ± 7,20	6,60 ± 4,00	11,90 ± 6,50	43,13 ± 30,98

AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina aminotransferase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. Valores representam a média ± desvio padrão.

No grupo II, não foi observada diferença significativa nem no perfil lipídico nem nos níveis das enzimas hepáticas dos animais tratados com diferentes concentrações de aspartame em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito do aspartame nos parâmetros bioquímicos dos camundongos com 22 semanas tratados por 30 dias

	Grupos experimentais			
	Controle	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg
AST (U/L)	120,30 ± 29,11	129,50 ± 30,5	94,20 ± 16,24	116,60 ± 16,24
ALT (U/L)	17,67 ± 3,11	18,67 ± 5,00	16,00 ± 3,60	11,60 ± 3,52
AST/ALT (U/L)	7,58 ± 3,36	7,74 ± 3,02	6,35 ± 1,56	9,97 ± 5,48
Colesterol total (mg/dL)	93,33 ± 12,89	96,83 ± 3,17	93,40 ± 12,72	103,80 ± 13,44
Triglicerídeos (mg/dL)	181,33 ± 21,77	151,00 ± 36,00	151,25 ± 29,62	112,80 ± 14,24
HDL (mg/dL)	62,00 ± 9,33	61,83 ± 2,89	61,00 ± 12,00	69,00 ± 9,20

AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina aminotransferase; HDL: lipoproteína de alta densidade. Valores representam a média ± desvio padrão.

Para os grupos III e IV, foi observada diminuição das concentrações séricas da LDL nos camundongos que receberam ração suplementada com aspartame na concentração de 40 mg/kg/dia por 140 dias (Grupo IV) quando comparados com o grupo controle. Nos demais parâmetros do perfil lipídico e nas enzimas hepáticas, não foram observadas alterações entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do aspartame nos parâmetros bioquímicos dos camundongos tratados por 70 dias ou 140 dias a partir de 3 semanas de idade (desmame)

	Grupos experimentais			
	70 dias		140 dias	
	Controle	Aspartame	Controle	Aspartame
AST (U/L)	177,20 ± 57,04	147,83 ± 42,50	191,17 ± 58,80	141,75 ± 37,62
ALT (U/L)	18,75 ± 5,57	19,67 ± 1,38	14,80 ± 4,16	12,75 ± 2,75
AST/ALT (U/L)	10,35 ± 1,91	8,02 ± 2,67	14,96 ± 4,54	11,45 ± 2,78
Colesterol total (mg/dL)	96,20 ± 17,28	96,25 ± 7,88	93,40 ± 10,72	74,00 ± 11,00
Triglicerídeos (mg/dL)	143,25 ± 53,75	185,60 ± 32,08	109,60 ± 32,48	96,50 ± 22,25
HDL (mg/dL)	42,80 ± 4,72	40,83 ± 2,94	41,00 ± 2,80	36,00 ± 3,50
LDL (mg/dL)	28,60 ± 12,08	21,80 ± 8,16	30,40 ± 3,52	18,67 ± 5,56 (*)

AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina aminotransferase; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade. Valores representam a média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs. grupo controle.

4.1.10. Avaliação da elasticidade da pele dos camundongos tratados com aspartame

A elasticidade da pele dos camundongos de 13 semanas tratados por 30 dias foi avaliada tendo como parâmetro a resistência da pele quando submetida à tração. Foi observada uma tendência de diminuição na resistência da pele à tração entre o grupo tratado somente com água (controle) (2,37 ± 0,98 N) e os grupos tratados com aspartame nas doses de 20 (1,59 ± 0,54 N); 40 (1,00 ± 0,11 N) e 80 mg/kg/dia (0,87

$\pm 0,04$ N), resultados apresentados na Figura 35, porém não houve diferença significativa observada nos tratamentos estatísticos.

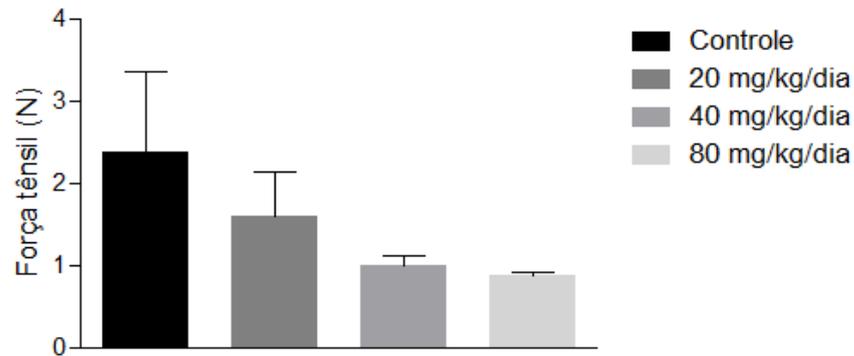


Figura 35: Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele de camundongos a partir de 13 semanas de idade tratados por 30 dias. Resultados representados como média \pm EPM. (teste de variância *one-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni).

No grupo II, não foram observadas alterações na resistência da pele à tração entre o grupo tratado somente com água (controle) e os grupos tratados com aspartame (Figura 36).

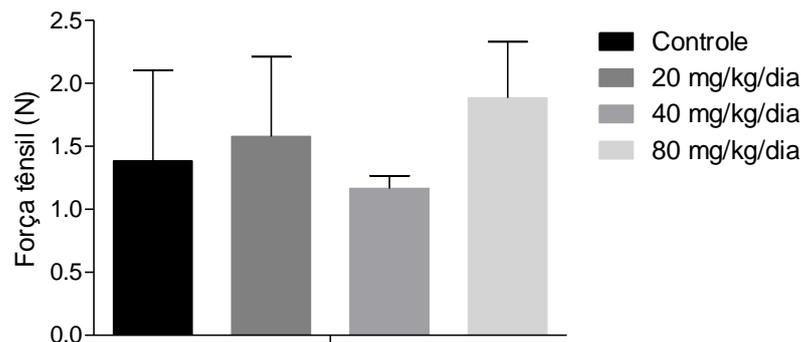


Figura 36: Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele de camundongos a partir de 22 semanas de idade tratados por 30 dias. Resultados representados como média \pm EPM. (teste de variância *one-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni).

No grupo III, foi observada uma tendência de diminuição na resistência da pele à tração entre o grupo tratado somente com água (controle) ($0,93 \pm 0,13$ N) e o grupo tratado com aspartame 40 mg/kg/dia ($0,78 \pm 0,15$ N) (Figura 37).

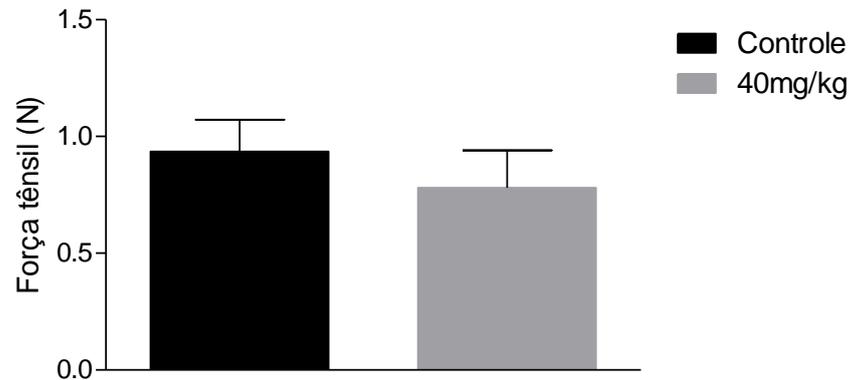


Figura 37: Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele de camundongos tratados por 70 dias a partir da idade de desmame. Resultados representados como média \pm EPM. (teste de t de Student não pareado).

Assim como no grupo que foi tratado por 70 dias com aspartame (Grupo III), os animais que receberam a ração suplementada com aspartame por 140 dias (Grupo IV) apresentaram uma tendência de diminuição na resistência da pele à tração entre o grupo tratado somente com água (controle) e os grupos tratados com aspartame (Figura 38).

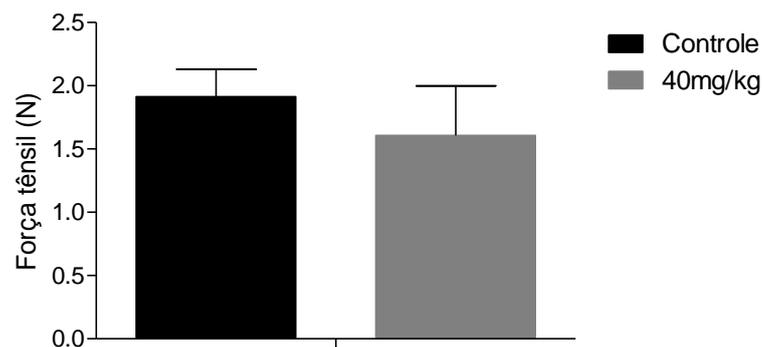


Figura 38: Efeito do aspartame sobre a resistência mecânica à tração da pele de camundongos tratados por 140 dias a partir da idade de desmame. Resultados representados como média \pm EPM. (teste t de Student não pareado).

4.1.11. Avaliação histológica da pele dos camundongos tratados com aspartame

No grupo I, houve uma tendência de diminuição nas espessuras da epiderme dos animais do grupo tratado por 30 dias com aspartame nas concentrações de 20

($10,92 \pm 0,14 \mu\text{m}$) e 40 mg/kg/dia ($11,02 \pm 1,28 \mu\text{m}$) quando comparados ao grupo controle ($13,62 \pm 0,71 \mu\text{m}$) (Figura 39).

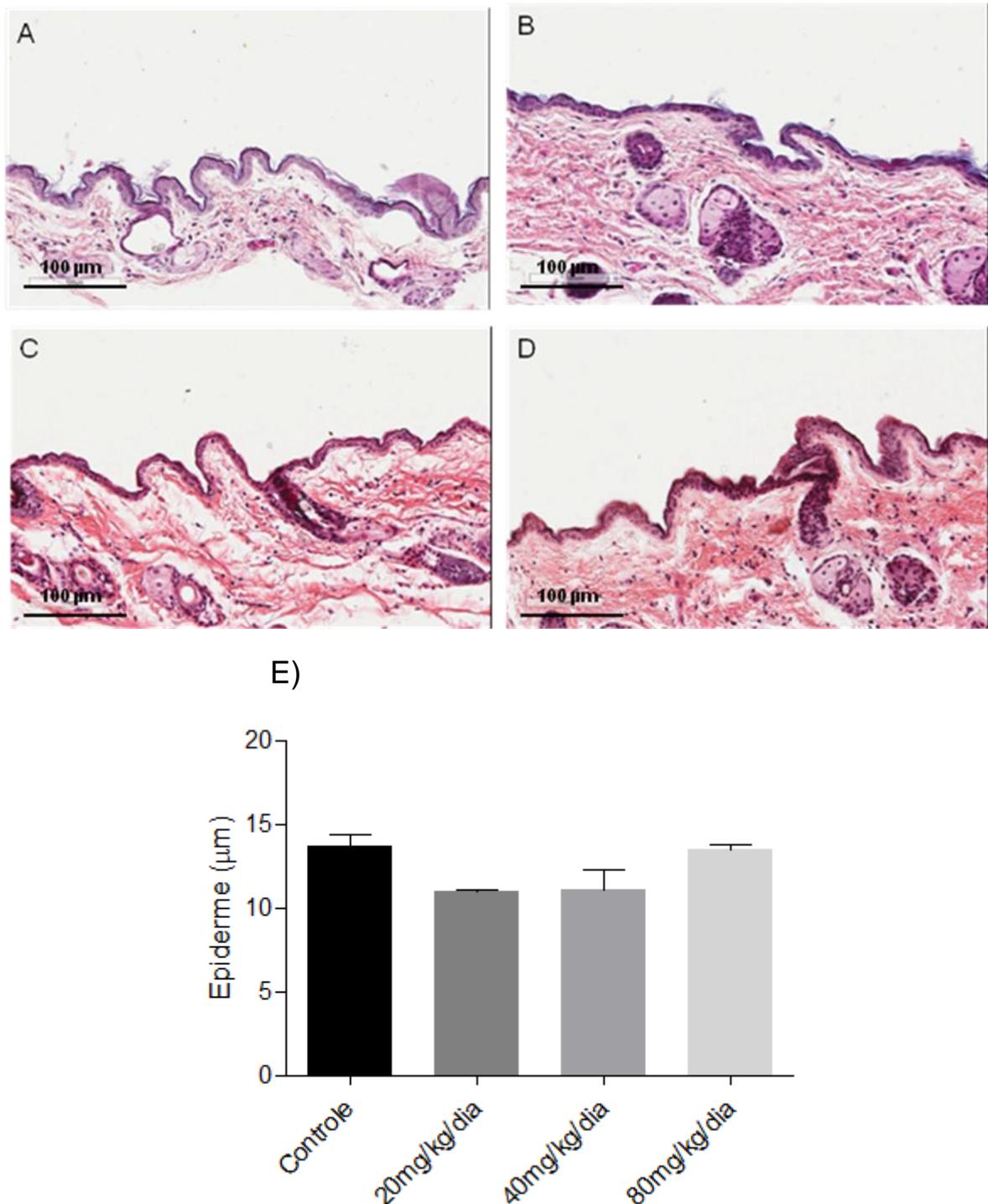


Figura 39: Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Hematoxilina-Eosina para verificação da espessura da epiderme dos camundongos de 13 semanas do grupo controle (A) e dos grupos tratados por 30 dias com aspartame nas concentrações de 20 mg/kg/dia (B); 40 mg/kg/dia (C); e 80 mg/kg/dia (D). Espessuras das peles analisadas (E). Escala: 100 μm; objetiva de 20x com aumento de 20x. Resultados representados como média ± EPM (teste de variância *one-way* ANOVA, seguido de pós-teste Newman-Keuls).

No Grupo II, a espessura da epiderme do grupo de animais que receberam 80 mg/kg/dia ($17,57 \pm 6,61 \mu\text{m}$) de aspartame tendeu a aumentar quando comparado ao grupo controle ($14,32 \pm 1,05 \mu\text{m}$) (Figura 40).

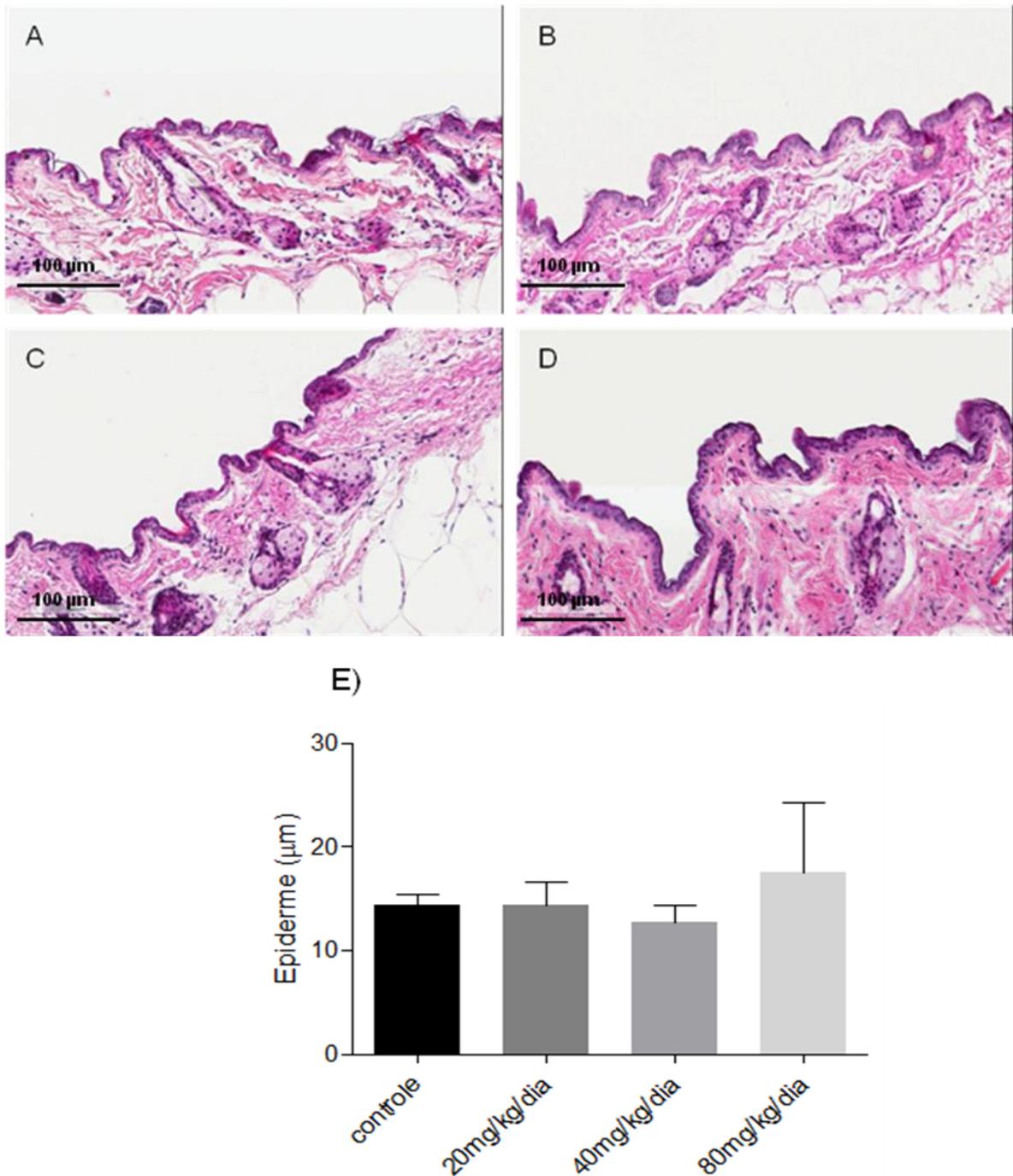


Figura 40: Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Hematoxilina-Eosina para verificação da espessura da epiderme dos camundongos de 22 semanas do grupo controle (A) e dos grupos tratados por 30 dias com aspartame nas concentrações de 20 mg/kg/dia (B); 40 mg/kg/dia (C); e 80 mg/kg/dia (D). Espessuras das peles analisadas (E). Escala: 100 μm; objetiva de 20x com aumento de 20x. Resultados representados como média ± EPM (teste de variância *one-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls).

Nos animais que foram tratados por 70 dias (Grupo III) com aspartame, houve uma tendência de aumento na espessura da epiderme ($14,98 \pm 2,26 \mu\text{m}$) comparado ao grupo controle ($12,33 \pm 0,47 \mu\text{m}$) (Figura 41A, B e E). Já no grupo que recebeu aspartame por 140 dias (Grupo IV), foi observada uma diminuição significativa da espessura da epiderme da pele dos animais que receberam tratamento ($10,34 \pm 0,54 \mu\text{m}$) quando comparado ao controle ($14,87 \pm 0,70 \mu\text{m}$) (Figura 41C, D e E).

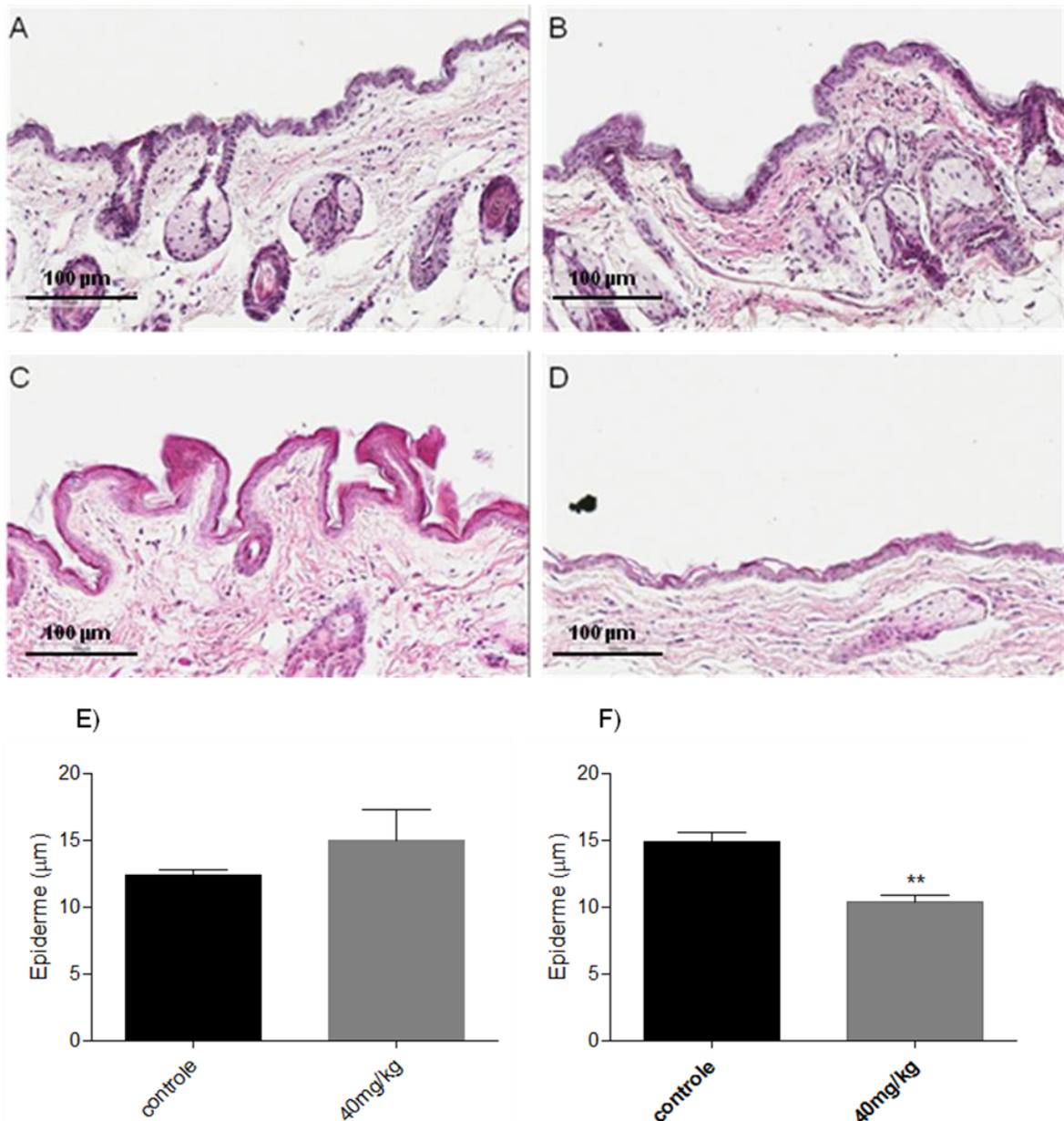


Figura 41: Fotomicrografia dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Hematoxilina-Eosina para verificação da espessura da epiderme dos camundongos do grupo controle (A) e tratados por 70 dias com aspartame (B); e do grupo controle (C) e tratados por 140 dias com aspartame (D). Média da espessura da pele entre os grupos tratados por 70 dias (E) e 140 dias (F). Escala: 100 μm; objetiva de 20x com aumento de 20x. Resultados representados como média ± EPM. ** p = 0,0096 vs. grupo controle (teste t de Student não pareado).

Para avaliação das fibras colágenas na pele dos camundongos que receberam ou não tratamento com aspartame, as amostras de pele foram coradas pelo método do Tricrômio de Masson e analisadas por intensidade de cor. A quantificação das fibras foi representada em porcentagem (Figuras de 42 a 45). As fotomicrografias mostram a distribuição das fibras, coradas em azul, ao longo da derme. A Figura 42 representa os resultados das fêmeas de 13 semanas de idade que foram tratadas por 30 dias (Grupo I). Foi possível observar que houve uma tendência de diminuição na quantidade de fibras colágenas das peles dos animais que receberam aspartame nas concentrações de 20 ($37,36 \pm 4,18\%$), 40 ($38,68 \pm 8,75\%$) e 80 mg/kg/dia ($30,12 \pm 3,87\%$) quando comparados aos animais do grupo controle ($46,51 \pm 1,73\%$) (Figura 42E).

