

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

EDUARDO VON POSER TOIGO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ADOÇANTES ARTIFICIAIS DURANTE A  
GESTAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO, METABOLISMO ENERGÉTICO E  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE RATOS NA VIDA ADULTA**

Porto Alegre

2015

EDUARDO VON POSER TOIGO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ADOÇANTES ARTIFICIAIS DURANTE A  
GESTAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO, METABOLISMO ENERGÉTICO E  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE RATOS NA VIDA ADULTA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carla Dalmaz

Co-orientador: Letícia Pettenuzzo

Porto Alegre

2015

*“Don't Quit*

*When things go wrong as they sometimes will,  
When the road you're trudging seems all up hill,  
When the funds are low and the debts are high  
And you want to smile, but you have to sigh,  
When care is pressing you down a bit,  
Rest if you must, but don't you quit.  
Life is queer with its twists and turns,  
As every one of us sometimes learns,  
And many a failure turns about  
When he might have won had he stuck it out;  
Don't give up though the pace seems slow--  
You may succeed with another blow,  
Success is failure turned inside out--  
The silver tint of the clouds of doubt,  
And you never can tell how close you are,  
It may be near when it seems so far;  
So stick to the fight when you're hardest hit--  
It's when things seem worst that you must not quit.”*

(Edgar A. Guest)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas do laboratório 37 pelos anos de convivência e aprendizado. Entre essas, tenho que fazer um agradecimento especial a professora Carla Dalmaz pelos anos de ensinamento, compreensão e várias lições de vida, e a minha coorientadora Letícia Pettenuzzo, que foi a pessoa que mais me ajudou e ensinou em todos esses anos de bioquímica, desde meu início como bolsista fazendo *water-maze* nos finais de semana, até 9 anos depois, me ajudando muito a escrever essa tese.

Tenho que agradecer a toda a minha família por todo o apoio, carinho durante a minha vida toda. Tenho que fazer um agradecimento muito especial aos meus pais, que são meus modelos de pessoa, de cidadãos, de profissionais, de tudo. Se durante minha vida eu puder ser metade do que eles são e conseguir transmitir aos meus filhos metade do amor e carinho que eles me deram e me dão sempre, eu sei que vou ser o melhor pai do mundo. Amo vocês demais.

Por último, tenho que agradecer muito a Carol, minha noiva. Muito obrigado pelo apoio, incentivo e amor. Obrigado por me fazer sorrir e ter força em momentos que eu mesmo duvidei de mim, de me dar força quando pensei em desistir e por todo o amor que tu me dá todos os dias nesses 10 anos juntinhos e por tudo que vamos passar junto pelo resto de nossas vidas. Te amo cada dia mais, minha linda, e mal posso esperar pelos próximos capítulos de nossa vida.

## RESUMO

Ao longo das últimas décadas tem se verificado um aumento concomitante no consumo de adoçantes artificiais e na epidemia da obesidade. Adicionalmente ao seu disseminado uso em bebidas dietéticas, os adoçantes artificiais são utilizados em milhares de outros produtos, desde comidas congeladas, iogurtes até papinhas para bebês. Apesar de ser muito utilizado por pessoas que visam um estilo de vida mais saudável, vários estudos têm demonstrado que o consumo de adoçantes artificiais pode levar a ganho de peso e ao desenvolvimento de diversas alterações metabólicas enquadradas dentro da síndrome metabólica. Por outro lado, o número de estudos avaliando os efeitos do consumo materno de adoçantes artificiais não calóricos sobre o metabolismo dos filhotes ao longo de sua vida são quase inexistentes.

Na primeira parte dessa tese verificamos que a exposição intrauterina a aspartame e sacarina, dois adoçantes artificiais não calóricos, interferiu no metabolismo dos animais quando adultos, sendo que o aspartame apresentou efeitos mais pronunciados. Demonstrou-se que os animais expostos ao aspartame durante o período pré-natal apresentaram um maior consumo de alimentos doces durante a idade adulta e que eles estavam mais suscetíveis a alterações metabólicas, apresentando níveis aumentados de glicose, LDL e triglicédeos.

Na segunda fase deste trabalho, verificou-se que os machos expostos ao aspartame apresentaram aumento nos níveis de leptina, um hormônio secretado por adipócitos e conhecidamente envolvido no controle do metabolismo energético. Concomitantemente, esses animais apresentaram uma diminuição em receptores hipotalâmicos envolvidos na via de sinalização da insulina. Os resultados encontrados nessa tese vão de encontro com a literatura, que também tem verificado efeitos mais expressivos dos adoçantes artificiais sobre os machos.

Analisando-se em conjunto, os dados encontrados nessa tese sugerem que o consumo de adoçantes artificiais, especialmente o aspartame, durante a gravidez pode levar a efeitos deletérios ao filhote no longo prazo, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina e aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de desordens metabólicas na idade adulta.

**Palavras-chave:** adoçantes artificiais, aspartame, insulina, leptina, obesidade, pré-natal.

## ABSTRACT

Over the past decades, the consumption of artificial sweeteners have grown alongside the obesity epidemic. In addition to its widespread use in diet drinks, artificial sweeteners are used in thousands of other products ranging from frozen foods, yogurt to baby food. Despite being widely used by those seeking a healthier lifestyle, several studies have shown that consumption of artificial sweeteners can lead to weight gain and development of several metabolic disorders classified in the metabolic syndrome spectrum. Nonetheless, the number of studies evaluating the effects of maternal consumption of non-caloric artificial sweeteners on the metabolism of offspring throughout his life are almost nonexistent.

In the first part of this thesis we found that intrauterine exposure to aspartame and saccharin, two artificial non-caloric sweeteners, interfere with the metabolism of animals as adults, and the aspartame had more pronounced effects. The study showed that animals exposed to aspartame during prenatal period increased their intake of sweet foods during adulthood and that they were more susceptible to metabolic alterations, with elevated levels of glucose, triglycerides and LDL.

In the second phase of this study, it was found that males exposed to aspartame showed increases in the plasma levels of leptin, a hormone secreted by adipocytes and known to be involved in the control of energy metabolism. Concomitantly, these animals showed a decrease in hypothalamic receptors involved in insulin signaling pathway. The result found in this thesis are in line with the literature that has also found that males are more sensitive to the effects of artificial sweeteners.

Analyzing together, the data found in this thesis suggest that the consumption of artificial sweeteners, especially aspartame, during pregnancy can lead to deleterious effects on the puppy in the long run, being a risk factor for the development of insulin resistance and increasing the susceptibility to develop metabolic disorders in adulthood.

**Keywords:** artificial sweeteners, aspartame, leptin, insulin, prenatal, obesity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAs</b>	Adoçantes Artificiais
<b>AgRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene <i>coutia</i> (ou <i>agouti</i> )
<b>AMPK</b>	Cinase dependente de AMP
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ARC</b>	Núcleo arqueado do hipotálamo
<b>ASP</b>	Aspartame
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>CART</b>	Transcrito regulado por anfetamina e cocaína
<b>CCK</b>	Colecistocinina
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DOPA</b>	Diidroxifenilalanina
<b>ED</b>	Edulcorantes
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GLP-1</b>	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento insulínico tipo 1
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>NPY</b>	Neuropeptídeo Y
<b>NTS</b>	Núcleo do Trato Solitário
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-cinase
<b>POMC</b>	Pró-opiomelanocortina
<b>PYY</b>	Peptídeo YY
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SM</b>	Síndrome Metabólica
<b>TANCL</b>	Transportador de aminoácidos neutros de cadeia longa
<b>UCP-1</b>	Proteína de desacoplamento do tipo 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>08</b>
<b>1.1 Histórico dos adoçantes artificiais .....</b>	<b>08</b>
<b>1.2 Consumo de adoçantes .....</b>	<b>09</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Obesidade .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Definição e Epidemiologia .....	12
2.1.2 A Ingestão Alimentar e o Peso Corporal: Controle Periférico e Central .....	13
2.1.3 Leptina, Insulina e Obesidade .....	15
<b>2.2 Adoçantes .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Adoçantes Naturais.....	17
2.2.2 Adoçantes Artificiais .....	19
2.2.2.1 <i>Possíveis mecanismos de ação dos adoçantes artificiais</i> .....	20
2.2.2.2 <i>Sacarina</i> .....	22
2.2.2.3 <i>Aspartame</i> .....	23
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>4 MÉTODOS E RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Artigo 1 .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Artigo 2 .....</b>	<b>36</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>



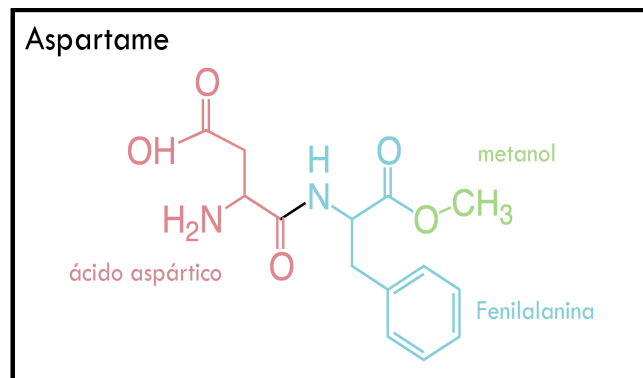
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico dos adoçantes artificiais

A descoberta de vários adoçantes artificiais (AAs) se deve à violação do código de higiene praticada por alguns cientistas em seus laboratórios ao provar suas amostras (Pedersen et al., 1991). A sacarina, o adoçante artificial mais antigo, foi descoberta por Constantine Fahlberg na Universidade Johns Hopkins, em 1879 (Kauffman & Priebe, 1978), enquanto trabalhava com derivados de alcatrão de carvão. Durante décadas a sacarina se manteve como um produto especial para pacientes diabéticos (Cohen, 1986). No início da década de 40, a escassez de açúcar e a mudança de padrões estéticos de beleza incentivaram as mulheres a recorrer também a substitutos artificiais (de la Peña, 2010). Foi também durante essa época que os rótulos dos refrigerantes *diet* mudaram sutilmente, passando de “apenas para uso de pessoas com necessidade de limitar a ingestão de açúcar” para “uso em pessoas que desejam limitar a ingestão de açúcar” (Rubini, 1968). A sacarina é cerca de 300 vezes mais doce que o açúcar, mas deixa um sabor amargo residual na boca.

O ciclamato, descoberto em 1937 por Michael Sveda na Universidade de Illinois (Kaufman, 1999), era frequentemente misturado com a sacarina para melhorar o sabor. Em 1969, a agência para o controle de alimentos e fármacos (*Food and Drug Administration*, FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) banuiu essa substância devido a alguns estudos que demonstravam um potencial efeito carcinogênico. Atualmente, o ciclamato continua a ser vendido em cerca de 50 países, incluindo o Brasil.

Em 1965, durante um estudo para desenvolver um novo medicamento para o tratamento de úlcera, James Schlatter descobriu o aspartame (ASP) (Mazur et al., 1970). O ASP consiste de dois aminoácidos, fenilalanina e aspartato, ligados ao metanol (Figura 1). Ao contrário de outros AAs que normalmente são excretados inalterados, o ASP pode ser metabolizado. Portanto, não se trata estritamente de um produto não calórico (4 kcal/g) e não deve ser usado por pessoas com fenilcetonúria (Kroger et al., 2006). Entretanto, devido ao fato de ser cerca de 200 vezes mais doce que o açúcar, a quantidade ingerida a cada vez é muito pequena, tornando sua contribuição calórica negligenciável.



**Figura 1:** Estrutura química do Aspartame

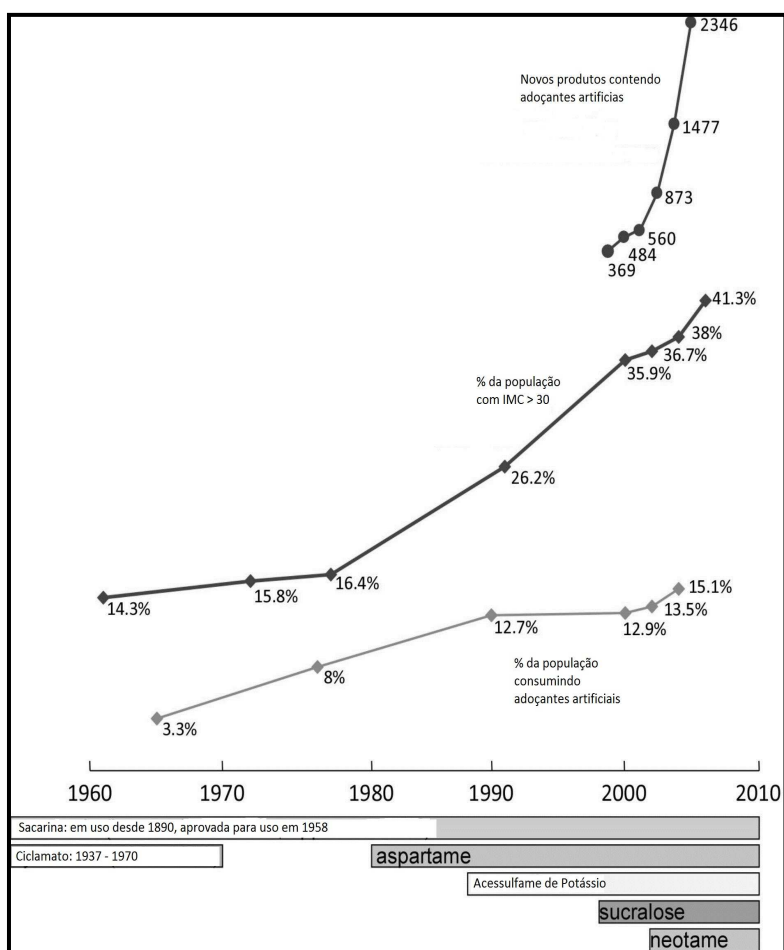
## 1.2 Consumo de adoçantes

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define edulcorantes (ED) como sendo substâncias naturais ou artificiais, diferentes dos açúcares, que conferem sabor doce aos alimentos. Atualmente no Brasil existem 15 ED aprovados para utilização pela ANVISA, e dentre os mais conhecidos e mais comercializados estão o aspartame, a sacarina e o ciclamato, comumente utilizados em refrigerantes *light* ou *diet*. Os últimos 20 anos têm visto um enorme aumento no número de alimentos contendo AAs não calóricos. Entre os anos de 1999 e 2004, mais de 6000 novos produtos foram lançados somente nos EUA contendo algum AA (Figura 2). Atualmente, uma pesquisa de ingredientes no sítio *foodfacts.com* gerou mais de 12000 produtos contendo um ou mais dos AAs aprovados pela ANVISA, variando desde refrigerantes dietéticos, sucos de frutas, iogurtes, alimentos congelados até alimentos para recém-nascidos. Uma análise dos dados da *National Health and Nutrition Examination* (NHNE), entre 1999 e 2008, demonstrou que a ingestão de AAs em bebidas aumentou de 6,1% para 12,5% entre crianças e de 18,7% para 24,1% entre adultos (Sylvetsky et al., 2012).

A obesidade é um dos principais problemas que afligem a sociedade atual e sua incidência vem aumentando consideravelmente nos últimos tempos. Ao longo dos anos, estudos epidemiológicos e clínicos têm fornecido evidências de que o consumo de uma dieta rica em açúcares, como frutose e sacarose, pode ser um importante fator para explicar o aumento na prevalência de obesidade e síndrome metabólica (SM) observada em humanos (Fowler et al., 2008; Johnson et al., 2013; Ludwig, 2013; Swithers et al., 2013). A SM é um conjunto de anormalidades, incluindo resistência à insulina, obesidade visceral,

hipertrigliceridemia, baixos níveis séricos de HDL, altos níveis de colesterol e hipertensão, o que aumenta o risco de doença cardiovascular e diabetes tipo 2 (Swithers, 2013). A maior parte dessas alterações também foram encontradas em ratos alimentados com um alto teor de frutose (Oron-Herman et al., 2008) ou uma dieta rica em sacarose (Perez-Torres et al., 2001), sugerindo que, de forma semelhante aos humanos, roedores também são susceptíveis ao desenvolvimento de SM induzida por uma dieta rica em açúcares. Além disso, é importante salientar que essa predisposição ao desenvolvimento de SM pode ser adquirida nas fases iniciais da vida (Lakshmy, 2013). Esse aumento no percentual da população obesa coincide também com o aumento no uso disseminado de adoçantes artificiais (Blundell & Hill, 1986; Institute of Medicine, 1995; National Heart, Lung and Blood Institute, 1998). Apesar disso, devido à grande controvérsia em relação ao uso de AAs e o seu papel no balanço energético, essa associação pode simplesmente ser uma coincidência. Enquanto alguns estudos sugerem que os AAs podem auxiliar no controle do peso corporal (Tordoff & Alleva 1990; Rogers et al., 1995; Blackburn et al., 1997; Raben et al., 2002; De la Hunty et al., 2006), outros dizem que os AAs não possuem qualquer efeito sobre a saciedade (Porikos et al., 1982; Mattes, 1990; Rogers et al., 1990; Rolls, 1991; Drewnowski, 1994; Van Wymelbeke et al., 2004). Há ainda estudos demonstrando que os AAs levam ao aumento da sensação de fome ou da ingestão alimentar (Wurtman, 1986; Blundell & Hill, 1986; Tordoff & Alleva, 1990; Blundell & Green, 1996; Lavine et al., 1997; Swithers & Davidson, 2008; Swithers et al., 2009). De fato, uma exposição a um ambiente nutricional aberrante durante períodos críticos do desenvolvimento, tais como o período intrauterino, tem grande impacto na programação do risco do feto para o desenvolvimento de SM em estágios mais avançados da vida, indicando uma importante e independente influência do ambiente intrauterino sobre a adiposidade da prole (Brenseke et al., 2013; Lakshmy, 2013; Mischke et al., 2013). O comportamento alimentar e parâmetros metabólicos dependem não apenas da genética, mas da história prévia do indivíduo, e estudos têm mostrado que diferentes tipos de intervenções no período gestacional influenciam parâmetros relacionados à saúde ou ao comportamento dos filhotes na vida adulta (Damasceno et al., 2003; Lesage et al., 2004; Halldorsson et al., 2010). Ratas submetidas a estresse durante a gestação geraram filhotes que sofreram restrição de crescimento intrauterino, intolerância à glicose, distúrbios no comportamento alimentar e aumento do risco de obesidade (Lesage et al., 2004). Um estudo epidemiológico com mulheres dinamarquesas demonstrou uma relação entre o consumo de refrigerantes dietéticos na gravidez e um aumento no risco de nascimentos prematuros (Halldorsson et al., 2010). Em outro estudo foi demonstrado que o consumo de adoçantes artificiais nos primeiros dias de

gestação leva a um maior número de embriões implantados, o que poderia resultar em restrição do crescimento intrauterino (Damasceno et al., 2003). Apesar de ser um assunto controverso, existem vários trabalhos demonstrando uma relação entre o consumo de adoçantes artificiais em certos períodos da vida e o desenvolvimento de obesidade (Malik et al., 2006; Johnson et al., 2009; van Baak & Astrup, 2009; Malik et al., 2010; Te Morenga et al., 2013). Entretanto, estudos avaliando os efeitos da exposição prolongada a adoçantes durante o período gestacional e de aleitamento sobre o desenvolvimento, o comportamento e parâmetros metabólicos dos filhotes são quase inexistentes.



**Figura 2:** Linha do tempo do uso de adoçantes artificiais e obesidade nos EUA. National Health and Nutrition Examination Survey, 2006.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Obesidade

#### 2.1.1 Definição e Epidemiologia

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal em relação à massa magra. Sua prevalência atingiu nos últimos anos grandes proporções (Ng et al., 2014), sendo um dos principais problemas de saúde pública da sociedade moderna (Halpern & Mancini, 2003). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o número de pessoas obesas dobrou desde os anos de 1980 até os dias atuais, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Friedrich, 2002; Popkin et al., 2012; Specchia et al., 2015). A obesidade aumenta o risco de várias doenças crônicas, como diabetes mellitus, doenças cardio e cerebrovasculares, alterações na coagulação, neoplasias e outras (Dixon, 2010; Vucenik & Stains, 2012; Ojeda et al., 2014). O método mais comumente usado para avaliar obesidade em adultos é o Índice de Massa Corporal (IMC), que é calculado como peso corporal (em kg) dividido pela altura (em metros) elevada ao quadrado. As pessoas adultas são consideradas com sobrepeso quando possuem IMC igual ou maior a 25 kg/m<sup>2</sup>, enquanto que pessoas adultas são consideradas obesas com problemas funcionais e de saúde, quando apresentam IMC acima de 30 kg/m<sup>2</sup>.

De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde – 2013 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (PNS, 2015), atualmente o excesso de peso afeta 56,9% dos brasileiros, ou seja, 56,9 % dos brasileiros têm um IMC igual ou maior que 25. O estudo também mostra que o percentual de obesos, que em 2006 era de 11%, em 2010 atingiu 17% da população brasileira e atualmente esse número encontra-se em 20,8%. Esse aumento na obesidade não é restrito a adultos, crescendo em todos os grupos de idade e raças, bem como em ambos os sexos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde levantados em 2010, 43 milhões de crianças com menos de cinco anos apresentavam excesso de peso (WHO, 2010). A morbimortalidade (Coutinho & Benchimol, 2006) vinculada à obesidade vem aumentando exponencialmente, principalmente quando o IMC situa-se em pelo menos 30 kg/m<sup>2</sup> e o risco de morte prematura duplica acima de 35 kg/m<sup>2</sup>. A obesidade grau III ( $\geq 40$

kg/m<sup>2</sup>) é das doenças que mais matam no mundo, sendo que na América Latina, aproximadamente 200 mil pessoas morrem, anualmente, em decorrência das comorbidades relacionadas à obesidade. A taxa de mortalidade para esses obesos ( $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>) é 12 vezes mais alta entre homens de 25 a 40 anos, quando comparada à de pessoas de peso normal.

A obesidade é uma síndrome que gera um grande impacto nas despesas médicas, principalmente em países em desenvolvimento. Um estudo retrospectivo constatou que no Brasil, num período de três anos (2008 a 2010), a média anual de gastos em procedimentos ambulatoriais e hospitalizações relacionadas com a obesidade ultrapassou os US\$ 2 bilhões de dólares somente em atendimentos do Sistema Único de Saúde (Bahia et al., 2012). Nos Estados Unidos da América, um estudo demonstrou gastos de US\$ 75 bilhões de dólares com doenças relacionadas à obesidade somente no ano de 2003 (Gostin, 2007)

Apesar de possuir um mercado multibilionário, a indústria da dieta e da vida saudável tem tido pouca eficácia em conseguir resultados de perda de peso em longo prazo. Além disso, apesar de inúmeras pesquisas sobre possíveis alvos para o desenvolvimento de medicamentos para tratar a epidemia da obesidade, somente intervenções cirúrgicas como as cirurgias bariátricas têm mostrado benefícios persistentes (Sjostrom et al., 2004). Devido à elevada incidência e prevalência, aos custos que essa condição gera e ao fato de que cada vez mais vem afetando as pessoas desde uma idade muito inicial, o entendimento da etiologia da obesidade e sua complexa regulação pelo sistema neuroendócrino, assim como o desenvolvimento de tratamentos e prevenção é cada vez mais importante.

### 2.1.2 A Ingestão Alimentar e o Peso Corporal: Controle Periférico e Central

O controle do peso corporal ocorre de maneira central, visando manter um equilíbrio entre a regulação do consumo alimentar e o gasto energético. Esse controle se dá através de sinais centrais ou periféricos. Os sinais periféricos do consumo alimentar se dão através dos sinais de saciedade e de adiposidade, os quais acabam refletindo em alterações centrais; os sinais centrais atuam via vários efetores, como neuropeptídeos e neurotransmissores (Morton et al., 2006).

O consumo alimentar está sujeito a uma intensa regulação pelos sistemas hedônico e homeostático. O controle homeostático é regulado considerando deficiência e/ou aporte calórico ou nutricional, e inclui uma sinalização hormonal e/ou neuronal, de que participam

parte do trato gastrointestinal, o hipotálamo e outras estruturas do sistema nervoso, incluindo o córtex. A regulação hedônica, por sua vez, independe da necessidade de nutrientes, sendo efetuada pelas regiões encefálicas envolvidas com a recompensa e com a motivação (e.g., núcleo accumbens, córtex orbitofrontal, ínsula anterior e VTA).

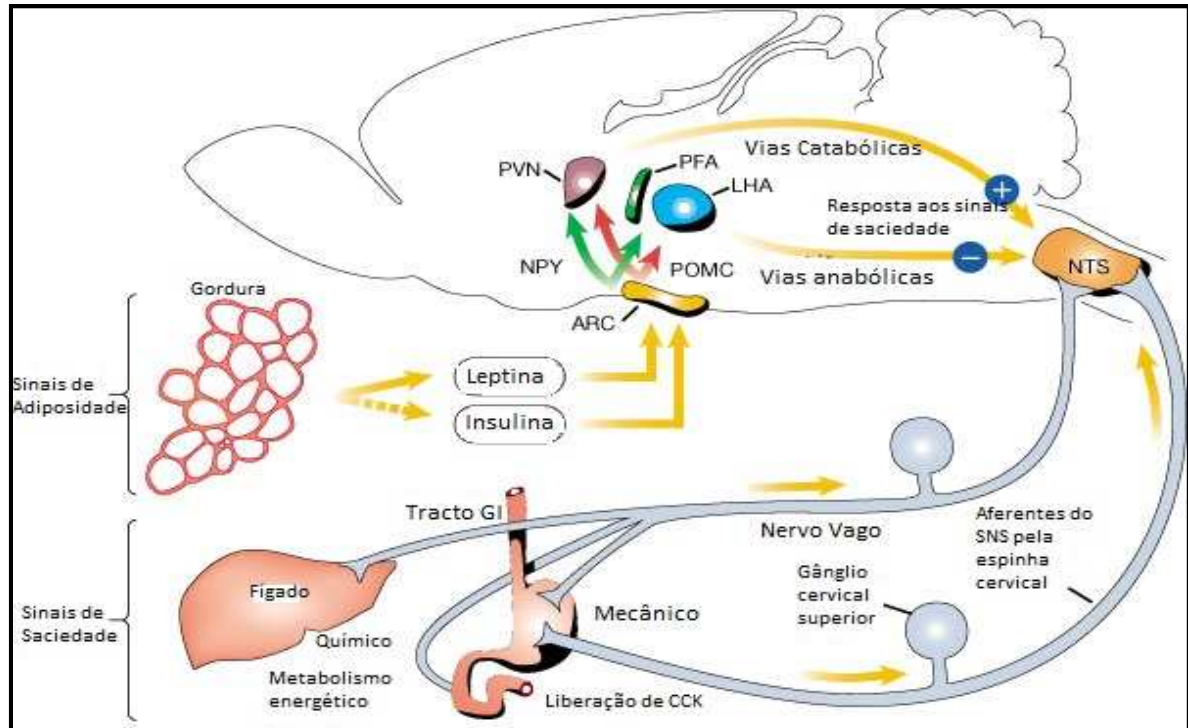
Os sinais de saciedade e de adiposidade interagem com outros fatores no hipotálamo e em outras partes do sistema nervoso central (SNC) para controlar o apetite (Figura 3). Quando um alimento é consumido, estimula-se a liberação de peptídeos da saciedade pelo trato gastrointestinal, tais como a colecistocinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY). Sinais desencadeados por esses peptídeos, por meio do nervo vago, atingem o núcleo do trato solitário (NTS), no tronco encefálico caudal. O NTS possui fibras eferentes que são projetadas para o núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, onde ocorre a integração desses sinais da saciedade com os da adiposidade (Strader & Woods, 2005).

Sinais relacionados a aporte e reserva de energia, insulina e leptina são responsáveis por mudanças na sensibilidade do encéfalo aos sinais de saciedade, agindo de acordo com a proporção de gordura corporal. No estado alimentado ocorre o aumento da leptina e da insulina, que irão sinalizar para os neurônios hipotalâmicos, ativando a liberação de peptídeos anorexigênicos, como por exemplo a pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART), reduzindo o comportamento alimentar. Por outro lado, durante o jejum ocorre o processo inverso, a diminuição da insulina e da leptina torna os circuitos neurais menos sensíveis aos sinais de saciedade e o concomitante aumento da liberação de peptídeos orexígenos, como por exemplo, o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene *coutia* (ou *agouti*; AgRP) (Woods & D'Alessio, 2008).

Ao longo dos anos, estudos levantaram a hipótese de que o consumo alimentar em excesso possa ser o resultado de um desequilíbrio entre os mecanismos de saciedade, a circuitaria neuronal relacionada à motivação e à recompensa e circuitos pré-frontais envolvidos em controles executivos do comportamento consumatório. Alguns estudos têm sugerido similaridades entre essas alterações e o abuso de drogas, demonstrando, inclusive, que um sabor doce intenso poderia ter um valor de recompensa maior que a própria cocaína (Lenoir et al., 2007; Covasa, 2010; de Lartigue et al., 2011).

Os neurotransmissores monoaminérgicos possuem diferentes ações no controle do comportamento alimentar. A serotonina (5-HT), por exemplo, inibe fortemente a alimentação em roedores quando injetada em diversas regiões do hipotálamo (Leibowitz et al., 1988) e os medicamentos que aumentam a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica, tais como

fluoxetina (Goldstein et al., 1994), dexfenfluramina (McTavish & Hell, 1992) e sibutramina (Lean, 1997), levam a perda de peso em obesos.



**Figura 3:** Modelo Neuroanatômico das vias pelas quais os sinais de adiposidade, leptina (secretado pelos adipócitos) e insulina (secretada pelo pâncreas) interagem com os sinais de saciedade e com os circuitos centrais para regular a alimentação (adaptada de Schwartz et al., 2000). CCK: Colecistoquinina; NTS: Núcleo do trato solitário; ARC: núcleo arqueado POMC: Pró-opiomelanocortina; NPY: Neuropeptídeo Y; PVN: Núcleo Paraventricular; LHA: Área lateral do hipotálamo; PFA: Área Perifornical

### 2.1.3 Leptina, Insulina e Obesidade

A leptina é produzida principalmente no tecido adiposo branco e seus níveis circulantes correlacionam-se com a quantidade de gordura corporal. Esse hormônio possui diversos papéis importantes, tais como regulação da homeostase energética, regulação de funções neuroendócrinas e imunitárias, além de atuar no metabolismo de lipídeos e da glicose (Dalamaga et al., 2013; Moon et al., 2013).

A leptina atua principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), interagindo com uma complexa rede neural para controlar o comportamento alimentar, ativando



neurônios anorexigênicos para sintetizar POMC e CART. Concomitantemente inibe neurônios orexigênicos que sintetizam o AgRP e o NPY. Durante o jejum, os níveis circulantes de leptina diminuem rapidamente, estimulando a expressão de AgRP e NPY e inibindo POMC e CART, conseqüentemente aumentando o comportamento alimentar e diminuindo o gasto energético (Ahima et al., 1999; Cowley et al., 2001).

Muitas outras ações da leptina têm sido sugeridas ao longo dos anos. Leininger et al. (2009) demonstraram uma atuação da leptina sobre o controle hedônico da alimentação através do sistema dopaminérgico mesolímbico. Essa atuação se daria através de neurônios do hipotálamo lateral que apresentam o receptor para leptina e que inervam a área tegmentar ventral. Mais recentemente, Garfield et al. (2012) demonstraram que a leptina parece agir também em sinergia com CCK e GLP-1 no NTS para promover saciedade. Além de atuar na regulação do consumo alimentar, a leptina aumenta o gasto energético através da ativação do sistema nervoso simpático. Em roedores, a leptina estimula a termogênese no tecido adiposo marrom através da expressão de proteínas de desacoplamento (UCP-1) (Haynes et al., 1997; Scarpace et al., 1997).

A importância da leptina na homeostase energética se mostra mais evidente na análise de sua deficiência. Em estudos com animais, camundongos *ob/ob*, que possuem deficiência total de leptina, desenvolvem uma hiperfagia grave, apresentam baixa taxa metabólica e um rápido desenvolvimento de obesidade, em associação com altos níveis de NPY e baixos de POMC no hipotálamo. Observa-se, também, que todos esses efeitos são revertidos com uma simples suplementação de leptina (Pelleymounter et al., 1995; Ahima & Osei, 2004). Assim como em roedores, humanos com deficiência congênita de leptina são obesos e hiperfágicos. Tratamento com leptina nesses indivíduos também resulta em uma grande redução no consumo energético e gordura corporal (Farooqi et al., 1999, 2002). Em contraste, a grande maioria de pessoas obesas é insensível à hiperleptinemia ou ao tratamento com leptina, indicando a existência de uma “resistência à leptina” nas formas comuns de obesidade derivadas de um excesso no comportamento alimentar e um estilo de vida sedentário (Hukshorn et al., 2002; Mittendorfer et al., 2011; Moon et al., 2011).

A insulina é um hormônio peptídico produzido no pâncreas envolvido em manter a homeostase da glicose através de diferentes vias, seja diminuindo as vias de produção de glicose, como a gliconeogênese, ou aumentando a captação de glicose no músculo e no tecido adiposo. Esse hormônio é produzido na forma de uma molécula precursora (pré-pró-insulina). Após a remoção da sequência sinalizadora dessa molécula e o estabelecimento de três ligações de dissulfeto, esta é armazenada em grânulos na célula beta do pâncreas sendo, então,

chamada de pró-insulina. Quando o nível plasmático de glicose está alto, a molécula de pró-insulina perde seu peptídeo C, originando uma molécula de insulina madura. A resistência à insulina atinge grande parte da população obesa. O hormônio ainda é produzido, mas não consegue exercer sua ação de forma completa, fazendo com que o indivíduo produza e libere maiores quantidades de insulina em uma tentativa de compensação. Porém, em longo prazo, esse mecanismo perde sua eficiência e os níveis plasmáticos de glicose tornam-se elevados. Esse aumento na concentração de glicose no sangue pode acarretar um estado de pré-diabetes ou até diabetes (Lehninger, 2014).

Animais com deficiência total de leptina (ob/ob) e indivíduos com deficiência congênita de leptina são caracterizados por possuírem resistência à insulina, diabetes, esteatose hepática e outras características da síndrome metabólica. Em ambos, antes mesmo de diminuir o peso, o tratamento com leptina leva à diminuição dos níveis plasmáticos de glicose, insulina e lipídios (Pelleymounter et al., 1995; Schwartz et al., 1996). Ao longo dos anos, vários estudos têm demonstrado que a leptina consegue influenciar o metabolismo da glicose de diversas maneiras. Em ratos diabéticos não-obesos, a administração periférica de leptina normaliza a glicemia através da supressão dos níveis de glucagon e da normalização dos níveis de vários metabólitos intermediários, tais como acilcarnitinas, aminoácidos, acilCoAs e intermediários do ciclo de Krebs (Wang et al., 2010). Outros estudos têm demonstrado que a leptina poderia aumentar a sensibilidade à insulina e a captação de glicose periférica por meio de diferentes mecanismos, desde a ação de neurônios liberadores de POMC e AgRP no ARC até o aumento da fosforilação da cinase dependente de AMP (AMPK) no músculo esquelético e ativação da fosfoinositol-3-cinase (PI3K) no hipotálamo, ambas envolvidas na via de sinalização da insulina (Coppari et al., 2005; Kievit et al., 2006; Hill et al., 2009; Huo et al., 2009; Banno et al., 2010; Roman et al., 2010; German et al., 2011; Berglund et al., 2012; Goncalves et al., 2014).

## **2.2 Adoçantes**

### **2.2.1 Adoçantes Naturais**

A sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), um adoçante natural, também conhecida como açúcar de mesa, é um carboidrato do tipo dissacarídeo composto pelos monossacarídeos glicose e frutose unidos por uma ligação glicosídica  $\alpha 1-\beta 2$ . A maior extração desse produto para fins comerciais acontece a partir da cana-de-açúcar, mas a beterraba também é utilizada (Marks & Smith, 2007). Não existe um nível seguro estabelecido pela comunidade científica para o consumo de sacarose, sendo ainda que esse produto possui uma correlação linear com o desenvolvimento de SM, obesidade e diabetes.

A glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) desempenha um papel fundamental no metabolismo, sendo o principal monossacarídeo do sangue e tendo sua regulação sob controle da insulina e do glucagon. Além de ser o substrato energético universal para as células, a glicose também atua como fonte de carbono para a síntese de compostos tais como lipídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos. Após ser absorvida no intestino, a glicose atinge o sangue e, de lá, é transportada para dentro das células e será direcionada para diversas vias metabólicas, como a glicólise, a via das pentoses-fosfato e a síntese de glicogênio (Lehninger, 2014).

A frutose ( $C_6H_{12}O_6$ ), ou levulose, é conhecida como o açúcar das frutas. No organismo humano, a frutose é fosforilada em frutose-6-fosfato pela hexocinase, sendo posteriormente catabolizada na glicólise. No fígado, entretanto, é transformada pela frutocinase em frutose-1-fosfato, que é clivada em di-hidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído, o qual é fosforilado ou reduzido a glicerol. Devido ao fato de entrar na via glicolítica após um dos principais pontos de regulação, a fosfofrutocinase-1, um consumo excessivo de frutose pode levar à saturação da via glicolítica, produzindo elevadas quantidades de acetil-CoA e conseqüentemente um aumento na biossíntese de ácidos graxos e aumento do tecido adiposo (Lehninger, 2014).

O consumo de carboidratos do tipo sacarose contribui muito para o aumento da gordura corporal. Ao contrário dos carboidratos complexos, como os polissacarídeos, a sacarose promove aumento rápido da glicemia e conseqüente liberação de insulina. Esse grande aumento na glicose plasmática, combinado com a liberação de insulina, resulta na rápida captação de glicose pelas células do fígado e do tecido adiposo, com síntese de lipídeos. As rápidas variações na concentração da glicose podem levar a uma hipoglicemia, a uma menor eficiência na saciedade e levar à fome (Melanson et al., 1999).

Vários estudos em animais têm demonstrado que o consumo de uma dieta com alto índice glicêmico (um indicador da velocidade com que a glicose ingerida em dado alimento é capaz de atingir o sangue) aumenta o risco de obesidade (Storlien et al., 1988; Toida et al., 1996). Além disso, também foi demonstrado que, quando comparados animais com uma dieta

rica em gordura com animais com dieta rica em carboidratos, os últimos tiveram maior expressão de NPY no ARC. Essa mudança foi acompanhada por uma supressão acentuada da expressão da UCP1, demonstrando um diminuído potencial de termogênese nesses animais (Giraud et al., 1994).

Em humanos, o maior consumo de mono e dissacarídeos tem se dado através de bebidas adoçadas com sacarose/frutose. Essas bebidas estão sendo consideradas um importante contribuinte no ganho de peso e no aumento do risco de diabetes mellitus 2 e doenças cardiovasculares. Além disso, também foi demonstrado que a ingestão de líquidos é menos eficiente no aumento da saciedade e na supressão da ingestão alimentar, sendo mais um fator facilitador no desenvolvimento da obesidade (Schulze et al., 2004; Palmer & Boogs, 2008; Malik et al., 2010). Estudos de longo prazo, acompanhando entre 40.000 e 50.000 pessoas demonstraram que aquelas que consumiram mais bebidas adoçadas com sacarose tiveram um aumento em média de 2 kg por ano quando comparadas com os controles (Schulze et al., 2004; Palmer et al., 2008).

### 2.2.2. Adoçantes Artificiais

Considerando o baixo conteúdo calórico dos AAs, as pessoas os utilizam no lugar dos açúcares para perder ou manter peso. Os açúcares fornecem uma grande quantidade de carboidratos rapidamente absorvíveis, levando à ingestão excessiva de energia, ganho de peso e síndrome metabólica (Popkin & Nielsen, 2003; Saris, 2003; Schulze et al., 2004). Há muitos anos, açúcares e outros adoçantes calóricos têm sido colocados entre os principais culpados da crescente epidemia de obesidade, e os AAs têm sido considerados como “alimento saudável” (de la Peña, 2010). Entretanto, será que os AAs realmente ajudam a reduzir o peso?

Surpreendentemente, dados epidemiológicos têm sugerido exatamente o contrário. Vários estudos prospectivos de larga escala têm encontrado uma correlação positiva entre o uso de AAs e ganho de peso e/ou IMC, incluindo o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) e o *San Antonio Heart Study* (Stellman & Garfinkel, 1986; Colditz et al., 1990; Duffey & Popkin, 2006; Fowler et al., 2008). É interessante observar que vários estudos têm feito observações similares em crianças, encontrando uma associação positiva entre o consumo de refrigerantes *diet* e o aumento do IMC (Forshee & Storey, 2003; Berkey et al., 2004; Blum et al., 2005; Striegel-Moore et al., 2006). Cabe ressaltar, entretanto,

que esses estudos encontraram efeitos mais pronunciados em meninos do que em meninas em relação ao aumento do IMC.

#### *2.2.2.1 Possíveis Mecanismos de Ação dos Adoçantes Artificiais*

Vários mecanismos comportamentais têm sido propostos para explicar a associação epidemiológica entre o consumo de AAs e ganho de peso. Apesar disso, a literatura ainda não exhibe um consenso sobre quais realmente estão em atuação, tendo alguns trabalhos sugerido que estes podem agir sinergicamente.

A partir dos trabalhos de Swithers & Davidson em modelos animais (Swithers & Davidson 2008; Swithers et al., 2009; Swithers et al., 2010; Swithers et al., 2013), foi desenvolvida a hipótese de que o uso de AAs enfraquece a capacidade da percepção do sabor doce em prever energia e evocar as chamadas respostas cefálicas para preparar o trato digestivo para o consumo alimentar. A fase cefálica da alimentação refere-se às respostas autonômicas e endócrinas à estimulação dos sistemas sensoriais (Zafra et al., 2006). O consumo, especialmente de doces, leva a uma liberação de insulina na fase cefálica e, conseqüentemente, a uma queda correspondente na concentração de glicose plasmática (Bruce et al., 1987). Essa queda na glicose plasmática que se segue a tal liberação de insulina pode estar associada a sensações de fome e aumento da ingestão alimentar em curto prazo. Dados de vários experimentos demonstraram que animais que consumiam uma dieta sempre adoçada com um AA (que não predizia caloria) apresentavam maior massa corporal, acumulavam mais gordura corporal e possuíam uma menor resposta térmica ao consumo de alimentos do que aqueles animais expostos a uma dieta adoçada com glicose. Essa hipótese de que a exposição a AAs enfraquece as respostas cefálicas a alimentos doces ainda não possui testes definitivos em humanos, necessitando de maiores estudos para solidificar a teoria.