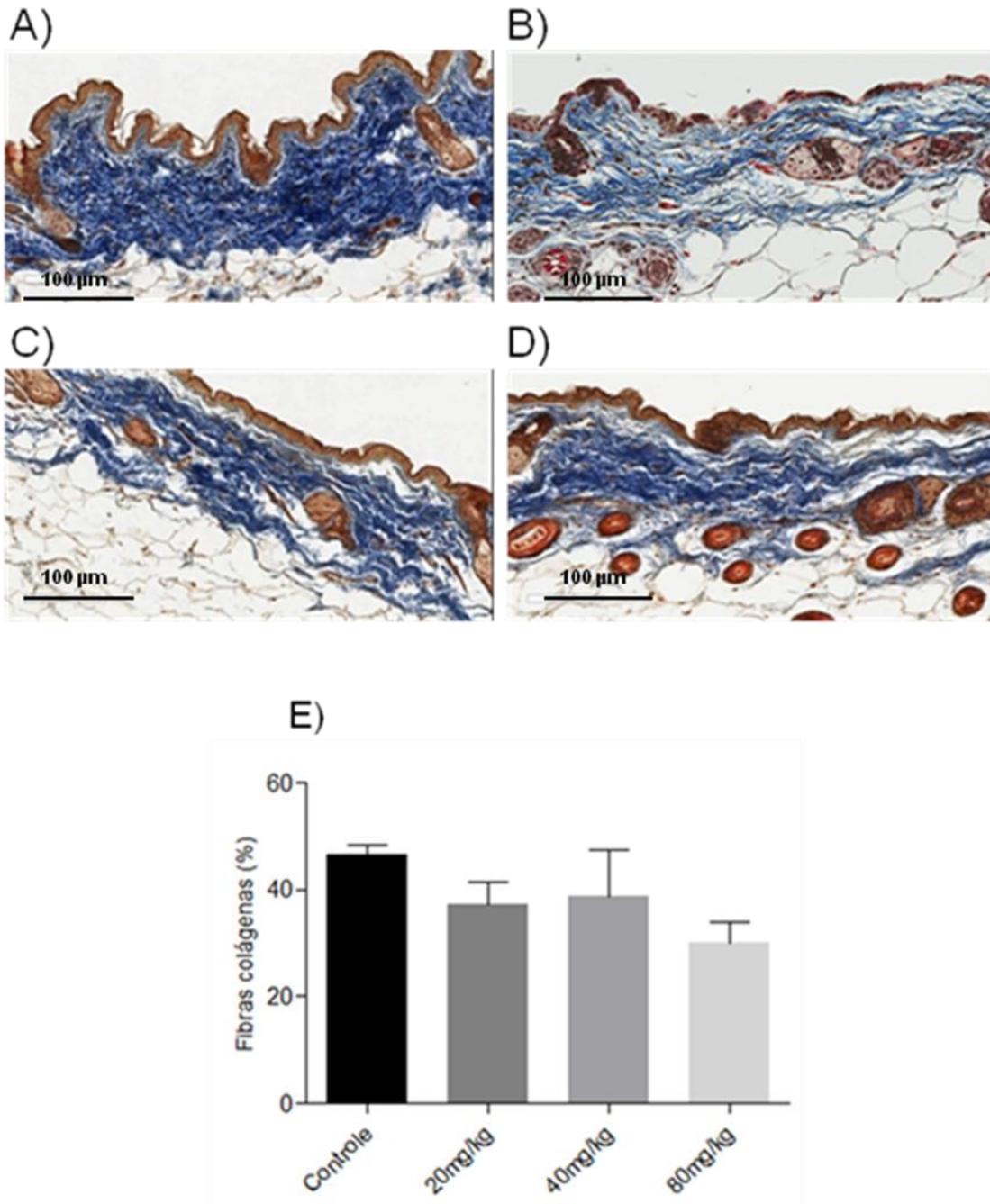


Figura 42: Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos de 13 semanas do grupo controle (A) e tratados por 30 dias com aspartame nas concentrações de 20 mg/kg/dia (B); 40 mg/kg/dia (C); e 80 mg/kg/dia (D). Escala: 100 µm; objetiva de 20x com aumento de 20x. (E) Média da porcentagem de fibras colágenas. O teste estatístico aplicado para tratamento dos dados foi o teste de variância *one-way* ANOVA, seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

Para o Grupo II, a avaliação das fibras colágenas dos camundongos de 22 semanas de vida que receberam ou não aspartame por 30 dias mostrou que, à exceção do grupo que foi tratado com a dose de 80 mg/kg/dia ($47,76 \pm 1,77\%$), que apresentou uma tendência de aumento de fibras colágenas quando comparado ao

grupo controle ($46,82 \pm 3,96\%$), todos os demais grupos que recebem aspartame apresentaram uma tendência de diminuição na quantidade de fibras colágenas (Figura 43).

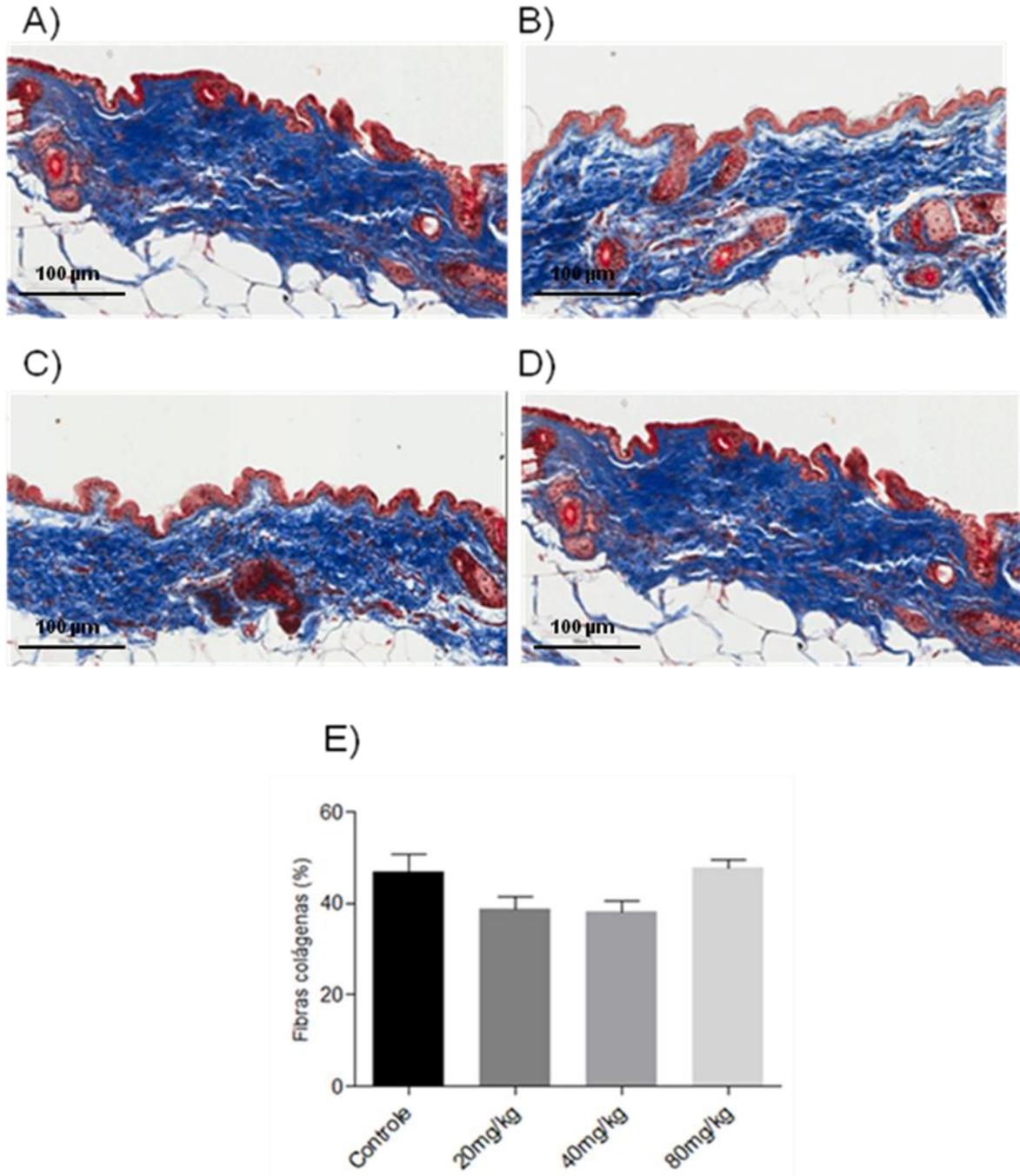


Figura 43: Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos de 22 semanas do grupo controle (A) e tratados por 30 dias com aspartame nas concentrações de 20 mg/kg/dia (B); 40 mg/kg/dia (C); e 80 mg/kg/dia (D). Escala: 100 µm; objetiva de 20x com aumento de 20x. (E) Média da porcentagem de fibras colágenas (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Newman-Keuls).

No Grupo III, foi possível observar que houve uma tendência de diminuição na quantidade de fibras colágenas das peles dos animais que receberam aspartame por 70 dias ($45,44 \pm 3,51\%$) comparados com o controle ($50,84 \pm 6,51\%$) (Figura 44).

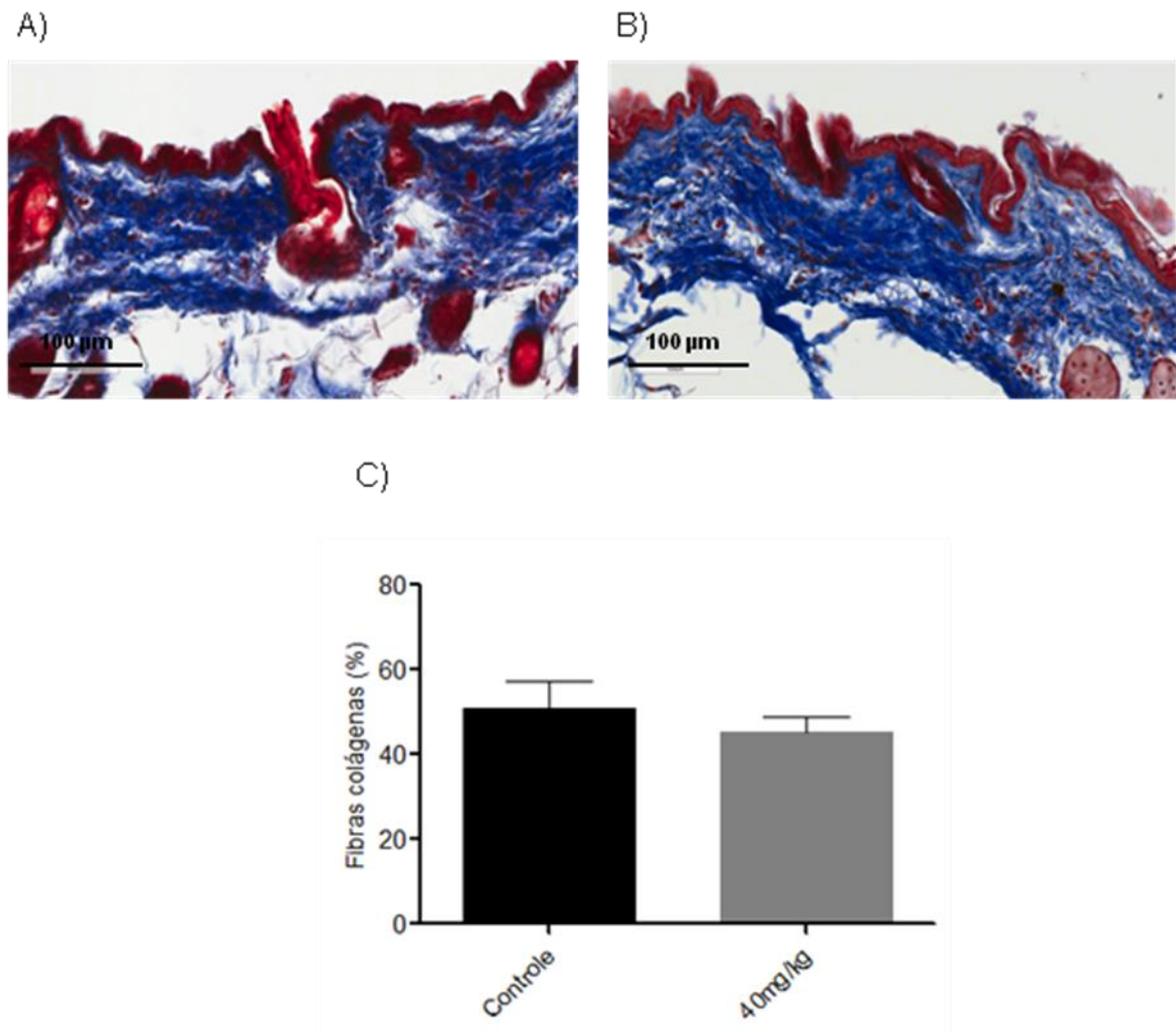


Figura 44: Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos do grupo controle (A) e tratados por 70 dias com aspartame (B). Escala: 100 µm; objetiva de 20x com aumento de 20x. (C) Média da porcentagem de fibras colágenas (teste t de Student, seguido do teste de correção de Welch).

No Grupo IV, também foi possível observar que houve uma tendência de diminuição na quantidade das fibras colágenas das peles dos animais que receberam aspartame por 140 dias ($37,32 \pm 1,48\%$) comparados com o controle ($45,49 \pm 1,60\%$) (Figura 45).

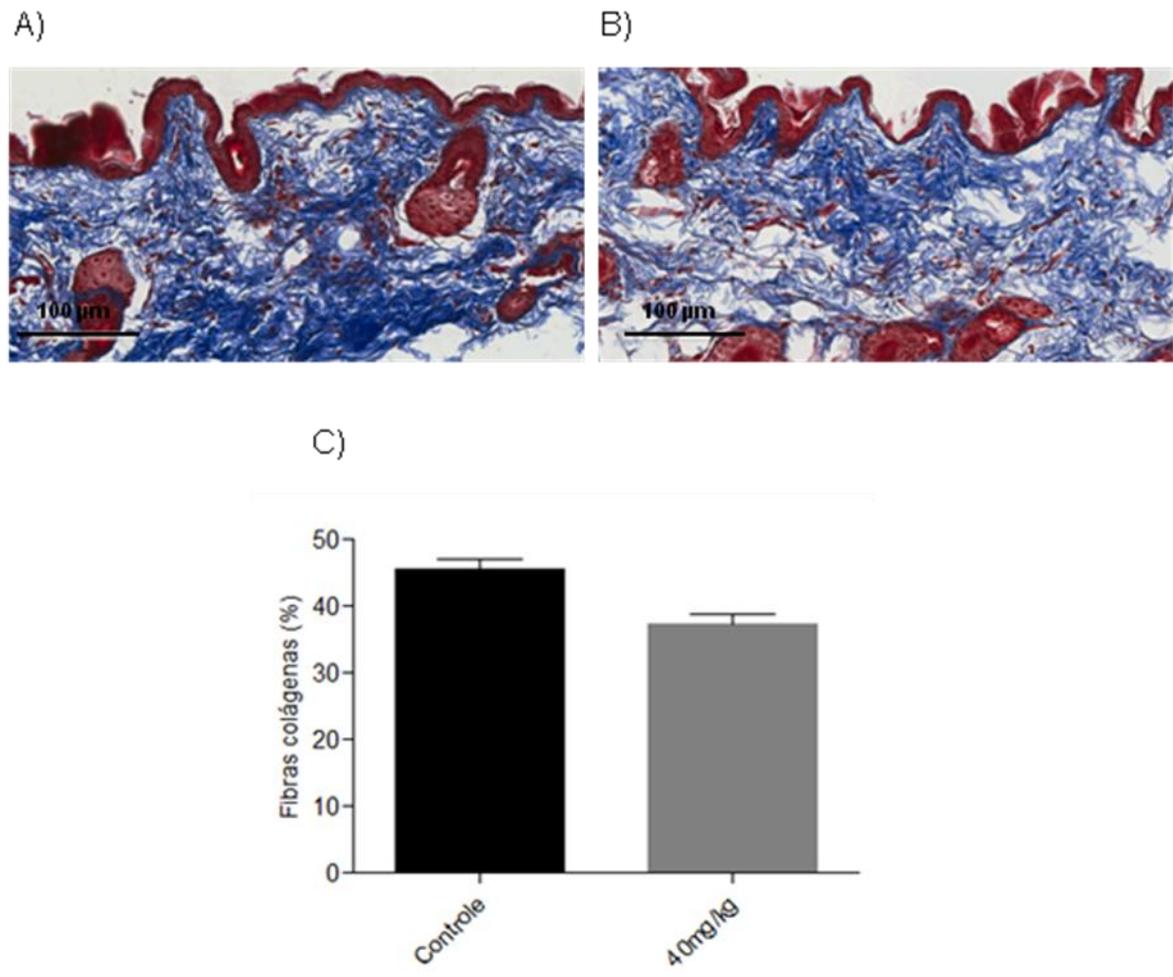


Figura 45: Fotomicrografias dos cortes histológicos da pele dos camundongos após a coloração com Tricrômio de Masson para avaliação das fibras colágenas da derme dos camundongos do grupo controle (A) e tratados por 140 dias com aspartame (B). Escala: 100 µm; objetiva de 20x com aumento de 20x. (C) Média da porcentagem de fibras colágenas (teste t de Student, seguido do teste de correção de Welch).

4.1.12. Avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase nas peles dos camundongos

Os resultados estão representados como porcentagem de atividade da CAT e da SOD, sendo a atividade de 100% atribuída ao controle. As peles dos

animais de 13 semanas de vida que recebem 80 mg/kg/dia de aspartame por 30 dias (Grupo I) tiveram uma diminuição significativa na atividade da catalase ($61,67 \pm 4,34\%$) (Figura 46A) e um aumento na atividade da superóxido dismutase ($110,2 \pm 1,9\%$), o que também foi observado no grupo de camundongos que recebeu o tratamento na concentração de 20 mg/kg/dia ($122,1 \pm 2,0\%$) (Figura 46 B).

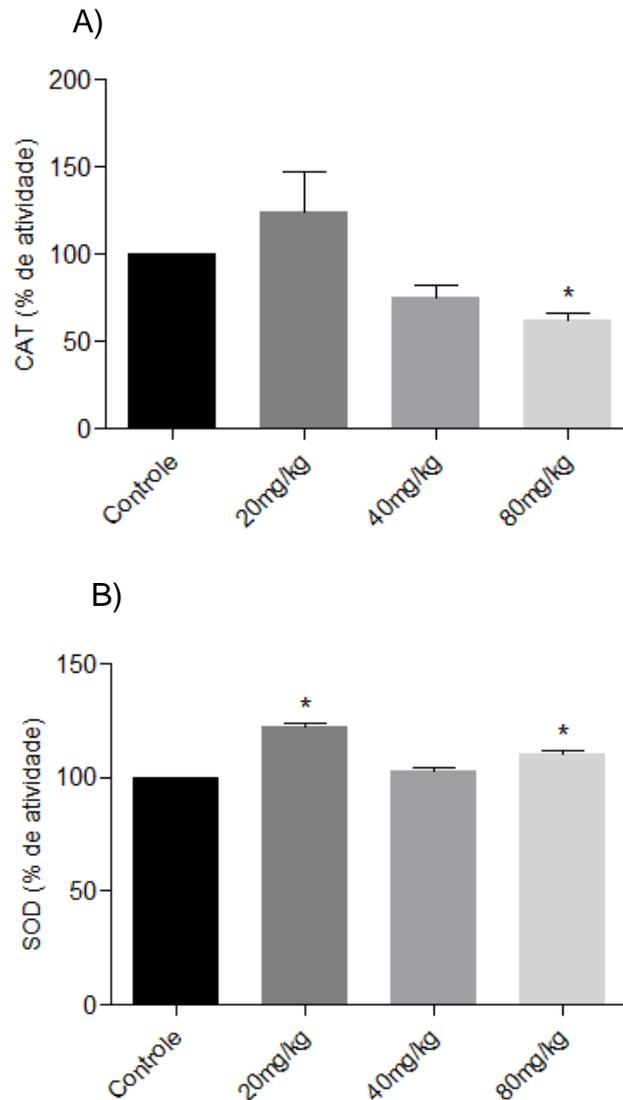


Figura 46: Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos de 13 semanas tratados por 30 dias. Resultados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,5$ vs. grupo controle (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey).

Não foram observadas alterações significativas nas enzimas do sistema antioxidante entre os subgrupos de camundongos do Grupo II (Figura 47).

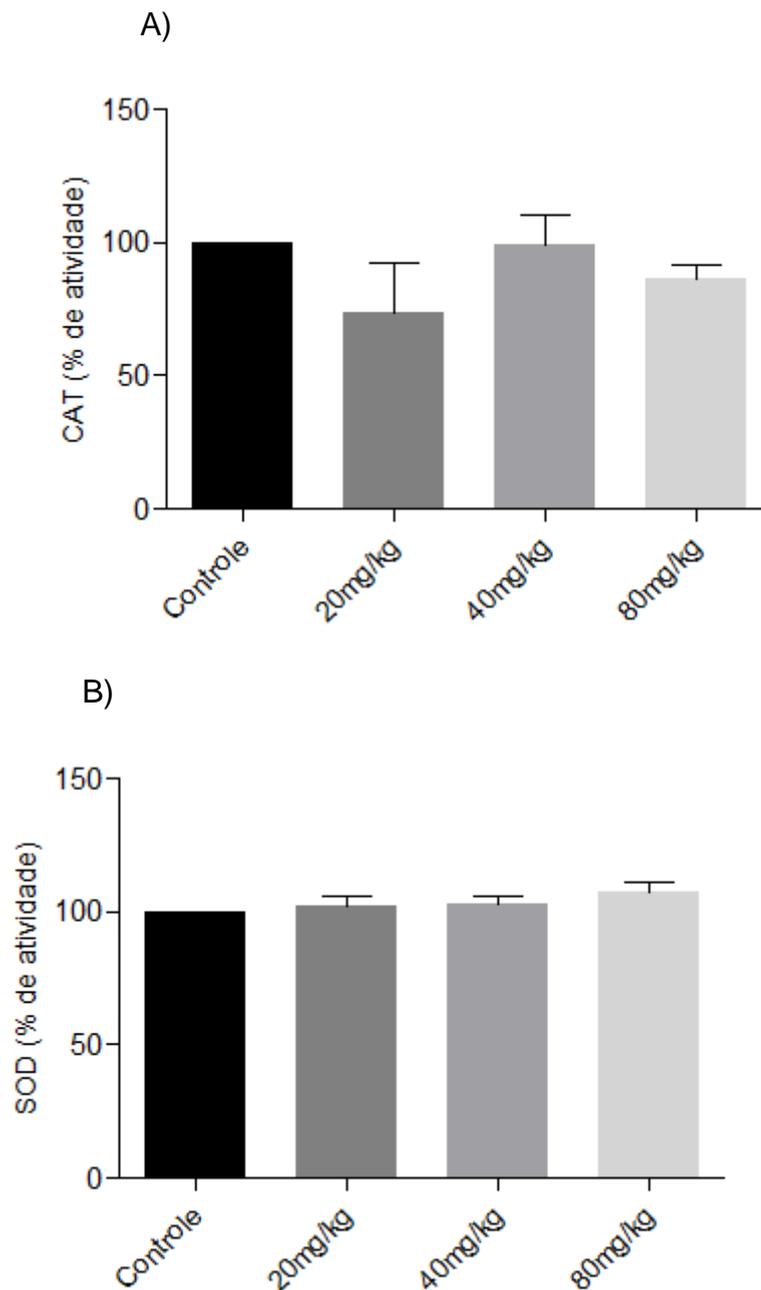


Figura 47: Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos de 22 semanas tratados por 30 dias. Resultados apresentados como média \pm EPM (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey).

No grupo que recebeu 40 mg/kg/dia de aspartame por 70 dias, a alteração observada foi uma diminuição significativa na atividade da enzima catalase ($53,31 \pm 3,25\%$) (Figura 48A). Nos animais tratados por 140 dias, não houve alterações nas atividades dessas enzimas do sistema antioxidante (Figura 49).

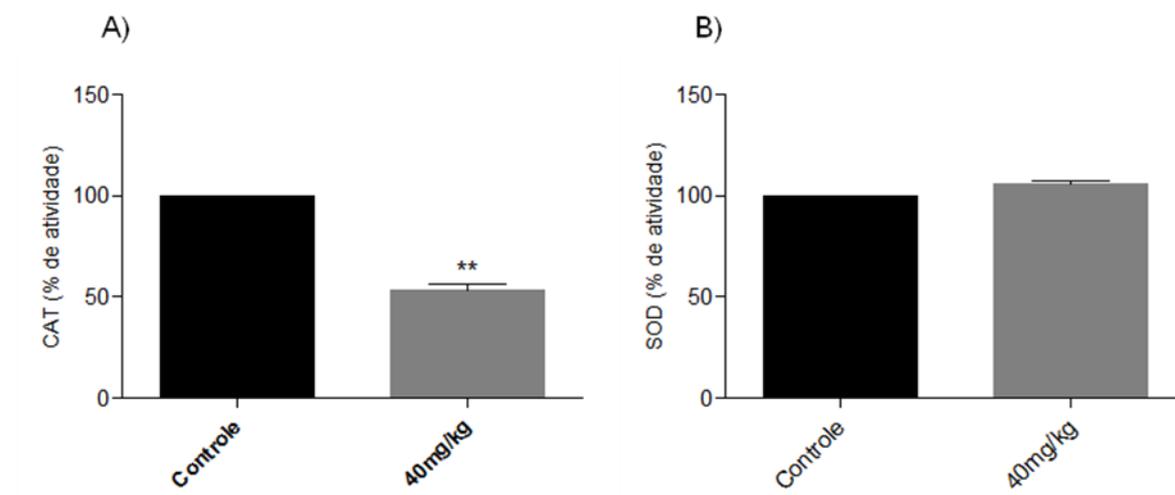


Figura 48: Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos tratados, a partir do desmame, por 70 dias. Resultados representados como média \pm EPM. ** $p = 0,0096$ vs. controle (teste t de Student não pareado).