Uma das descobertas mais interessantes nos últimos anos foi a existência de receptores de sabor em outros locais além da língua (Jang et al., 2007; Mace et al., 2007; Margolskee et al., 2007). A descoberta de receptores de sabor no trato gastrointestinal e no pâncreas sedimentou ainda mais essa teoria, com os AAs interagindo com esses receptores nesses órgãos e influenciando a liberação de insulina (Malaisse et al., 1998; Mace et al., 2007; Margolskee et al., 2007; Nakagawa et al., 2009; Kyriazis et al., 2012). Contudo, a sensação de recompensa acionada pelo alimento consiste de duas vias: sensorial e pós-ingestão (Avena et

al., 2008). A via sinalizada na pós-ingestão depende dos produtos metabólicos do alimento (Sclafani & Ackroff, 2004). A perda da contribuição calórica geralmente elimina o componente pós-ingestão. Quando privados de alimento, ratos preferem uma solução de glicose a uma de sacarina, independentemente do sabor, que pode ser mascarado utilizando quinino (Sclafani & Ackroff, 1994). Desse modo, tem sido sugerido que a dissociação entre a sensação de sabor doce e a ingestão calórica pode promover o apetite, conduzindo a uma maior ingestão de alimentos e ganho de peso.

O sistema de recompensa estimulado pela alimentação compartilha circuitos cerebrais com outras atividades prazerosas como sexo e uso de drogas (Small, 2002; Avena et al., 2008), além de também compartilhar o mesmo paradigma comportamental com outras formas de adição, o que inclui fenômenos como a abstinência (Avena et al., 2008). O hipotálamo, que é um importante centro controlador do comportamento alimentar, secreta vários neuropeptídeos para regular a energia, o balanço osmótico e o comportamento alimentar e tem sido reconhecido como o mediador da via de recompensa pós-ingestão (Smeets et al., 2005; Avena et al., 2008). O núcleo arqueado do hipotálamo é uma região posicionada próxima a capilares fenestrados na base do hipotálamo, o que o coloca em contato com importantes hormônios como a leptina (Glaum et al., 1996) e a insulina (Muroya et al., 1999). Crescentes evidências sugerem que adoçantes artificiais não ativam o sistema de recompensa da mesma maneira que os adoçantes naturais.

Já foi demonstrado que uma única dose de 200 mg/Kg de aspartame consegue aumentar os níveis de tirosina e fenilalanina (Phe) plasmáticas em 142% e 62%, respectivamente (Yokogoshi, et al., 1984). Os níveis de tirosina irão aumentar como um subproduto da oxidação da Phe no fígado (Fernstorm, 1988; Stegink et al., 1988). Esses níveis elevados de Phe, devido ao consumo de aspartame, poderiam potencialmente acumular no cérebro, o que poderia levar a mudanças nas concentrações de neurotransmissores. Foi, contudo, demonstrada uma diminuição de neurotransmissores como serotonina (5-HT), noradrenalina e dopamina (DA) no encéfalo de camundongos tratados com aspartame (Abdel-Salam, et al., 2012). DA e 5-HT são importantes neurotransmissores na regulação do comportamento alimentar. Acredita-se que a DA regule esse comportamento via sistema meso-hipotalâmico por seus aspectos hedônicos e via sistema nigroestriatal pelo gasto energético (Berthoud & Morrison, 2008; Palmiter, 2007; Gambarana et al., 2003). Apesar de não estar claro o papel específico da DA na obesidade, existem fortes evidência de que uma neurotransmissão dopaminérgica defeituosa está associada com obesidade tanto em animais quanto em humanos. A 5-HT, por sua vez, possui um efeito inibitório sobre o comportamento

alimentar, tanto em roedores quanto em humanos, o que foi demonstrado por diversos estudos nos quais a administração de compostos serotoninérgicos afeta o consumo alimentar e a preferência por gordura (McTavish & Heel, 1992; Blundell & Lawton, 1995; Lawton et al., 1995; Simansky, 1996; White et al., 2000; Bray, 2001; Lean, 2001). Um estudo realizado por Wurtman (1983) mostrou, em ratos, que altas doses de aspartame conseguem suprimir o aumento nas concentrações de serotonina, que normalmente ocorre após a ingestão de glicose. Uma vez que vários estudos mostram que a serotonina promove saciedade, a sua supressão poderia, teoricamente, estimular o apetite.

Outra hipótese que tem se mostrado bastante promissora é que os AAs, através de seus efeitos bacteriostáticos, poderiam estar interferindo com a microbiota do trato digestivo e influenciando o metabolismo. Em um trabalho recente, Suez et al. (2014) demonstraram que animais expostos durante 11 semanas a AAs tiveram um maior pico de glicose quando alimentados com alimento doce do que os controles. Suez et al. (2014) demonstraram que a hiperglicemia induzida por AAs era transferível para animais controle sem microbiota intestinal que nunca tinham sido expostos a sacarina, mas que receberam um transplante fecal de ratos alimentados com sacarina ou de uma microbiota incubada *in vitro* em presença de sacarina. Consistente com esses estudos, Palmnas et al. (2014) demonstraram os efeitos do aspartame sobre a microbiota intestinal e sobre o metabolismo.

Na literatura, são discutidas outras teorias, além das citadas acima, sobre como os AAs atuam para influenciar o metabolismo, e vários mecanismos, que não são mutuamente excludentes, poderiam explicar a associação paradoxal entre o consumo de AAs e as alterações metabólicas observadas nos estudos epidemiológicos. Apesar desses estudos demonstrando uma associação entre o consumo de AAs e distúrbios metabólicos em humanos (Dhingra et al., 2007; Fowler et al., 2008; Lutsey et al., 2008) e de todos os dados mostrando a causalidade entre a exposição a AAs e distúrbios metabólicos em animais (Swithers & Davidson, 2008; Corey et al., 2012; Kyriazis et al., 2012; Swithers et al., 2013), muito ainda é necessário para entender exatamente como essa interação acontece.

#### 2.2.2.2 *Sacarina*

A sacarina é um produto que possui um amplo uso na indústria alimentícia, podendo ser encontrada em refrigerantes, produtos de panificação, geleias, conservas de frutas, doces,

molhos para saladas, coberturas de sobremesa, goma de mascar e como adoçante de mesa (Shankar et al., 2013). Em 1977, após estudos vincularem o uso de sacarina com uma maior propensão ao desenvolvimento de câncer de bexiga em animais, o *Food and Drug Administration* (FDA), órgão de regulação dos EUA, propôs banir o produto. Após um ávido protesto dos consumidores, uma moratória foi emitida pelo Congresso Nacional daquele país sobre a decisão final de banimento. Estudos posteriores demonstraram que o câncer de bexiga associado ao consumo de sacarina seria específico da fisiologia dos roedores (Kroger et al., 2006). A sacarina não é metabolizada no trato gastrointestinal e, portanto, não afeta os níveis de insulina no sangue, o que faz com que esse adoçante seja indicado a pacientes diabéticos.

Diversos estudos com animais têm associado o uso de sacarina com o ganho de peso. Em um estudo no qual os animais eram expostos a sacarina ou glicose 1 hora antes da refeição, o AA gerou um aumento de peso 20% maior (Swithers & Davidson, 2008). Estudos recentes têm sustentado a hipótese de que a sacarina, assim como outros AAs, leva a uma dissociação entre a percepção do gosto doce e a ingestão calórica consequente, induzindo maior consumo energético e ganho de peso por não haver a compensação calórica que ocorre normalmente (Davidson et al., 2011). Adicionalmente, outros autores constataram que o sabor doce da sacarina pode também induzir secreção de insulina, de forma independente do conteúdo energético ou da glicemia (Berthoud et al., 1980; Ionescu et al., 1988; Malaisse et al., 1998; Jang et al., 2007; Just et al., 2008). Muito dessa secreção independente de insulina parece ocorrer através da interação da sacarina com receptores de sabor existentes em células beta-pancreáticas (Nakagawa et al., 2009; Al-Saleh et al., 2011). Essa liberação de insulina pelas células beta vai estimular o armazenamento da glicose circulante tanto no fígado quanto nos tecidos. Desta maneira, o consumo do AA resultaria em baixos níveis glicêmicos e um aumento na secreção de insulina, o que potencializaria o comportamento alimentar e a captação da glicose.

### 2.2.2.3 Aspartame

O ASP é um pó branco, cristalino e inodoro, 180-200 vezes mais doce que a sacarose, que é hidrolisado completamente em três subprodutos: Phe (50%), ácido aspártico (40%) e metanol (10%) (Rowe et al., 2009). Devido a essa metabolização, é obrigatório um aviso no rótulo de todos os produtos contendo ASP para indivíduos portadores de



fenilcetonúria. Aprovado para uso na indústria alimentícia somente em 1981, é o AA que possui maior polêmica na literatura científica, sendo um dos aditivos alimentares mais estudados antes de receber o selo de aprovação pelo FDA (Stegink, 1984). O uso do ASP como um agente adoçante tem sido controverso por anos devido aos efeitos prejudiciais de altas concentrações dos seus metabólitos, o que fez com que fosse estabelecida uma dose aceitável para consumo de 40 mg/kg por dia (European Commission of Food, 2002; Magnuson et al., 2007). Estudos têm demonstrado que os principais consumidores desses produtos são crianças e mulheres em idade fértil (Gardner et al., 2012; Maslova et al., 2013).

Apesar de ser liberado para o uso, a literatura sobre a segurança do aspartame tem se mostrado bastante controversa. Por um lado, alguns estudos demonstraram que o aspartame é seguro e não causa tumores cerebrais (Ishii, 1981; Butchko et al., 2002). Por outro lado, Olney e colaboradores (1996) reportaram que o aspartame pode estar associado com um aumento na incidência de tumores cerebrais. Além disso, outros estudos têm demonstrado que o consumo deste adoçante está relacionado com neurotoxicidade (Christian et al., 2004; Tsakiris et al., 2005; Bergstrom et al., 2007; Gallus et al., 2007; Roberts, 2007; Soffritti et al., 2007; Whitehouse et al., 2008), com o aumento do risco de desenvolvimento de leucemia (Soffritti et al., 2005, 2006, 2007), assim como cânceres de fígado e de pulmão (Soffritti et al., 2010).

Ao longo dos anos, diversos estudos têm relacionado o consumo de aspartame com uma possível desregulação do metabolismo. Hill & Blundell (1986) relataram que o consumo de aspartame resultou em aumento do apetite. No ano de 1990, Tordoff e colaboradores observaram que uma estimulação oral por aspartame, através de uma goma de mascar, aumentava a sensação de fome, e sugeriram que esse efeito se daria através de reflexos cefálico-hepáticos. Lavin et al. (1997) realizaram um estudo no qual avaliaram os efeitos de limonadas adoçadas com aspartame ou sacarose em mulheres com uma dieta restritiva. Durante o primeiro dia do estudo, o consumo de energia foi um pouco inferior ao beber a limonada adoçada com sacarose, indicando talvez um mecanismo de compensação na ingestão de calorias. No segundo dia, entretanto, o consumo de energia foi significativamente maior no grupo da limonada adoçada com aspartame, o que sugere que, quando em restrição alimentar, substituir as bebidas adoçadas com sacarose por bebidas dietéticas não reduz a ingestão total de energia e pode até resultar em um maior consumo.

Vários estudos em animais têm tentado explicar como o consumo de ASP pode levar o indivíduo a desenvolver doenças metabólicas. Como comentado acima, entre os mecanismos mais prevalentemente hipotetizados encontram-se: a) ativação de receptores de sabor doce no intestino, o que aumentaria a absorção de glicose (Margolskee et al., 2007;

Pepino et al., 2011), b) alteração da microbiota intestinal (Abou-Donia et al., 2008; Pepino et al., 2011), c) indução de estresse oxidativo (Collison et al., 2012a; Collison et al., 2012b), d) alteração de neurotransmissores cerebrais (Abdel-Salam et al., 2012), e) comportamento alimentar compensatório (Swithers et al., 2013).

Portanto, o aspartame e seus metabólitos poderiam potencialmente prejudicar uma série de processos corporais, incluindo metabolismo de aminoácidos, estrutura e metabolismo de proteínas, integridade dos ácidos nucleicos, funções neuronais e equilíbrio endócrino. Esses prejuízos, se ocorridos durante o desenvolvimento fetal, poderiam levar a alterações permanentes na circuitaria neural e no metabolismo desses neurotransmissores.

## **JUSTIFICATIVA**

Adoçantes artificiais são mais comumente utilizados em bebidas carbonadas, entretanto também podem ser encontrados em uma grande variedade de produtos, como comidas para bebês e comidas congeladas. Com uma seleção tão diversa de produtos disponíveis contendo adoçantes artificiais, é provável que uma pessoa possa entrar em contato com eles durante a vida toda, simplesmente ao fazer suas escolhas do dia a dia em comidas e bebidas (Yang, 2010). Sabe-se que diferentes intervenções no período gestacional produzem diversos efeitos sobre os filhotes. O conhecimento a respeito de como fatores precoces podem influenciar a saúde do indivíduo em longo prazo é de fundamental importância para a proposta de medidas de saúde pública. Apesar de existirem vários trabalhos demonstrando uma relação entre o consumo de adoçantes artificiais em certos períodos da vida e o desenvolvimento de obesidade, a literatura é muito escassa quanto a trabalhos avaliando os efeitos da exposição prolongada a adoçantes durante o período gestacional e de aleitamento, sobre o comportamento e parâmetros metabólicos dos filhotes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Devido ao crescente e disseminado uso de AA, conhecimentos mais aprofundados sobre os possíveis efeitos de exposições crônicas e em diferentes fases da vida são de grande importância e os conhecimentos adquiridos em experimentos com animais podem gerar hipóteses e questões relevantes à fisiologia humana.

O objetivo da presente investigação foi, portanto, o de estudar os efeitos da exposição crônica a dois dos principais AAs utilizados comercialmente, durante o período pré-natal, sobre diversos parâmetros comportamentais e do metabolismo energético na vida adulta.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da exposição crônica a AAs no período pré-natal sobre a atividade locomotora e a ansiedade na vida adulta

2. Avaliar os efeitos da exposição crônica a AAs no período pré-natal sobre o consumo alimentar de ração padrão ou alimentos doces na vida adulta, durante o jejum e durante o estado alimentado na idade adulta.

3. Avaliar os efeitos da exposição crônica a AAs no período pré-natal sobre o ganho de peso e sobre as gorduras epididimais e retroperitoneais na idade adulta.

4. Avaliar os efeitos da exposição crônica a AAs no período pré-natal sobre os níveis plasmáticos de glicose e lipídeos (colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL)) na idade adulta.

5. Avaliar os efeitos da exposição crônica ao ASP no período pré-natal sobre os níveis plasmáticos de leptina na idade adulta.

6. Avaliar os efeitos da exposição crônica ao ASP no período pré-natal sobre os receptores 5-HT1B e 5-HT2C no estriado e sobre o receptor IGF-1/IR no hipotálamo na idade adulta.

## 4 MÉTODOS E RESULTADOS

Os métodos e resultados serão apresentados na forma de dois artigos, o primeiro deles publicado na revista *Appetite* e o segundo, submetido à revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*.

#### **4.1 Artigo 1**

### **Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame**

E. von Poser Toigo \*, A.P. Huffell, C.S. Mota, D. Bertolini, L.F. Pettenuzzo, C. Dalmaz

Appetite 87: 168–174, 2015



## Research report

# Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame <sup>☆</sup>

E. von Poser Toigo <sup>\*</sup>, A.P. Huffell, C.S. Mota, D. Bertolini, L.F. Pettenuzzo, C. Dalmaz

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 October 2013

Received in revised form 15 December 2014

Accepted 21 December 2014

Available online 24 December 2014

## Keywords:

Artificial sweeteners

Obesity

Feeding behavior

Metabolism

Aspartame

Gestation

## ABSTRACT

The use of artificial sweeteners has increased together with the epidemic growth of obesity. In addition to their widespread use in sodas, artificial sweeteners are added to nearly 6000 other products sold in the US, including baby foods, frozen dinners and even yogurts. It has been suggested that the use of nonnutritive sweeteners can lead to body weight gain and an altered metabolic profile. However, very few studies have evaluated the effects of maternal consumption of artificial non-caloric sweeteners on body weight, feeding behavior or the metabolism of offspring in adult life. In this study, we found that animals exposed to aspartame during the prenatal period presented a higher consumption of sweet foods during adulthood and a greater susceptibility to alterations in metabolic parameters, such as increased glucose, LDL and triglycerides. These effects were observed in both males and females, although they were more pronounced in males. Despite the preliminary nature of this study, and the need for further confirmation of these effects, our data suggest that the consumption of sweeteners during gestation may have deleterious long-term effects and should be used with caution.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

The global prevalence of obesity continues to remain high and is directly associated with a dramatic increase in healthcare expenses as medical costs to treat obese patients are 42% higher than for normal-weight patients. The annual costs of obesity for the medical system in the United States alone is estimated to be as high as \$147 billion (Finkelstein, Trogdon, Cohen, & Dietz, 2009; Ogden et al., 2006). Therefore, the need to better understand factors that are associated with weight gain and obesity is an important public health as well as an economic issue.

The increased prevalence of obesity has been attributed to the increased dietary intake of high-fat foods, sugar and other caloric sweeteners, and reduced physical activity (Andersen, 2000). To counterbalance this problem, individuals have replaced sugar for artificial non-caloric sweeteners in an attempt to lose or maintain weight. Recently, however, a number of studies have questioned the long-term effectiveness of replacing sugar with artificial sweeteners. Increased Non-nutritive sweetener (NNS) consumption is associated with an increase in body weight (Fowler et al., 2008; Mattes & Popkin, 2009; Stelman & Garfinkel, 1988) and the increased prevalence of obesity (Fowler et al., 2008; Popkin & Nielsen, 2003; Yang,

2010). Furthermore, the use of saccharin or aspartame is associated with an increased sensation of hunger (Appleton & Blundell, 2007; Blundell & Green, 1996; Lavin, French, & Read, 1997; Rogers, Carlyle, Hill, & Blundell, 1988). However, these were performed in adult animals and, to our knowledge, very few studies have evaluated the effects of the maternal consumption of artificial non-caloric sweeteners on body weight, feeding behavior or metabolism of pups.

It has been reported that maternal diet composition and quality have a major influence on the metabolic development of offspring. Maternal obesity and over-nutrition may alter the hypothalamic leptin sensitivity (Férézou-Viala et al., 2007) and increase the expression of hypothalamic appetite-regulating peptides in the offspring. In addition, dams that consumed ad libitum high-fat (HF) or high-carbohydrate (HC) diets during gestation and lactation gave birth to pups with altered production and action of hypothalamic neuropeptides, such as neuropeptide-Y, and other molecules involved in the regulation of appetite and metabolism (Beck, Kozak, Moar, & Mercer, 2006; Cerf et al., 2010; Chang, Gaysinskaya, Karatayev, & Leibowitz, 2008; Chen & Morris, 2009; Kozak, Burlet, Burlet, & Beck, 2000; Kozak et al., 1998; Kozak, Richy, & Beck, 2005; Morris & Chen, 2009; Page, Malik, Ripple, & Anday, 2009). Thus, it is clear that maternal nutrition and environment during early development may markedly affect behavior and metabolism later in life (Jackson, Burdge, & Lillcrop, 2010) as well as the differentiation of the neuroendocrine system that regulates energy homeostasis which begins during the pre-natal period (Grove, Grayson, Glavas, Xiao, & Smith, 2005). Yet, few studies have investigated maternal

<sup>☆</sup> Acknowledgements: Financial support: National Research Council of Brazil (CNPq), and PRONEX, CAPES, FAPERGS/CNPq 10/0018.3.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [edutoigo@gmail.com](mailto:edutoigo@gmail.com) (E. von Poser Toigo).

diet and metabolism of offspring using artificial sweeteners during pregnancy. Thus, the aim of our study was to determine the effect of chronic consumption of artificial sweeteners during pregnancy on the metabolism and feeding behavior of pups as they reach adulthood.

## Materials and methods

For the present study, we used 16 adult female Wistar rats (90 days of age at the beginning of the treatment), weighing 150–200 g and their offspring. The animals were divided into 4 groups; control (receiving water), sucrose (45 g/L), saccharin (1.35 g/L) and aspartame (2 g/L). The experimentally-naïve animals were housed in groups of three to five, according to their groups, in home cages made of Plexiglas material (65 × 25 × 15 cm) with the floor covered with sawdust. They were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 and 19:00 h), at a room temperature of 22 ± 2 °C. The rats had free access to food (standard rat chow) and water (or the different solutions). The compounds were administered in the drinking water as the only source of water for 30 days. Subsequently, the females were placed with a male, in a ratio of 3 to 1, in order to mate. Animals were then monitored and approximately 5 days prior to delivery, the dams were isolated. The animals continued receiving the treatment until giving birth. After birth all animals received free access to water and standard lab chow and all litters were standardized at 8 animals per mother. At 21 days post-partum the pups were separated from the dams and divided by sex. The animals were left undisturbed until the start of behavioral procedures with free access to standard chow and tap water. At 112 days of age the animals were killed by decapitation in order to perform the biochemical evaluations. No more than two animals per sex per litter were used per experiment. All studies were approved by the Institutional Ethical Committee and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and of the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology.