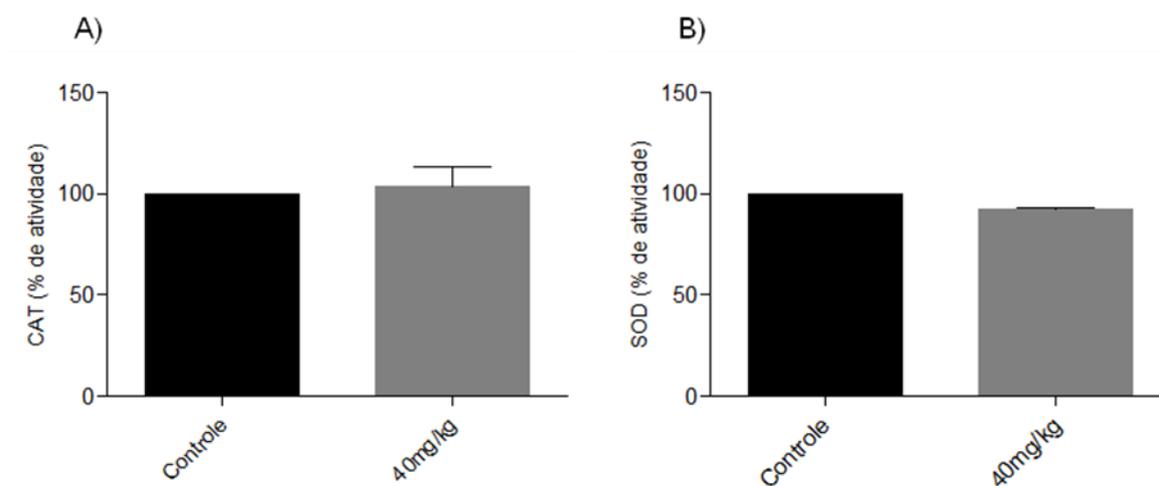


Figura 49: Avaliação de atividade das enzimas CAT e SOD na pele dos camundongos tratados, a partir do desmame, por 140 dias. Resultados apresentados como média \pm EPM. O teste estatístico aplicado para tratamento dos dados foi o teste t de Student não pareado.

4.1.13. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica na pele

O tratamento dos animais com aspartame por 30 dias consecutivos foi capaz de induzir a peroxidação lipídica (Figura 50). Houve um aumento dos produtos indicadores da peroxidação lipídica nos animais tratados com aspartame na dose de

20 mg/kg/dia ($185,9 \pm 36,1\%$) e na dose de 40 mg/kg/dia ($166,2 \pm 5,6\%$) em comparação com o controle (100,0%).

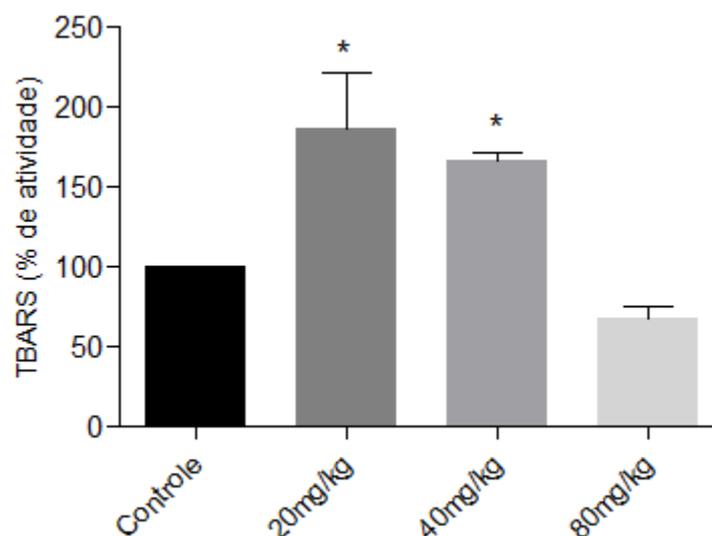


Figura 50: Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica na pele dos camundongos de 13 semanas tratados por 30 dias com aspartame. TBARS - produtos da peroxidação lipídica capazes de se complexar com o ácido tiobarbitúrico. Resultados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,5$ vs. controle (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey).

O tratamento dos animais de 22 semanas de idade com aspartame na dose de 20 mg/kg/dia ($116,4 + 3,2\%$) por 30 dias consecutivos foi capaz de induzir a peroxidação lipídica (Figura 51). Entretanto, nas doses de 40 mg/kg/dia ($82,23 + 2,86\%$) e 80 mg/kg/dia ($55,97 + 6,11\%$), houve uma diminuição, não estatisticamente significatativa, em comparação com o controle (100,00%).

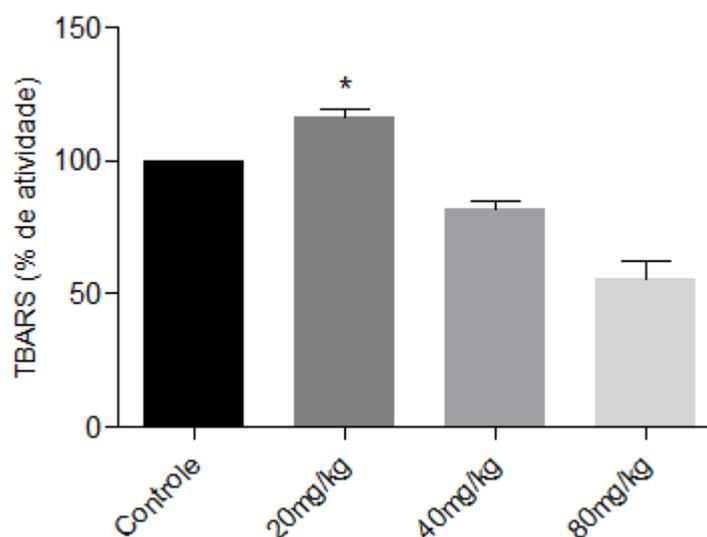


Figura 51: Avaliação de peroxidação lipídica na pele dos camundongos de 22 semanas tratados por 30 dias. TBARS - produtos da peroxidação lipídica capazes de se complexar com o ácido tiobarbitúrico. Resultados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,5$ vs controle (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey).

Já os animais que receberam aspartame na dose de 40 mg/kg/dia por um período mais longo apresentaram uma diminuição significativa dos produtos indicadores de peroxidação lipídica quando comparados ao grupo controle. Os animais que receberam aspartame por 70 dias apresentaram uma diminuição para $29,81 \pm 5,77\%$ em relação ao controle (100%) (Figura 52) e nos animais que receberam aspartame por 140 dias foi observada uma diminuição para $47,94 \pm 5,22\%$ comparados ao controle (Figura 53).

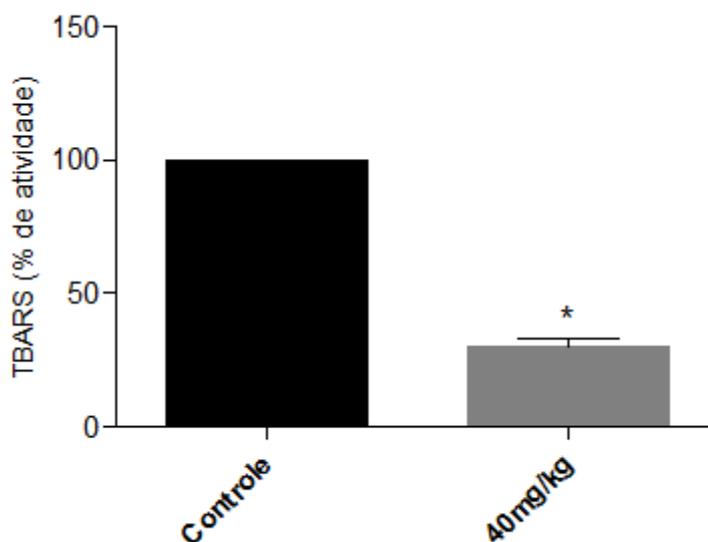


Figura 52: Avaliação da peroxidação lipídica na pele dos camundongos tratados a partir de 3 semanas de vida por 70 dias. TBARS - produtos da peroxidação lipídica capazes de se complexar com o ácido tiobarbitúrico. Resultados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,5$ vs. controle (teste t de Student não pareado).

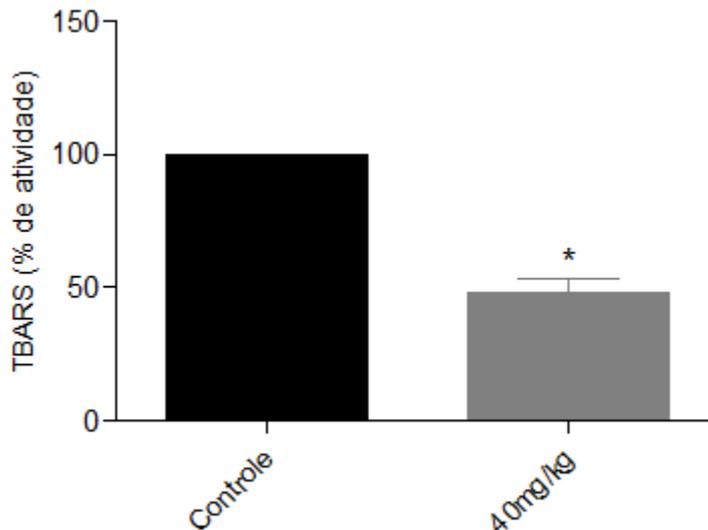


Figura 53: Avaliação nos níveis de peroxidação lipídica na pele dos camundongos tratados por 140 dias a partir de 3 semanas de idade. TBARS - produtos da peroxidação lipídica capazes de se complexar com o ácido tiobarbitúrico. Resultados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,5$ vs. controle (teste t de Student não pareado).

4.2. Estudos em cultura de células

4.2.1. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de aspartame em células mesangiais

O resultado apresentado na Figura 54 mostra que não houve diferença significativa na viabilidade celular após tratamento com aspartame em relação ao controle, sendo que a maior concentração de aspartame utilizada apresentou média de viabilidade celular de 85,47%.

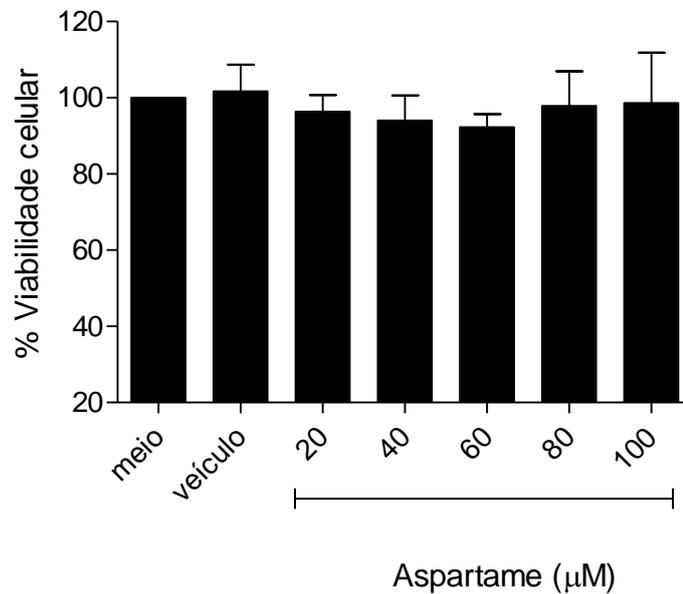


Figura 54: Avaliação da citotoxicidade do aspartame em células mesangiais. As células mesangiais foram tratadas com concentrações crescentes de aspartame, com o veículo, ou não receberam tratamento (meio) e, em seguida, foram incubadas com MTT. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de, no mínimo, três experimentos, da porcentagem de células viáveis, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%. O teste estatístico aplicado para tratamento dos dados foi a análise de variância *one-way* ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey.

4.2.2. Investigação do efeito agonista do aspartame em receptores nucleares PPAR γ – ensaio de gene repórter

O ensaio de gene repórter não mostrou capacidade de ativação do PPAR γ pelo aspartame nas concentrações testadas no ensaio de citotoxicidade. Como não houve indício de citotoxicidade, concentrações mais altas foram testadas no ensaio de ativação de PPAR γ até 1 mM. Os resultados desse ensaio não mostraram ativação dos receptores nucleares PPAR γ pelo aspartame na concentração de até 1 mM (Figura 55).

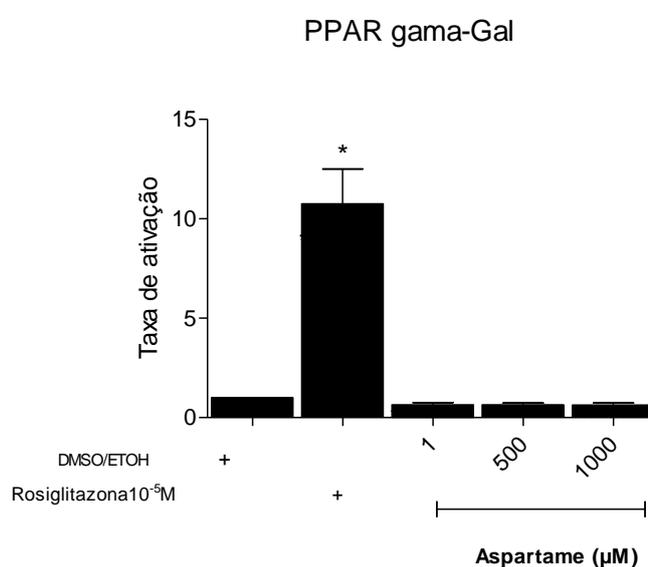


Figura 55: Ensaio de avaliação da atividade agonista de aspartame em PPAR γ . As células mesangiais foram transfectadas com PPAR-GAL4 e seu repórter GAL4-RE e tratadas com o ligante sintético rosiglitazona 10^{-5} M, aspartame (1, 500 e 1000 μ M), ou o veículo da solução de rosiglitazona (DMSO/EtOH) durante 24 horas. Os dados foram expressos como média de ativação da transcrição em relação ao veículo (controle). * $p < 0,05$ em comparação ao veículo (análise de variância *one-way* ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey).

4.3. Revisão Sistemática

4.3.1. Seleção dos estudos

Na revisão, foram inicialmente incluídos 1.367 artigos selecionados de cinco diferentes bases de dados indexadas. Na literatura cinzenta, foram selecionados os primeiros cem artigos obtidos a partir de pesquisa no Google Acadêmico. Após remover os artigos duplicados, 1.050 artigos permaneceram no estudo. Destes, 979 foram excluídos depois da avaliação do título e do resumo. Dois foram incluídos do Google Acadêmico e quatro artigos identificados a partir das listas de referência dos artigos selecionados foram incluídos. Consequentemente, para leitura na íntegra, foram selecionados 77 artigos. Destes selecionados, 29 foram considerados de interesse para a análise descritiva e 12 foram selecionados para meta-análise. Foi elaborado um fluxograma detalhando do processo de identificação, seleção, inclusão e exclusão dos estudos (Figura 56 e Apêndice A).

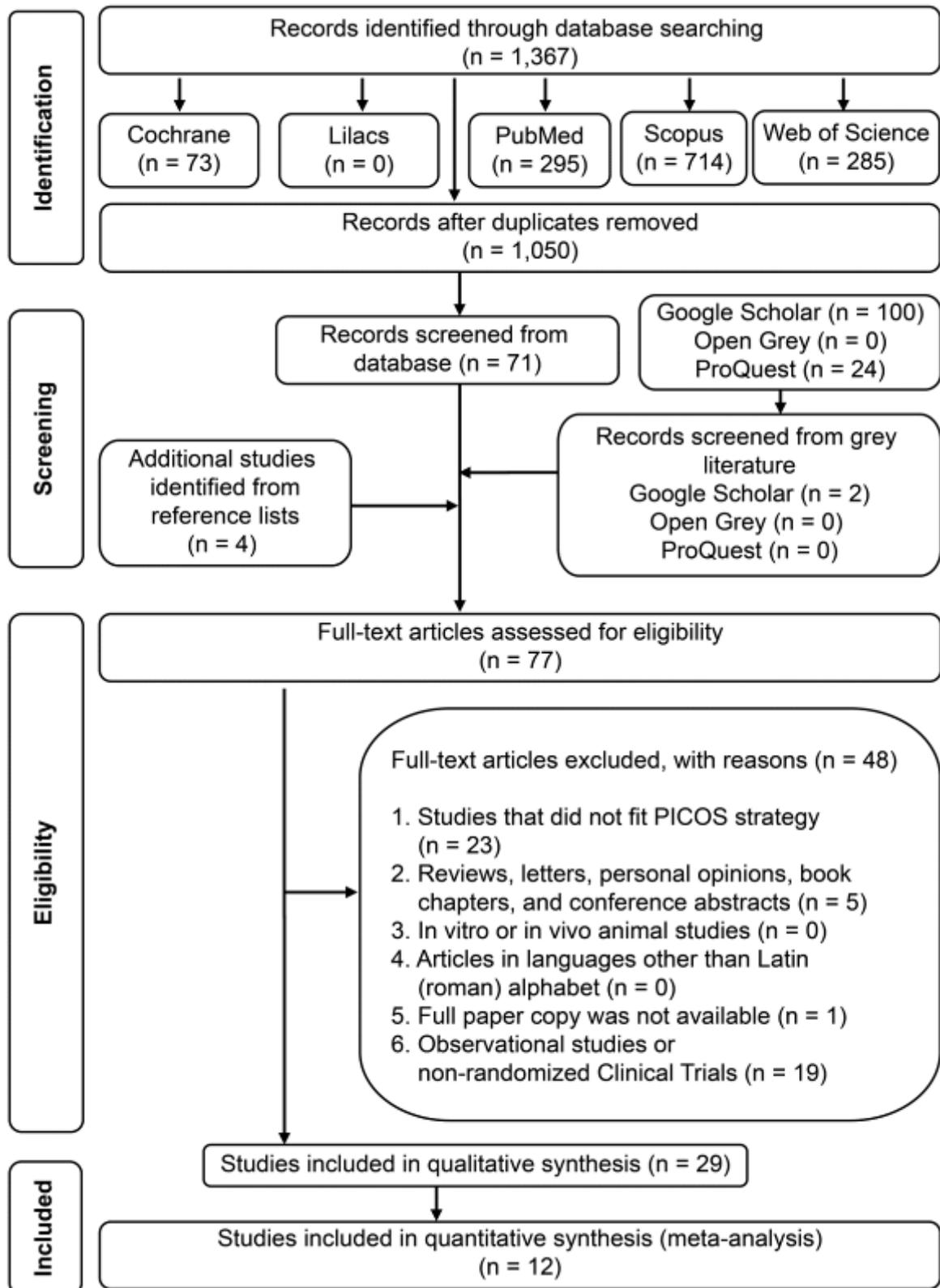


Figura 56: Fluxograma (Moher et al., 2009).

4.3.2. Características dos estudos

Os vinte e nove estudos incluídos eram ensaios clínicos e foram publicados em inglês. Dezesete dos vinte e nove estudos incluídos (Black et al., 1991; Black et al., 1993; Blackburn et al., 1997; Bruce et al., 1987; Colagiuri et al., 1989; Horwitz et al., 1988; Kanders et al., 1988; Lapierre et al., 1990; Lavin et al., 1997; Leon et al., 1989; Melanson et al., 1999; Nehrling et al., 1985; Reid et al., 2007; Rodin, 1990; Ryan-Harshman et al., 1987; Singleton et al., 1999; Stern et al., 1976;) foram realizados antes de 2000 e os outros doze (Bryant et al., 2014; Coppola et al., 2004; Flood et al., 2006; Kuzma et al., 2015; Maersk et al., 2012; Maersk et al., 2012a; Reid et al., 2007; Sathyapalan et al., 2015; Siegler et al., 2012; Smeets et al., 2005; Steinert et al., 2011; Temizkan et al., 2015) foram publicados após o ano 2000.

Todos os estudos apresentaram um grupo que consumiu o aspartame comparando-o com grupos que consumiram glicose, sacarose, outro tipo de adoçante ou ainda outra substância de controle (água ou placebo sem adoçante ou açúcar) e relataram ao menos um dos resultados descritos como um desfecho primário (controle glicêmico e obesidade) ou secundário (concentração de glicose, peso corporal, consumo energético e perfil lipídico) na estratégia de PICOS.

Juntos, os estudos incluídos tiveram um total de 1.044 participantes. Dezenove ensaios foram realizados exclusivamente em participantes saudáveis. Um estudo foi conduzido em participantes saudáveis e com sobrepeso, quatro foram conduzidos em participantes com sobrepeso ou obesos, dois estudos foram conduzidos em participantes saudáveis e diabéticos e 3 estudos foram realizados com pacientes diabéticos que utilizam ou não insulina. A faixa etária média dos participantes dos estudos foi de 18 a 71 anos. A faixa de IMC médio dos participantes foi de 18,5 a 40,0 Kg/m². A Tabela 4 apresenta um resumo das características descritivas dos estudos.

Tabela 4: Resumo das características descritivas dos artigos incluídos na revisão sistemática (n = 29)

<i>First author, Year, Country</i>	<i>Study Design</i>	<i>Gender, Age</i>	<i>Population Mean BMI (kg/m²)</i>	<i>Interventions</i>	<i>Main outcomes to APM consumption</i>	<i>Main conclusion</i>
<i>Black (1991) Canada</i>	<i>Within subject</i>	<i>20 healthy men Age: 19 to 25 years</i>	<i>22 - 29</i>	<i>1) 280 mL of CMW 2) 280 mL DSD (160 – 170 mg APM)</i>	<i>1) Food intake: no difference between all preload types.</i>	<i>The consumption of aspartame-sweetened beverages did not increase short-term subjective hunger or food intake, in a meal taken within the following 60 to 90 minutes.</i>
<i>Black (1993) Canada</i>	<i>Randomized across subjects</i>	<i>18 men Age: 19 to 25 years</i>	<i>21 - 25</i>	<i>1) 280 mL of CMW 2) 280 mL of CMW with 340 mg of encapsulated APM 3) 560 mL of CMW 4) 560 mL of an APM-sweetened soft drink (340 mg APM)</i>	<i>1) Total caloric intake: Consuming 340 mg APM as a sweetener significantly increased all four measures of subjective hunger and subjective appetite</i>	<i>Neither treatment had a significant effect on total caloric intake at the lunchtime meal</i>
<i>Blackburn (1997) United States</i>	<i>Prospective, randomized, stratified, two-arm parallel design-test</i>	<i>APM group 82 obese women Age: 42.5 ± 9.3 No APM group 81 obese women Age: 43.0 ± 10.2</i>	<i>APM group (37.4 ± 5.1) No APM group (37.2 ± 4.6)</i>	<i>1) Food and drinks sweetened with APM 2) Use of sugar or honey as sweetener</i>	<i>1) Body weight: mean weight loss of 5.1 kg (5.1%)</i>	<i>Participation in a weight-control program that included the use of the high-intensity sweetener APM facilitated long-term maintenance of a reduced body weight and a greater weight loss during active weight loss</i>
<i>Bruce (1987) Australia</i>	<i>Randomized Clinical Trial</i>	<i>Seventeen healthy normal subjects Age: 19 to 32 years</i>	<i>-</i>	<i>Study 1: Dextrose Study 2: Noncaloric artificial sweetener APM + dextrose or water + dextrose</i>	<i>1) Blood glucose: No significant changes (Study 1 and Study 3) and decrease (Study 2) 2) Plasma insulin levels: No significant changes (Study 1 and Study 3) and increase</i>	<i>The administration of APM alone had no effect on blood glucose or serum insulin when compared with control</i>

				<i>Study 3: APM or water</i>	(Study 2)	
<i>Bryant (2014) United Kindom and United States</i>	<i>Randomized Clinical Trial</i>	<i>6 men and 4 women Age: 18 to 24 years</i>	21.8 ± 1.8	<i>1) Glucose 2) Glucose + APM 3) Glucose + saccharin 4) Glucose + acesulfame-K</i>	<i>1) Blood glucose: no difference between intervention 2 and others</i>	<i>The administration of APM with glucose did not alter glycemic response when compared to glucose alone</i>
<i>Colagiuri (1989) Australia</i>	<i>Double-blind, cross-over design</i>	<i>8 men and 1 woman noninsulin-dependent diabetes mellitus Age: 66 ± 5</i>	26.4 ± 2.1	<i>1) APM 2) Sucrose</i>	<i>1) Blood glucose: no difference compared with pretreatment values 2) Body weight: mean increase of 1.2 Kg on eight subjects during the sucrose period. Loss of 4 Kg on one subject during the APM period 3) Insulin levels: no difference with pretreatment values</i>	<i>APM is an acceptable sucrose substitute for diabetic individuals but has no specific advantage over sucrose when used solely as a sweetening agent except perhaps in weight-reducing diets</i>
<i>Coppola (2004) Italy</i>	<i>Randomized Clinical Trial</i>	<i>10 men and 10 women with (NGT) Age: 68 ± 8 and 10 men and 10 women with (IGT) Age: 69 ± 1.1</i>	$NGT = 26.4 \pm 3$ $IGT = 27 \pm 3.6$	<i>1) APM 2) Glucose</i>	<i>1) Blood glucose levels: no change after APM intake 2) Insulin levels: no change after APM intake</i>	<i>The APM treatment was not able to alter blood glucose and insulin levels</i>
<i>Flood (2006) United States</i>	<i>Crossover design</i>	<i>18 women Age: 22.0 ± 0.2 and 15 men Age: 23.3 ± 0.3</i>	<i>Women 22.6 ± 0.3 and Men 24.4 ± 0.3</i>	<i>1) Cola 2) Diet cola 3) Water</i>	<i>1) Energy intake: Increase at lunch for caloric beverage consumption compared with non-caloric beverage</i>	<i>Replace caloric beverages with low-calorie or noncaloric beverages can be an effective strategy for decreasing energy intake</i>

Horwitz (1988) United States	Randomized crossover design	20 normal subjects Age: 28 ± 8 and 10 Diabetic subjects Age: 57 ± 8	-	1) Control 2) APM 3) Saccharin	1) Glucose levels: no significant changes	Ingestion of APM in the absence of food appears to cause no adverse changes in blood glucose concentration in normal subjects or subjects with non insulin dependent diabetes mellitus
Kanders (1988) United States	Prospective parallel design	13 men and 46 women 26.5 to 60.7	Control group: 36 -38 and Experimental group: 37-38	1) BDD 2) BDD + foods and beverages sweetened with APM	1) Body weight: loss of 1.68 Kg in experimental group	The greater weight loss in the experimental group of women suggest that adding APM may facilitate compliance to a hypocaloric diet
Kuzma (2015) United States	Randomized, controlled, double-blind crossover study	10 healthy normal- weight adults Age: 18 to 25 years	22.7 ± 1.3	1) APM 2) Fructose 3) Glucose	1) Body weight: no difference between three diet periods 2) Energy intake: lower in APM period compared with others	Sugar-sweetened beverages (SSB) promote an increase in overall energy intake in healthy adults
Lapierre (1990) United Kingdom	Randomized double-blind, placebo controlled crossover design	6 men and 4 women Age: 26.3	-	1) APM 2) Placebo	1) Glucose levels: no difference in comparison to placebo	Treatment with APM was not able to significantly alter plasma glucose levels
Lavin (1997) United Kingdom	Clinical trial	14 healthy normal- weight women	-	1) APM 2) Sucrose 3) Mineral water	1) Energy intake: higher when compared with interventions 2 and 3	Women restrained eaters do not automatically reduce their total energy intake when sucrose-sweetened drinks are replaced by diet drinks containing APM
Leon (1989) United States	Randomized, double-blind, placebo- controlled, parallel- group design	101 healthy Age: 18 to 62 years	-	1) APM 2) Placebo	1) Body weight: no significant change in the APM group 2) Lipoprotein cholesterol: no significant changes	APM consumed daily at doses equivalent to those contained in approximately 10 L of APM- containing beverage is not associated with any significant changes in clinical measures or adverse experiences in healthy adults

Maersk (2012) Denmark	Crossover design	24 subjects overweight or obese Age: 33.5 ± 9.2 years	31.4 ± 3.11	1) APM sweetened diet cola 2) Semi-skimmed Milk 3) Sucrose in regular cola 4) Water	1) Peak glucose concentration: higher after regular cola compared with interventions 1, 2 and 3 2) Insulin levels (AUC): no significant difference between diet cola and water 3) Energy intake: higher after regular cola compared with diet cola and water	There were no indications that APM-sweetened diet cola increases appetite or energy intake compared with water
Maersk (2012)a Denmark	Randomized intervention study	47 nondiabetic subjects Age: 20 to 50 years	26 - 40	1) APM sweetened diet cola 2) Sucrose-sweetened regular cola 3) Semiskim milk 4) Mineral water	1) Body weight: no significant difference between the 4 groups 2) Glucose levels: no significant difference between the 4 groups 3) Insulin levels: no significant difference between the 4 groups 4) Total fat mass: no significant difference between the 4 groups	Effect of APM sweetened diet cola on fatness, ectopic fat, and metabolic factors is mainly neutral and very similar to that of water
Melanson (1999) Netherlands and United States	Clinical Trial	10 healthy weight-stable men	23.4 ± 1.9	1) APM drinks 2) Simple carbohydrate drinks 3) High-fat drinks	1) Blood glucose: no difference was found 2) Energy intake: no compensation after APM preload ingestion	After ingestion of the APM preload, inter-individual variability in spontaneous food intakes were related to differences in blood glucose responses
Moller (1991) Denmark	Clinical Trial	6 healthy men Age: 22 to 37	-	1) APM 2) Bovine albumin 3) Water	1) Glucose levels: decrease relative to control 2) Insulin levels: not significantly affected	APM consumption by healthy men did not affect plasma insulin but had a significant dose effect on plasma glucose
Nehrling (1985) United States	Placebo-controlled, double-blind experimental design	62 subjects insulin-dependent or non-insulin-dependent diabetes Age: 18 to 65	-	1) APM-capsules 2) Placebo capsules	1) Glucose levels: no difference from placebo treated groups	The use of APM as a low-calorie sweetener does not adversely affect glycemic control of persons with diabetes

Reid (2007) United Kingdom	Clinical Trial	133 women Age: 31.8 ± 9.1	22.5 ± 2.8	1) APM drinks 2) Sucrose drinks	1) Body weight: loss on APM group 2) Energy intake: lower than baseline at week 1 and week 4	APM consumption was related to weight loss and lower energy intake when compared to sucrose drinks consumption
Rodin (1990). United States	Clinical trial, within-subjects design	6 normal-weight men 6 normal-weight women 6 overweight men 6 overweight women	-	Preload: 1) APM 2) Fructose 3) Glucose 4) Water	1) Glucose levels: lower when compared to fructose and glucose 2) Energy intake: no difference from water 3) Insulin levels: lower when compared to fructose and glucose	APM does not appear to have stimulating effect on food intake
Ryan-Harshman (1987) Canada	Double Blind Randomized Clinical Trial	13 healthy men 23.1 ± 3.8	-	1) ALA placebo 2) APM (5.04 g) + ALA (5.04 g) 3) APM (10.08 g) + PHE (10.08 g)	1) Energy intake: APM did not affect mean energy intake	APM in doses up to 10 g failed to alter food intake or hunger, mood and arousal in normal weight adult males
Sathyapalan (2015) United Kingdom And Ireland, Qatar	Double Blind Randomized Crossover Study	Sensitive n = 48 50.53 ± 16.24 and Control n = 48 52.42 ± 15.38	Sensitive 30.14 ± 5.71 and Control 28.87 ± 5.9	1) APM containing snack bar 2) Control snack bars	1) Biochemical or metabolic measures: no difference compared to control	Acute ingestion of APM does not have any detectable psychological or metabolic effects in humans
Siegler (2012) Australia	Randomized clinical trial	9 men Age: 22 ± 2	-	1) Carbohydrate maltodextrin + sucrose 2) APM + maltodextrin + sucrose 3) APM + maltodextrin 4) Water	1) Insulin levels: decrease comparing intervention 2 versus 1 and no difference comparing intervention 3 versus 4	APM with carbohydrate significantly lowered insulin levels during exercise versus carbohydrate alone
Singleton (1999) Italy and United States	Clinical trial	12 men and 10 women Age: 27.36	25.3 ± 4.5	1) APM 2) Fructose 3) Glucose 4) Plain	1) Glucose levels: no changes 2) Insulin levels: no changes 3) Total cholesterol: no changes	No significant main treatment effects or interactions were noted for insulin, glucose, total cholesterol, HDL cholesterol or LDL cholesterol

						<i>concentrations</i>
<i>Smeets (2005) Netherlands</i>	<i>Randomized crossover design</i>	<i>5 men Age: 20.4</i>	<i>21.7 ± 1.1</i>	<i>1) Water 2) Water + glucose 3) Water + APM 4) Water + maltodextrin</i>	<i>1) Insulin levels: no changes</i>	<i>APM solutions failed to trigger an insulin response</i>
<i>Steinert (2011) Switzerland</i>	<i>Randomized, placebo controlled, double-blind, six-way cross-over trial</i>	<i>6 men and 6 women Age: 23.3 ± 0.7</i>	<i>23.0 ± 0.5</i>	<i>1) APM 2) Acesulfame K 3) Glucose 4) Fructose 5) Sucralose 6) Water</i>	<i>1) Glucose levels: no change 2) Insulin levels: no change 3) Plasma glucagon: no change</i>	<i>Artificial sweetener had a minimal effect on appetite and did not affect blood glucose concentration and plasma glucagon. No significant insulin response was observed</i>
<i>Stern (1976) United States</i>	<i>Randomized, double-blind clinical trial</i>	<i>Non-insulin dependent diabetic subjects 12 men and 57 women Age: 21 to 70</i>	<i>-</i>	<i>1) APM capsules 2) Placebo capsules</i>	<i>1) Diabetic control: no difference between APM and placebo 2) LDH: higher in placebo group</i>	<i>Subjects exhibited no symptoms that could be attributed to the administration of APM or placebo, and diabetic control was unaffected by the chronic administration of these substances. The various laboratory parameters showed no variations that could be attributable to APM</i>
<i>Temizkan (2015) Turkey</i>	<i>Randomized, single-blinded clinical trial</i>	<i>4 Men and 4 women type 2 diabetic patients Age: 51.5 ± 9.2 and 4 Men and 4 women healthy Age : 45.0 ± 4.1</i>	<i>Diabetic patients 33.7 ± 5.4 Healthy 30.3 ± 4.5</i>	<i>1) APM + water 2) Sucralose + water</i>	<i>1) Glucose levels: no difference between APM and water 2) Insulin levels: no difference between APM, sucralose and water</i>	<i>APM did not alter glucose and insulin levels compared with water and sucralose</i>

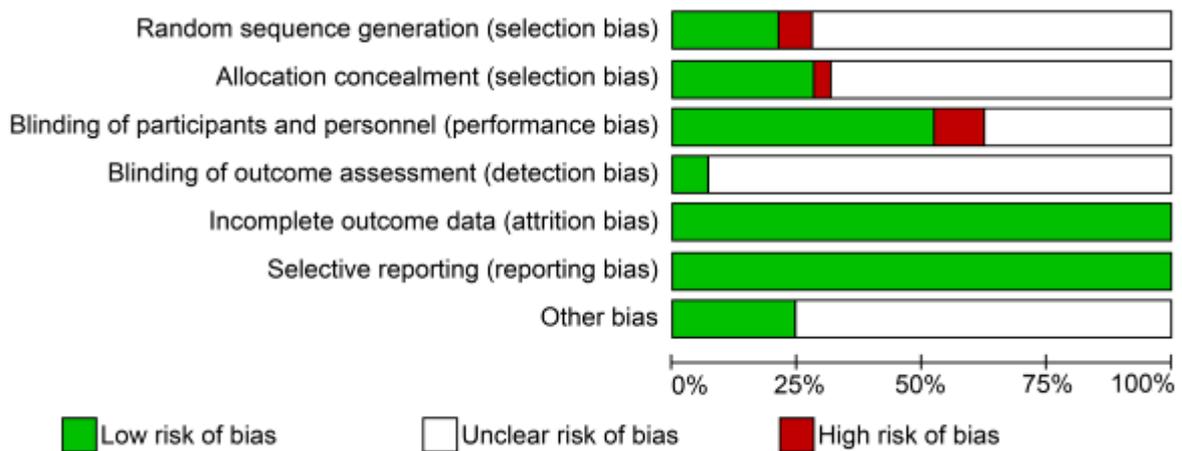
Abbreviations: ALA, alanine, APM, aspartame; BDD, Balanced Deficit Diet; CMW, carbonated mineral water; DSD, diet soft drink; IGT, impaired glucostolerance; NGT, normal glucose tolerance; PHE, phenylalanine; ¹, Mean ± SD (all such values).

4.3.3. Risco de viés entre os estudos

Entre os 29 estudos incluídos na revisão, 20,68% apresentaram baixo risco de viés na geração de sequência aleatória; 72,41% foram classificados como incertos; e 6,89% foram classificados como de alto risco de viés. Considerando a ocultação de alocação, 27,58% dos estudos apresentaram baixo risco de viés; e 65,51% e 3,44% foram classificados como incertos ou com um alto risco de viés, respectivamente. Em relação ao cegamento dos participantes, 51,72% apresentaram baixo risco de viés na geração de sequência aleatória; 37,93% foram classificados como incertos; e 10,34% foram classificados como de alto risco de viés. 6,89% dos estudos foram classificados como baixo risco de viés e 93,10% foram classificados como incertos no cegamento de dados sobre resultados.

Todos os estudos foram classificados como de baixo risco de viés em relação aos dados incompletos dos desfechos e ao relato do desfecho seletivo. 24,13% dos estudos apresentaram baixo risco de viés em relação a outras fontes de riscos e 75,86% foram classificados como incertos (Figura 57A). O resumo da avaliação para cada item, por estudo separadamente, de acordo com a ferramenta da *Cochrane Collaboration* para avaliar o risco de viés nos critérios de ensaios clínicos randomizados, é apresentado na Figura 57B e no Apêndice B.

A)



B)

	Random sequence generation (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Blackburn et al., 1997	●	●	●		●	●	●
Black et al., 1991					●	●	●
Black et al., 1993			●		●	●	●
Bruce et al., 1987					●	●	
Bryant et al., 2014					●	●	
Colagiuri et al., 1989			●		●	●	●
Coppola et al., 2004					●	●	
Flood et al., 2006					●	●	
Horwitz et al., 1988	●	●			●	●	
Kanders et al., 1988			●		●	●	●
Kuzma et al., 2015	●	●	●		●	●	●
Lapierre et al., 1990			●		●	●	
Lavin et al., 1997	●				●	●	
Leon et al., 1989	●	●	●	●	●	●	●
Maersk et al., 2012	●		●		●	●	
Maersk et al., 2012a			●		●	●	
Melanson et al., 1999			●		●	●	
Moller, 1991					●	●	
Nehrling et al., 1985		●	●		●	●	
Reid et al., 2007					●	●	
Rodin, 1990		●			●	●	
Ryan-Harshman et al., 1987		●	●		●	●	
Sathyapalan et al., 2015	●	●	●	●	●	●	
Siegler et al., 2012			●		●	●	
Singleton et al., 1999					●	●	
Smeets et al., 2005	●	●	●		●	●	
Steinert et al., 2011			●		●	●	
Stem et al., 1976			●		●	●	
Temizkan et al., 2015			●		●	●	

■ Low risk of bias Unclear risk of bias ■ High risk of bias

Figura 57: Avaliação do risco de viés utilizando a ferramenta da Colaboração Cochrane. (A) Gráfico do risco de viés de todos os estudos incluídos na revisão, apresentando suas respectivas porcentagens em cada item da avaliação. (B) Resumo do risco de viés dos estudos (representados pelos nomes dos autores) com seu respectivo resultado em cada item da avaliação.

4.3.4. Síntese dos resultados

Nove estudos não mostraram efeito significativo do consumo de aspartame na glicemia de jejum ou nos valores de insulina plasmática em indivíduos saudáveis (Bruce et al., 1987; Bryant et al., 2014; Coppola et al., 2004; Lapierre et al., 1990; Moller, 1991; Sathyapalan et al., 2015; Singleton et al., 1999; Smeets et al., 2005; Steinert et al., 2011). Estudos que compararam indivíduos saudáveis com diabéticos não mostraram mudanças na glicemia após o consumo de aspartame (Colagiuri et al., 1989; Horwitz et al., 1988; Nehrling et al., 1985; Temizkan et al., 2015). Porém um estudo mostrou diferenças nos níveis de glicose após ingestão de aspartame, com um declínio observado em 40% dos indivíduos (Melanson et al., 1999).

Moller (1991) relatou diminuição dos níveis de glicose e, ainda, Siegler e colaboradores (2012) relataram que, durante a prática de atividades físicas, o consumo de carboidrato associado ao aspartame diminuiu a concentração de insulina plasmática quando comparado ao consumo somente do carboidrato.

Seis estudos não mostraram alterações no consumo energético de indivíduos que consumiram aspartame (Black et al., 1991; Black et al., 1993; Flood et al., 2006; Maersk et al., 2012; Rodin, 1990; Ryan-Harshman et al., 1987), comparados aos controles.

Os resultados de um estudo mostraram que o consumo de aspartame foi correlacionado com a perda de peso e ajudou, em longo prazo, na manutenção da redução do peso corporal de mulheres obesas que participaram de um programa de controle de peso (Blackburn et al., 1997).

Em outro estudo, os participantes com sobrepeso ou obesos que consumiram dieta hipocalórica suplementada com aspartame apresentaram uma perda de peso maior quando comparados ao grupo controle que consumiu uma dieta hipocalórica sem suplementação (Kanders et al., 1988).

Um estudo relatou que a ingestão aguda de 100 mg de aspartame não causou quaisquer efeitos metabólicos detectáveis em humanos (Sathyapalan et al., 2015).

Maersk e colaboradores (2012a) mostraram que o efeito de uma bebida adoçada com aspartame na deposição de massa adiposa ectópica e nos fatores metabólicos dos indivíduos foi praticamente nulo e foi muito semelhante aos efeitos encontrados nos indivíduos que receberam água.

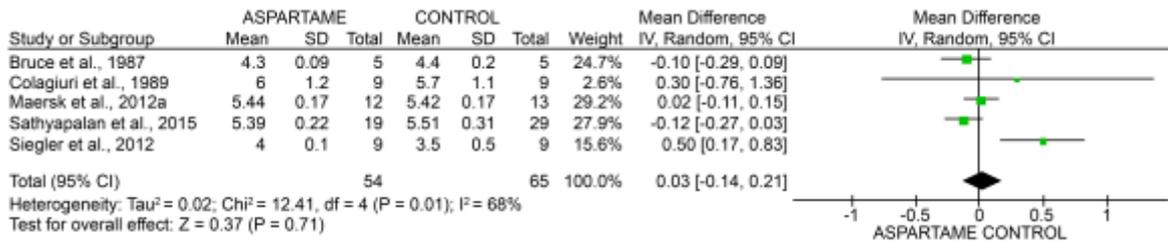
Leon e colaboradores (1989) e Stern e colaboradores (1976) não encontraram diferença na média do peso corporal dos indivíduos que ingeriram aspartame em comparação com os indivíduos que receberam apenas o placebo.

Apenas um estudo mostrou um aumento no consumo energético de indivíduos que receberam aspartame quando comparados aos que receberam sacarose como controle ou aos que receberam apenas água mineral gaseificada (Lavin et al., 1997).

Os resultados dos estudos clínicos randomizados foram sintetizados para serem analisados estatisticamente. A meta-análise foi feita com dados de artigos em que os participantes consumiram aspartame em comparação com um grupo controle que recebeu água ou placebo (sem açúcar ou adoçante) ou em comparação com a sacarose. Estudos nos quais os resultados foram apresentados em gráficos ou estudos que não apresentaram dados com o desvio padrão foram excluídos, assim como os que apresentaram resultados de área sob a curva. O gráfico do tipo floresta foi construído com os resultados do consumo de aspartame *versus* controle e o consumo de aspartame *versus* sacarose. Dos vinte e nove estudos selecionados para a análise qualitativa, doze apresentaram resultados que puderam ser utilizados para a análise quantitativa (meta-análise) (Black et al., 1991; Blackburn et al., 1997; Bruce et al., 1987; Colagiuri et al., 1989; Lavin et al., 1997; Maersk et al., 2012; Maersk et al., 2012a; Melanson et al., 1999; Reid et al., 2007; Ryan-Harshman et al., 1987; Sathyapalan et al., 2015; Siegler et al., 2012) (Figura 57). Os estudos foram reunidos e a meta-análise foi feita individualmente para cada desfecho. Essa opção de análise individual dos desfechos se deu pela grande variação nos valores dos estudos distintos avaliados, que interfeririam na análise como um todo.

Resultados da glicose de jejum mostraram moderada heterogeneidade entre os estudos com uma inconsistência (I^2) de 68%; não houve diferença entre os grupos que consumiram aspartame comparados com o grupo controle ($p = 0,71$; $n = 119$) (Figura 58A). Para a comparação entre o grupo que consumiu aspartame ou sacarose, foi encontrada uma inconsistência (I^2) de 56%. Não houve diferença entre esses dois grupos ($p = 0,09$; $n = 58$) (Figura 58B).

A)



B)

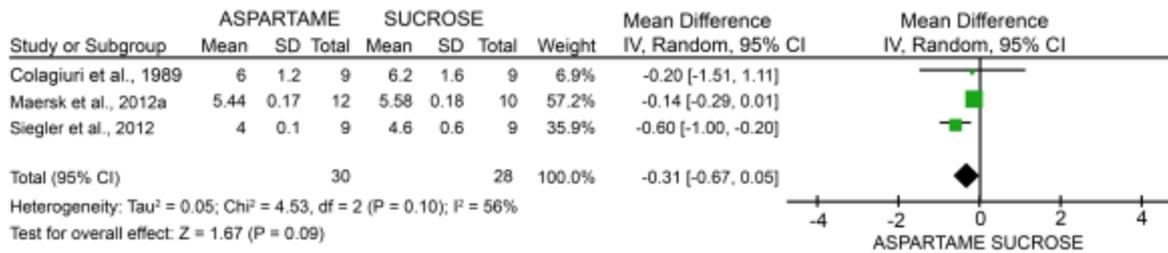
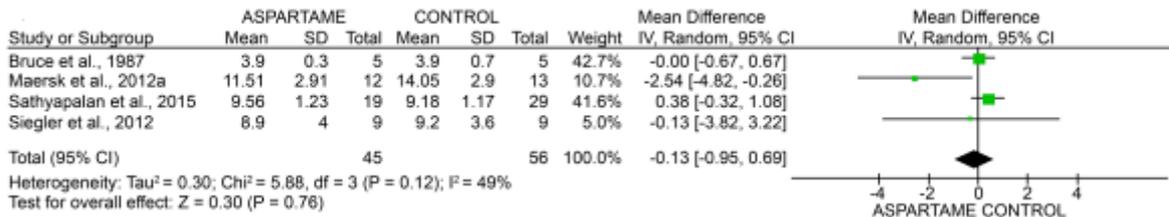


Figura 58: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle (A) e aspartame *versus* sacarose (B) para os níveis de glicose de jejum (mmol/L).

Os resultados da insulina plasmática mostraram moderada heterogeneidade (I^2) de 49%, e não houve diferença entre o grupo que recebeu aspartame comparado com o grupo controle ($p = 0,76$; $n = 101$) (Figura 59A). A comparação entre o consumo de aspartame *versus* consumo da sacarose mostrou alta heterogeneidade, I^2 de 92%. Não houve diferença entre o grupo que consumiu aspartame comparado com o grupo que consumiu sacarose ($p = 0,57$; $n = 40$) (Figura 59B).