## Behavioral procedures

### *Habituation to the new foods*

From 60 days of age, rats were habituated to a novel environment containing new foods. During this period, they were placed in a lighted rectangular box (40 cm × 15 cm × 20 cm) with floor and side walls made of wood and a glass ceiling. Ten Froot Loops® (Kellogg's® – pellets of wheat, cornstarch and sucrose) were placed at one end of the box. The animals were habituated to this environment during 5 days, 3 min each day, under food restriction (80% of habitual ingestion of standard lab chow) in order to avoid the neophobic effect of presenting a food other than the usual rat chow. After the habituation session, the animals were fed ad libitum and exposed to a 3-min test session, 24 h later. Time spent until the initiation of eating and the number of ingested Froot Loops® were evaluated in each trial and in the test session. A protocol was established so that when the animals ate part of the Froot Loops® (e.g., 1/3 or 1/4), this fraction was considered.

### *Open-field test*

At 70 days of age the animals were submitted to the open-field test which consisted of an open wooden arena (60 × 40 cm) with 12 equally-divided areas measuring 15 × 13.3 cm and fifty-centimeter high wall. The front wall was made of glass, which allowed the observation of the animal by the researcher. The open-field test was originally described to study emotionality (reviewed by Prut & Belzung, 2003) and has been extensively used to evaluate motor

activity, having the ability to detect and quantify both increased and decreased motor activity due to pharmacological and non-pharmacological factors (Frussa-Filho et al., 2010). The number of line crossings and the time in the central area were recorded for a 5 min period as a measurement of locomotor activity.

### *Elevated plus maze*

At 73 days of age the animals were evaluated for anxiety by being submitted to the elevated plus maze that consisted of two opposing open arms (48.5 × 10 cm), two opposing enclosed arms with no roof (48.5 × 9.5 × 49 cm), and an open area (13 × 10 cm) in the center. The maze was elevated 50 cm above the floor. The behavioral test was conducted in the same observational room using red light illumination. The animal was placed in the center of the plus maze, facing one of the open arms, and remained in the apparatus for 5 min. Rats tend to avoid unprotected areas of a novel environment. Therefore, they will typically explore the arms with walls, avoiding the open arms. When the animal stays longer in the closed arms, and rarely ventures out to the open arms, this behavior is interpreted as anxious-like (Bertoglio & Carobrez, 2010); thus the number of entries and the time spent in the open or enclosed arms were recorded to assess anxiety.

## Chocolate and lab chow consumption

To evaluate the feeding behavior of treated animals when they had free access to a high caloric sweet food, 1 male and 1 female animal per litter were chosen at random and from the ages of 80 to 110 days the animals were exposed to a free choice between standard chow and chocolate. The consumption of both foods was measured on a daily basis.

### *Blood collection and evaluation of abdominal fat*

At 112 days of life the animals were killed by decapitation between 10:00 and 16:00 h, and the trunk blood was collected using EDTA, centrifuged at 4 °C at 1000 g, and plasma separated and stored at –80 °C until analysis. The epididymal and retroperitoneal fats were dissected and weighed on a precision scale.

## Plasma lipids and glucose (blood biochemistry)

Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), and triglyceride analyses were performed on EDTA plasma collected. TC and triglycerides were measured by enzymatic method kits (Wiener Lab, Argentina). HDL concentrations were measured by a system for selective precipitation of Low and Very Low Density Lipoproteins (LDL and VLDL) and HDL cholesterol measurement in the supernatant, using an end-point reaction, as described in the HDL Kit (Labtest, Brazil). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL) was calculated using the Friedewald formula. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina). All analyses were performed on a Spectra Max M5 autoanalyzer.

## Statistical analyses

Results are expressed as mean and standard deviation. All data were analyzed by one-way ANOVA; a post hoc Duncan test was employed when appropriated to compare the differences between the groups. Since the present study presented multiple comparisons, we applied the Bonferroni correction to diminish the false discovery rate and  $P < 0.001$  was considered statistically significant. All data were analyzed using SPSS software, made by IBM, New York.

## Results

Fluid consumption was evaluated during treatments and each animal was found to consume approximately 30 mL fluid/day (data not shown). **Figure 1** demonstrates that males from the groups whose mothers were treated with sucrose and saccharin did not present any increase in the number of entries in the closed arms [ $F(3,26) = 3.46$ ,  $p = 0.03$ ] (**Fig. 1A**) of the apparatus. On the other hand, females from the group whose mothers were treated with aspartame showed a reduced number of entries in the closed [ $F(3,36) = 11.47$ ,  $p < 0.001$ ] and open arms [ $F(3,36) = 6.60$ ,  $p < 0.001$ ] (**Fig. 1B**). As also shown in **Fig. 1**, both males and females spent more time in the closed arms [males,  $F(3,26) = 134$ ,  $p < 0.001$ ; females,  $F(3,36) = 135$ ,  $p < 0.001$ ] and less time in the open arms [males,  $F(3,26) = 29.94$ ,  $p < 0.001$ ; females,  $F(3,36) = 34.33$ ,  $p < 0.001$ ] (**Fig. 1C and D**, respectively). In order to assess whether these effects were due to altered motor activity, the open-field test was performed, which did not show any differences between the groups (data not shown).

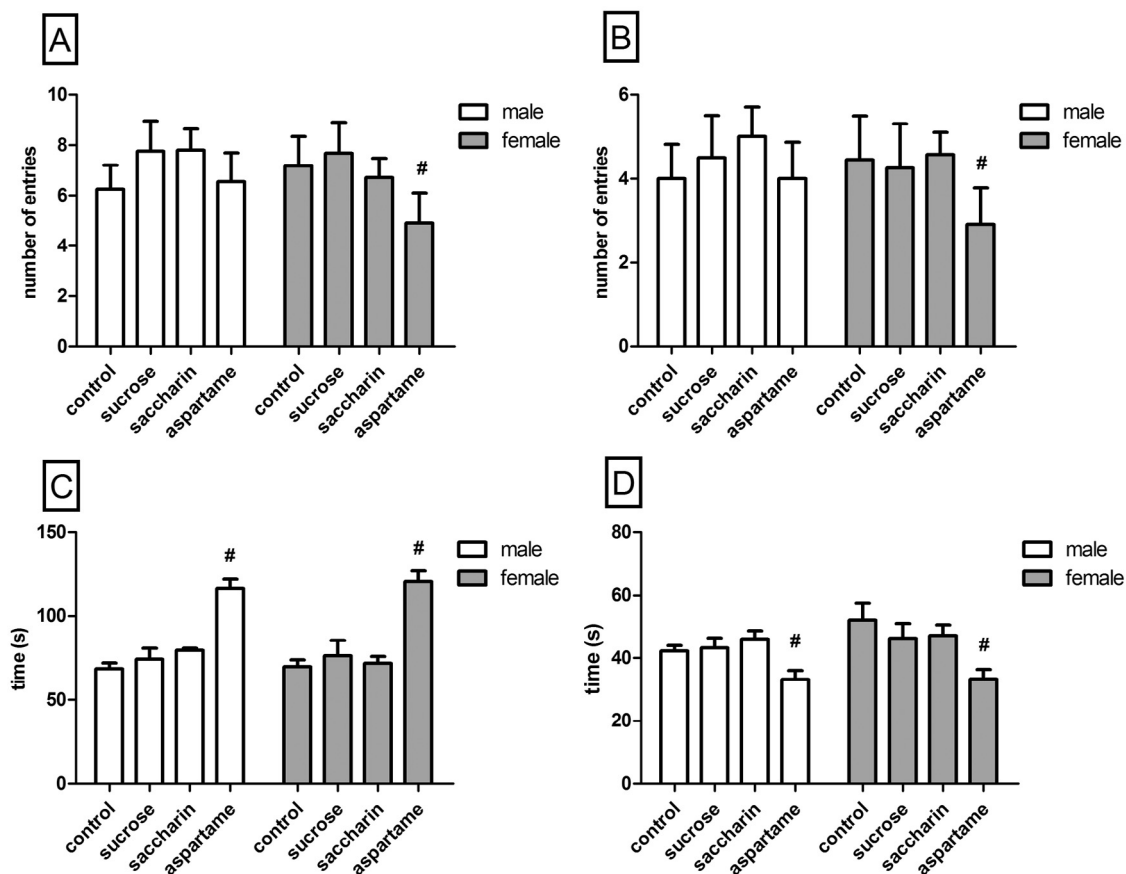
Using repeated measures ANOVA, male pups whose mothers were treated with aspartame Froot Loops® ate more compared to the saccharin-treated group as shown for both within subjects  $F(12,104) = 3.98$  ( $p = 0.001$ ) and between subjects effect  $F(3,26) = 6.89$  ( $p < 0.001$ ), **Fig. 2A**. In addition, female animals whose mothers were treated with aspartame ate more Froot Loops® during the five-day trial compared to all other groups [within subjects effects  $F(12,168) = 4.54$ ,  $p < 0.001$ ; between subjects effects,  $F(3,42) = 7.27$ ,  $p < 0.001$ , **2B**). In the test session, offspring from mothers treated with aspartame showed increased Froot Loops® consumption,

for both males and females [males,  $F(3,26) = 39.8$ ,  $p < 0.001$ ; females,  $F(3,42) = 63.66$ ,  $p < 0.001$ ].

There was no statistically significant increase in the consumption of calories from chocolate in the aspartame group [ $F(3,15) = 4.32$ ,  $p = 0.022$ ], when this type of food was offered chronically (**Fig. 3**). As food consumption was measured in home cages with 3 to 4 animals per cage, data for males and females were analyzed together.

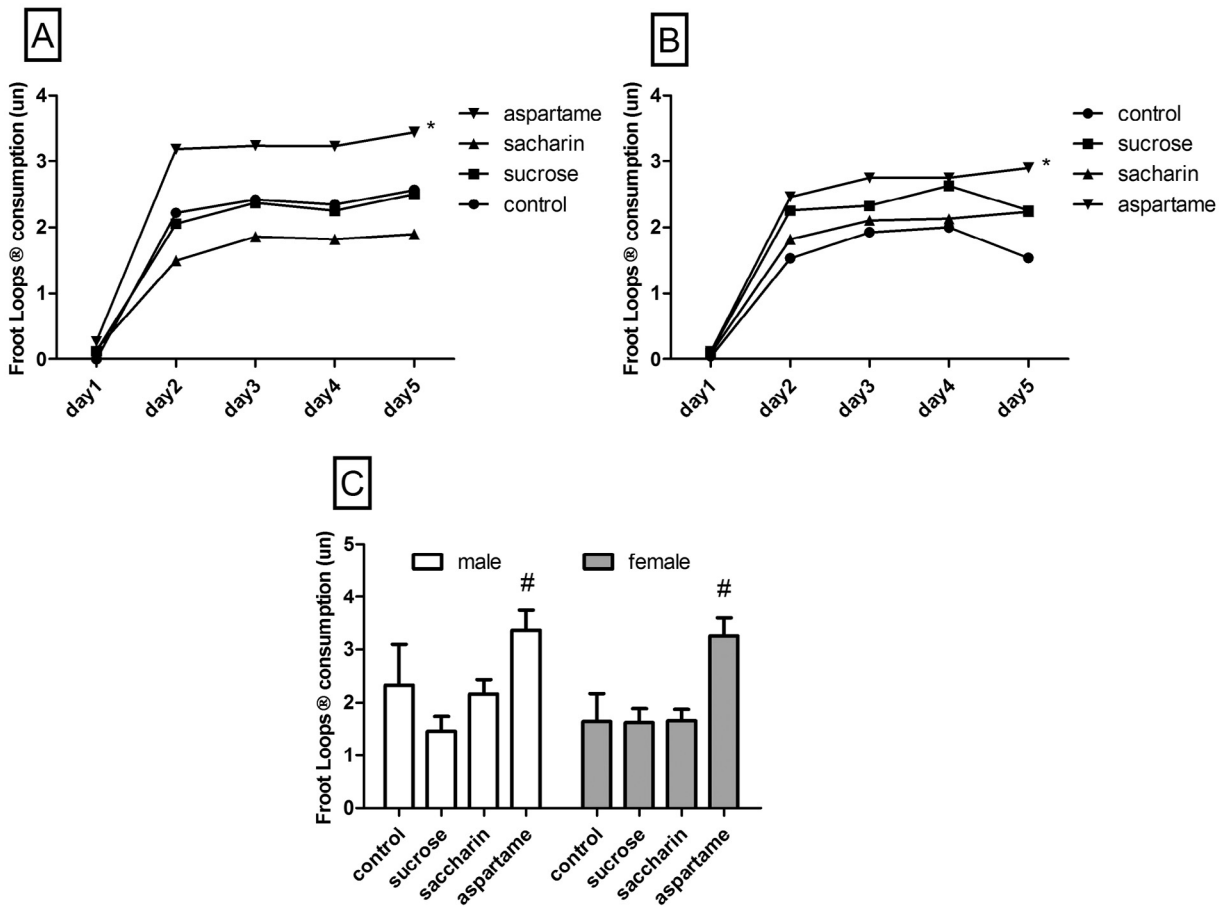
As shown in **Fig. 4A**, an increase in weight gain was observed in males whose mothers were treated with aspartame and saccharin [ $F(3,26) = 21.6$ ,  $p < 0.001$ ]; the same result was not observed for females whose mothers were treated with aspartame [ $F(3,36) = 3.05$ ,  $p = 0.041$ ]. However, **Fig. 4B** shows that the increase in gonadal fat depots in males of the sucrose and aspartame groups is not statistically significant [ $F(3,26) = 3.29$ ,  $p = 0.036$ ] and the same effect was also observed in the retroperitoneal fat depots in the females of the saccharin group [ $F(3,36) = 3.36$ ,  $p = 0.029$ ].

Plasma lipids values are presented by group in **Fig. 5**. An increase in cholesterol and LDL in the sucrose and aspartame treated groups was determined for both in males [ $F(3,26) = 19.02$ ,  $p < 0.001$ ]; [ $F(3,26) = 15.80$ ,  $p < 0.001$ ] and females [ $F(3,36) = 8.38$ ,  $p = 0.001$ ]; [ $F(3,36) = 12.57$ ,  $p < 0.001$ ] as shown in **Fig. 5A and B**. It was also observed that females from the saccharin-treated group presented increased LDL [ $F(3,36) = 12.57$ ,  $p < 0.001$ ]. Males of the sucrose and aspartame groups presented an increase in triglycerides [ $F(3,26) = 20.82$ ,  $p < 0.001$ ] compared to the control group (**Fig. 5D**). Finally, plasma glucose levels were increased in the group whose mothers were treated with aspartame, as shown in **Fig. 6** [males,  $F(3,26) = 11.18$ ,  $p < 0.001$ , females,  $F(3,36) = 20.57$ ,  $p < 0.001$ ].



**Fig. 1.** Effect of chronic consumption of sweeteners by the dam on adult offspring performance in the plus maze test: (A) number of entries on closed arms; (B) number of entries in open arms; (C) time spent in the closed arms; (D) time spent in the open arms. # different from all other groups.





**Fig. 2.** Effect of chronic consumption of sweeteners by mother on feeding behavior of adult offspring: (A) Froot Loops® consumption (units) in males during trials; (B) Froot Loops® consumption (units) in females during trials; (C) Froot Loops® consumption (units) in the test. \* Different from control group; # different from all other groups.

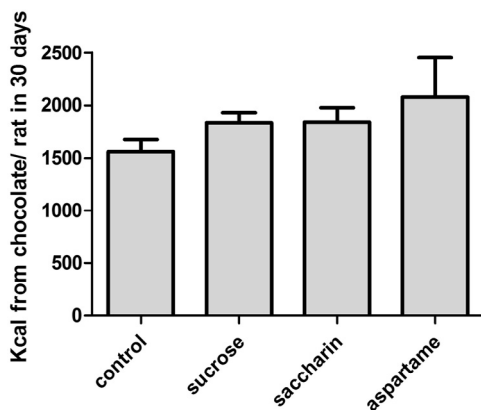
**Discussion and conclusion**

As the global prevalence of obesity continues to increase, it is important to determine factors that promote excess weight gain. Recent studies have associated the increase in food consumption and consequently in weight gain with the increase in the use of NNS (Fowler et al., 2008; Mattes & Popkin, 2009; Yang, 2010). The present study provides additional support to this idea by demonstrating that

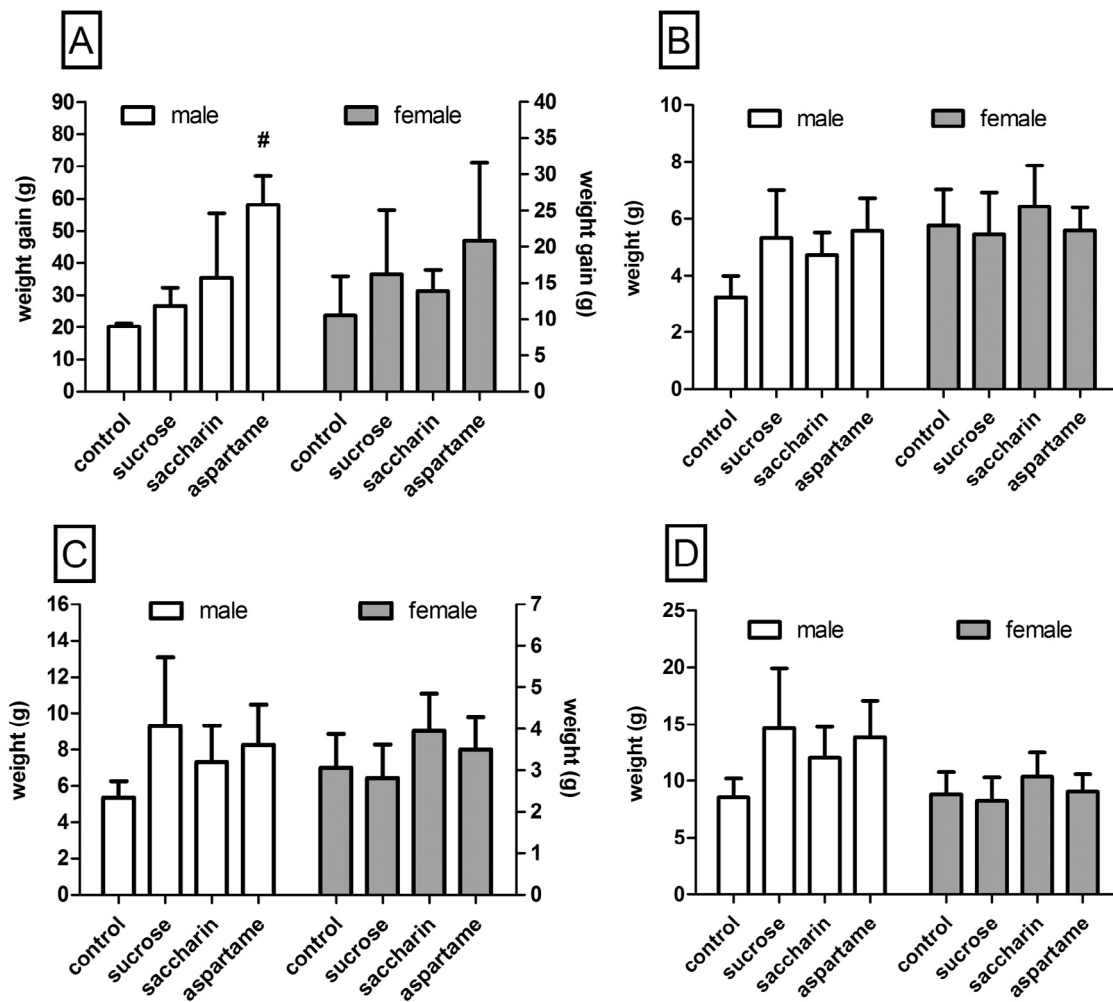
offspring of dams that consumed aspartame during pregnancy, when evaluated as adults, showed increased consumption of palatable foods and gained more weight, as well as exhibited more anxiety-like behavior, when compared to controls. Additionally, offspring of dams that consumed aspartame also had higher plasma glucose, total and LDL-cholesterol when compared to control subjects. In the case of the sucrose group, an increase in total cholesterol and LDL cholesterol was observed, as well as an increase in serum triglycerides in males.

Recent studies have suggested that consumption of artificial sweeteners may lead to an increased risk of excessive weight gain, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease (Duffey, Steffen, Van Horn, Jacobs, & Popkin, 2012; Lutsey, Steffen, & Stevens, 2008; Yang, 2010). Several large-scale prospective cohort studies have found a positive correlation between artificial sweetener use and weight gain in adults (Colditz et al., 1990; Fowler et al., 2008; Stellman & Garfinkel, 1988) and in children (Berkey, Rockett, Field, Gillman, & Colditz, 2004; Blum, Jacobsen, & Donnelly, 2005; Striegel-Moore et al., 2006). Consistent with the findings of our study, artificial sweeteners appear to have more effects in males than in females (Berkey et al., 2004). However, these similarities must be viewed with a great deal of caution, given the fact that these studies were performed in consumers of sweeteners, and that effects were not evaluated in the consumers’ offspring.