A)



B)

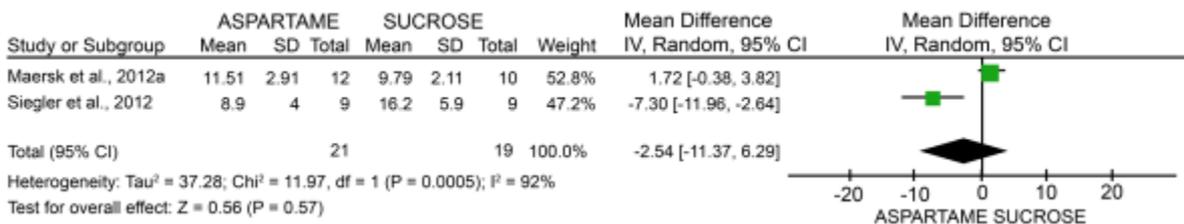
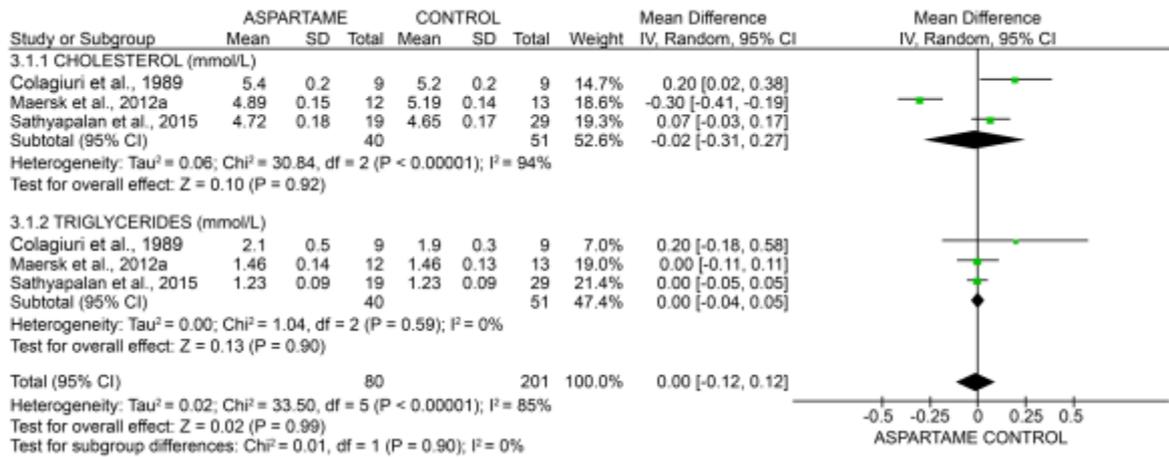


Figura 59: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle (A) e aspartame *versus* sacarose (B) para a concentração de insulina plasmática (µU/mL).

Para os resultados do perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos), a análise mostrou alta heterogeneidade entre os estudos, com I² de 85%, e não houve diferença entre o grupo do aspartame e o grupo controle (p = 0,99; n = 182) (Figura 60A). Para o grupo aspartame comparado ao grupo que recebeu sacarose, a análise estatística mostrou alta heterogeneidade de dados, I² de 95%, e não houve diferença entre os grupos (p = 0,48; n = 80) (Figura 60B).

Todas as comparações entre os grupos aspartame *versus* controle ou aspartame *versus* sacarose foram feitas com um modelo randômico.

A)



B)

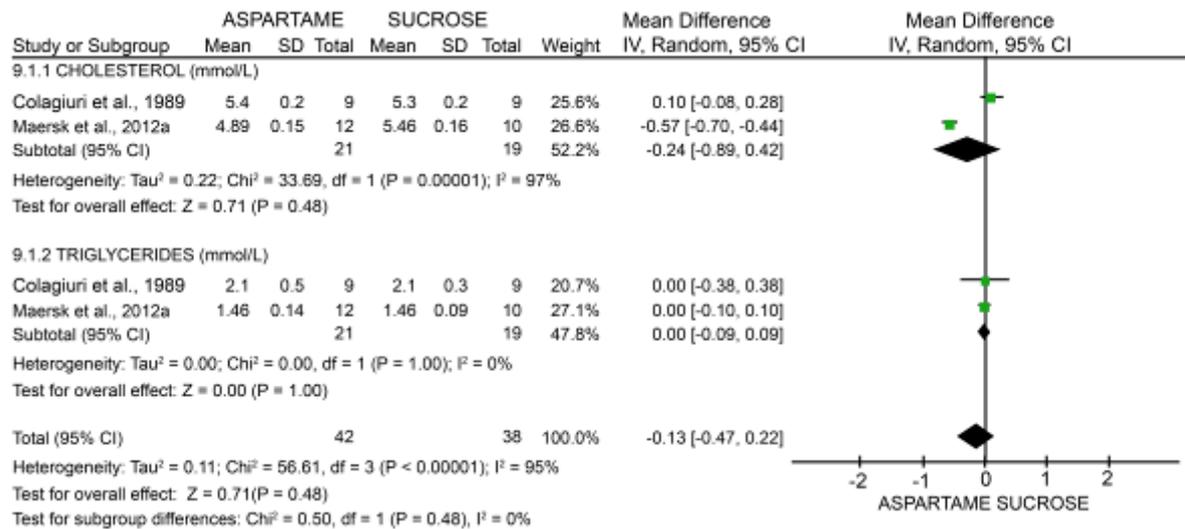
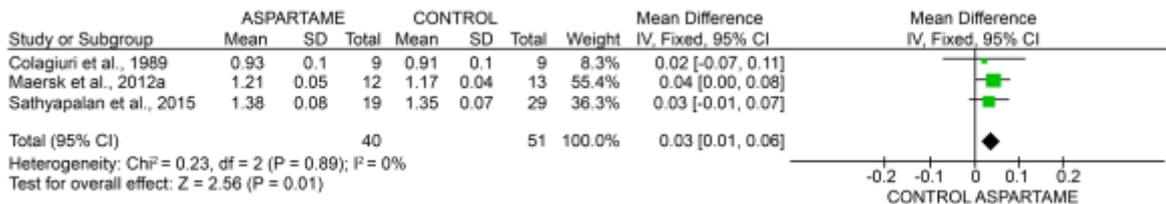


Figura 60: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle (A) e aspartame *versus* sacarose (B) para as concentrações séricas de colesterol e triglicerídios (mmol/L).

Para os níveis séricos de HDL-c, o resultado da meta-análise mostrou baixa heterogeneidade de dados (I² de 0%) e houve diferença estatística entre o grupo do aspartame comparado ao grupo controle, favorecendo o grupo que havia recebido

aspartame (p = 0,01; n = 91) (Figura 61A). A comparação entre o grupo que recebeu aspartame com o que recebeu sacarose também mostrou uma baixa heterogeneidade de dados (I² de 0%) e os resultados foram diferentes nessa comparação, favorecendo os indivíduos que tinham consumido sacarose (p = 0,005, n = 40) (Figura 61B). Os dados foram avaliados pelo modelo fixo devido à baixa heterogeneidade apresentada entre eles.

A)



B)

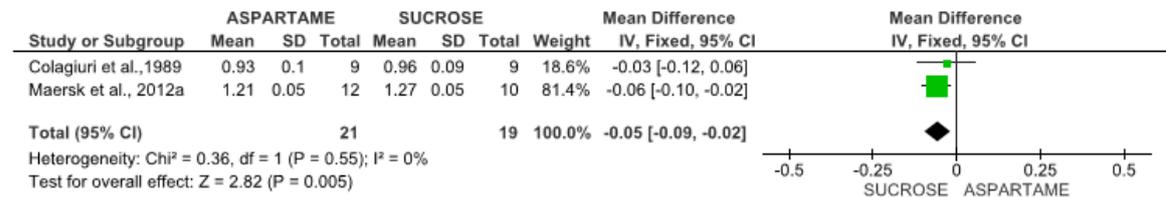
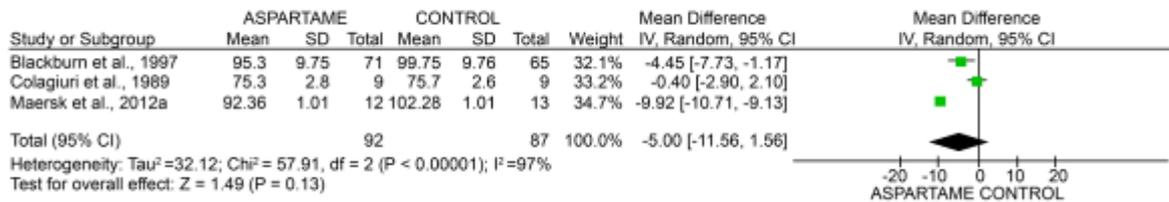


Figura 61: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle (A) e aspartame *versus* sacarose (B) para as concentrações séricas da lipoproteína de alta densidade (HDL-c; mmol/L).

Uma alta heterogeneidade de dados foi observada entre os estudos que analisaram o peso corporal, com I² de 97% para a comparação dos grupos aspartame e controle, e I² de 94% para comparação entre os grupos que receberam aspartame e sacarose. Não houve diferença significativa na comparação dos resultados entre o grupo que consumiu aspartame e o controle (p = 0,13; n = 179) (Figura 62A), nem entre os grupos que consumiram aspartame e sacarose (p = 0,21; n = 40) (Figura 62B). Para ambas as comparações, foi utilizado o modelo randômico.

A)



B)

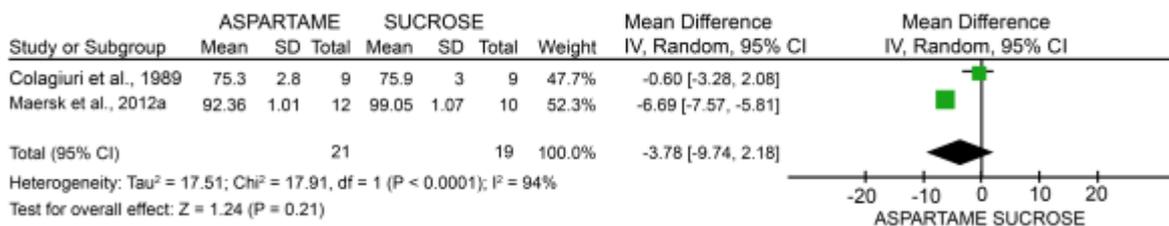
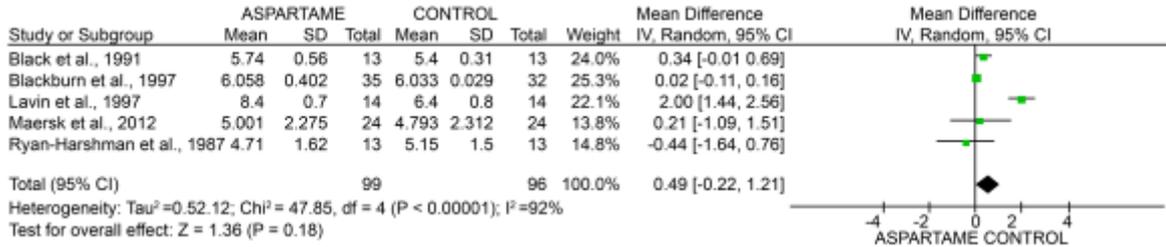


Figura 62: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle (A) e aspartame *versus* sacarose (B) para o peso corporal (Kg).

Para a avaliação do efeito do aspartame sobre o consumo energético, os resultados mostraram alta heterogeneidade entre os estudos, com $I^2=92\%$, e não houve diferença entre o grupo que recebeu aspartame e o grupo controle ($p = 0,18$; $n = 195$) (Figura 63A). Quando foi comparado aspartame com sacarose, também foi observada uma alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 94\%$). Não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu aspartame quando comparado ao grupo que recebeu sacarose ($p = 0,86$; $n = 201$) (Figura 64B). O modelo ranômico foi escolhido para fazer as comparações entre os grupos.

A)



B)

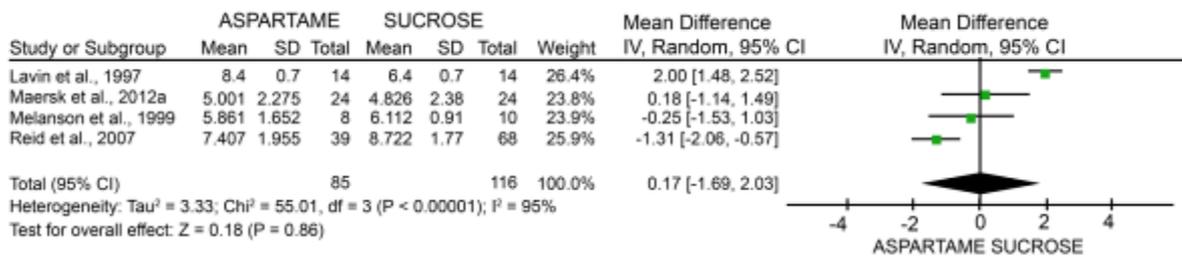


Figura 63: Gráfico do tipo floresta da comparação de aspartame *versus* controle (A) e aspartame *versus* sacarose (B) para o consumo energético (MJ).

4.3.5. Risco de viés entre os estudos

Os estudos incluídos apresentaram uma metodologia semelhante, o que reduziu o risco de má interpretação dos resultados. Por serem estudos clínicos randomizados, os estudos selecionados nesta revisão foram considerados relativamente homogêneos. Na meta-análise, os estudos apresentaram alta heterogeneidade, provavelmente devido aos diferentes padrões de tratamento para o aspartame, a sacarose ou o controle.

4.3.6. Avaliação da qualidade da evidência cumulativa

No geral, a qualidade da evidência dos resultados avaliados pelo sistema GRADE foi julgada como moderada, sugerindo uma confiança moderada no efeito estimado dos desfechos analisados (Anexo C).

5. DISCUSSÃO

Os adoçantes artificiais surgiram com o propósito de substituir os açúcares no que se refere a conferir o sabor doce aos alimentos. Porém seu uso vem sendo feito de forma indiscriminada por crianças e adultos, independentemente de gênero, etnia ou condições sociais. Dúvidas sobre o benefício do uso aumentam, pois os estudos clínicos controlados ainda são bastante limitados (Sylvetsky et al., 2016).

Na literatura, não há relatos de estudos que relacionem o consumo de aspartame com algum efeito sobre o envelhecimento precoce da pele. Neste estudo, camundongos *Swiss* fêmeas com idade de 13 ou 22 semanas foram tratados com aspartame em diferentes doses diárias por um período de 30 dias (Grupos I e II). As doses escolhidas para serem utilizadas nos tratamentos corresponderam à dose de ingestão diária aceitável (IDA) de 40mg/kg/dia, à metade e ao dobro dessa dose.

Ainda, um grupo de animais recebeu ração suplementada com aspartame logo após o desmame, por 70 ou 140 dias, em uma tentativa de mimetizar o consumo de produtos dietéticos ao longo da vida, dentro da ingestão diária aceitável para o aspartame (IDA, 40 mg/kg de massa corpórea/dia) (Grupos III e IV). Durante o tratamento, o consumo de ração e água e a variação da massa corpórea foram monitorados e, ao final do tratamento, foram analisados a glicemia de jejum, a massa de tecido branco visceral, o tecido marrom, a massa dos rins e do coração dos animais, assim como o perfil lipídico e as enzimas hepáticas.

Quando se iniciou o tratamento por 30 dias com aspartame nos camundongos mais velhos, com 22 semanas de idade, foi observada uma perda de peso após o período de tratamento, principalmente na dose de 40 mg/kg de massa corpórea/dia, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando os camundongos foram tratados com ração suplementada com aspartame desde o desmame até completarem 22 semanas de idade, também não foram observadas diferenças significativas de peso desses animais tratados quando comparados ao grupo controle.

Nos grupos III e IV deste estudo, foram avaliados camundongos fêmeas que receberam aspartame, a partir da idade de desmame, por 70 ou 140 dias, respectivamente. Nesses grupos, foi verificado que o consumo de ração e de água

não foi diferente entre os grupos tratados, sugerindo que em longo prazo o consumo de aspartame nas doses testadas pareceu não influenciar no aumento da ingestão hídrica ou de ração. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados em outros estudos, como o de Soffritti e colaboradores (2007) que suplementaram a ração de ratos com diferentes doses de aspartame (100 ou 20 mg/kg) desde a vida fetal até aproximadamente 144 semanas de vida e observaram que não houve diferenças no consumo de ração e na ingestão hídrica entre os grupos.

Porém, para os camundongos com 13 semanas de idade, submetidos ao tratamento com aspartame por 30 dias, foi observado um ganho de massa corporal, que foi maior e significativo no grupo de animais que recebeu aspartame na dose de 40 mg/kg de massa corpórea/dia, nos quais foi observado um ganho de peso médio de 12,75%, em comparação ao grupo controle, cujo ganho de peso médio foi de 5,06%. Esses resultados corroboram estudos anteriores descritos por Collison e colaboradores (2012), nos quais os autores verificaram aumento significativo de ganho de peso de camundongos C57BL/6J machos quando tratados com uma solução de 0,25 g/L de aspartame, equivalente à dose de 50 mg/kg de massa corpórea por dia, por 20 semanas.

Esses efeitos de ganho de peso e casos de obesidade associados ao consumo de adoçantes vêm sendo cada dia mais estudados. Hill e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de bebida adoçada com aspartame e acesulfame de potássio comparado com água ou bebida adoçada com açúcar e steviol em 77 mulheres e observaram o nível de saciedade pelo que tinham ingerido. As participantes que ingeriram bebidas com adoçantes artificiais ficaram menos saciadas do que as que ingeriram bebida adoçada com açúcar, ou até menos do que as que consumiram água. No ano anterior, Swithers (2013) discutiu vários casos de estudos epidemiológicos que associavam o uso de adoçantes não calóricos ao ganho de peso e ao desenvolvimento de síndrome metabólica, hipertensão e doenças cardiovasculares. O autor ainda levantou a hipótese de que o uso desses edulcorantes estimularia a ingestão de alimentos por alterar sinais da modulação neural ligados ao balanço energético.

Esses resultados também corroboram os achados neste estudo, uma vez que foi observado um maior consumo de ração nos camundongos de 13 semanas de idade tratados por 30 dias com diferentes doses de aspartame. Nesse mesmo grupo, foi observado que houve uma tendência de aumento de consumo de ração

nos grupos tratados com relação ao grupo controle ao longo do tempo. Nos grupos que receberam ração suplementada com aspartame em longo prazo (70 e 140 dias), a partir do desmame, não houve diferença no consumo de ração entre os grupos.

Recentemente, foi descrito por Suez e colaboradores (2014) que os riscos à saúde decorrentes do uso dos adoçantes poderiam estar intimamente relacionados à modificação da composição e da função da microbiota intestinal por adoçantes não metabolizados pelo organismo. Os autores mostraram que a alteração na microbiota após o consumo de sacarina produz uma alteração no perfil de degradação de glicanos no intestino, o que está intimamente ligado ao consumo de energia.

Palrnãs e colaboradores (2014) avaliaram o consumo de baixa dose crônica de aspartame no perfil antropométrico, metabólico, metabolômico e na microbiota intestinal de ratos *Sprague-Dawley* machos tratados por 2 semanas com aspartame adicionado à água de tratamento na concentração de 60 mg/L, com dieta hipercalórica ou normal. Os autores mostraram que o aspartame diminui efeitos negativos associados à alimentação hipercalórica, como massa corpórea, adiposidade, consumo calórico e níveis de insulina de jejum. Porém o consumo de aspartame resultou em hiperglicemia e diminuição da capacidade de resposta à insulina, que os autores sugeriram ser devido ao aumento da gliconeogênese induzida pela produção de propionato de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota intestinal. Os autores mostraram haver uma variação da microbiota intestinal com o consumo de aspartame, tanto para animais tratados com dieta normal quanto para os que receberam dieta hipercalórica, porém houve uma maior diminuição de *Bacteroidetes* (bactérias Gram-negativas) no intestino dos animais tratados com dieta normal, enquanto houve uma maior diminuição de *Firmicutes* (bactérias Gram-positivas) no intestino de animais tratados com dieta hipercalórica e aspartame, com relação aos seus respectivos controles. Além disso, houve uma grande variação da composição do filo *Firmicutes* entre os animais com os diferentes tipos de tratamento.

Os camundongos utilizados neste estudo tiveram sua glicemia de jejum avaliada e os resultados mostraram que, após 30 e 70 dias de tratamento, foi verificado, tanto nas fêmeas com 13 semanas de idade quanto nas com 22 semanas de idade, que não houve diferença na glicemia de jejum entre os animais que receberam aspartame e os que receberam apenas o veículo. Houve somente uma tendência de aumento da glicemia do Grupo III, nos animais que receberam

aspartame por 70 dias a partir do desmame, comparado com os que receberam apenas o controle.

Já no grupo de animais que recebeu aspartame na dose de 40mg/kg de massa corpórea, foi possível observar uma diminuição significativa da glicemia de jejum em relação aos animais do grupo controle. Esse resultado sugere que, em longo prazo, o consumo do aspartame se mostrou benéfico neste aspecto.

Segundo Collison e colaboradores (2012), a exposição crônica dos camundongos C57BL/6J ao aspartame (50 mg/kg) e também ao aspartame associado ao glutamato monossódico ocasionou um aumento da glicemia de jejum em 2,3 vezes em relação ao controle. Prokić e colaboradores (2011), ao tratarem camundongos por seis semanas com aspartame na dose de 40 mg/kg/dia, também observaram aumento da glicemia de jejum.

Em trabalho recente, foi reportado que, em modelos animais induzidos à obesidade que foram tratados com suplementação de sacarose ou de adoçantes não nutritivos (compostos por 99% de eritritol e 1% aspartame), os primeiros apresentavam aumento de hiperglicemia, adiposidade e massa corpórea, enquanto que os que receberam a suplementação com adoçantes não nutritivos apresentaram diminuição da hiperglicemia. Os autores concluíram que esses adoçantes promoveram o aumento da adiposidade e da insulina sérica nos animais, quando comparados ao controle, sugerindo que o consumo de adoçantes não nutritivos pode influenciar no metabolismo energético de camundongos com obesidade induzida por dieta, mas que podem ser bons substitutos do açúcar para pessoas que já possuem hiperglicemia (Mitsutomi et al., 2014).

Em relação aos tecidos adiposos analisados dos camundongos estudados neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas das massas em relação aos grupos controle, apesar de ser observada uma clara tendência de aumento do tecido adiposo branco visceral nos camundongos de 13 semanas de idade tratados com aspartame por 30 dias, nas diferentes doses, sendo essa tendência maior para as concentrações de 40 e 80 mg/kg de massa corpórea/dia. Além disso, apesar desse efeito não ser observado nos camundongos de 22 semanas de idade, após o tratamento crônico, foi possível observar, em alguns camundongos, uma maior quantidade de tecido adiposo branco periovariano.

No grupo de 13 semanas de idade, foi observada uma diminuição significativa da massa dos rins dos animais tratados com 40 e 80 mg/kg/dia, em comparação à

massa corpórea dos mesmos. Já no grupo de 22 semanas de idade, tratados por 30 dias, houve um aumento significativo no tamanho dos rins em relação ao controle para os animais tratados com aspartame nas doses de 20 e 80 mg/kg/dia, proporcionalmente ao peso do animal. Nos camundongos tratados com aspartame por 140 dias, também foi observado um aumento significativo nos rins dos animais.

Outros estudos avaliaram o efeito do aspartame sobre os rins também relatando alterações. Martins e Azoubel (2006), avaliando o efeito do aspartame (14 mg/kg/dia) armazenado à temperatura ambiente e de aspartame (14 mg/kg/dia) após aquecimento a 40°C nos rins de fetos de ratos fêmeas tratados do nono ao vigésimo primeiro dia de gestação, observaram que os rins dos animais do grupo que foi tratado com aspartame aquecido a 40°C apresentaram sinais de nefrotoxicidade, como o aumento significativo do volume glomerular e o aumento no tamanho dos núcleos dos tubos proximais e distais em relação ao grupo controle.

Quando observadas variações de massa do coração dos animais, não houve diferenças significativas entre os grupos dos diferentes tipos de tratamento.

Não foram observadas variações na massa adiposa marrom entre os grupos de camundongos tratados com aspartame ou não. O tecido foi retirado da região interescapular, que, segundo Waldén e colaboradores (2012), é o maior depósito de tecido marrom em camundongos, sendo de aproximadamente 220 mg. O tecido adiposo marrom juntamente com o tecido adiposo branco atuam no balanço do metabolismo, regulando consumo e gasto energético, pois ambos compartilham, em escala distinta, a capacidade de sintetizar lipídeos e armazená-los na forma de triglicerídeos (Cypess et al., 2009; Barbatelli et al., 2010; Cannon e Nedergaard., 2004; Lichtenbelt et al., 2009; Fedorenko et al., 2012).

O envelhecimento da pele é um processo contínuo e cumulativo em consequência de mudanças fisiológicas que levam à diminuição da capacidade de regeneração que, conseqüentemente, ocasiona perdas nas propriedades de elasticidade e na pigmentação, causando uma diminuição da espessura da pele e, ainda, a redução do número e da qualidade de colágeno e fibras elásticas (Wölfle et al., 2014).

A epiderme da pele dos camundongos foi avaliada quanto a sua espessura e foi observado que, no grupo de 13 semanas de idade tratado por 30 dias, houve uma tendência de diminuição da espessura da pele dos animais que receberam aspartame. O grupo que recebeu aspartame na dose de 20 mg/kg/dia apresentou

uma média de espessura de 10,93 μm , e o que recebeu a dose de 40 mg/kg/dia apresentou uma epiderme com espessura média de 11,71 μm . Isso representou uma diferença de 2,34 e 1,56 μm entre esses grupos, respectivamente, quando comparados à espessura da epiderme dos animais do grupo controle.

Na derme, foi possível observar que na pele dos animais que foram tratados com aspartame na dose de 40mg/kg de massa corpórea/dia, por 140 dias, houve uma diminuição das papilas dérmicas da pele. O mesmo foi observado na pele dos animais com 13 semanas de vida que foram tratados com a dose de 20mg/kg de massa corpórea/dia por 30 dias. Histologicamente, os efeitos do envelhecimento causado por fatores extrínsecos se manifestam na forma de uma interface plana como perda das papilas dérmicas entre a epiderme e a derme e atrofia dérmica (El-Domyati et al., 2002).

A pele sofre deformações quando submetida a uma força e as maiores responsáveis pela resistência a essas deformações da pele são as fibras elásticas e o colágeno situados na derme (Larrabee, 1986). Produzidas por fibroblastos, as fibras colágenas ficam dispostas de forma paralela à superfície da pele e, juntamente com a epiderme, que é composta por microfilamentos contráteis, conferem força à pele para resistir a trações (Chistolini et al., 1999; Calleja-Agius et al., 2007). Com o envelhecimento, há uma perda da elasticidade da pele. Com exceção do grupo que foi tratado com aspartame desde o desmame por 70 dias (Grupo III), todos os outros grupos (I, II e IV) apresentaram uma tendência de diminuição da espessura da pele dos animais que receberam aspartame em alguma das concentrações, comparados aos do controle. Concordando com esse resultado, também foi observada uma tendência de diminuição na resistência à tração da pele dos camundongos tratados nos Grupos I, III e IV, e na dose de 40 mg/kg/dia no grupo II. Quando avaliada histologicamente, pela coloração de Tricrômio de Masson, foi observado que houve uma tendência de diminuição na porcentagem das fibras colágenas em quase todos os grupos nos quais os animais receberam aspartame em relação aos que receberam controle.

Essas variações não foram estatisticamente diferentes, mas claramente foi observado que a derme dos animais tratados com aspartame apresentou fibras menos densas e dispostas de forma mais irregular quando comparadas com à avaliação histológica do grupo controle, sugerindo uma degradação do colágeno e envelhecimento da pele.

A flacidez da pele e o desenvolvimento de úlceras de pressão em consequência de obesidade resultam de funções dérmicas deficientes, como redução de síntese de colágeno e degradação de proteínas de matriz extracelular (Ezure e Amano, 2011). Ezure e Amano, em trabalhos publicados em 2010, demonstraram que o aumento da camada adiposa subcutânea promove a diminuição da elasticidade dérmica em camundongos e humanos. Em 2007, os autores demonstraram que a adiponectina aumenta a expressão de ácido hialurônico nos fibroblastos dérmicos (Ezure e Amano, 2007), apontando uma importante relação entre a função dérmica e o tecido adiposo subcutâneo. Fazendo uma co-cultura de fibroblastos e adipócitos, Ezure e Amano concluíram que o aumento da camada adiposa na pele pode afetar a função dérmica pela modulação negativa de funções dos fibroblastos, que é feita por moduladores secretados pelos adipócitos de tamanho aumentado, como ocorre com o ácido palmítico que, quando secretado em co-cultura de adipócitos e fibroblastos, diminuiu a proliferação celular, a expressão de colágeno tipo I e de elastina e aumentou a expressão de MMP-13 nos fibroblastos 3T3-L1 (Ezure e Amano, 2011).

Nas últimas décadas, houve um aumento da compreensão da obesidade como uma doença inflamatória e há evidências científicas de que compostos bioativos presentes nos alimentos podem modular mediadores inflamatórios ou pró-inflamatórios (Leite et al., 2009), incluindo adoçantes não nutritivos.

O metanol, produto do metabolismo do aspartame, está intimamente ligado ao estresse oxidativo das células, o que pode induzir a expressão de MMP, que reduziria a concentração e organização de fibras de colágeno na pele, além de promover instalação de processos inflamatórios no organismo.

O equilíbrio entre a produção e a neutralização das espécies reativas de oxigênio é um processo bastante delicado. Em um primeiro momento, a superóxido dismutase reduz o radical superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, em seguida a catalase e a glutathione peroxidase atuam em conjunto para redução do peróxido de hidrogênio à água (Ferreira e Matsubara, 1997; Finkel e Holbrook, 2000; Carochi e Ferreira, 2013). Neste estudo, a atividade do sistema antioxidante da pele foi avaliada por meio da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase. Foi observado que houve um aumento da atividade da SOD no grupo de animais que recebeu aspartame a partir de 13 semanas de vida por 30 dias, em comparação aos que não receberam aspartame. Nesse mesmo grupo, foi observada uma diminuição

significativa da atividade da catalase. Adicionado a isso, foi observado um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica na pele desses mesmos animais (Figura 50). Esse quadro sugere a instalação de um estado de estresse oxidativo na pele desses animais.

Com o intuito de avaliar se o aspartame possuía atividade agonista ao PPAR γ e, no caso de resposta positiva, avaliar sua capacidade na diferenciação de adipócitos, o aspartame foi avaliado com relação à sua citotoxicidade às células mesangiais. Os ensaios de citotoxicidade avaliam a interferência de agentes nos processos metabólicos das células no que diz respeito ao crescimento e morte. São de baixo custo, reprodutíveis e muito utilizados como forma de triagem (Freshney, 2001). De acordo com esse ensaio, o sal amarelo, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), é absorvido pelas células e no interior da célula sofre redução pela enzima succinato desidrogenase, formando, assim, cristais azuis de formazana que podem ser analisados por espectrofotometria UV/VIS (Mosmann, 1983). O resultado apresentado mostra que não houve diferença significativa da viabilidade celular do tratamento com aspartame em relação ao controle, sendo que a maior concentração de aspartame utilizada apresentou média de viabilidade celular de 85,47%. Dessa forma, concluiu-se poder ser utilizada a concentração máxima usada nesse ensaio (100 μ M) para estudos posteriores como a avaliação da atividade agonista em receptores nucleares PPAR γ .

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) atuam na homeostase da glicose, no metabolismo de lipídios e na inflamação (Tavares et al., 2007). Existem três diferentes isoformas de PPAR, α (NR1C1), β (NR1C2) e γ (NR1C3) (Rizzo; Fiorucci, 2006). Esse receptor forma o heterodímero PPAR/RXR e liga-se ao elemento responsivo específico (PPRE/DR-1) e, após recrutar fatores como coativadores, inicia sua transcrição. O PPAR γ é altamente expresso em tecido adiposo branco e marrom. No tecido branco, atua na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, principais componentes desse tecido, e na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas às vias lipogênicas (Rosen et al., 1999; Stumvoll e Häring., 2002; Moraes et al., 2006).

Ativadores do PPAR γ são conhecidos por induzir a diferenciação em adipócitos, é o caso, por exemplo, das tiazolidinadionas, como a rosiglitazona, que se ligam diretamente e ativam esse receptor e também estimulam a adipogênese (Schoonjans, et al., 1996; Gregoire et al., 1998). PPAR γ exerce um papel crucial no

desenvolvimento e na função de células adiposas e, apesar de estar presente em baixas concentrações em células 3T3-L1, é fortemente induzido durante a diferenciação em adipócitos (Chawla, 1994). Os resultados obtidos neste ensaio não mostraram ativação dos receptores nucleares PPAR γ pelo aspartame na concentração de até 1 mM, fato que corrobora o estudo realizado por Pandurangan e colaboradores (2014), que demonstrou que o tratamento de células 3T3-L1 com aspartame promoveu uma diminuição da adipogênese, via redução da fosforilação do PPAR γ . Contudo, foi descrito por Collison e colaboradores (2013) que o aspartame associado ao glutamato monossódico foi capaz de induzir alto nível de deposição de gordura visceral e aumentar a expressão de leptina e TNF- α , citocinas relacionadas ao desenvolvimento da obesidade.

Além disso, Schumacher e colaboradores (2008) já reportaram, por meio de ensaio da luciferase, que a fenilalanina, produto de metabolização do aspartame, a uma concentração de 1.212 μ M, foi capaz de ativar esse receptor nuclear.

O aspartame é um adoçante não nutritivo presente em mais de 6.000 produtos e é consumido mundialmente como substituto para o açúcar, devido não só ao seu poder adoçante, mas também por não conferir conteúdo calórico aos alimentos e bebidas (Bellisle e Drewnowski, 2007; Butchko et al., 2002; Fernstrom, 2015). Com o objetivo de reduzir a ingestão de calorias, o consumo do aspartame aumentou, principalmente entre a população diabética e obesa (Butchko et al., 2002). Entretanto, desde a sua aprovação nos anos de 1980, vêm surgindo preocupações sobre os efeitos adversos que podem ser desencadeados por esse adoçante (Sathyapalan et al., 2015).

A descoberta de que o consumo de adoçantes artificiais não nutritivos, tanto em ratos quanto em seres humanos, pode alterar a microbiota intestinal e, conseqüentemente, pode afetar o peso, induzir resistência à insulina e diabetes tipo 2 levantou dúvidas sobre os benefícios do seu uso (Suez et al., 2014).

Assim, durante este trabalho, uma revisão sistemática com meta-análise de estudos clínicos randomizados encontrados na busca até o dia 13 de abril de 2016 foi feita para avaliar evidências que afirmassem ou negassem uma ligação entre o uso de aspartame e as mudanças nos parâmetros metabólicos na idade adulta. Os resultados encontrados mostraram que o consumo de aspartame não parece influenciar na glicemia de jejum ou na insulina plasmática, uma vez que não houve diferenças nesses parâmetros nem quando o grupo do aspartame foi comparado ao

controle, nem quando comparado à sacarose. Isso pode ter sido atribuído ao fato de ter havido heterogeneidade moderada entre os estudos avaliados, pois eles tinham delineamentos diferentes para a avaliação do consumo de aspartame, que variaram desde uma única dose (Bruce et al., 1987) até o acompanhamento de dois anos de intervenção (Blackburn et al., 1997), além de diferentes critérios de inclusão dos participantes que eram saudáveis, diabéticos ou obesos (Bruce et al., 1987; Colagiuri et al., 1989; Hartel et al., 1993; Maersk et al., 2012a; Sathyapalan et al., 2015; Siegler et al., 2012).

Por isso, de acordo com os resultados sumarizados nesta revisão sistemática, não há evidências dos benefícios ou malefícios relacionados ao consumo de alimentos ou bebidas contendo aspartame sobre a glicemia de jejum e insulina plasmática. Assim, com base nesses resultados, não é possível estabelecer a recomendação do consumo do aspartame para a melhora do controle glicêmico.

Considerando o perfil lipídico (colesterol total, HDL e triglicerídeos), somente os níveis séricos de HDL foram diferentes entre os grupos, sendo mais alto nos grupos que receberam aspartame quando comparados aos que receberam controle e mais baixo quando comparados à sacarose (Colagiuri et al., 1989; Maersk et al., 2012a; Sathyapalan et al., 2015). No entanto, os estudos sobre o perfil lipídico avaliados nesta meta-análise também foram limitados em função do número de participantes incluídos em cada grupo (aspartame, n = 40; e controle, n = 51) e sacarose (aspartame, n = 21; e sacarose, n = 19).

Dentre os estudos clínicos encontrados, o aspartame não promoveu ganho de peso e, em alguns casos, produziu uma diminuição modesta de peso que foi condizente com a redução calórica associada à sua presença na dieta.

O estudo de Kanders e colaboradores (1988) que incluiu indivíduos com sobrepeso e obesos, participantes de um programa de 12 semanas para perda de peso, mostrou que a perda de peso foi maior no grupo que consumiu alimentos e bebidas contendo aspartame. Outro estudo, incluindo mulheres obesas que participaram de um programa multidisciplinar de perda de peso, mostrou maior perda de peso e melhor manutenção do peso no grupo que consumiu alimentos e bebidas adoçadas com aspartame comparado com o grupo em abstinência desse adoçante (Blackburn et al., 1977).

Por outro lado, um estudo observacional publicado em 2008 por Fowler e colaboradores mostrou uma relação dose-dependente positiva entre o consumo de

bebidas adoçadas artificialmente e o ganho de peso em longo prazo. Além disso, os resultados de 381 indivíduos não diabéticos (44% homens e 56% mulheres; com idade de $43,3 \pm 13,2$ anos) em estudo de acompanhamento nutricional mostrou que o consumo de adoçantes artificiais foi correlacionado com alterações nos parâmetros relacionados à síndrome metabólica, incluindo peso corporal e comprometimento da resposta glicêmica levando ao aumento na glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada e diminuição da tolerância à glicose (Suez et al., 2014).

A meta-análise não mostrou diferença significativa entre o peso corporal de indivíduos que ingeriram aspartame comparado com os que ingeriram controle não adoçado ou sacarose. Esses resultados são diferentes dos obtidos nos estudos de De la Hunty (2006) que mostrou redução significativa no peso corporal e consumo de energia quando o consumo de aspartame foi comparado ao controle, com exceção quando a comparação foi realizada com controle não adoçado com sacarose, por exemplo, a água.

De la Hunty (2006) analisou resultados de estudos clínicos randomizados tanto de aspartame separadamente quanto combinado com outros adoçantes, enquanto que a presente meta-análise incluiu apenas os estudos nos quais o aspartame foi avaliado separadamente para melhor observar os efeitos específicos desse adoçante sem a interferência dos resultados obtidos que sejam de outros adoçantes.

A meta-análise de Rogers e colaboradores (2016) mostrou que o consumo de adoçantes de baixa caloria em substituição ao açúcar, em diferentes tempos de tratamento (4 semanas a 40 meses), no geral, leva à redução do consumo energético e do peso corporal em humanos.

Os resultados dos artigos utilizados para avaliar o consumo energético mostraram uma alta heterogeneidade. Somente um estudo, de Lavin e colaboradores (1997), mostrou um aumento significativo na energia ingerida depois do consumo de limonada adoçada com aspartame comparado tanto com limonada adoçada com sacarose quanto com água. Os autores atribuíram esse efeito ao aumento da quantidade de carboidrato consumido que, conseqüentemente, era resultado de uma alta ingestão energética. Swithers (2013) propôs que o consumo de bebidas contendo adoçante artificial contribuiu para o sobrepeso devido a mudanças nos sinais da modulação neural responsável pelo balanço energético, que, conseqüentemente, indicavam que mais açúcar deveria ser consumido.

A qualidade moderada das evidências a partir dos resultados obtidos nesta revisão sistemática com meta-análise deveu-se, principalmente, à heterogeneidade entre os estudos, com exceção de HDL, que mostrou homogeneidade entre os estudos, mas com um baixo número de participantes. Os artigos incluídos apresentaram variações na sua concepção e população de estudo, incluindo pessoas saudáveis, diabéticos e obesos. Além disso, a duração das intervenções variou amplamente, indo desde um único dia até dois anos de intervenção. Além disso, alguns estudos não visavam estudar especificamente os efeitos do consumo de aspartame, mas ele foi usado como um controle e, por essa razão, puderam ser incluídos.

De forma geral, as evidências encontradas na revisão sistemática para avaliação do efeito do aspartame nas variáveis metabólicas associadas ao diabetes e à obesidade são limitadas e não podem apoiar ou refutar um benefício ou malefício relacionado ao consumo desse adoçante artificial.

6. CONCLUSÕES

- O aspartame foi capaz de induzir ganho de peso em animais a partir de 13 semanas de vida quando tratados por 30 dias na dose de 40 mg/kg/dia.
- Foi possível observar uma tendência de diminuição da porcentagem de fibras de colágeno nas peles dos animais de 13 semanas de vida que receberam aspartame por 30 dias, principalmente na dose de 20 mg/kg/dia, e nas peles dos animais que receberam ração suplementada com aspartame por 140 dias.
- O aspartame foi capaz de promover uma tendência de diminuição na elasticidade da pele dos camundongos de 13 semanas de vida que receberam aspartame por 30 dias.
- Os resultados sugerem que o aspartame foi capaz de induzir um quadro de estresse oxidativo, com aumento da peroxidação lipídica observada na pele dos grupos de animais com 13 semanas de idade que receberam aspartame na dose de 20 e 40 mg/kg/dia, por 30 dias, e no grupo dos animais com 22 semanas de idade que receberam aspartame na dose de 20 mg/kg/dia por 30 dias.
- Não foi observado efeito agonista do aspartame sobre o receptor PPAR gama.
- Na revisão sistemática, a avaliação dos resultados do efeito do aspartame sobre variáveis metabólicas relacionadas ao diabetes e à obesidade não foi suficiente para afirmar ou negar os benefícios ou malefícios do consumo desse adoçante na população adulta.

7. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, L.; CHABERT, M.; LOUISSYLVESTRE, J. Cephalic phase responses to sweet taste. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 65, n. 3, p. 737-743, 1997.

ABDEL-SALAM, O. M.; SALEM, N. A.; HUSSEIN, J. S. Effect of aspartame on oxidative stress and monoamine neurotransmitter levels in lipopolysaccharide-treated mice. **Neurotoxicity research**. v. 21, n. 3, p. 245-55, 2012.

ABHILASH, M.; AUGUSTINE, R. Diabetes and Health Care: An overview. **Diabetes Mellitus and Human Health Care: A Holistic Approach to Diagnosis and Treatment**. p. 1, 2014.

ABHILASH, M.; PAUL, M. V. S.; VARGHESE, M. V.; NAIR, R. H. Long-term consumption of aspartame and brain antioxidant defense status. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 36, n. 2, p. 135-140, 2013.

ABHILASH, M.; PAUL, M. V.; VARGHESE, M. V.; NAIR, R. H. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**. v. 49, n. 6, p. 1203-7, 2011.

ABU-TAWEEL, G. M.; ZYADAH, M.; AJAREM, J. S.; AHMAD, M. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 42, p. 60-67, 2014.

ADARAMOYE, O. A.; AKANNI, O. O. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. v. 27, n. 1, p. 29-37, 2016.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.

AL-NUAIMI, Y; SHERRATT, M. J.; GRIFFITHS, C. E. Skin health in older age. **Maturitas**. v. 79, n. 3, p. 256-264, 2014.

ANDRADE, T. A.; IYER, A; DAS, P.K; FOSS, N.T; GARCIA, S.B; COUTINHO-NETTO, J; ORDÃO-JR, A.A; FRADE, M.A. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.v. 44, n. 10, p. 1036-47, 2011.

ANTON, S. D.; MARTIN, C. K.; HAN, H.; COULON, S.; CEFALU, W. T.; GEISELMAN, P.; WILLIAMSON, D. A. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Appetite**. v. 55, n. 1, p. 37-43, 2010.

ASHOK, I.; SHEELADEVI, R.; WANKHAR, D. Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. **Journal of Biomedical Research**. v. 29, n. 5, p. 390, 2015.

BALSHEM, H.; HELFAND, M.; SCHUNEMANN, H. J.; OXMAN, A. D.; KUNZ, R.; BROZEK, J.; VIST, G. E.; FALCK-YTTER, Y.; MEERPOHL, J.; NORRIS, S.; GUYATT, G. H. GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. **Journal of Clinical Epidemiology**. v. 64, n. 4, p. 401-6, 2011.

BARBATELLI, G.; MURANO, I.; MADSEN, L.; HAO, Q.; JIMENEZ, M.; KRISTIANSEN, K.; GIACOBINO, J. P.; DE MATTEIS, R.; CINTI, S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v. 298, n. 6, p. E1244-53, 2010.

BASU, S.; VELLAKKAL, S.; AGRAWAL, S.; STUCKLER, D.; POPKIN, B.; EBRAHIM, S. Averting obesity and type 2 diabetes in India through sugar-sweetened beverage taxation: an economic-epidemiologic modeling study. **PLoS Med**. v. 11, n. 1, p. e1001582, 2014.

BAUMANN, L. Skin ageing and its treatment. **The Journal of Pathology**. v. 211, n. 2, p. 241-51, 2007.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.

BHANDARY, B.; MARAHATTA, A.; KIM, H.-R.; CHAE, H.-J. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 1, p. 434-456, 2012.

BIRCH-MACHIN, M. A.; RUSSELL, E. V.; LATIMER, J. A. Mitochondrial DNA damage as a biomarker for ultraviolet radiation exposure and oxidative stress. **The British Journal of Dermatology**. v. 169 Suppl 2, p. 9-14, 2013.

BLACK, R. M.; LEITER, L. A.; ANDERSON, G. H. Consuming aspartame with and without taste - Differential-effects on appetite and food-intake of young-adult males. **Physiology & Behavior**. v. 53, n. 3, p. 459-466, 1993.

BLACK, R. M.; TANAKA, P.; LEITER, L. A.; ANDERSON, G. H. Soft drinks with aspartame: effect on subjective hunger, food selection, and food intake of young adult males. **Physiology & Behavior**. v. 49, n. 4, p. 803-10, 1991.

BLACKBURN, G. L.; KANDERS, B. S.; LAVIN, P. T.; KELLER, S. D.; WHATLEY, J. The effect of aspartame as part of a multidisciplinary weight-control program on short- and long-term control of body weight. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 65, n. 2, p. 409-18, 1997.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative

regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**. v. 20, n. 3, p. 161-8, 2010.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008**. Brasília: Diário Oficial da União. Seção 1, p 30-31 2008.

_____. **Ministério da Saúde**. Vigitel 2014: Obesidade estabiliza no Brasil, mas excesso de peso aumenta. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/vs/noticias-svs/17455-obesidade-estabiliza-no-brasil-mas-excesso-de-peso-aumenta>. 2014. Acessado em 13/04/2016.

BRUCE, D. G.; STORLIEN, L. H.; FURLER, S. M.; CHISHOLM, D. J. Cephalic phase metabolic responses in normal weight adults. **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 36, n. 8, p. 721-5, 1987.

BRYANT, C. E.; WASSE, L. K.; ASTBURY, N.; NANDRA, G.; MCLAUGHLIN, J. T. Non-nutritive sweeteners: no class effect on the glycaemic or appetite responses to ingested glucose. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, n. 5, p. 629-31, 2014.

BUTCHKO, H. H.; STARGEL, W. W.; COMER, C. P.; MAYHEW, D. A.; BENNINGER, C.; BLACKBURN, G. L.; DE SONNEVILLE, L. M. J.; GEHA, R. S.; HERTELENDY, Z.; KOESTNER, A.; LEON, A. S.; LIEPA, G. U.; MCMARTIN, K. E.; MENDENHALL, C. L.; MUNRO, I. C.; NOVOTNY, E. J.; RENWICK, A. G.; SCHIFFMAN, S. S.; SCHOMER, D. L.; SHAYWITZ, B. A.; SPIERS, P. A.; TEPHLY, T. R.; THOMAS, J. A.; TREFZ, F. K. Aspartame: Review of safety. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 35, n. 2, p. S1-S93, 2002.

CALLAGHAN, T. M.; WILHELM, K. P. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part 2: Clinical perspectives and clinical methods in the evaluation of ageing skin. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 30, n. 5, p. 323-32, 2008.

CALLEJA-AGIUS, J.; MUSCAT-BARON, Y.; BRINCAT, M. P. Skin ageing. **British Menopause Society Journal**. v. 13, n. 2, p. 60-64, 2007.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 9, n. 6, p. 737-43, 2009.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**. v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**. v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, P. T.; MAZZER, N.; DOS REIS, F. A.; BELCHIOR, A. C.; SILVA, I. S. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**. v. 21, n. 3, p. 177-83, 2006.

CHAWLA, A.; SCHWARZ, E. J.; DIMACULANGAN, D. D.; LAZAR, M. A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. **Endocrinology**. v. 135, n. 2, p. 798-800, 1994.

CHEN, S. K.; HSU, C. H.; TSAI, M. L.; CHEN, R. H.; DRUMMEN, G. P. Inhibition of oxidative stress by low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups in skin fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 10, p. 19399-415, 2013.

CHISTOLINI, P.; DE ANGELIS, G.; DE LUCA, M.; PELLEGRINI, G.; RUSPANTINI, I. Analysis of the mechanical properties of in vitro reconstructed epidermis: preliminary results. **Medical & Biological Engineering & Computing**. v. 37, n. 5, p. 670-2, 1999.

COLAGIURI, S.; MILLER, J. J.; EDWARDS, R. A. Metabolic effects of adding sucrose and aspartame to the diet of subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **The American journal of clinical nutrition**. v. 50, n. 3, p. 474-8, 1989.

COLLISON, K. S.; MAKHOUL, N. J.; ZAIDI, M. Z.; INGLIS, A.; ANDRES, B. L.; UBUNGEN, R.; SALEH, S.; AL-MOHANNA, F. A. Prediabetic changes in gene expression induced by aspartame and monosodium glutamate in Trans fat-fed C57Bl/6 J mice. **Nutrition & Metabolism**. v. 10, p. 44, 2013.

COLLISON, K. S.; MAKHOUL, N. J.; ZAIDI, M. Z.; SALEH, S. M.; ANDRES, B.; INGLIS, A., . . . AL-MOHANNA, F. A. Gender dimorphism in aspartame-induced impairment of spatial cognition and insulin sensitivity. **PloS one**. v. 7, n. 4, p. e31570, 2012.