With regards to feeding behaviors and dietary intake, recent studies suggest that artificial sweeteners do not activate the food reward pathway in the same manner as natural components as there is a lack of a caloric contribution to eliminating the post-ingestive



**Fig. 3.** Effect of chronic consumption of sweeteners by mother on homecage chocolate consumption by adult offspring.



**Fig. 4.** Effect of chronic consumption of sweeteners by mother on adult offspring weight gain and fat after 30 days of free access to chocolate: (A) weight gain of males is represented on the left Y scale and of females is on the right Y scale; (B) Gonadal fat weight; (C) retroperitoneal fat weight; (D) total abdominal fat weight. # different from all other groups.

component. The absence of complete satisfaction, due to the failure to activate this post-ingestive factor, enhances food-seeking behavior, which may contribute to obesity. Despite the fact that aspartame is usually completely hydrolyzed (Rycerz & Jaworska-Adamu, 2013), when pregnant animals are subjected to chronic, high levels of this sweetener, some may reach the fetus. In animals that were subjected to aspartame throughout their prenatal development, their ability to activate the post-ingestive factor of the food reward pathway may be affected, or underdeveloped, losing, at least in part, this hypothalamic control of food ingestion, especially concerning sweet foods. We found that animals whose mothers consumed aspartame during pregnancy consumed more energy than those born to mothers fed a standard diet, both during short-term and in a long-term exposure to palatable food. These findings suggest that animals chronically subjected to aspartame during the prenatal period could have developed a less efficient mechanism of satiety or a distinct mechanism of reward related to palatable food, which could lead to compensatory over-eating and positive energy balance later on in life, even if the exposure to the sweetener occurred in the past, during the intra-uterine life. However, due to the novelty of the subject, further studies must be performed in order to confirm or deny the present findings.

We found that animals with perinatal exposure to aspartame developed an anxiety-like behavior as adults. Similar to our findings, other studies have demonstrated that perinatal decreases in serotonin, which may be generated by chronic exposure to high levels of Phe can lead to increased anxiety-like behavior in adults (Gross et al., 2002). In fact, studies have suggested that, in rodents, chronic treatment with aspartame (Christian et al., 2004; Dow-Edwards, Scribani, & Riley, 1989) and its exposure prenatally may cause behavioral differences and learning impairment, suggesting the possibility of an effect on pathways related to learning and development in the brain (Humphries, Pretorius, & Naude, 2008). Specifically, a single dose of 200 mg/kg of aspartame can increase plasma tyrosine and Phe levels by 142% and 62%, respectively in rats (Yokogoshi, Roberts, Caballero, & Wurtman, 1984). Furthermore, tyrosine will increase as a breakdown by-product of Phe in the liver (Fernstrom, 1988; Stegink, Filer, & Baker, 1988) and the aspartame-induced elevated levels of phenylalanine could potentially accumulate in the brain, leading to changes in regional brain concentrations of neurotransmitters (Abdel-Salam, Salem, & Hussein, 2012). In addition, it has been demonstrated that a tryptophan-deficient diet during the neonatal period can also lead to an increase in anxiety-like behavior in adult life (Zoratto, Fiore, Ali, Laviola, & Macri, 2013). Our results are consistent with other studies that have

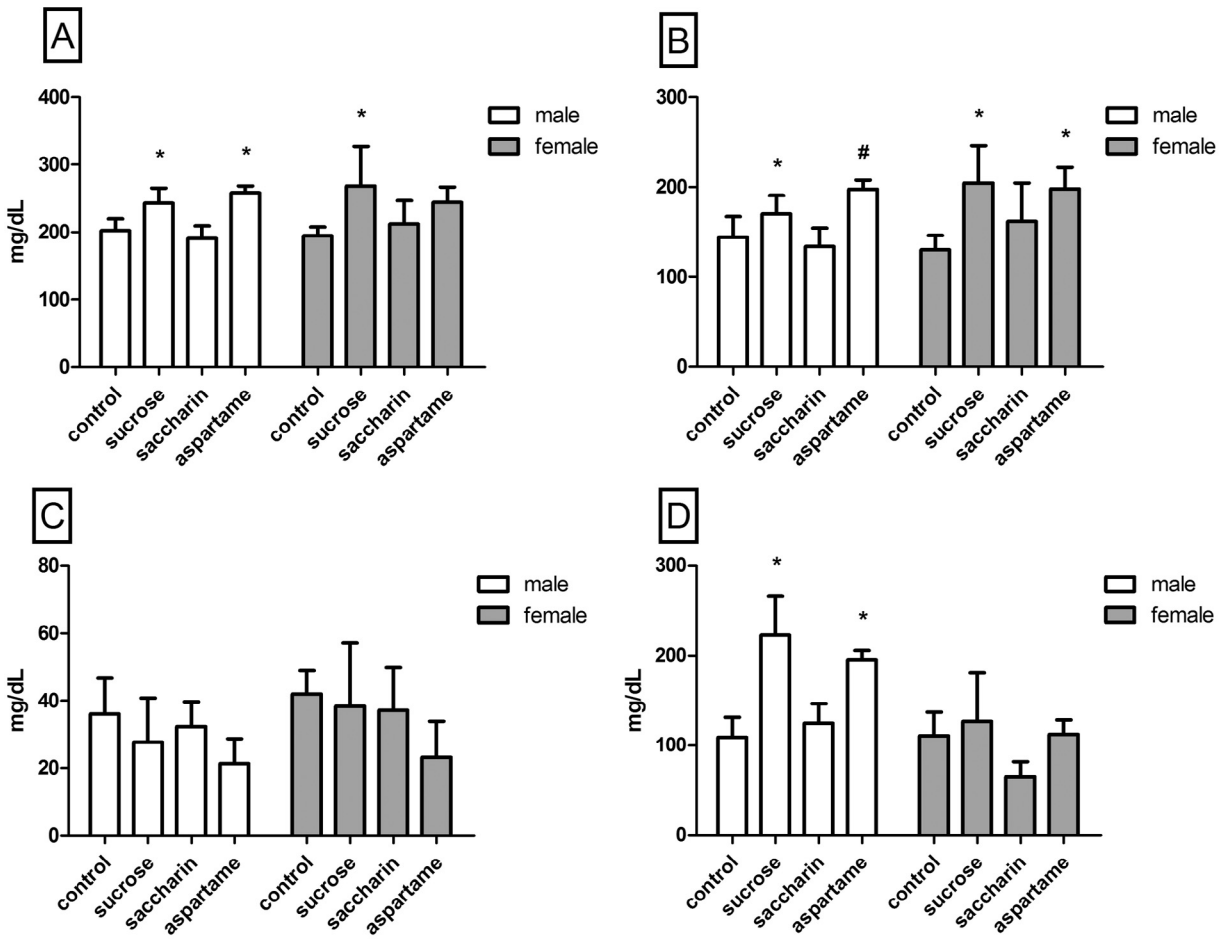


Fig. 5. Effect of chronic consumption of sweeteners by mother on adult offspring lipid profile: (A) total cholesterol; (B) LDL; (C) HDL; (D) triglycerides. \* Different from control group; # different from all other groups.

found an increase in the consumption of sweet foods in association with anxiety-like behavior (Ely et al., 1997; Silveira et al., 2000). Thus, aspartame and its components could potentially disrupt a wide range of processes in the body. This disruption, if occurring during fetal development, could lead to permanent alterations in brain circuits and in the metabolism of these neurotransmitters.

Regarding post-natal metabolism, we found an increase in the plasma glucose levels in the animals whose mothers were treated with aspartame, both males and females. It is generally agreed that Phe is actively transported across the placenta (Pueschel, Boylan, Jackson, & Piasecki, 1982), resulting in an increase in placental Phe dependent on maternal consumption. In rodents, high levels of accumulated Phe may be converted into other metabolites (Gazit, Ben-Shlomo, Ben-Shachar, Karnieli, & Katz, 1998; Scriver, Kaufman, Eisensmith, & Woo, 1995) that could interfere with normal metabolism (Gazit, Ben-Abraham, Rudin, & Katz, 2003; Gazit et al., 1998). In rodents, phenylalanine hydroxylase activity is absent until the end of gestation (Tourian, Treiman, & Carr, 1972; Yeoh et al., 1988). It is improbable that the concentration of phenylalanine in the brains of offspring is as high as that found in hyperphenylalaninemia, but a small chronic alteration in neuronal glucose homeostasis during prenatal development could lead to permanent changes in this parameter. Taken together, these disturbances could explain the mechanism underlying the perturbation in glucose homeostasis observed in our study.

In conclusion, we present one of the first studies showing the effects of gestational aspartame ingestion on offspring health as animals were found to develop a higher susceptibility to altered metabolic parameters, as well as augmented risk factors for cardiovascular disease. These effects were observed both in males and females, although they were more pronounced in males. This study is one of the first to indicate a possible deleterious effect of artificial sweeteners consumption during gestation. Still, other studies are needed to confirm and elucidate the mechanisms involved in the development of these effects.

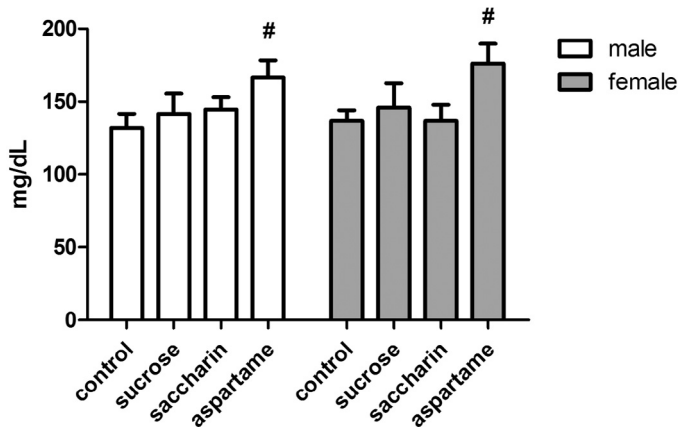


Fig. 6. Effect of chronic consumption of sweeteners by mother on adult offspring serum glucose. # Different from all other groups.

## References

- Abdel-Salam, O. M., Salem, N. A., & Hussein, J. S. (2012). Effects of aspartame on oxidative stress and monoamine neurotransmitter levels in lipopolysaccharide-treated mice. *Neurotoxicity Research*, 21, 245–255.
- Andersen, R. E. (2000). The spread of the childhood obesity epidemic. *Canadian Medical Association Journal*, 163, 1461–1462.
- Appleton, K. M., & Blundell, J. E. (2007). Habitual high and low consumers of artificially-sweetened beverages. Effects of sweet taste and energy on short-term appetite. *Physiology and Behavior*, 92, 479–486.
- Beck, B., Kozak, R., Moar, K. M., & Mercer, J. G. (2006). Hypothalamic orexigenic peptides are overexpressed in young Long-Evans rats after early life exposure to fat-rich diets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 452–458.
- Berkey, C. S., Rockett, H. R. H., Field, A. E., Gillman, M. W., & Colditz, G. A. (2004). Sugar-added beverages and adolescent weight change. *Obesity Research*, 12, 778–788.
- Bertoglio, L. J., & Carobrez, A. P. (2010). Animal tests for anxiety. In M. L. Andersen & S. Tufik (Eds.), *Animal models as tools in ethical biomedical research* (pp. 271–284). São Paulo: AFIP/CEPID.
- Blum, J. W., Jacobsen, D. J., & Donnelly, J. E. (2005). Beverage consumption patterns in elementary school aged children across a two-year period. *The Journal of the American College of Nutrition*, 24, 93–98.
- Blundell, J. E., & Green, S. M. (1996). Effect of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 20, 12–17.
- Cerf, M. E., Williams, K., van Rooyen, J., Esterhuysen, A. J., Muller, C. J., & Louw, J. (2010). Gestational 30% and 40% fat diets increase brain GLUT2 and neuropeptide Y immunoreactivity in neonatal Wistar rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28, 625–630.
- Chang, G. Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming. Increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *The Journal of Neuroscience*, 28, 12107–12119.
- Chen, H., & Morris, M. J. (2009). Differential responses of orexigenic neuropeptides to fasting in offspring of obese mothers. *Obesity*, 17, 1356–1362.
- Christian, B., McConaughy, K., Bethae, E., Brantley, S., Coffey, A., Hammond, L., et al. (2004). Chronic aspartame affects T-maze performance, brain cholinergic receptors and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 78, 121–127.
- Colditz, G. A., Willett, W. C., Stampfer, M. J., London, S. J., Segal, M. R., & Speizer, F. E. (1990). Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 1100–1105.
- Dow-Edwards, D. L., Scribani, L. A., & Riley, E. P. (1989). Impaired performance on odor-aversion testing following prenatal aspartame exposure in the guinea pig. *Neurotoxicology and Teratology*, 11, 413–416.
- Duffey, K. J., Steffen, L. M., Van Horn, L., Jacobs, D. R., Jr., & Popkin, B. M. (2012). Dietary patterns matter. Diet beverages and cardiometabolic risks in the longitudinal Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 909–915.
- Ely, D. R., Dapper, V., Marasca, J., Corrêa, J. B., Gamaro, G. D., Xavier, M. H., et al. (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology and Behavior*, 61, 395–398.
- Férézou-Viala, J., Roy, A. F., Sérugne, C., Grépois, D., Parquet, M., Bailleux, V., et al. (2007). Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293, 1056–1062.
- Fernstrom, J. D. (1988). Tryptophan, serotonin and carbohydrate appetite. Will the real carbohydrate craver please stand up! *Journal of Nutrition*, 118, 1417–1419.
- Finkelstein, E. A., Trogon, J. G., Cohen, J. W., & Dietz, W. (2009). Annual medical spending attributable to obesity. Payer- and service-specific estimates. *Health Affairs*, 28, 822–831.
- Fowler, S. P., Williams, K., Resendez, R. G., Hunt, K. J., Hazuda, H. P., & Stern, M. P. (2008). Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity*, 16, 1894–1900.
- Frusca-Filho, R., Fukushima, D. F., Patti, C. L., Marinho, E. A. V., Kameda, S. R., & Carvalho, R. C. (2010). Assessment of motor function in rodents. Behavioral models sharing simplicity and multifaceted applicability. Part 1. The open-field test. In M. L. Andersen & S. Tufik (Eds.), *Animal models as tools in ethical biomedical research* (pp. 287–313). São Paulo: AFIP/CEPID.
- Gazit, V., Ben-Abraham, R., Rudin, M., & Katz, Y. (2003). Glucose-lowering effect of beta-phenylpyruvate in neonatal mice. A possible mechanism for phenylketonuria-related neurodegenerative changes. *Developmental Brain Research*, 141, 137–140.
- Gazit, V., Ben-Shlomo, I., Ben-Shachar, D., Karnieli, E., & Katz, Y. (1998). Phenylpyruvate induced hypoglycemia. Relevance to the pathogenesis of brain damage in phenylketonuria. *Neuroscience Letters*, 51, S5.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., et al. (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*, 416, 396–400.
- Grove, K. L., Grayson, B. E., Glavas, M. M., Xiao, X. Q., & Smith, M. S. (2005). Development of metabolic systems. *Physiology and Behavior*, 86, 646–660.
- Humphries, P., Pretorius, E., & Naude, H. (2008). Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 451–462.
- Jackson, A. A., Burdge, G. C., & Lillcrop, K. A. (2010). Diet, nutrition and modulation of genomic expression in fetal origins of adult disease. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 3, 192–208.
- Kozak, R., Burlet, A., Burlet, C., & Beck, B. (2000). Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. *Developmental Brain Research*, 125, 75–82.
- Kozak, R., Mercer, J. G., Burlet, A., Moar, K. M., Burlet, C., & Beck, B. (1998). Hypothalamic neuropeptide Y content and mRNA expression in weanling rats subjected to dietary manipulations during fetal and neonatal life. *Regulatory Peptides*, 75, 397–402.
- Kozak, R., Richey, S., & Beck, B. (2005). Persistent alterations in neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus of rats subjected to dietary manipulation during early life. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2887–2892.
- Lavin, J. H., French, S. J., & Read, N. W. (1997). The effect of sucrose- and aspartame-sweetened drinks on energy intake, hunger and food choice of female, moderately restrained eaters. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 21, 37–42.
- Lutsey, P. L., Steffen, L. M., & Stevens, J. (2008). Dietary intake and the development of the metabolic syndrome. The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*, 117, 754–761.
- Mattes, R. D., & Popkin, B. M. (2009). Nonnutritive sweetener consumption in humans. Effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1–14.
- Morris, M. J., & Chen, H. (2009). Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *International Journal of Obesity*, 33, 115–122.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J., & Flegal, K. M. (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *The Journal of the American Medical Association*, 295, 1549–1555.
- Page, K. C., Malik, R. E., Ripple, J. A., & Anday, E. K. (2009). Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297, 1049–1057.
- Popkin, B. M., & Nielsen, S. J. (2003). The sweetening of the world's diet. *Obesity Research*, 11, 1325–1332.
- Pruet, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors. A review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3–33.
- Pueschel, S. M., Boylan, J. M., Jackson, B. T., & Piasecki, G. J. (1982). A study of placental transfer mechanisms in nonhuman primates using [<sup>14</sup>C]phenylalanine. *Obstetrics and Gynecology*, 59, 182–188.
- Rogers, P. J., Carlyle, J. A., Hill, A. J., & Blundell, J. E. (1988). Uncoupling sweet taste and calories. Comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake. *Physiology and Behavior*, 43, 547–552.
- Rycerz, K., & Jaworska-Adamu, J. E. (2013). Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathologica*, 51, 10–17.
- Scriver, C. R., Kaufman, S., Eisensmith, R. C., & Woo, S. L. C. (1995). The hyperphenylalaninemia. In C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, & D. Valle (Eds.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (pp. 1015–1075). New York: McGraw-Hill.
- Silveira, P. P., Xavier, M. H., Souza, F. H., Manoli, L. P., Rosat, R. M., Ferreira, M. B. C., et al. (2000). Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 1343–1350.
- Stegink, L. D., Filer, L. J., Jr., & Baker, G. L. (1988). Repeated ingestion of aspartame-sweetened beverage. Effect on plasma amino acid concentrations in normal adults. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 37, 246–251.
- Stellman, S. D., & Garfinkel, L. (1988). Patterns of artificial sweetener use and weight change in an American Cancer Society prospective study. *Appetite*, 11, 85–91.
- Striegel-Moore, R. H., Thompson, D., Affenito, S. G., Franko, D. L., Obarzanek, E., & Barton, B. A. (2006). Correlates of beverage intake in adolescent girls. The National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *Journal of Pediatrics*, 148, 183–187.
- Tourian, A., Treiman, D. M., & Carr, J. S. (1972). Developmental biology of hepatic phenylalanine hydroxylase activity in foetal and neonatal rats synchronized as to conception. *Biochimica et Biophysica Acta*, 279, 484–490.
- Yang, Q. (2010). Gain weight by 'going diet'? Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. *Neuroscience, Yale Journal of Biology Medicine*, 83, 101–108.
- Yeoh, G. C., Edkins, E., Mackenzie, K., Fuller, S., Mercer, J. F., & Dahl, H. H. (1988). The development of phenylalanine hydroxylase in rat liver; in vivo, and in vitro studies utilizing fetal hepatocyte cultures. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 38, 42–48.
- Yokogoshi, H., Roberts, C. H., Caballero, B., & Wurtman, R. J. (1984). Effects of aspartame and glucose administration on brain and plasma levels of large neutral amino acids and brain 5-hydroxyindoles. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 40, 1–7.
- Zoratto, F., Fiore, M., Ali, S. F., Laviola, G., & Macri, S. (2013). Neonatal tryptophan depletion and corticosterone supplementation modify emotional responses in adult male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 24–39.

## 4.2 Artigo 2

### **Use of aspartame during pregnancy alters plasma leptin and hypothalamic insulin pathway activation in the offspring**

**von PoserToigo, E.<sup>a</sup>; Krolow, R.<sup>a</sup>; Pettenuzzo, L.F.<sup>a</sup>; Dalmaz, C.<sup>a</sup>**

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS  
Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37.  
90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil  
Phone: 55 51- 3308-5570.  
Fax: 55 51- 3308-5535.  
E-mail: edutoigo@gmail.com

## ABSTRACT

The use of artificial sweeteners have grown in tandem with the obesity epidemic. Among these sweeteners, aspartame is the one that has arisen most controversy around its use. Many studies have suggested that the use of aspartame can lead to disruptions in the metabolic profile. Nonetheless, very few studies have evaluated the effects of chronic exposure during the prenatal period and its effect in the adult metabolism of the offspring. In this study, we found that animals exposed prenatally to aspartame presented higher levels of plasma leptin alongside a decrease in the receptors involved in the insulin pathway in the hypothalamus as they reach adulthood. These data suggest that aspartame consumption during pregnancy can lead to deleterious long-term effects in the offspring and may act as a risk factor to insulin resistance and higher susceptibility to develop metabolic disorders later in adulthood.

**Keywords:** metabolism; aspartame; leptin; insulin; pregnancy.

## Introduction

Several studies have shown that a poor nutrition provided during fetal and neonatal life can lead to disorders in later life, such as obesity and cardiovascular disease (Grove et al., 2005, Beck et al., 2006; Férezou-Viala et al., 2007; Cerf et al., 2010). Despite the fact that the consumption of aspartame has been increasingly associated with health problems such as overweight, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome (Malik et al, 2006; Johnson et al, 2009; Malik et al, 2010; van Baak and Astrup, 2009), very few studies have evaluated the effect of maternal consumption of aspartame on metabolic parameters of pups (von Poser Toigo et al., 2015).