COPPOLA, L.; COPPOLA, A.; GRASSIA, A.; MASTROLORENZO, L.; LETTIERI, B.; DE LUCIA, D.; DE NANZIO, A.; GOMBOS, G. Acute hyperglycemia alters von Willebrand factor but not the fibrinolytic system in elderly subjects with normal or impaired glucose tolerance. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. v. 15, n. 8, p. 629-635, 2004.

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**. v. 3, n. 3, p. 207-215, 2015.

CYPESS, A. M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; TAL, I.; RODMAN, D.; GOLDFINE, A. B.; KUO, F. C.; PALMER, E. L.; TSENG, Y. H.; DORIA, A.; KOLODNY, G. M.; KAHN, C. R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 15, p. 1509-17, 2009.

DANBY, F. W. Nutrition and aging skin: sugar and glycation. **Clinics in Dermatology**. v. 28, n. 4, p. 409-11, 2010.

DE CARVALHO, A.; SILVA, V.; GRANDE, A. Avaliação do risco de viés de ensaios clínicos randomizados pela ferramenta da colaboração Cochrane. **Revista Diagnóstico e Tratamento**. v. 18, p. 38-44, 2013.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2010.

DE LA HUNTY, A.; GIBSON, S.; ASHWELL, M. A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control. **Nutrition Bulletin**. v. 31, n. 2, p. 115-128, 2006.

DEEKS, J.; HIGGINS, J.; ALTMAN, D.; GREEN, S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1. 0 [updated March 2011]. **The Cochrane Collaboration**. 2011.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**. v. 449, n. 7164, p. 811-818, 2007.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**. v. 7, n. 8, p. 504-11, 2011.

DOBREV, H. Use of Cutometer to assess epidermal hydration. **Skin Research and Technology** . v. 6, n. 4, p. 239-244, 2000.

DOROKHOV, Y. L.; SHINDYAPINA, A. V.; SHESHUKOVA, E. V.; KOMAROVA, T. V. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. **Physiological Reviews**. v. 95, n. 2, p. 603-44, 2015.

DREWNOWSKI, A.; MASSIEN, C.; LOUIS-SYLVESTRE, J.; FRICKER, J.; CHAPELOT, D.; APFELBAUM, M. Comparing the effects of aspartame and sucrose on motivational ratings, taste preferences, and energy intakes in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 59, n. 2, p. 338-45, 1994.

DUCA, F. A.; LAM, T. K. Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance. **Diabetes, obesity & metabolism**. v. 16 Suppl 1, p. 68-76, 2014.

EFSA, ANS. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. **EFSA Journal**.n. 11, v.12,p.:3496, 2013.

EL-DOMYATI, M.; ATTIA, S.; SALEH, F.; BROWN, D.; BIRK, D. E.; GASPARRO, F.; AHMAD, H.; UITTO, J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. **Experimental Dermatology**. v. 11, n. 5, p. 398-405, 2002.

EZURE, T.; AMANO, S. Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. **BioFactors**. v. 31, n. 3-4, p. 229-36, 2007.

EZURE, T.; AMANO, S. Adiponectin and leptin up-regulate extracellular matrix production by dermal fibroblasts. **BioFactors**. v. 31, n. 3-4, p. 229-36, 2007.

_____. Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. **Experimental Dermatology**. v. 19, n. 10, p. 878-82, 2010.

_____. Negative regulation of dermal fibroblasts by enlarged adipocytes through release of free fatty acids. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 131, n. 10, p. 2004-9, 2011.

FANJUL-FERNANDEZ, M.; FOLGUERAS, A. R.; CABRERA, S.; LOPEZ-OTIN, C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1803, n. 1, p. 3-19, 2010.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 30, n. 2, p. 87-95, 2008.

FEDORENKO, A.; LISHKO, P. V.; KIRICHOK, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. **Cell**. v. 151, n. 2, p. 400-13, 2012.

FEIJO FDE, M.; BALLARD, C. R.; FOLETTI, K. C.; BATISTA, B. A.; NEVES, A. M.; RIBEIRO, M. F.; BERTOLUCI, M. C. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. **Appetite**. v. 60, n. 1, p. 203-7, 2013.

FENSKE, N. A.; LOBER, C. W. Structural and functional changes of normal aging skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 15, n. 4 Pt 1, p. 571-85, 1986.

FERNSTROM, J. D. Non-nutritive sweeteners and obesity. **Annual Review of Food Science and Technology**. v. 6, p. 119-136, 2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997.

FINAMOR, I. A.; OURIQUE, G. M.; PÊS, T. S.; SACCOL, E. M.; BRESSAN, C. A.; SCHEID, T.; BALDISSEROTTO, B.; LLESUY, S. F.; PARTATA, W. A.; PAVANATO, M. A. The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. **Neurochemical research**. v. 39, n. 9, p. 1681-1690, 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, n. 6809, p. 239-47, 2000.

FISHER, G. J.; WANG, Z. Q.; DATTA, S. C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **The New England journal of medicine**. v. 337, n. 20, p. 1419-28, 1997.

FLOOD, J. E.; ROE, L. S.; ROLLS, B. J. The effect of increased beverage portion size on energy intake at a meal. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 106, n. 12, p. 1984-1990, 2006.

FOLETTI, K. C.; BATISTA, B. A. M.; NEVES, A. M.; DE MATOS FEIJÓ, F.; BALLARD, C. R.; RIBEIRO, M. F. M.; BERTOLUCI, M. C. Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. **Appetite**. v. 96, p. 604-610, 2016.

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**. v. 16, n. 8, p. 1894-1900, 2008.

FRANKENFELD, C. L.; SIKAROODI, M.; LAMB, E.; SHOEMAKER, S.; GILLEVET, P. M. High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States. **Annals of Epidemiology**. v. 25, n. 10, p. 736-42 e4, 2015.

FRANSEN, M.; NORDGREN, M.; WANG, B.; APANASETS, O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**. v. 1822, n. 9, p. 1363-1373, 2012.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**. v. 17, n. 4-5, p. 213-30, 2001.

GARCIA-ALMEIDA, J. M.; CASADO FDEZ, G. M.; GARCIA ALEMAN, J. [A current and global review of sweeteners. Regulatory aspects]. **Nutricion Hospitalaria**. v. 28 Suppl 4, p. 17-31, 2013.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**. v. 312, n. 5778, p. 1355-9, 2006.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**. v. 78, n. 3, p. 783-809, 1998.

GREMBECKA, M.; SZEFER, P. Simultaneous determination of caffeine and aspartame in diet supplements and non-alcoholic beverages using liquid-chromatography coupled to Corona CAD and UV-DAD detectors. **Food Analytical Methods**. v. 5, n. 5, p. 1010-1017, 2012.

GUH, D. P.; ZHANG, W.; BANSBACK, N.; AMARSI, Z.; BIRMINGHAM, C. L.; ANIS, A. H. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. **BMC public health**. v. 9, n. 1, p. 1, 2009.

HALL, W. L.; MILLWARD, D. J.; ROGERS, P. J.; MORGAN, L. M. Physiological mechanisms mediating aspartame-induced satiety. **Physiology & Behavior**. v. 78, n. 4-5, p. 557-562, 2003.

HAN, H. S.; KWON, Y. J.; PARK, M. S.; PARK, S. H.; CHO, S. M.; RHO, Y. S.; KIM, J. W.; SIN, H. S.; UM, S. J. Efficacy validation of synthesized retinol derivatives in vitro: stability, toxicity, and activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 11, n. 17, p. 3839-3845, 2003.

HARRIS, K.; KASSIS, A.; MAJOR, G.; CHOU, C. J. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? **Journal of Obesity**. v. 2012, 2012.

HARTEL, B.; GRAUBAUM, H. J.; SCHNEIDER, B. INFLUENCE OF INTENSE SWEETENER SOLUTIONS ON INSULIN-SECRETION AND BLOOD-GLUCOSE LEVEL. **Ernahrungs-Umschau**. v. 40, n. 4, p. 152-155, 1993.

HIGGINS, J. P.; GREEN, S. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions**. Wiley Online Library, 2008.

HILL, S. E.; PROKOSCH, M. L.; MORIN, A.; RODEHEFFER, C. D. The effect of non-caloric sweeteners on cognition, choice, and post-consumption satisfaction. **Appetite**. v. 83, p. 82-88, 2014.

HORWITZ, D. L.; MCLANE, M.; KOBE, P. Response to single dose of aspartame or saccharin by NIDDM patients. **Diabetes Care**. v. 11, n. 3, p. 230-4, 1988.

HOTCHKISS, R. D. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. **Archives of Biochemistry**. v. 16, n. 1, p. 131-41, 1948.

HULL, M. T.; WARFEL, K. A. Age-related changes in the cutaneous basal lamina: scanning electron microscopic study. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 81, n. 4, p. 378-80, 1983.

HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDE, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 62, n. 4, p. 451-62, 2008.

IBRAHIM, O. O. High intensity sweeteners chemicals structure, properties and applications. **Natural Science and Discovery**. v. 1, n. 4, p. 88-94, 2015.

JACOB, S. E.; STECHSCHULTE, S. Formaldehyde, aspartame, and migraines: a possible connection. **Dermatitis**. v. 19, n. 3, p. E10-1, 2008.

JAIN, T.; GROVER, K. Sweeteners in Human Nutrition. **International Journal of Health Sciences and Research (IJHSR)**. v. 5, n. 5, p. 439-451, 2015.

KANDERS, B. S.; LAVIN, P. T.; KOWALCHUK, M. B.; GREENBERG, I.; BLACKBURN, G. L. An evaluation of the effect of aspartame on weight loss. **Appetite**. v. 11 Suppl 1, p. 73-84, 1988.

KIM, H. H.; LEE, M. J.; LEE, S. R.; KIM, K. H.; CHO, K. H.; EUN, H. C.; CHUNG, J. H. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 126, n. 11, p. 1170-7, 2005.

KOHL, E.; STEINBAUER, J.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Skin ageing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v. 25, n. 8, p. 873-884, 2011.

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, n. 2, p. 35-47, 2006.

KRUK, J.; DUCHNIK, E. Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 15, n. 2, p. 561-8, 2014.

KRUTMANN, J.; SCHROEDER, P. Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. **The journal of Investigative Dermatology**. v. 14, n. 1, p. 44-9, 2009.

KUZMA, J. N.; CROMER, G.; HAGMAN, D. K.; BREYMEYER, K. L.; ROTH, C. L.; FOSTER-SCHUBERT, K. E.; HOLTE, S. E.; CALLAHAN, H. S.; WEIGLE, D. S.; KRATZ, M. No difference in ad libitum energy intake in healthy men and women consuming beverages sweetened with fructose, glucose, or high-fructose corn syrup: a randomized trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 102, n. 6, p. 1373-80, 2015.

KYRIAKIDES, T. R.; WULSIN, D.; SKOKOS, E. A.; FLECKMAN, P.; PIRRONE, A.; SHIPLEY, J. M.; SENIOR, R. M.; BORNSTEIN, P. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. **Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology**. v. 28, n. 2, p. 65-73, 2009.

LANA, A.; RODRÍGUEZ-ARTALEJO, F.; LOPEZ-GARCIA, E. Consumption of sugar-sweetened beverages is positively related to insulin resistance and higher plasma leptin concentrations in men and nonoverweight women. **The Journal of Nutrition**. v. 144, n. 7, p. 1099-1105, 2014.

LAPIERRE, K. A.; GREENBLATT, D. J.; GODDARD, J. E.; HARMATZ, J. S.; SHADER, R. I. The neuropsychiatric effects of aspartame in normal volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 30, n. 5, p. 454-60, 1990.

LARRABEE, W. F., JR.; GALT, J. A. A finite element model of skin deformation. III. The finite element model. **The Laryngoscope**. v. 96, n. 4, p. 413-9, 1986.

LAVIN, J.; FRENCH, S.; READ, N. The effect of sucrose-and aspartame-sweetened drinks on energy intake, hunger and food choice of female, moderately restrained eaters. **International Journal of Obesity**. v. 21, n. 1, p. 37-42, 1997.

LECOMTE, V.; KAAKOUSH, N. O.; MALONEY, C. A.; RAIPURIA, M.; HUINAO, K. D.; MITCHELL, H. M.; MORRIS, M. J. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. **PloS one**. v. 10, n. 5, p. e0126931, 2015.

LEITE, L. D.; DE MEDEIROS ROCHA, É. D.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Ciência & Saúde**. v. 2, n. 2, p. 85-95, 2010.

LEON, A. S.; HUNNINGHAKE, D. B.; BELL, C.; RASSIN, D. K.; TEPHLY, T. R. Safety of long-term large doses of aspartame. **Archives of Internal Medicine**. v. 149, n. 10, p. 2318-24, 1989.

LEY, R. E. Obesity and the human microbiome. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 26, n. 1, p. 5-11, 2010.

LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, n. 31, p. 11070-11075, 2005.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**. v. 124, n. 4, p. 837-848, 2006.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**. v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, 2006a.

LIANG, F. Q.; GODLEY, B. F. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. **Experimental Eye Research**. v. 76, n. 4, p. 397-403, 2003.

LOFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **The European Respiratory Journal**. v. 38, n. 1, p. 191-208, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological Interactions**. v. 224, p. 164-175, 2014.

MAERSK, M.; BELZA, A.; HOLST, J. J.; FENGER-GRON, M.; PEDERSEN, S. B.; ASTRUP, A.; RICHELSEN, B. Satiety scores and satiety hormone response after

sucrose-sweetened soft drink compared with isocaloric semi-skimmed milk and with non-caloric soft drink: a controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 66, n. 4, p. 523-9, 2012.

MAERSK, M.; BELZA, A.; STODKILDE-JORGENSEN, H.; RINGGAARD, S.; CHABANOVA, E.; THOMSEN, H.; PEDERSEN, S. B.; ASTRUP, A.; RICHELSEN, B. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. **The American journal of clinical nutrition**. v. 95, n. 2, p. 283-9, 2012a.

MAGNUSON, B. A.; BURDOCK, G. A.; DOULL, J.; KROES, R. M.; MARSH, G. M.; PARIZA, M. W.; SPENCER, P. S.; WADDELL, W. J.; WALKER, R.; WILLIAMS, G. M. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 37, n. 8, p. 629-727, 2007.

MALLORY, F. B. **Pathological Technique: A practical manual for workers in pathological histology including directions for the performance of autopsies and for microphotography**. Hafner Pub. Co., 1961.

MARCZINSKI, C. A.; STAMATES, A. L. Artificial sweeteners versus regular mixers increase breath alcohol concentrations in male and female social drinkers. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 37, n. 4, p. 696-702, 2013.

MARTINS, M. R. I.; AZOUBEL, R. Efeitos do aspartame no rim fetal de ratos—estudo cariométrico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v. 28, n. 3, p. 151-7, 2006.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **Journal of Dermatological Science**. v. 58, n. 2, p. 85-90, 2010.

MATTES, R. D.; POPKIN, B. M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 89, n. 1, p. 1-14, 2009.

MATTES, R. Effects of aspartame and sucrose on hunger and energy intake in humans. **Physiology & Behavior**. v. 47, n. 6, p. 1037-44, 1990.

MELANSON, K. J.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S.; CAMPFIELD, L. A.; SARIS, W. H. M. Blood glucose and meal patterns in time-blinded males, after aspartame, carbohydrate, and fat consumption, in relation to sweetness perception. **British Journal of Nutrition**. v. 82, n. 6, p. 437-446, 1999.

MITSUMI, K.; MASAKI, T.; SHIMASAKI, T.; GOTOH, K.; CHIBA, S.; KAKUMA, T.; SHIBATA, H. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 63, n. 1, p. 69-78, 2014.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Annals of Internal Medicine**. v. 151, n. 4, p. 264-269, 2009.

MOINZADEH, P.; DENTON, C. P.; ABRAHAM, D.; ONG, V.; HUNZELMANN, N.; ECKES, B.; KRIEG, T. Biomarkers for skin involvement and fibrotic activity in scleroderma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v. 26, n. 3, p. 267-76, 2012.

MOLLER, S. E. Effect of aspartame and protein, administered in phenylalanine-equivalent doses, on plasma neutral amino acids, aspartate, insulin and glucose in man. **Pharmacology & toxicology**. v. 68, n. 5, p. 408-12, 1991.

MOORE, S. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 243, n. 23, p. 6281-3, 1968.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 110, n. 3, p. 371-85, 2006.

MORENO-INDIAS, I.; CARDONA, F.; TINAHONES, F. J.; QUEIPO-ORTUNO, M. I. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Frontiers in Microbiology**. v. 5, p. 190, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURAD, I. M.; NOOR, N. A. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. **International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences**. v. 2, n. 1, p. 4-10, 2011.

MOURAD, M. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 5, n. 6, p. 678-862, 2011.

MURRAY, S.; TULLOCH, A.; CRISCITELLI, K.; AVENA, N. M. Recent studies of the effects of sugars on brain systems involved in energy balance and reward: Relevance to low calorie sweeteners. **Physiology & Behavior**. 2016.

NASCIMENTO, A. P.; COSTA, A. M. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. **The British Journal of Nutrition**. v. 96, n. 6, p. 1069-77, 2006.

NEHRLING, J. K.; KOBE, P.; MCLANE, M. P.; OLSON, R. E.; KAMATH, S.; HORWITZ, D. L. Aspartame use by persons with diabetes. **Diabetes Care**. v. 8, n. 5, p. 415-7, 1985.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OKUNO, G.; KAWAKAMI, F.; TAKO, H.; KASHIHARA, T.; SHIBAMOTO, S.; YAMAZAKI, T.; YAMAMOTO, K.; SAEKI, M. Glucose tolerance, blood lipid, insulin and glucagon concentration after single or continuous administration of aspartame in diabetics. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 2, n. 1, p. 23-7, 1986.

PALMNAS, M. S.; COWAN, T. E.; BOMHOF, M. R.; SU, J.; REIMER, R. A.; VOGEL, H. J.; HITTEL, D. S.; SHEARER, J. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. **PloS one**. v. 9, n. 10, p. e109841, 2014.

PANDURANGAN, M.; PARK, J.; KIM, E. Aspartame downregulates 3T3-L1 differentiation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**. v. 50, n. 9, p. 851-7, 2014.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**. v. 4, n. 8, p. 617-29, 2004.

PARTHASARATHY, N. J.; KUMAR, R. S.; MANIKANDAN, S.; NARAYANAN, G. S.; KUMAR, R. V.; DEVI, R. S. Effect of methanol-induced oxidative stress on the neuroimmune system of experimental rats. **Chemico-Biological Interactions**. v. 161, n. 1, p. 14-25, 2006.

PATTERSON, E.; O'DOHERTY, R. M.; MURPHY, E. F.; WALL, R.; O'SULLIVAN, O.; NILAWEERA, K.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. **British Journal of Nutrition**. v. 111, n. 11, p. 1905-1917, 2014.

POLJŠAK, B.; DAHMANE, R. Free radicals and extrinsic skin aging. **Dermatology Research and Practice**. v. 2012, 2012.

PORIKOS, K. P.; HESSER, M. F.; VAN ITALLIE, T. B. Caloric regulation in normal-weight men maintained on a palatable diet of conventional foods. **Physiology & Behavior**. v. 29, n. 2, p. 293-300, 1982.

PROKIC, M. D.; PAUNOVIC, M. G.; MATIC, M. M.; DJORDJEVIC, N. Z.; OGNJANOVIC, B. I.; STAJN, A. S.; SAICIC, Z. S. Prooxidative effects of aspartame on antioxidant defense status in erythrocytes of rats. **Journal of Biosciences**. v. 39, n. 5, p. 859-66, 2014.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; BORK, P.; EHRLICH, S. D.A

human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.

QUAN, T.; QIN, Z.; XIA, W.; SHAO, Y.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 14, n. 1, p. 20-4, 2009.

REID, M.; HAMMERSLEY, R. The effects of sugar on subsequent eating and mood in obese and non-obese women. **Psychology, Health and Medicine**. v. 3, n. 3, p. 299-313, 1998.

REID, M.; HAMMERSLEY, R.; DUFFY, M. Effects of sucrose drinks on macronutrient intake, body weight, and mood state in overweight women over 4 weeks. **Appetite**. v. 55, n. 1, p. 130-136, 2010.

REID, M.; HAMMERSLEY, R.; DUFFY, M.; BALLANTYNE, C. Effects on obese women of the sugar sucrose added to the diet over 28 d: a quasi-randomised, single-blind, controlled trial. **The British Journal of Nutrition**. v. 111, n. 3, p. 563-70, 2014.

REID, M.; HAMMERSLEY, R.; HILL, A. J.; SKIDMORE, P. Long-term dietary compensation for added sugar: effects of supplementary sucrose drinks over a 4-week period. **The British Journal of Nutrition**. v. 97, n. 1, p. 193-203, 2007.

RENWICK, A.; NORDMANN, H. First European conference on aspartame: Putting safety and benefits into perspective. Synopsis of presentations and conclusions. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, n. 7, p. 1308-1313, 2007.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

RIES, C.; POPP, T.; EGEA, V.; KEHE, K.; JOCHUM, M. Matrix metalloproteinase-9 expression and release from skin fibroblasts interacting with keratinocytes: Upregulation in response to sulphur mustard. **Toxicology**. v. 263, n. 1, p. 26-31, 2009.

RINNERTHALER, M.; BISCHOF, J.; STREUBEL, M. K.; TROST, A.; RICHTER, K. Oxidative stress in aging human skin. **Biomolecules**. v. 5, n. 2, p. 545-589, 2015.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing Research Reviews**. v. 1, n. 4, p. 705-720, 2002.

RIZZO, G.; FIORUCCI, S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 6, n. 4, p. 421-7, 2006.

ROBERTS, J. R. The paradox of artificial sweeteners in managing obesity. **Current Gastroenterology Reports**. v. 17, n. 1, p. 1-3, 2015.

RODIN, J. Comparative effects of fructose, aspartame, glucose, and water preloads on calorie and macronutrient intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 51, n. 3, p. 428-35, 1990.

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 & Behavior**. v. 43, n. 5, p. 547-52, 1988.

ROGERS, P.; HOGENKAMP, P.; DE GRAAF, C.; HIGGS, S.; LLUCH, A.; NESS, A.; PENFOLD, C.; PERRY, R.; PUTZ, P.; YEOMANS, M. Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. **International Journal of Obesity**. v. 40, n. 3, p. 381-394, 2016.

ROGERS, P. J.; KEEDWELL, P.; BLUNDELL, J. E. Further analysis of the short-term inhibition of food intake in humans by the dipeptide L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (aspartame). **Physiology & Behavior**. v. 49, n. 4, p. 739-743, 1991.

ROGERS, P. J.; PLEMING, H. C.; BLUNDELL, J. E. Aspartame ingested without tasting inhibits hunger and food intake. **Physiology & Behavior**. v. 47, n. 6, p. 1239-43, 1990.

ROSEN, E. D.; SARRAF, P.; TROY, A. E.; BRADWIN, G.; MOORE, K.; MILSTONE, D. S.; SPIEGELMAN, B. M.; MORTENSEN, R. M. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular Cell**. v. 4, n. 4, p. 611-7, 1999.

RYAN-HARSHMAN, M.; LEITER, L. A.; ANDERSON, G. H. Phenylalanine and aspartame fail to alter feeding behavior, mood and arousal in men. **Physiology & Behavior**. v. 39, n. 2, p. 247-53, 1987.

RYCERZ, K.; JAWORSKA-ADAMU, J. E. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. **Folia Neuropathologica**. v. 51, n. 1, p. 10-7, 2013.

SARIS, W. H.; TARNOPOLSKY, M. A. Controlling food intake and energy balance: which macronutrient should we select? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 6, n. 6, p. 609-613, 2003.

SATHYAPALAN, T.; THATCHER, N. J.; HAMMERSLEY, R.; RIGBY, A. S.; PECHLIVANIS, A.; GOODERHAM, N. J.; HOLMES, E.; LE ROUX, C. W.; ATKIN, S. L.; COURTS, F. Aspartame sensitivity? A double blind randomised crossover study. **PloS one**. v. 10, n. 3, 2015.

SAUNDERS, C.; PADILHA, P. D. C.; LIMA, H. T. D.; OLIVEIRA, L. M. D.; THEME, M. L. M. Revisão da literatura sobre recomendações de utilização de edulcorantes em gestantes portadoras de diabetes mellitus. **Femina**. v. 38, n. 4, 2010.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BRENNISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**. v. 35, n. 3, p. 307-16, 2000.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochimica et Biophysica acta**. v. 1302, n. 2, p. 93-109, 1996.

SCHULZE, M. B.; MANSON, J. E.; LUDWIG, D. S.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. **Journal of the American Medical Association**. v. 292, n. 8, p. 927-934, 2004.