A previous study from our laboratory demonstrated that exposure to aspartame during the prenatal period can increase the susceptibility to alterations in metabolic parameters, such as increased serum glucose, LDL and triglycerides, besides altering feeding behavior (von Poser Toigo et al., 2015). These results suggest altered control of food intake and energy balance in the pups whose mothers were exposed to aspartame during pregnancy; the changes observed could represent a higher vulnerability of these animals to metabolic syndrome, a set of metabolic abnormalities as well as an important pathophysiological factor in the development of type 2 diabetes, cardiovascular, and liver diseases (Biddinger and Kahn, 2006).

Insulin resistance is a major metabolic feature of obesity and a central component of the metabolic syndrome. Studies have shown that insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin receptor plays a critical role in brain glucose metabolism (Cheng et al., 2000) and feeding behavior (Obici et al., 2002; Niswender et al., 2003; Hallschmid et al., 2004). It is well established in the literature that the impairment of insulin signaling in the hypothalamus can alter the regulation of food intake (Schwartz et al., 1992; Baskin et al., 1999; Carvalheira et al., 2001; Obici et al., 2002; Torsoni et al., 2003). In addition, the weight gain associated with insulin resistance has been attributed to defective insulin signaling in the hypothalamus (Figlewicz et al., 1985; Ikeda et al., 1986; Schwartz et al., 1992; Bruning et al., 2000; Kahn and Flier, 2000; Obici et al., 2002).

Adipose tissue is the main endogenous source of circulating lipids as well as the site of production and secretion of several hormones and cytokines, including the adipocytokine leptin (Zhang et al., 1994; Kershaw and Flier, 2004). In obesity, high concentrations of plasma leptin are observed, and this situation may lead to leptin-resistance, that is associated to

metabolic diseases, including insuling resistance and type 2 diabetes (Ceddia et al., 2002). Conversely, weight loss is associated with reduction in leptinemia and increased insulin sensitivity (Sivitz et al., 1997; Chinookoswong et al., 1999).

Several studies have shown that aspartame can decrease the levels of monoamines, such as dopamine, norepinephrine and serotonin (5-HT) in different brain regions (Bergstrom et al. 2007; Andolina et al., 2011). Serotonin, beyond its known role in anxiety, has been shown to powerfully inhibit feeding in rodents when injected into various brain regions (Leibowitz et al., 1988), and drugs which increase 5-HT availability in the synaptic cleft, such as fluoxetine (Goldstein et al., 1994), dexfenfluramine (McTavish and Heel, 1992) and sibutramine (Lean, 1997), cause weight loss in obese humans. In addition, numerous 5-HT receptors have been identified and some of them have been implicated in modulating food intake, such as the 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub>, which may be among the receptors that mediate 5-HT's anorexic effect (Bendotti and Samanin, 1986; Macor et al., 1990; Grignaschi et al., 1996; Bonhaus et al., 1997).

Brain reward systems play an important role in feeding behavior and consequently in the pathophysiology of obesity (Saper et al., 2002; Finkelstein et al., 2005; Volkow and Wise, 2005; Lutter and Nestler, 2009; Kenny, 2011). There is a large body of research using different kinds of reward paradigms that underpin the substantial account of serotonin (5-HT) in reward (Ahn et al., 2005; Cools et al., 2005; Evers et al., 2005; Vollm et al., 2006; Walker et al., 2006, 2008; Ding et al., 2009). Studies throughout the last decades have established 5-HT as a satiety generating signal in the brain (Blundell, 1992; Lam and Heisler, 2007) and demonstrated that serotonergic disturbances can perpetuate excess eating and lead to obesity.

Given the fact that in our previous study we observed that animals exposed to aspartame in the prenatal period showed increased consumption of sweet foods, increased weight gain and higher glycemia (von Poser Toigo et al., 2015), pointing to altered control of food intake and energy balance, and since the hypothalamus is the brain region responsible for these functions (Smeets et al., 2005; Avena et al, 2008), it becomes important to further evaluate the effects of this sweetener during the prenatal period on insulin signaling, by measuring the insulin receptors in the hypothalamus, as well as on plasma leptin levels. Additionally, since altered sweet food consumption could be due to changes in the reward system, and the striatum is one of the regions involved in the reward response, serotonin receptors in this structure were also investigated. In this study we evaluated the effect of chronic consumption of aspartame during pregnancy on the hypothalamic IGF1-IR, and



striatal 5-HT1B and 5-HT2C receptors, as well as plasma leptin levels of pups as they reach adulthood. To this end, we exposed animals to aspartame *in utero* via the mother's drinking water, employing a dosage of aspartame similar to that of the recognized acceptable daily intake (ADI) of the artificial sweeteners

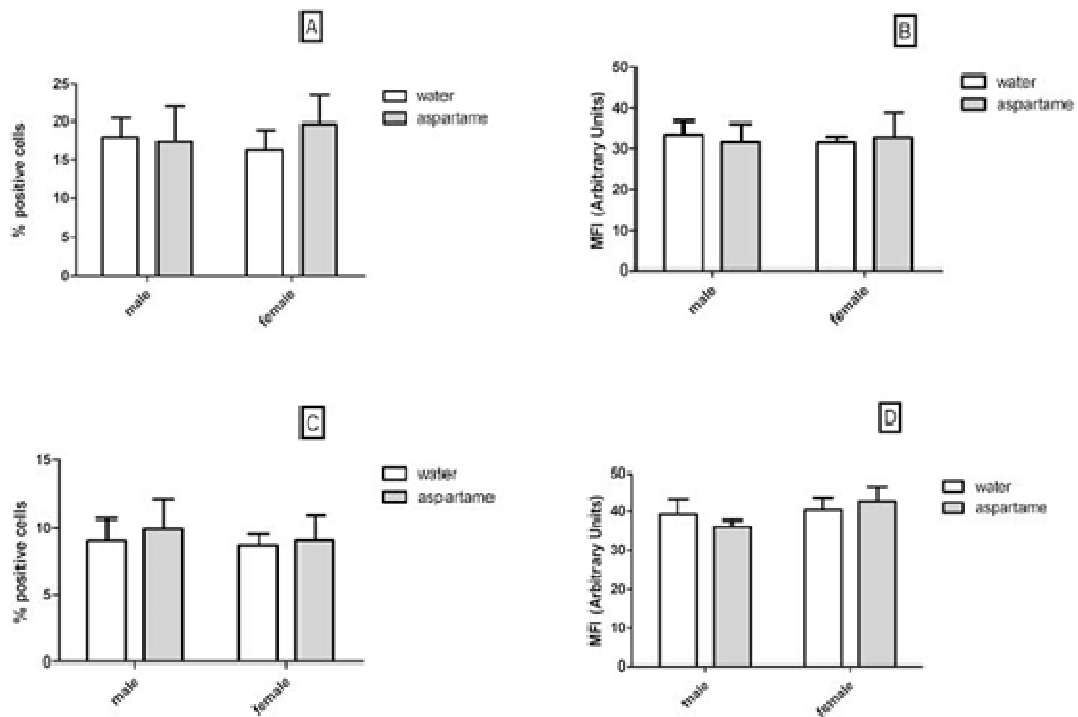
## Material and Methods

For the present study, we used adult female Wistar rats (90 days of age at the beginning of the treatment), weighing 150–200 g and their offspring. The females were divided into 2 groups; control (receiving water), and aspartame (2 g/L). The experimentally-naive animals were housed in groups of three to five, according to their groups, in home cages made of Plexiglas material (65 × 25 × 15 cm) with the floor covered with sawdust. They were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 and 19:00 h), at a room temperature of  $22 \pm 2$  °C. The rats had free access to food (standard rat chow) and water (or the aspartame solution). Aspartame was administered in the drinking water as the only source of water for 30 days. Subsequently, the females were placed with a male, for 3 days, in a ratio of 3 to 1, in order to mate. Animals were then monitored and approximately 5 days prior to delivery, the dams were isolated. The animals continued receiving the treatment until giving birth. After birth, all animals had free access to water and standard lab chow and all litters were standardized at 8 animals per dam. At 21 days post-partum the pups were separated from the dams and divided by sex. At 112 days of age the animals were left fasting for 12 hours and killed by decapitation in order to perform the biochemical evaluations. Trunk blood was collected into tubes with EDTA for leptin determination, which was measured by ELISA (Abnova Corporation, Jhongli City, Taoyuan County, Taiwan). The hypothalamus and striatum were dissected and tissue samples (30 mg) were mechanically dissociated with 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 0.1 mg/mL of collagenase IV, and decanted during 10 minutes to remove large clumps of cells and debris. Afterwards, the cells were permeabilized with 0.001 % PBS Triton X-100 and blocked for 15 min with bovine serum albumin 1 %. After blocking, the cells were incubated for 1 h in blocking solution containing the antibodies Anti-phospho-Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor (pTyr1162/1163) produced in rabbit, diluted 1:100 (Sigma Aldrich, Missouri, USA); Anti-5HT1b Receptor produced in rabbit, diluted 1:100 (Sigma Aldrich, Missouri, USA) and

Anti-5HT<sub>2C</sub> receptor produced in rabbit, diluted 1:100 (Sigma Aldrich, Missouri, USA). The cells were then incubated for 1 h in blocking solution containing Alexa 488 anti-rabbit IgG diluted 1:200 (Life technologies, CA, USA). The number of IR/IGF-1, 5HT<sub>1b</sub> and 5HT<sub>2C</sub> positive cells and the mean fluorescent intensity in positive cells were determined by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Negative controls (samples with the secondary antibody) were included for the machine voltage setup and negative gates setting. The emission of fluorochromes was recorded through specific band-pass fluorescence filters: green (FL-1; 530 nm/30) and red (FL-3; 670 nm long pass) using a CellQuest Pro software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Fluorescence emissions were collected by using logarithmic amplification. In brief, data from 10,000 events were acquired, after the exclusion of debris events from the data set. All flow cytometric analyses were performed using Flow Jo software 7.6.3 (Treestar, Ashland, OR). Flow cytometry data were analyzed and plotted by density as dot plots, which show the relative FL1 or FL3 fluorescence on the x-axis and the forward scatter on the y-axis. The negative and positive quadrants were determined by using samples stained only with the secondary antibody. The number of cells in each quadrant and the mean fluorescent intensity was computed (Hansel et al., 2015). No more than two animals per sex per litter were used per experiment. All studies were approved by the Institutional Ethical Committee and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and of the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology.

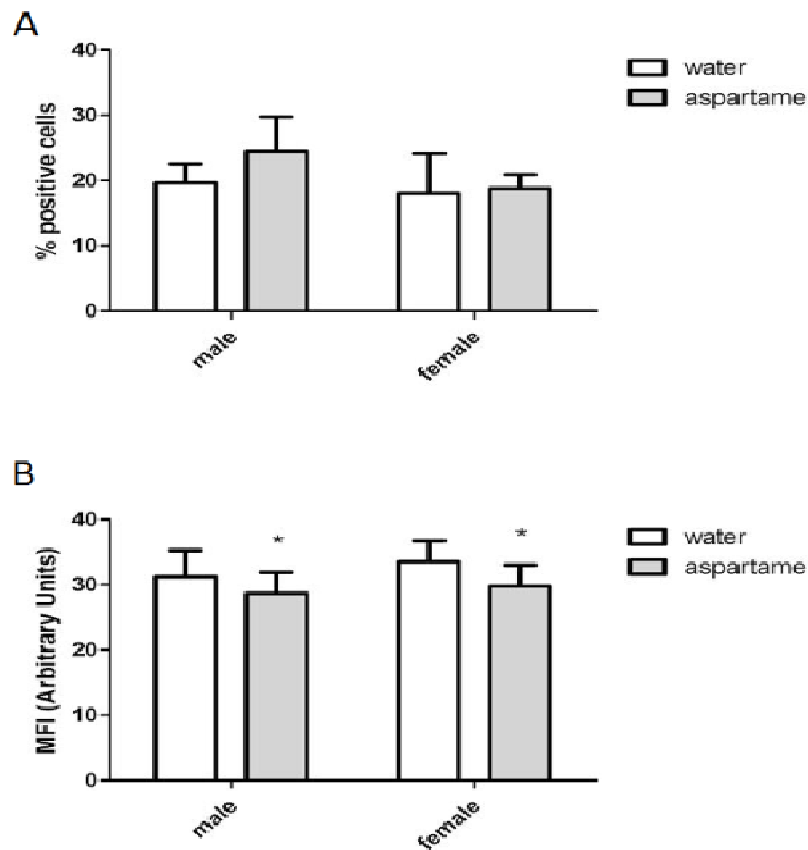
## **Results**

In this study, as shown in Figure 1, intrauterine exposure to aspartame did not have effects neither on the striatal number of positive cells stained to 5-HT<sub>1b</sub> and 5HT<sub>2c</sub> receptor, nor in the expression of these receptors in the cells, represented by the mean of fluorescence in positive cells ( $P > 0.05$ ; Figure 1).



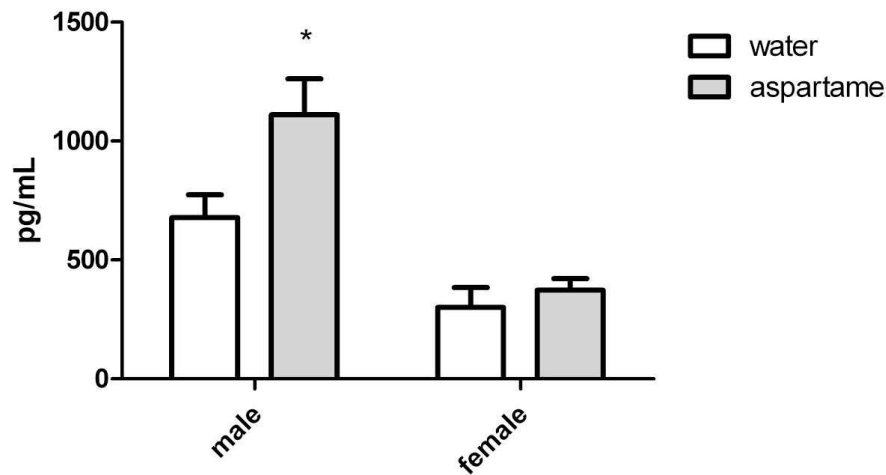
**Figure 1.** Effect of chronic consumption of aspartame by the mother on striatal 5-HT1b and 5-HT2C receptors of adult offspring: (A) Number of positive cells stained to 5-HT1b receptor; (B) Expression of 5-HT1b receptors in the cells; (C) Number of positive cells stained to 5-HT2c receptor; (D) Expression of 5-HT2C receptors in the cells. Data expressed as mean + SEM. MFI = mean fluorescence intensity for positive cells. There were no differences between groups.

Two-way ANOVA (using aspartame treatment and sex as factors) demonstrated that, despite the fact that both groups presented the same number of IGF1-R/IR positive cells in the hypothalamus (Figure 2A), the expression of the IGF/IR receptors is smaller in the aspartame group [ $F(1,18) = 4.55$ ,  $P = 0.047$ ] (Figure 2B). No interaction was observed between sex and aspartame ( $P = 0.26$ ), demonstrating that aspartame had the same effect in both sexes.



**Figure 2.** Effect of chronic consumption of aspartame by the mother on IGF1-R/IR receptors in the hypothalamus of adult offspring: (A) Number of positive cells stained to IGF-1/IR receptor; (B) Expression of IGF-1/IR receptor in the cells. MFI =- mean fluorescence intensity. Data expressed as mean + SEM.  
\* Significantly different from control (P = 0.047).

Two-way ANOVA also demonstrated that the aspartame group presented higher levels of plasma leptin than the control group [ $F(1, 18)=5.70$ ,  $P =0.028$ ], and that males presented higher levels than females [ $F(1, 18)=27.65$ ,  $P =0.0001$ ], without interaction between sex and aspartame treatment (Figure 3).



**Figure 3.** Effect of chronic consumption of aspartame by the dam on plasma leptin levels of adult offspring. Data expressed as mean + SEM.  
\* Significantly different from control ( $P = 0.028$ ).

## Discussion

Aspartame is the most used artificial sweetener in the world. Hundreds of millions of people consume aspartame worldwide; among the major users of aspartame are children and women of childbearing age (Anton et al., 2010; Soffritti et al., 2010). The consumption of aspartame has been increasingly associated with health problems such as overweight, obesity, type 2 diabetes, metabolic syndrome (Malik et al., 2006; Johnson et al., 2009; van Baak and Astrup, 2009; Malik et al., 2010). The great majority of the numerous studies on the aspartame toxicity in pregnant women focus on malformation of fetuses, and the effects on pups development have been minimally addressed (Halldorsson et al., 2010, von Poser Toigo et al., 2015). Thus, in view of the widespread use of aspartame, their long term effects, with particular regard to their metabolic long term safety, need to be investigated. In this study, we found a decrease in anti-phospho-Insulin Receptor Antibody / Insulin-like growth factor-1 receptor (pTyr1162 / 1163) protein in the hypothalamus of animals whose mothers consumed aspartame during pregnancy. The antibody used in the present study binds the phosphorilated (activated) form of both insulin and IGF-1 receptors. The IGF-1 receptor and the insulin receptor are homologous with identical signal-transducing domains controlling most of the same intracellular pathways (De Meyts et al., 1994), and both play a critical role in brain glucose metabolism (Cheng et al., 2000). A decrease in this receptor can indicate that insulin

pathway is less active in the hypothalamus of the animals exposed to aspartame. In a previous study from our laboratory (von Poser Toigo et al., 2015), we showed that the animals prenatally exposed to aspartame had an increase in the plasmatic glucose levels as young adults. An increase in the plasmatic glucose levels accompanied with a decrease in the hypothalamic insulin pathway activation could indicate an increased susceptibility to the development of insulin resistance, metabolic alterations, and hence diabetes. These findings are in accordance with studies that show that frequent consumers of this sugar substitute may also be at increased risk of excessive weight gain, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease (Lutsey et al., 2008; Yang, 2010; Duffey et al., 2012), extending these observations to exposure to this artificial sweetener during the prenatal period.

Leptin plays key roles in a complex network that appears to modulate obesity and related metabolic disorders, including insulin resistance (Mitsutomi et al., 2014). A previous study from our laboratory showed that animals exposed to aspartame had an increase in weight gain but did not show increase in gonadal and retroperitoneal fats (von Poser Toigo et al., 2015). It is possible that the higher leptin level is related to an increase in other types of body adiposity. In addition to that, studies have shown that supplementation with non nutritive sweeteners, like aspartame, decrease oxygen consumption, primarily via the decrease of UCP1, a mitochondrial uncoupler protein, in the brown adipose tissue, which may regulate body adiposity by affecting energy metabolism (Mitsutomi et al., 2014). To further support the role of leptin in modulating the effects observed in these animals, it has been reported that leptin affects insulin signaling in insulin sensitive tissues (Kim et al., 2000), with leptin impairing insulin signaling at the level of MAP-kinase activity, insulin receptor phosphorylation and glycogen synthase-kinase phosphorylation. In that sense, the maternal levels of aspartame could be leading to increase in the fetal levels, leading to an obesogenic profile, which leads to an increase in leptin and that could be interfering in the IGF1R activity and/or in the activity of insulin signaling pathway.

Studies on the effect of aspartame on brain monoamines have yielded inconsistent results with the levels of norepinephrine, dopamine, and serotonin varying in distinct brain regions (Coulombe and Sharma, 1986; Goerss et al., 2000, Bergstrom et al., 2007; Perego et al., 1988; Dailey et al., 1991). Numerous 5-HT receptors have been identified and some have been implicated in modulating food intake, such as the 5-HT1B and 5-HT2C, which may be among the receptors that mediate 5-HT's anorexic effect (Bendotti and Samanin, 1986; Macor et al., 1990; Grignaschi et al., 1996; Bonhaus et al., 1997). In general, activation of 5-HT1B receptors reduces consummatory behavior, such as water, food and

ethanol intake (Maurel et al., 1999). Drugs with high affinity for 5-HT1B receptors, such as RU24969 and CP-94,253, reduce food intake and generate anorexia (Dourish et al., 1986), which might be caused by influencing satiety processes (Samanin and Garattini, 1993; Halford et al., 1996). Whereas 5-HT1B receptor activation leads to hypophagia and anorexia, lacking this receptor might result in the opposite effects. In addition, a 5-HT2C agonist has been recently approved by the US Food and Drug Administration for weight loss (Gustafson et al., 2013). Studies have shown that serotonin is an important modulator of the reward system. Such action appears to be mediated by 5-HT1b and 5-HT2c receptors having an inhibitory effect on dopamine release in the striatum (Grottick et al., 2000; Di giovanni et al., 2006; Alex and Pehek, 2007; De Deurwaerdere et al., 2013). Therefore, a decrease in the striatal HT2C receptors could lead to an increase in dopamine release in response to food and being at least partially responsible for the increase in food consumption observed in these animals exposed to aspartame (von Poser Toigo et al., 2015). In this study, we found no difference in the amount of HT2C and HT1B in the striatum of treated animals when compared to controls, which does not exclude the serotonergic system from involvement in the effects observed in these animals. More studies are needed to properly determine the influence of aspartame on the serotonergic system and how this could influence food intake.

In conclusion, we present one of the first studies showing the effects of gestational aspartame ingestion on offspring metabolic health. Animals exposed to aspartame in the gestational period presented a decrease in the receptors involved in the insulin pathway in the hypothalamus and elevation of plasma leptin levels as they reach adulthood, which could indicate a higher susceptibility to develop metabolic disorders, as well as augmented risk for diabetes. Still, other studies are needed to confirm, support, supplement and elucidate the mechanisms involved in the development of these effects.

## References

- Ahn, K.C., Pazderka-Robinson, H., Clements, R., Ashcroft, R., Ali, T, Morse, C., Greenshaw, A.J., 2005. Differential effects of intra-midbrain raphe and systemic 8-OH-DPAT on VTA self-stimulation thresholds in rats. *Psychopharmacology* 178, 381-388.
- Alex, K.D., Pehek, E.A., 2007. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission, *Pharmacol. Ther.* 113, 296-320.

Andolina, D., Conversi, D., Cabib, S., Trabalza, A., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S., Pascucci, T., 2011. 5-Hydroxytryptophan during critical postnatal period improves cognitive performances and promotes dendritic spine maturation in genetic mouse model of phenylketonuria. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14(4), 479-89.

Anton, S.D., Martin, C.K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W.T., Geiselman P., Williamson, D.A., 2010. Effects of stevia, aspartame and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite* 55, 37-43.

Avena, N.M., Rada, P., Hoebel, B.G., 2008. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 20-39.

Baskin, D.G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D. Jr, Schwartz, M.W., 1999. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 848, 114-123.

Beck, B., Kozak R., Moar K.M., Mercer J.G., 2006. Hypothalamic orexigenic peptides are overexpressed in young Long-Evans rats after early life exposure to fat-rich diets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342(2), 452-458.

Bendotti, C., Samanin, R., 1986. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 121(1):147-150.

Bergstrom, B.P., Cummings, D.R., Skaggs, T.A., 2007. Aspartame decreases evoked extracellular dopamine levels in the rat brain: an in vivo voltammetry study. *Neuropharmacology* 53(8), 967-974.

Biddinger, S.B., Kahn, C.R., 2006. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 123-158.

Blundell, J.E., 1992. Serotonin and the biology of feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 155S-159S.

Bonhaus, D.W., Berger, J., Adham, N., Branchek, T.A., Hsu, S.A., Loury, D.N., Leung, E., Wong, E.H., Clark, R.D., Eglen, R.M., 1997. [3H]RS 57639, a high affinity, selective 5-HT<sub>4</sub> receptor partial agonist, specifically labels guinea-pig striatal and rat cloned (5-HT<sub>4S</sub> and 5-HT<sub>4L</sub>) receptors. *Neuropharmacology* 36(4-5), 671-679.

Bruning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R.,



Krone, W., Muller-Wieland, D., Kahn, C.R., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.

Carvalheira, J.B., Siloto, R.M., Ignacchitti, I., Brenelli, S.L., Carvalho, C.R., Leite, A., Velloso, L.A., Gontijo, J.A., Saad, M.J., 2001. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett.* 500, 119-124.

Cerf, M.E., Williams, K., van Rooyen, J., Esterhuysen, A.J., Muller, C.J., Louw, J., 2010. Gestational 30% and 40% fat diets increase brain GLUT2 and neuropeptide Y immunoreactivity in neonatal Wistar rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28(7), 625-630.

Cheng, C.M., Reinhardt, R.R., Lee, W.H., Joncas, G., Patel, S.C., Bondy, C.A., 2000. Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(18), 10236-10241.

Chinookoswong, N., Wang, J.L., Shi, Z.Q., 1999. Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat. *Diabetes* 48(7), 1487-1492.

Ceddia, R.B., Koistinen, H.A., Zierath, J.R., Sweeney, G., 2002. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 16(10), 1163-1176.

Cools, R., Blackwell, A., Clark, L., Menzies, L., Cox, S., Robbins, T.W., 2005. Tryptophan depletion disrupts the motivational guidance of goal-directed behavior as a function of trait impulsivity. *Neuropsychopharmacology* 30, 1362-1373.

Coulombe, R.A. Jr, Sharma, R.P., 1986. Neurobiochemical alterations induced by the artificial sweetener aspartame (NutraSweet). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83(1), 79-85.

Dailey, J.W., Lasley, S.M., Burger, R.L., Bettendorf, A.F., Mishra, P.K., Jobe, P.C., 1991. Amino acids, monoamines and audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats: effects of aspartame. *Epilepsy Res.* 8(2), 122-133.

De Deurwaerdère P, Lagièrre M, Bosc M, Navailles S., 2013. Multiple controls exerted by 5-HT<sub>2C</sub> receptors upon basal ganglia function: from physiology to pathophysiology. *Exp Brain Res.* 230(4), 477-511.

De Meyts, P., Wallach, B., Christoffersen, C.T., Ursø, B., Grønskov, K., Latus, L.J., Yakushiji, F., Ilondo, M.M., Shymko, R.M., 1994. The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm. Res.* 42(4-5), 152-69.

Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M., Benigno, A., Esposito, E., 2006. Central Serotonin 2C receptor: from physiology to pathology. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(18), 1909-1925.

Ding, Z.M., Toalston, J.E., Oster, S.M., McBride, W.J., Rodd, Z.A., 2009. Involvement of local serotonin-2A but not serotonin-1B receptors in the reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology* 204, 381-390.

Dourish, C.T., Hutson, P.H., Kennett, G.A., Curzon, G., 1986. 8-OH-DPAT-induced hyperphagia: its neural basis and possible therapeutic relevance. *Appetite* 7,127-140.

Duffey, K.J., Steffen, L.M., Van Horn, L., Jacobs, D.R. Jr, Popkin, B.M., 2012. Dietary patterns matter: diet beverages and cardiometabolic risks in the longitudinal Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 95(4), 909-915.

Evers, E.A., Cools, R., Clark, L., van der Veen, F.M., Jolles, J., Sahakian, B.J., Robbins, T.W., 2005. Serotonergic modulation of prefrontal cortex during negative feedback in probabilistic reversal learning. *Neuropsychopharmacology* 30, 1138-1147.

Férézou-Viala, J., Roy, A.F., Sérougne, C., Gripois, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., Taouis, M., 2007. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(3), R1056-1062.

Figlewicz, D.P., Dorsa, D.M., Stein, L.J., Baskin, D.G., Paquette, T., Greenwood, M.R., Woods, S.C., Porte, D. Jr., 1985. Brain and liver insulin binding is decreased in Zucker rats carrying the 'fa' gene. *Endocrinology* 117, 1537-1543.

Finkelstein, E.A., Ruhm, C.J., Kosa, K.M., 2005. Economic causes and consequences of obesity. *Annu. Rev. Public Health* 26, 239-257.

Goerss, A.L., Wagner, G.C., Hill, W.L., 2000. Acute effects of aspartame on aggression and neurochemistry of rats. *Life Sci.* 67(11), 1325-1329.

Goldstein D.J., Rampey A.H., Enas G.G., Potvin J.H., Fludzinski L.A., Levine L.R., 1994. Fluoxetine: a randomized clinical trial in the treatment of obesity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 18,129-135.

Grignaschi, G., Sironi, F., Samanin, R., 1996. Stimulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the paraventricular hypothalamus attenuates neuropeptide Y-induced hyperphagia through activation of corticotropin releasing factor. *Brain Res.* 708(1-2), 173-176.

Grottick, A.J., Fletcher, P.J., Higgins, G.A., 2000. Studies to investigate the role of 5-HT<sub>2C</sub> receptors on cocaine- and food-maintained behavior, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295, 1183-1191.

Grove, K.L., Grayson, B.E., Glavas, M.M., Xiao, X.Q., Smith, M.S., 2005. Development of metabolic systems. *Physiol. Behav.* 86(5), 646-660.

Gustafson, A., King, C., Rey, J.A., 2013. Lorcaserin (Belviq): A Selective Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> agonist in the treatment of obesity. *PT.* 38(9), 525-534.

Halford, J.C., Blundell, J.E., 1996. The 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. *Physiol. Behav.* 60(3), 933-9.

Halldorsson, T.I., M. Strom, S.B. Petersen and S.F. Olsen, 2010. Intake of artificially sweetened soft drinks and risk of preterm delivery: A prospective cohort study in 59,334 Danish pregnant women. *Am. J. Clin. Nut.* 92, 626-633.

Hansel, G., Tonon, A.C., Guella, F.L., Pettenuzzo, L.F., Duarte, T., Duarte, M.M., Oses J.P., Achaval, M., Souza, D.O., 2015. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. *Mol. Neurobiol.* 52(3), 1791-1803.

Ikeda, H., West, D.B., Pustek, J.J., Figlewicz, D.P., Greenwood, M.R., Porte, D. Jr, Woods, SC., 1986. Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite* 7, 381-386.

Johnson R.J., Perez-Pozo S.E., Sautin Y.Y., Manitius J., Sanchez-Lozada L.G., Feig D.I., Shafiu M., Segal M., Glasscock R.J., Shimada M., Roncal C., Nakagawa T., 2009. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr. Rev.* 30(1), 96-116

Kahn, B.B., Flier, J.S., 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 473-481.

Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6), 2548-56.

Kenny P.J. 2011. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* 69(4), 664-679.

Kim Y.B., Uotani S., Pierroz D.D., Flier J.S., Kahn B.B., 2000. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 141(7), 2328-2339.

Lam, D.D., Heisler, L.K., 2007. Serotonin and energy balance: Molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev. Mol. Med.* 9, 1-24.

Lean, M.E., 1997. Sibutramine-a review of clinical efficacy. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21(1), S30-36.

Leibowitz, S.F., Weiss, G.F., Shor-Posner, G., 1988. Hypothalamic serotonin: pharmacological, biochemical and behavioral analysis of its feeding-suppressive action, *Clin. Neuropharmacol.* 11, S51-71.

Lutter, M., Nestler, E.J., 2009. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J. Nutr.* 139, 629-632.

Lutsey P.L., Steffen L.M., Stevens J., 2008. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation* 117(6), 754-761.

Macor, J.E., Burkhart, C.A., Heym, J.H., Ives J.L., Lebel L.A., Newman M.E., Nielsen J.A., Ryan K., Schulz D.W., Torgersen L.K. et al., 1990. 3-(1,2,5,6-tetrahydropyrid-4-yl)pyrrolo[3,2-b]pyrid-5-one: a potent and selective serotonin (5-HT<sub>1B</sub>) agonist and rotationally restricted phenolic analogue of 5-methoxy-3-(1,2,5,6-tetrahydropyrid-4-yl)indole. *J. Med. Chem.* 33(8), 2087-2093.

Malik, V.S., Schulze, M.B., Hu, F.B., 2006. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 274-288.

Malik, V.S., Popkin, B.M., Bray, G.A., Després, J.P., Willett, W.C., Hu, F.B., 2010. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 33, 2477-2483.

Maurel, S., De Vry, J., De Beun R., Schreiber, R., 1999. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub>/5-HT<sub>1B</sub> receptors are differentially involved in alcohol preference and consummatory behavior in cAA rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62(1), 89-96.

McTavish D., Heel R.C., 1992. Dexfenfluramine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in obesity. *Drugs* 43, 713-733.

Mitsutomi, K., Masaki, T., Shimasaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Kakuma, T., Shibata, H., 2014. Effects of a nonnutritivesweetener on bodyadiposity and energymetabolism in mice with diet-inducedobesity. *Metabolism* 63(1), 69-78.

Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R., Baskin, D.G., Myers, M.G., Jr., Seeley, R.J. Schwartz M.W., 2003. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52, 227-231.

Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D.G., Rossetti, L., 2002. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat. Neurosci.* 5, 566-572.

Perego, C., De Simoni, M.G., Fodritto, F., Raimondi, L., Diomede, L., Salmona, M., Algeri, S., Garattini, S., 1988. Aspartame and the rat brain monoaminergic system. *Toxicol. Lett.* 44(3), 331-339.

Samanin, R., Garattini, S., 1993. Neurochemical mechanism of action of anorectic drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 73(2), 63-68.

Saper, C.B., Chou, T.C., Elmquist, J.K., 2002. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36, 199-211.

Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P. et al., 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608-3616.

Sivitz, W.I., Walsh, S.A., Morgan, D.A., Thomas, M.J., Haynes, W.G., 1997. Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 138(8), 3395-3401.

Smeets, P.A., de Graaf, C., Stafleu, A., van Osch, M.J., van der Grond, J., 2005. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. *Am J Clin Nutr.* 82(5), 1011-1016.

Soffritti, M., Belpoggi, F., Manservigi, M., Tibaldi, E., Lauriola, M., Falcioni L., Bua L., 2010. Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male swiss mice. *Am. J. Ind. Med.* 53, 1197-1206.

Te Morenga, L., Mallard, S., Mann, J., 2013. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *Brit. Med. J.* 346, e7492.

Torsoni, M.A., Carvalheira, J.B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M.A., Saad, M.J., Velloso, L.A., 2003. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E216-E223.

van Baak MA, Astrup A. Consumption of sugars and body weight. *Obes Rev.* 2009 Suppl 1:9-23.

Volkow, N.D., and Wise, R.A., 2005. How can drug addiction help us understand obesity? *Nat. Neurosci.* 8, 555-560.

Vollm, B, Richardson, P, McKie, S, Elliott, R, Deakin, J.F., Anderson, I.M., 2006. Serotonergic modulation of neuronal responses to behavioural inhibition and reinforcing stimuli: an fMRI study in healthy volunteers. *Eur. J. Neurosci.* 23, 552-560.

von Poser Toigo, E., Huffell, A.P., Mota, C.S., Bertolini, D., Pettenuzzo, L.F., Dalmaz, C., 2015. Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame. *Appetite* 87,168-174.

Walker S.C., Mikheenko Y.P., Argyle L.D., Robbins T.W., Roberts A.C., 2006. Selective prefrontal serotonin depletion impairs acquisition of a detour-reaching task. *Eur. J. Neurosci.* 23, 3119-3123.

Walker, S.C., Robbins, T.W., Roberts, A.C., 2008. Differential contributions of dopamine and serotonin to orbitofrontal cortex function in the marmoset. *Cereb. Cortex* 19, 889-898.

Yang, Q., 2010. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: *Neuroscience 2010. Yale J. Biol. Med.* 83(2), 101-108.

Zhang, J., Dhakal, I.B., Zhang, X., Prizment, A.E., Anderson, K.E., 2014. Genetic variability in energy balance and pancreatic cancer risk in a population-based case-control study in Minnesota. *Pancreas.* 43(2), 281-286.

## 5. DISCUSSÃO

O sobrepeso e a obesidade constituem um importante problema de saúde e vêm assumindo características epidêmicas (Wei et al., 2009). Por se tratar de uma doença multifatorial, de difícil tratamento e muito custosa, as causas desta epidemia estão sendo estudadas por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo. Devido ao fato de o consumo de açúcares estar associado com resultados adversos para a saúde, adoçantes artificiais não calóricos têm sido usados durante anos como um substituto que não contribuiria para o ganho de peso e para o desenvolvimento de outras alterações metabólicas associadas (Tordoff & Alleva, 1990; Raben et al., 2002; Brown et al., 2010). Apesar disso, a sua segurança e seus potenciais efeitos benéficos sobre o metabolismo têm sido questionados por um considerável número de estudos (Soffritti et al., 2007; Soffritti et al., 2008; Soffritti et al., 2010; Collison et al., 2012a; Collison et al., 2012b). Embora AAs não contribuam significativamente para o consumo de energia, estudos epidemiológicos (Brown et al., 2010; Sylvestsky et al., 2011; Pereira & Odegaard, 2013; Swithers, 2013) e em animais (Swithers et al., 2009; Pepino & Bourne, 2011; Swithers et al., 2013) têm demonstrado que o consumo a longo prazo de AAs está associado a um risco aumentado de excesso de peso, obesidade, diabetes do tipo 2 e SM. No entanto, em alguns desses estudos epidemiológicos, a incapacidade de ajustar para diferentes fatores demográficos e clínicos inerentes à população do estudo, tais como nível de escolaridade, índice de massa corporal inicial, circunferência abdominal, pode eventualmente enfraquecer ou abolir a associação positiva entre AAs e o risco de disfunção metabólica (Nettleton et al., 2009; Bellisle et al., 2012; Pereira & Odegaard, 2013). Apesar disso, Collison et al. (2012a e 2012b) demonstraram que a exposição crônica ao aspartame, começando no útero e indo até o quinto mês de idade, dentro da dosagem aceitável diariamente, levou a aumento de peso corporal, nos níveis de gordura, e nos níveis de glicose em jejum, assim como diminuiu a sensibilidade a insulina no animal adulto (tratado durante toda a vida com esse AA). Curiosamente, descendentes do sexo masculino foram mais vulneráveis aos efeitos adversos neurometabólicos do aspartame, quando comparado com as fêmeas, sugerindo uma resposta sexualmente dimórfica a esses efeitos adversos induzidos por aspartame. A presente tese teve por objetivo investigar os efeitos da exposição crônica de adoçantes artificiais durante o período intrauterino, nos quais os animais estão bastante suscetíveis a interferências externas, sobre possíveis alterações bioquímico-metabólicas e comportamentais na idade adulta. Os resultados obtidos nessa tese demonstram que o uso de

adoçantes artificiais, especialmente o aspartame, durante o período intrauterino já é suficiente para produzir efeitos deletérios de longo prazo sobre o metabolismo energético. Indo de encontro com a literatura, nossos resultados demonstraram que os machos foram mais suscetíveis a exposição intrauterina ao aspartame (Berkey et al., 2004; Collison et al., 2012a; 2012b).

No presente estudo, inicialmente os animais foram divididos em quatro grupos, sendo submetidos durante a vida intrauterina aos AAs sacarina e aspartame, à sacarose ou água. Os animais eram expostos a esses produtos através de uma diluição na água como única fonte de líquido disponível às mães durante a gestação. As doses utilizadas dos AAs e da sacarose foram equilibradas para conter valores equivalentes de doçura e estarem dentro dos níveis de consumo diário considerado aceitáveis. Assim que atingiram a idade adulta, os animais foram submetidos a testes comportamentais. O teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto demonstraram que os animais expostos durante o período pré-natal ao ASP apresentavam um comportamento do tipo ansioso. ASP é metabolizado em Phe, aspartato e metanol. A Phe não só desempenha um papel no metabolismo de aminoácidos, mas também é precursora de tirosina (Hawkins et al., 1988), diidroxifenilalanina (DOPA), DA, noradrenalina e adrenalina (Ganong, 1997), além de ter uma importante atuação na regulação de neurotransmissores (Caballero & Wurtman, 1988). Após entrar no organismo, a Phe pode seguir duas vias de metabolização. Uma parte é convertida em tirosina no fígado (Caballero & Wurtman, 1988) pela enzima fenilalanina hidroxilase. A porção restante, não convertida em tirosina, vai ligar-se a um transportador de aminoácidos neutros de cadeia longa (TANCL). Um grande número de compostos, incluindo a tirosina e a fenilalanina, irá competir, uns com os outros, por um sítio de ligação nos TANCL, pois é a única maneira pela qual podem atravessar a barreira hematoencefálica. Adicionalmente, é importante ressaltar que a tirosina não pode ser sintetizada no cérebro, sendo o transporte via TANCL essencial para a manutenção dos níveis cerebrais da mesma. O TANCL é também um co-transportador de fenilalanina, triptofano (importante na síntese de serotonina no encéfalo), metionina e outros, com todos eles competindo pelo transportador. Portanto, uma grande quantidade de um desses aminoácidos na corrente sanguínea vai ocupar a maior parte destes transportadores (Humphries et al., 2008). A tirosina, uma vez que cruze a BHE, será convertida em DOPA pela enzima tirosina hidroxilase, posteriormente formando dopamina. Já foi demonstrado que uma única dose de 200 mg/Kg de aspartame consegue aumentar os níveis de tirosina e Phe plasmáticas em 142% e 62%, respectivamente (Yokogoshi et al., 1984). Esses níveis elevados de Phe, devido ao consumo de aspartame, poderiam potencialmente acumular no encéfalo, o



que poderia levar ao comprometimento na produção de diversos neurotransmissores. Essa diminuição de neurotransmissores, tais como 5-HT, noradrenalina e DA, já foi demonstrada no encéfalo de camundongos tratados com aspartame (Abdel-Salam et al., 2012). Portanto, o aspartame e seus metabólitos poderiam potencialmente prejudicar uma série de processos corporais, incluindo metabolismo de aminoácidos, estrutura e metabolismo de proteínas, integridade dos ácidos nucleicos, funções neuronais e balanços endócrinos. Esses prejuízos, se ocorridos durante o desenvolvimento fetal, poderiam levar a alterações permanentes na circuitaria neural e no metabolismo desses neurotransmissores.

É geralmente aceito que a Phe consegue atravessar a placenta através de transporte ativo (Pueschel et al., 1982), resultando em um aumento na Phe placentária dependente do consumo materno. Isso se torna importante uma vez que quanto mais jovem o encéfalo, mais sensível aos efeitos da Phe ele é. Os resultados encontrados nesse trabalho vão de acordo com a literatura, que tem demonstrado que variações neonatais no sistema serotoninérgico podem contribuir para tornar o indivíduo mais propenso a desenvolver distúrbios emocionais na idade adulta, entre eles um comportamento do tipo ansioso (Gross et al., 2002; Zoratto et al., 2013). Adicionalmente, diversos estudos (Ely et al., 1997; Silveira et al., 2000; da Silva et al., 2014) têm demonstrado que um comportamento do tipo ansioso está associado com um aumento no consumo de alimentos doces, o que está de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho.