SCHUMACHER, U.; LUKACS, Z.; KALTSCHMIDT, C.; FREUDLSPERGER, C.; SCHULZ, D.; KOMPISCH, K.; MULLER, R.; RUDOLPH, T.; SANTER, R.; LORKE, D. E.; ULLRICH, K. High concentrations of phenylalanine stimulate peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for the pathophysiology of phenylketonuria. **Neurobiology of Disease**. v. 32, n. 3, p. 385-90, 2008.

SCHUNEMANN, H.; BROZEK, J.; OXMAN, A. GRADE handbook for grading quality of evidence and strength of recommendation. **British Medical Journal**. v. 336, n.7653, p. 1106-10, 2008.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**. v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

SIEGLER, J.; HOWELL, K.; VINCE, R.; BRAY, J.; TOWLSON, C.; PEART, D.; MELLOR, D.; ATKIN, S. Aspartame in conjunction with carbohydrate reduces insulin levels during endurance exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 9, n. 1, p. 36, 2012.

SILVERBERG, J. I.; KLEIMAN, E.; LEV-TOV, H.; SILVERBERG, N. B.; DURKIN, H. G.; JOKS, R.; SMITH-NOROWITZ, T. A. Association between obesity and atopic dermatitis in childhood: a case-control study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 127, n. 5, p. 1180-1186. e1, 2011.

SINGLETON, M. J.; HEISER, C.; JAMESSEN, K.; MATTES, R. D. Sweetener augmentation of serum triacylglycerol during a fat challenge test in humans. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 18, n. 2, p. 179-85, 1999.

SMEETS, P. A.; DE GRAAF, C.; STAFLEU, A.; VAN OSCH, M. J.; VAN DER GROND, J. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. **American Society for Clinical Nutrition**. v. 82, n. 5, p. 1011-6, 2005.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; DEGLI ESPOSTI, D.; LAMBERTINI, L.; TIBALDI, E.; RIGANO, A. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, n. 3, p. 379-85, 2006.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; TIBALDI, E.; ESPOSTI, D. D.; LAURIOLA, M. Life-span exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, n. 9, p. 1293-7, 2007.

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

SPANEL, P.; DRYAHINA, K.; VICHERKOVA, P.; SMITH, D. Increase of methanol in exhaled breath quantified by SIFT-MS following aspartame ingestion. **Journal of Breath Research**. v. 9, n. 4, p. 047104, 2015.

STEINERT, R. E.; FREY, F.; TÖPFER, A.; DREWE, J.; BEGLINGER, C. Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. **British Journal of Nutrition**. v. 105, n. 09, p. 1320-1328, 2011.

STERN, S. B.; BLEICHER, S. J.; FLORES, A.; GOMBOS, G.; RECITAS, D.; SHU, J. Administration of aspartame in non-insulin-dependent diabetics. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences** .. v. 2, n. 2, p. 429-39, 1976.

STUMVOLL, M.; HARING, H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. **Diabetes**. v. 51, n. 8, p. 2341-7, 2002.

SUEZ, J.; KOREM, T.; ZEEVI, D.; ZILBERMAN-SCHAPIRA, G.; THAISS, C. A.; MAZA, O.; ISRAELI, D.; ZMORA, N.; GILAD, S.; WEINBERGER, A. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**. v. 514, n. 7521, p. 181-186, 2014.

SWITHERS, S. E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 24, n. 9, p. 431-41, 2013.

SWITHERS, S. E.; DAVIDSON, T. L. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. **Behavioral Neuroscience**. v. 122, n. 1, p. 161, 2008.

SYLVETSKY, A. C.; BLAU, J. E.; ROTHER, K. I. Understanding the metabolic and health effects of low-calorie sweeteners: methodological considerations and implications for future research. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**. p. 1-8, 2016.

TAP, J.; MONDOT, S.; LEVENEZ, F.; PELLETIER, E.; CARON, C.; FURET, J. P.; UGARTE, E.; MUÑOZ-TAMAYO, R.; PASLIER, D. L.; NALIN, R. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. **Environmental Microbiology**. v. 11, n. 10, p. 2574-2584, 2009.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 51, n. 4, p. 526-33, 2007.

TEMIZKAN, S.; DEYNELI, O.; YASAR, M.; ARPA, M.; GUNES, M.; YAZICI, D.; SIRIKCI, O.; HAKLAR, G.; IMERYUZ, N.; YAVUZ, D. G. Sucralose enhances GLP-1 release and lowers blood glucose in the presence of carbohydrate in healthy subjects but not in patients with type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 69, n. 2, p. 162-6, 2015.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; AGEE, K. A.; HOSHIKA, T.; UCHIYAMA, T.; TJADERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; THOMPSON, J. M.; MCCRACKEN, C. E.; LOONEY, S. W.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Inhibition of MMPs by alcohols. **Dental materials**. v. 27, n. 9, p. 926-33, 2011.

U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. National Institutes of Health. **Ntp Technical Report on the Toxicity Studies of Aspartame** (Case No. 22839-47-0); U.S. GPO: Washington, DC, 2003.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; VANHOMMERIG, J. W.; SMULDERS, N. M.; DROSSAERTS, J. M.; KEMERINK, G. J.; BOUVY, N. D.; SCHRAUWEN, P.; TEULE, G. J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 15, p. 1500-8, 2009.

VAN OLDEN, C.; GROEN, A. K.; NIEUWDORP, M. Role of intestinal microbiome in lipid and glucose metabolism in diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**. v. 37, n. 6, p. 1172-1177, 2015.

VASCONCELOS, L. H.; SOUZA, I. L.; PINHEIRO, L. S.; SILVA, B. A. Ion Channels in Obesity: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. **Frontiers in Pharmacology**. v. 7, 2016.

VERHOEFF, F. SOME NEW STAINING METHODS OF WIDE APPLICABILITY: INCLUDING A RAPID DIFFERENTIAL STAIN FOR ELASTIC TISSUE. **Journal of the American Medical Association**. v. 50, n. 11, p. 876-877, 1908.

VON POSER TOIGO, E.; HUFFELL, A. P.; MOTA, C. S.; BERTOLINI, D.; PETTENUZZO, L. F.; DALMAZ, C. Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame. **Appetite**. v. 87, p. 168-74, 2015.

WALDÉN, T. B.; HANSEN, I. R.; TIMMONS, J. A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**. v. 302, n. 1, p. E19-E31, 2012.

WELLS, J. I. **Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances**. E. Horwood, 1988. ISBN 0745802761.

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, n. 6, p. 251-9; quiz 260-1, 2008.

WHO. **Obesity: WORLD HEALTH ORGANIZATION.**
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/.2015>. Acessado Em :
13/04/2016.

WILLIAMS, R. A.; MAMOTTE, C. D.; BURNETT, J. R. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 12, p. 13, 2008.

WOLFLE, U.; SEELINGER, G.; BAUER, G.; MEINKE, M. C.; LADEMANN, J.; SCHEMPP, C. M. Reactive molecule species and antioxidative mechanisms in normal skin and skin aging. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 27, n. 6, p. 316-32, 2014.

YAGASAKI, M.; HASHIMOTO, S.-I. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 81, n. 1, p. 13-22, 2008.

YANG, Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. **The Yale Journal of Biology and Medicine**. v. 83, n. 2, p. 101-8, 2010.

ANEXO I: Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso Animal



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 06 de maio de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AValiação in vivo da influência do consumo de aspartame na elasticidade da pele.**", UnBDOC n.º 13863/2013, sob responsabilidade da Professora Maria de Fátima Borin foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. José Raimundo Corrêa
Coordenador da CEUA

APÊNDICE A: Artigos excluídos e a justificativa da exclusão (n = 48)**Tabela 5: Artigos excluídos e a razão para a exclusão**

Referência Número	Autor/Ano	Razão para exclusão
1.	Abdallah et al., 1997	(6)
2.	Abid et al., 2009	(1)
3.	Aguero et al., 2015	(6)
4.	Anton et al., 2010	(6)
5.	Catenacci et al., 2014	(1)
6.	Chong et al., 2014	(1)
7.	De Koning et al., 2011	(1)
8.	Drewnowski et al., 1992	(2)
9.	Drewnowski et al., 1994	(5)
10.	Drewnowski et al., 1994 ^a	(6)
11.	Drewnowski et al., 1995	(2)
12.	Drewnowski et al., 1995 ^a	(2)
13.	Durán Agúero et al., 2015	(6)
14.	Duran et al., 2013	(2)
15.	Fagherazzi et al., 2013	(1)
16.	Fukuda et al., 2010	(1)
17.	Giacco et al., 2004	(1)
18.	Hall et al., 2003	(6)
19.	Hartel et al., 1993	(6)
20.	Hendriksen et al., 2011	(1)
21.	Klein et al., 2006	(1)
22.	Knopp et al., 1976	(1)
23.	Little et al., 2009	(1)
24.	Mattes, 1990	(6)
25.	Nettleton et al., 2009	(1)
26.	Nimer Assy et al., 2008	(1)
27.	Okuno et al., 1986	(6)
28.	Olalde-Mendoza and Moreno-González, 2013	(1)
29.	Peters et al., 2014	(1)
30.	Peters et al., 2016	(1)
31.	Phelan et al., 2009	(1)
32.	Porikos et al., 1982	(6)
33.	Raben et al., 2002	(1)
34.	Raben et al., 2011	(1)
35.	Reid and Hammersley, 1998	(6)
36.	Reid et al., 2010	(6)
37.	Reid et al., 2014	(6)
38.	Robinson et al., 2001	(1)
39.	Rogers et al., 1988	(6)

40.	Rogers et al., 1990	(6)
41.	Rogers et al., 1991	(6)
42.	Rolls et al., 1990	(6)
43.	Shimer, 2012	(2)
44.	Sørensen et al., 2014	(1)
45.	Stanhope et al., 2015	(6)
46.	Tordoff and Alleva, 1990	(6)
47.	Wise et al., 1989	(1)
48.	Wolf-Novak et al., 1990	(1)

Critérios de exclusão: 1) estudo que não atendeu à estratégia PICOS; 2) revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros ou resumos de conferências; 5) estudos que não estavam disponíveis na íntegra; e 6) estudos observacionais e clínicos não randomizados.

Referências

- 1.ABDALLAH, L.; CHABERT, M.; LOUIS-SYLVESTRE, J. Cephalic phase responses to sweet taste. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 737-43, 1997.
- 2.ABID, A.; TAHA, O.; NSEIR, W.; FARAH, R.; GROSOVSKI, M.; ASSY, N. Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 918-924, 2009.
- 3.ANTON, S. D.; MARTIN, C. K.; HAN, H.; COULON, S.; CEFALU, W. T.; GEISELMAN, P.; WILLIAMSON, D. A. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Appetite**, v. 55, n. 1, p. 37-43, 2010.
- 4.ASSY, N.; NASSER, G.; KAMAYSE, I.; NSEIR, W.; BENIASHVILI, Z.; DJIBRE, A.; GROSOVSKI, M. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 10, p. 811-816, 2008.
- 5.CATENACCI, V. A.; PAN, Z.; THOMAS, J. G.; OGDEN, L. G.; ROBERTS, S. A.; WYATT, H. R., HILL, J. O. Low/no calorie sweetened beverage consumption in the National Weight Control Registry. **Obesity**, v. 22, n. 10, p. 2244-2251, 2014.
- 6.CHONG, E.; GUELFY, K. J.; FOURNIER, P. A. Combined glucose ingestion and mouth rinsing improves sprint cycling performance. **International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism**, v. 24, n. 6, 2014.
- 7.DE KONING, L.; MALIK, V. S.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 6, p. 1321-1327, 2011.

8. DREWNOWSKI, A.; LOUIS-SYLVESTRE, J.; MASSEN, C.; FRICKER, J.; CHAPELOT, D.; APFELBAUM, M. The effects of sucrose and aspartame on hunger, taste preferences and energy intakes in lean and obese women. ***Appetite***, v. 24, n. 1, p. 79, 1995a.
9. DREWNOWSKI, A.; LOUIS-SYLVESTRE, J.; MASSIEN, C.; FRICKER, J.; CHAPELOT, D.; APFELBAUM, M. Effects of sucrose and aspartame on hunger, energy intake and taste responsiveness in normal-weight men and women. ***Appetite***, v. 19, n. 2, p. 175, 1992.
10. DREWNOWSKI, A.; LOUIS-SYLVESTRE, J.; MASSIEN, C.; FRICKER, J.; CHAPELOT, D.; APFELBAUM, M. Comparing the effects of sucrose and aspartame on hunger, taste preferences, and energy intakes in obese and lean women. ***Appetite***, v. 24, n. 1, p. 66, 1995.
11. DREWNOWSKI, A.; MASSIEN, C.; LOUIS-SYLVESTRE, J.; FRICKER, J.; CHAPELOT, D.; APFELBAUM, M. Comparing the effects of aspartame and sucrose on motivational ratings, taste preferences, and energy intakes in humans. ***The American Journal of Clinical Nutrition***, v. 59, n. 2, p. 338-345, 1994a.
12. DREWNOWSKI, A.; MASSIEN, C.; LOUIS-SYLVESTRE, J.; FRICKER, J.; CHAPELOT, D.; APFELBAUM, M. The effects of aspartame versus sucrose on motivational ratings, taste preferences, and energy intakes in obese and lean women. ***International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity***, v. 18, n. 8, p. 570-578, 1994b.
13. DURÁN, A. S.; BLANCO, B. E.; RODRÍGUEZ, N. M. P.; CORDÓN, A. K.; SALAZAR, D. A. J.; RECORD, C. J., ENCINA, V. C. [Association between non-nutritive sweeteners and obesity risk among university students in Latin America]. ***Revista Medica de Chile***, v. 143, n. 3, p. 367-373, 2015.
14. DURAN MV, M. C. M. L. Effect of decreasing the consumption of sweetened caloric and non-caloric beverages on weight, body composition and blood pressure in young adults. ***European Journal of Preventive Cardiology***, v. 2013, n. 20, p. 120, 2013.
15. DURÁN, A. S.; RECORD, C. J.; ENCINA, V. C.; SALAZAR, D. A. J.; CORDÓN, A. K.; CERECEDA, B. M. P., ESPINOZA, B. S. [Consumption of carbonated beverages with nonnutritive sweeteners in Latin American university students]. ***Nutricion Hospitalaria***, v. 31, n. 2, p. 959-965, 2014.
16. FAGHERAZZI, G.; VILIER, A.; SARTORELLI, D. S.; LAJOUS, M.; BALKAU, B.; CLAVEL-CHAPELON, F. Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale—European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. ***The American Journal of Clinical Nutrition***, v. 97, n. 3, p. 517-523, 2013.

- 17.FUKUDA, M.; TERATA, T.; TSUDA, K.; SUGAWARA, M.; KITATANI, N.; SEINO, Y. Aspartame-Acesulfame K-containing Low-Energy Erythritol Sweetener Markedly Suppresses Postprandial Hyperglycemia in Mild and Borderline Diabetics. **Food Science and Technology Research**, v. 16, n. 5, p. 457-466, 2010.
- 18.GIACCO, R.; CLEMENTE, G.; LUONGO, D.; LASORELLA, G.; FIUME, I.; BROUNS, F., RIVELLESE, A. Effects of short-chain fructo-oligosaccharides on glucose and lipid metabolism in mild hypercholesterolaemic individuals. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 331-340, 2004.
- 19.HALL, W.; MILLWARD, D.; ROGERS, P.; MORGAN, L. Physiological mechanisms mediating aspartame-induced satiety. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 4, p. 557-562, 2003.
- 20.HARTEL, B.; GRAUBAUM, H.; SCHNEIDER, B. Influence of intense sweetener solutions on insulin-secretion and blood-glucose level. **Ernahrungs-Umschau**, v. 40, n. 4, p. 152-155, 1993.
- 21.HENDRIKSEN, M. A.; TIJHUIS, M. J.; FRANSEN, H. P.; VERHAGEN, H.; HOEKSTRA, J. Impact of substituting added sugar in carbonated soft drinks by intense sweeteners in young adults in the Netherlands: example of a benefit–risk approach. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 41-51, 2011.
- 22.KLEIN, D. A.; BOUDREAU, G. S.; DEVLIN, M. J.; WALSH, B. T. Artificial sweetener use among individuals with eating disorders. **International Journal of Eating Disorders**, v. 39, n. 4, p. 341-345, 2006.
- 23.KNOPP, R. H.; BRANDT, K.; ARKY, R. A. Effects of aspartame in young persons during weight reduction. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 2, n. 2, p. 417-428, 1976.
- 24.LITTLE, T. J.; GUPTA, N.; CASE, R. M.; THOMPSON, D. G.; MCLAUGHLIN, J. T. Sweetness and bitterness taste of meals per se does not mediate gastric emptying in humans. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 3, p. R632-R639, 2009.
- 25.MATTES, R. Effects of aspartame and sucrose on hunger and energy intake in humans. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 6, p. 1037-1044, 1990.
- 26.NETTLETON, J. A.; LUTSEY, P. L.; WANG, Y.; LIMA, J. A.; MICHOS, E. D.; JACOBS, D. R. Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Diabetes Care**, v. 32, n. 4, p. 688-694, 2009.
- 27.OKUNO, G.; KAWAKAMI, F.; TAKO, H.; KASHIHARA, T.; SHIBAMOTO, S.; YAMAZAKI, T., SAEKI, M. Glucose tolerance, blood lipid, insulin and glucagon concentration after single or continuous administration of aspartame in

- diabetics. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 2, n. 1, p. 23-27, 1986.
28. OLALDE-MENDOZA, L.; MORENO-GONZÁLEZ, Y. [Modification of fasting blood glucose in adults with diabetes mellitus type 2 after regular soda and diet soda intake in the State of Queretaro, Mexico]. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 63, n. 2, p. 142-147, 2013.
29. PETERS, J. C.; BECK, J.; CARDEL, M.; WYATT, H. R.; FOSTER, G. D.; PAN, Z.; BRILL, C. The effects of water and non-nutritive sweetened beverages on weight loss and weight maintenance: A randomized clinical trial. **Obesity**, v. 24, n. 2, p. 297-304, 2016.
30. PETERS, J. C.; WYATT, H. R.; FOSTER, G. D.; PAN, Z.; WOJTANOWSKI, A. C.; VANDER VEUR, S. S.; HILL, J. O. The effects of water and non-nutritive sweetened beverages on weight loss during a 12-week weight loss treatment program. **Obesity**, v. 22, n. 6, p. 1415-1421, 2014.
31. PHELAN, S.; LANG, W.; JORDAN, D.; WING, R. R. Use of artificial sweeteners and fat-modified foods in weight loss maintainers and always-normal weight individuals. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 10, p. 1183-1190, 2009.
32. PORIKOS, K. P.; HESSER, M. F.; VAN ITALLIE, T. B. Caloric regulation in normal-weight men maintained on a palatable diet of conventional foods. **Physiology & Behavior**, v. 29, n. 2, p. 293-300, 1982.
33. RABEN, A.; MÅLLER, B. K.; FLINT, A.; VASILARAS, T. H.; MÅLLER, A. C.; HOLST, J. J.; ASTRUP, A. Increased postprandial glycaemia, insulinemia, and lipemia after 10 weeks of sucrose-rich diet compared to an artificially sweetened diet: a randomised controlled trial. **Food & Nutrition Research**, v. 55, 2011.
34. RABEN, A.; VASILARAS, T. H.; MØLLER, A. C.; ASTRUP, A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 721-729, 2002.
35. REID, M.; HAMMERSLEY, R. The effects of sugar on subsequent eating and mood in obese and non-obese women. **Psychology, Health & Medicine**, v. 3, n. 3, p. 299-313, 1998.
36. REID, M.; HAMMERSLEY, R.; DUFFY, M. Effects of sucrose drinks on macronutrient intake, body weight, and mood state in overweight women over 4 weeks. **Appetite**, v. 55, n. 1, p. 130-136, 2010.
37. REID, M.; HAMMERSLEY, R.; DUFFY, M.; BALLANTYNE, C. Effects on obese women of the sugar sucrose added to the diet over 28 d: a quasi-randomised, single-blind, controlled trial. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 03, p. 563-570, 2014.

- 38.ROBINSON, R. R.; FEIRTAG, J.; SLAVIN, J. L. Effects of dietary arabinogalactan on gastrointestinal and blood parameters in healthy human subjects. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 279-285, 2001.
- 39.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 & Behavior**, v. 43, n. 5, p. 547-552, 1988.
- 40.ROGERS, P. J.; KEEDWELL, P.; BLUNDELL, J. E. Further analysis of the short-term inhibition of food intake in humans by the dipeptide L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (aspartame). **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 4, p. 739-743, 1991.
- 41.ROGERS, P. J.; PLEMING, H. C.; BLUNDELL, J. E. Aspartame ingested without tasting inhibits hunger and food intake. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 6, p. 1239-1243, 1990.
- 42.ROLLS, B. J.; KIM, S.; FEDOROFF, I. C. Effects of drinks sweetened with sucrose or aspartame on hunger, thirst and food intake in men. **Physiology & Behavior**, v. 48, n. 1, p. 19-26, 1990.
- 43.SHIMER, S. E. **Effects of Differentially Sweetened Beverages on Hepatic and Adipose De Novo Lipogenesis in Healthy Young Adults**. 2012. University of Washington
- 44.SØRENSEN, L. B.; VASILARAS, T. H.; ASTRUP, A.; RABEN, A. Sucrose compared with artificial sweeteners: a clinical intervention study of effects on energy intake, appetite, and energy expenditure after 10 wk of supplementation in overweight subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 1, p. 36-45, 2014.
- 45.STANHOPE, K. L.; MEDICI, V.; BREMER, A. A.; LEE, V.; LAM, H. D.; NUNEZ, M. V., . . . HAVEL, P. J. A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults. **The American Journal of Clinical nutrition**, v. 101, n. 6, p. 1144-1154, 2015.
- 46.TORDOFF, M. G.; ALLEVA, A. M. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 963-969, 1990.
- 47.WISE, J. E.; KEIM, K. S.; HUISINGA, J. L.; WILLMANN, P. A. Effect of sucrose-containing snacks on blood glucose control. **Diabetes Care**, v. 12, n. 6, p. 423-426, 1989.
- 48.WOLF-NOVAK, L. C.; STAGINK, L. D.; BRUMMEL, M. C.; PERSON, T. J.; FILER, L.; BELL, E. F., KRAUSE, W. L. Aspartame ingestion with and without

carbohydrate in phenylketonuric and normal subjects: effect on plasma concentrations of amino acids, glucose, and insulin. **Metabolism**, v. 39, n. 4, p. 391-396, 1990.

APÊNDICE B: Avaliação do risco de viés dos estudos clínicos randomizados

Tabela 6: Avaliação do risco de viés dos estudos clínicos randomizados de acordo com a ferramenta da Cochrane Collaboration (n = 29)

Artigos	Geração da sequência aleatória (Viés de seleção)	Ocultação da Alocação (Viés de seleção)	Cegamento dos participantes e dos profissionais (Viés de performance)	Cegamento de avaliadores do desfecho (Viés de detecção)	Desfechos incompletos (Viés de atrito)	Relato de desfecho seletivo (Viés de relato)	Outras fontes de viés
Black et al., 1991	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo
Black et al., 1993	Incerto	Incerto	Alto	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo
Blackburn et al., 1997	Baixo	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo
Bruce et al., 1987	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Bryant et al., 2014	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Colagiuri et al., 1989	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo
Coppola et al., 2004	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Flood et al., 2006	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Horwitz et al., 1988	Alto	Alto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Kanders et	Incerto	Incerto	Alto	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo

al., 1988							
Kuzma et al., 2015	Baixo	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo
Lapierre et al., 1990	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Lavin et al., 1997	Alto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Leon et al., 1989	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Maersk et al., 2012	Baixo	Incerto	Alto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Maersk et al., 2012a	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Melanson et al., 1999	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Moller, 1991	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Nehrling et al., 1985	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Reid et al., 2007	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Rodin , 1990	Incerto	Baixo	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto

Ryan-Harshman 1987	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Sathyapalan et al., 2015	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Incerto
Siegler et al., 2012	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Singleton et al., 1999	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Smeets et al., 2005	Baixo	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Steinert et al., 2011	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Stern et al., 1976	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto
Temizkan et al., 2015	Incerto	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto

APÊNDICE C: Avaliação GRADE

Tabela 7: Avaliação GRADE

Quality assessment							Nº of patients		Effect		Quality	Importance
Nº of studies	Study design	Risk of bias	Inconsistency	Indirectness	Imprecision	Other considerations	Aspartame	Control or Sucrose	Relative (95% CI)	Absolute (95% CI)		
<i>New outcome</i>												
12	randomized trials	not serious	serious ¹	not serious	not serious	none	246/529 (46.50%)	262/529 (49.53%)			MODERATE	

CI: Confidence interval

1. high heterogeneity in the meta-analysis