Durante essa tese, foi avaliado o comportamento alimentar dos animais durante dois momentos distintos. Primeiramente, aos 60 dias de vida, os animais, em jejum, eram habituados a um alimento doce durante cinco dias. No sexto dia, com o animal alimentado, era avaliado o quanto cada um comia desse alimento doce durante 3 minutos. Posteriormente, da idade de 80 a 110 dias, os animais tinham uma livre escolha entre chocolate ou ração padrão na caixa moradia. Esses testes demonstraram que quando expostos por um curto período de tempo a um alimento palatável os animais expostos a aspartame no período intrauterino, tanto machos quanto fêmeas, tiveram um maior consumo do alimento palatável. Por outro lado, quando expostos cronicamente, não houve diferença significativa entre os grupos. Quando avaliado o ganho de peso dos animais durante esse período, os machos do grupo aspartame apresentaram maior peso quando comparados com todos os outros grupos. Apesar disso, não foram verificados aumentos nas gorduras retroperitoneal ou gonadal medidas. Esse aumento de peso poderia ser explicado pelo aumento em outro tipo de adiposidade corporal além das estudadas, uma vez que há 6 diferentes gorduras viscerais: perirrenal, gonadal, epicárdica, retroperitoneal, omental e mesentérica. A gordura epicárdica é

um depósito de gordura visceral, localizado entre o coração e o pericárdio que tem sido relacionada com a SM e como um marcador para doença coronariana (Iacobellis et al., 2003; Rosito et al., 2008; Wang et al., 2009), aumentando nos estados de balanço energético positivo, quando os ácidos graxos livres no sangue são convertidos em triglicerídeos e acumulados inicialmente em adipócitos e depois em células não adiposas. Indo ao encontro desta possibilidade, os machos expostos ao aspartame no período pré-natal e depois ao livre acesso ao chocolate, apresentaram aumento nos níveis de triglicerídeos, LDL e colesterol total. Em relação aos níveis glicêmicos, tanto os machos quanto as fêmeas do grupo aspartame apresentaram aumento quanto comparados com todos os outros grupos.

Avaliando-se os resultados da primeira parte do estudo, verificou-se que dos dois AAs testados, o ASP apresentou mais efeitos que a sacarina. Por este motivo, os experimentos subsequentes foram realizados somente com o grupo aspartame, de modo a otimizar o trabalho, recursos, tempo e aprofundar mais o conhecimento dos efeitos da exposição crônica do aspartame no período intrauterino sobre o desenvolvimento metabólico. As genitoras foram divididas em dois grupos: controle e ASP, com os animais expostos ao mesmo protocolo anteriormente utilizado. Nesse estudo foi avaliado, através do uso de citometria de fluxo, se a exposição ao aspartame alteraria a quantidade de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> no corpo estriado, região cerebral que faz parte do sistema límbico e está vinculada com a sensação de prazer e recompensa, tanto na comida quanto em drogas (Akubuiro et al., 2013; Val-Laillet et al., 2015; Volkow et al., 2015). Vários estudos em animais têm demonstrado que a serotonina possui um papel importante na fisiologia da recompensa, atuando desde em atividades sexuais até na alimentação (Wirtshafter, 2001; Pfaus, 2009). Neurônios contendo serotonina possuem várias conexões com outros sistemas neurais em áreas cerebrais relacionadas com a recompensa, tais como o núcleo accumbens, área tegmentar ventral, amígdala e córtex pré-frontal (Hensler, 2006; Lechin et al., 2006; Ikemoto, 2010). Além de ter ligações recíprocas com muitas áreas do cérebro relacionadas à recompensa, a 5-HT regula a transmissão de todos os principais neurotransmissores (Fink & Gothert, 2007), incluindo a dopamina. Em uma recente revisão, Kranz et al. (2010), apresentaram evidências convergentes, particularmente a partir de farmacologia, eletrofisiologia, e imagens do cérebro humano, de que o sistema 5-HT é tão importante para o processamento de recompensa quanto a dopamina. A serotonina inibe a alimentação em roedores quando injetada em diversas regiões do hipotálamo (Leibowitz et al., 1988) e os compostos que aumentam a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica, tais como a fluoxetina (Goldstein et al., 1994), dexfenfluramina (McTavish & Heel, 1992) e sibutramina

(Lean, 1997), levam a perda de peso em seres humanos obesos. Nos últimos anos, vários receptores 5-HT foram identificados (Hoyer et al., 1993) e alguns têm sido implicados na modulação da ingestão de alimentos, tais como o 5-HT1B e 5-HT2C, que podem estar entre os receptores que medeiam os efeitos anoréxicos de 5-HT (Bendotti & Samanin, 1986; Macor et al., 1990; Grignaschi et al., 1996; Bonhaus et al., 1997). Alguns estudos têm sugerido que os efeitos da estimulação de receptores serotoninérgicos sobre a recompensa poderiam ocorrer por meio da modulação da liberação de dopamina. A ativação do receptor 5-HT1B parece, de uma maneira dose-dependente, aumentar a liberação de dopamina no sistema mesolímbico, verificado em estudos de microdiálise em roedores (Iyer & Bradberry, 1996; Yan & Yan, 2001; Yan et al., 2004). De uma maneira geral, diversos estudos demonstraram que a ativação do receptor 5-HT1B diminui a sensação de recompensa (Cervo et al., 2002; Fletcher et al., 2002; Hayes et al., 2009). A ativação de receptores 5-HT2C reduz a liberação de dopamina no corpo estriado, ao passo que antagonistas desse receptor aumentam a dopamina estriatal (Berg et al., 2008; Di Matteo et al., 2008; Egerton et al., 2008). Manipulações farmacológicas ou genéticas de receptores 5-HT2C alteram as respostas locomotoras, a intensidade de ação de psicoestimulantes, a ingestão de alimentos e a obesidade, além de alterarem os efeitos comportamentais de antidepressivos e antipsicóticos (Tecott et al., 1995; Rocha et al., 2002; Cannon et al., 2004; Giorgetti e Tecott, 2004; Abdallah et al., 2009), e de modularem o estresse, a ansiedade e a dor (Heisler et al., 2007; Hawkins et al., 2008; Christianson et al., 2010; Strong et al., 2011). Portanto, uma alteração nos níveis dos receptores 5-HT1B e 5-HT2C poderia levar a um aumento da liberação de dopamina em resposta à alimentação, sendo pelo menos parcialmente responsável pelo aumento no consumo de alimentos observada nestes animais expostos ao aspartame. Neste estudo, não foram encontradas diferenças na quantidade dos receptores 5-HT2C e HT1B no corpo estriado dos animais tratados quando comparados com o grupo controle. Este resultado não significa que o sistema serotoninérgico não está envolvido com os efeitos observados nesses animais. Além disso, só foi avaliada a quantidade de receptor e não sua atividade. Além disso, devido ao fato de ser um sistema muito complexo, com mais de 15 tipos de receptores divididos em sete famílias, mais estudos são necessários para determinar corretamente a influência do aspartame sobre o sistema serotoninérgico e como ele influencia o consumo alimentar.

Nesta tese, observou-se uma diminuição da proteína receptor fosforilado da insulina/receptor do fator de crescimento tipo insulina 1 (pTyr1162/1163) no hipotálamo dos animais submetidos à exposição crônica ao aspartame no período intrauterino. O anticorpo utilizado nesse estudo se liga na forma fosforilada (ativa) em ambos os receptores, de insulina

e do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1). A resistência à insulina é uma característica metabólica importante da obesidade e um componente central da SM, bem como um importante fator fisiopatológico no desenvolvimento da diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e hepáticas (Biddinger & Kahn, 2006). A insulina atua como um sinal de adiposidade exercendo funções modulatórias em várias regiões do sistema nervoso central. Apesar disso, o alvo primário dela parece ser o hipotálamo, regulando uma complexa rede de neuropéptídeos e neurotransmissores que influenciam a homeostase energética (Leibowitz et al., 2004; Williams et al., 2004). Estudos têm demonstrado que animais com deficiências no receptor de insulina no hipotálamo apresentam maior ganho de peso, de gordura corporal e aumento nos níveis plasmáticos de leptina e triglicerídeos (Grillo et al., 2007; Grillo et al., 2011a; Grillo et al., 2011b). Esses resultados estão de acordo com o que foi encontrado nesta tese nos animais expostos ao aspartame no período intrauterino. Por outro lado, durante o seu desenvolvimento, para apoiar o crescimento e a formação neuroglial, o encéfalo requer uma grande quantidade de energia. A insulina aumenta a utilização de substratos energéticos preferencialmente em tecidos periféricos, mas não parece estar envolvida na regulação do metabolismo cerebral (Baskin et al., 1987). A síntese de insulina intracerebral é muito pequena (Coker et al., 1990), e além disso, pouquíssima insulina cruza a BHE (Reinhardt & Bondy, 1994). Por outro lado, o IGF-1, um homólogo da insulina, é abundante no encéfalo em desenvolvimento (Rotwein et al., 1988; Bartlett et al., 1991; Bondy, 1991), e possui transdução de sinal praticamente idêntica, estando envolvido nas mesmas vias de sinalização intracelular (De Meyts et al., 1994). O IGF-1 possui um importante papel no metabolismo por suprimir a secreção de insulina e aumentar a disponibilidade de glicose no músculo esquelético (Moses, 2005; Clemmons, 2006). Camundongos modificados geneticamente para expressar deficiência de uma subunidade do IGF-1R no músculo esquelético exibem diminuição nas sinalizações das vias do IGF1-R e dos híbridos IGF-1R/IR, além de uma grave diabetes no início da vida (Fernandez et al., 2001; LeRoith & Grailova, 2006). Em contraste, camundongos com falta de um dos alelos do IGF1R (IGF1E+/-) em todo o corpo exibem intolerância à glicose e resistência à insulina à medida que envelhecem, com efeitos mais pronunciados nos machos (Bokov et al., 2011). A diminuição no IGF1R/IR hipotalâmico, verificada no desenvolvimento desta tese, poderia ser um indicativo de que a via de atuação da insulina encontra-se menos ativa nos animais expostos ao aspartame no período intrauterino. Como foi demonstrado na primeira parte desta tese, esses animais também apresentaram aumento nos níveis de glicose plasmática, o que, combinado com uma menor ativação da via insulínica hipotalâmica poderia indicar uma maior susceptibilidade ao

desenvolvimento de uma resistência à insulina, alterações metabólicas e consequentemente diabetes do tipo II. Esses resultados estão de acordo com a literatura que demonstra que o consumo de aspartame pode aumentar o risco de desenvolvimento de SM, diabetes do tipo II e doenças cardiovasculares (Lutsey et al., 2008; Yang, 2010; Duffey et al., 2012), estendendo essas observações para a exposição a esse adoçante artificial durante o período pré-natal.

Adicionalmente a esses resultados, também foi demonstrado que os machos expostos ao aspartame apresentaram aumento nos níveis de leptina plasmática. A leptina é um hormônio peptídico produzido em menor quantidade pelo epitélio gástrico, pela placenta, pelo tecido adiposo marrom e pelo músculo esquelético, mas principalmente pelo tecido adiposo branco, apresentando níveis elevados na obesidade (Lehninger, 2014). A leptina tem um papel importante na regulação da homeostase energética, das funções neuroendócrinas, imunitárias e no metabolismo de lipídios e da glicose (Dalamaga et al., 2013; Moon et al., 2013). Enquanto a administração de leptina reverte anormalidades neuroendócrinas e metabólicas em indivíduos com deficiência congênita de leptina, formas comuns de obesidade estão tipicamente associadas com níveis elevados de leptina e resistência aos efeitos da leptina sobre o metabolismo energético (Blüher & Mantzoros, 2009). Apesar de não ter sido verificado um aumento nos níveis das gorduras retroperitoneais e gonadais, não pode ser descartado que o aumento de leptina observado nos machos expostos ao aspartame no período intrauterino seja devido a um aumento em outro tipo de gordura. O tecido adiposo é classificado em tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco. Assim como a leptina, as proteínas desacopladoras podem ser consideradas como indicadoras do metabolismo energético (Masaki et al., 2003; Masaki & Yoshimatsu, 2006; Masaki & Yoshimatsu, 2007). A UCP1, produzida no tecido adiposo marrom, possui um papel importante no gasto energético tanto em humanos quanto em roedores (Yoshimatsu et al., 1993; Enerback et al., 1997; Cannon & Nedergaard, 2004). Em 2014, Mitsutomi e colaboradores demonstraram que a suplementação com AAs, tal como o ASP, diminuía o consumo de oxigênio, primariamente via uma diminuição nos níveis da UCP1 no tecido adiposo marrom, o que poderia estar regulando a adiposidade corporal por afetar o metabolismo energético. Normalmente, um aumento nos níveis de leptina estimula a produção de UCP1 no tecido adiposo marrom. Entretanto, estudos já demonstraram que a resistência à leptina, como a apresentada na obesidade, leva a uma diminuição nos níveis de UCP1 no tecido adiposo marrom (Sell et al., 2004). Mais estudos são necessários para validar essa teoria e verificar se a exposição ao ASP no período intrauterino é suficiente para induzir a uma diminuição nos níveis de UCP1 dos machos. Enfatizando ainda mais o papel da leptina em modular os efeitos observados nesses

animais, várias evidências têm demonstrado uma interação entre as vias de sinalização da insulina e da leptina. Tanto o receptor da leptina quanto o da insulina utilizam componentes em comum nas suas vias de sinalização, tais como a JAK2/STAT-3, MAP-cinase e IRS/PI-3-cinase. Estudos têm demonstrado que a leptina afeta a sinalização da insulina em tecidos sensíveis à insulina (Kim et al., 2000) e também que a insulina consegue modular a sinalização da leptina no hipotálamo por meio da cascata que utiliza JAK2/STAT-3 (Carvalho et al., 2001). Outros estudos têm demonstrado que a leptina consegue interferir na cascata de sinalização da insulina em diversas outras etapas, tais como inibindo a fosforilação do IR (Wang et al., 1997), inibindo a ativação da MAP-cinase, interferindo na fosforilação da glicogênio sintase-cinase, entre outros (Perez et al., 2004).

Tendo em vista os resultados discutidos acima, e devido à facilidade de exposição ao aspartame em uma dieta normal, nós sugerimos que os efeitos em longo prazo da ingestão de aspartame devem ser investigados de uma maneira mais detalhada e mais completa. Estudos destinados a avaliar as respostas gastrointestinais, cerebrais (Bellisle et al., 2012; Gardner et al., 2012) e cardiometabólicas (Pereira et al., 2013) ao aspartame e os seus efeitos no risco da prole desenvolver obesidade e SM são de grande relevância e de suma importância. Além disso, o desenvolvimento de metodologias que consigam estimar precisamente o consumo de AAs também deve ser algo a ser tratado como uma prioridade em pesquisas futuras, pois isso possibilitaria uma avaliação muito mais precisa dos efeitos desses produtos (Gardner et al., 2012)

## 6. CONCLUSÕES

A nutrição durante a vida intrauterina possui um papel fundamental em programar o risco do feto desenvolver doenças ao longo de sua vida. Apesar de AAs proverem sabor doce sem contribuir para a ingestão calórica, este estudo sugere que o consumo em longo prazo desses compostos (especialmente o ASP) durante o período intrauterino pode induzir um fenótipo adverso (maior peso corporal, níveis aumentados de leptina e redução no receptor hipotalâmico para a insulina) que predispõe os filhotes, principalmente os machos, a desenvolver doenças metabólicas como obesidade e síndrome metabólica ao longo da vida. Apesar de a extrapolação desses resultados para seres humanos ser muito prematura, uma vez que não existem estudos clínicos bem desenhados avaliando os efeitos adversos associados ao consumo de aspartame durante a gestação e o desenvolvimento metabólico, os resultados encontrados nessa tese sugerem que o uso de ASP deve ser feito com muita cautela, especialmente por mulheres grávidas.

## REFERÊNCIAS

- Abdallah L., Bonasera S.J., Hopf F.W., O'Dell L., Giorgetti M., Jongsma M., Carra S., Pierucci M., Di Giovanni G., Esposito E., Parsons L.H., Bonci A., Tecott L.H. Impact of serotonin 2C receptor null mutation on physiology and behavior associated with nigrostriatal dopamine pathway function. *J. Neurosci.*, 29:8156-8165, 2009.
- Abdel-Salam O.M., Salem N.A., Hussein J.S. Effect of aspartame on oxidative stress and monoamine neurotransmitter levels in lipopolysaccharide-treated mice. *Neurotox. Res.*, 21:245-255, 2012.
- Abou-Donia M.B., El-Masry E.M., Abdel-Rahman A.A., McLendon R.E., Schiffman S.S. Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health B*, 71:1415-1429, 2008.
- Ahima R.S., Kelly J., Elmquist J.K., Flier J.S. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology*, 140(11):4923-4931, 1999.
- Ahima R.S., Osei S.Y. Leptin signaling. *Physiol. Behav.*, 81(2):223-241, 2004.
- Akubuiro A., Bridget Zimmerman M., Boles Ponto L.L., Walsh S.A., Sunderland J., McCormick L., Singh M. Hyperactive hypothalamus, motivated and non-distractible chronic overeating in ADAR2 transgenic mice. *Genes Brain Behav.*, 12(3):311-322, 2013.
- Al-Saleh A.M., Corkey B., Deeney J., Tornheim K., Bauer E. Effect of artificial sweeteners on insulin secretion, ROS, and oxygen consumption in pancreatic beta cells. *FACEB Journal*, 25:530-531, 2011.
- Avena N.M., Rada P., Hoebel B.G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 32:20-39, 2008.
- Banno R., Zimmer D., De Jonghe B.C., Atienza M., Rak K., Yang W., Bence K.K. PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J. Clin. Invest.*, 120(3):720-734, 2010.
- Bartlett W.P., Li X.S., Williams M., Benkovic, S. Localization of insulin-like growth factor-1 mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev. Biol.*, 147:239-250, 1991.



- Baskin D.G., Figlewicz D.P., Woods S.C., Porte D. Jr, Dorsa D.M. Insulin in the brain. *Annu. Rev. Physiol.*, 49:335-347, 1987.
- Bellisle F., Drewnowski A., Anderson G.H., Westerterp-Plantenga M., Martin C.K. Sweetness, satiation, and satiety. *J. Nutr.*, 142:1149S-1454S, 2012.
- Bendotti C., Samanin R. 8-Hydroxy-2-di-n-propylamino. Tetralin 8-OH-DPAT. elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 121:147-150, 1986.
- Berg K.A., Clarke W.P., Cunningham K.A., Spampinato U. Fine-tuning serotonin<sub>2c</sub> receptor function in the brain: molecular and functional implications. *Neuropharmacology*, 55:969-976, 2008.
- Berglund E.D., Vianna C.R., Donato Jr J. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.*, 122(3):1000-1009, 2012.
- Berkey C.S., Rockett H.R.H., Field A.E., Gillman M.W., Colditz G.A. Sugar-added beverages and adolescent weight change. *Obes. Res.*, 12:778-788, 2004.
- Berthoud H.R., Trimble E.R., Siegel E.G., Bereiter D.A., Jeanrenaud B. Cephalicphase insulin secretion in normal and pancreatic islet-transplanted rats. *Am. J. Physiol.*, 238(4):E336-340, 1980.
- Berthoud, H.R., Morrison, C. The brain, appetite, and obesity. *Annu. Rev. Psychol.*, 59:55-92, 2008.
- Biddinger S.B., Kahn C.R. From mice to men, insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.*, 68:123-158, 2006.
- Bluher S., Mantzoros C.S. Leptin in humans: lessons from translational research. *Am. J. Clin. Nutr.*, 89(3):991S-997S, 2009.
- Blum J.W., Jacobsen D.J., Donnelly J.E. Beverage consumption patterns in elementary school aged children across a two-year period. *J. Am. Coll. Nutr.*, 24:93-98, 2005.

Blundell J.E., Hill A.J. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. *Lancet*, 1:1092-1093, 1986.

Blundell, J.E., Green, S.M. Effects of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 20(2S):12-17, 1996.

Blundell, J.E., Lawton, C.L. Serotonin and dietary fat intake: effects of dexfenfluramine. *Metabolism*, 44:33-37, 1995.

Bokov A.F., Garg N., Ikeno Y., Thakur S., Musi N., DeFronzo R.A., Zhang N., Erickson R.C., Gelfond J., Hubbard G.B., Adamo M.L., Richardson A. Does reduced IGF-1R signaling in *Igf1r*<sup>+/-</sup> mice alter aging? *PLoS One*, 6(11):e26891, 2011.

Bondy, C.A. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.*, 11:3442-3455, 1991.

Bonhaus D.W., Weinhardt K.K., Taylor M., DeSouza A., McNeeley P.M., Szczepanski K., Fontana D.J., Trinh J., Rocha C.L., Dawson M.W., Flippin L.A., Eglen R.M., RS-102221: a novel high affinity and selective, 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 36:621-629, 1997.

Bray, G.A. Drug treatment of obesity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2:403-418, 2001.

Brenseke B., Prater M.R., Bahamonde J., Gutierrez J.C. Current thoughts on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *J. Pregnancy*, 2013:368-461, 2013.

Brown R.J., de Banate M.A., Rother K.I. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int. J. Pediatr. Obes.*, 5:305-312, 2010.

Caballero B., Wurtman R.J. Control of plasma phenylalanine levels. In: Wurtman R.J., Ritterwalker E. (eds). *Dietary Phenylalanine and Brain Function*. Birkhauser: Basal, 1988. p. 9-23.

Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.*, 84:277-359, 2004.

Cannon C.M., Abdallah L., Tecott L.H., Durning M.J., Palmiter R.D. Dysregulation of striatal dopamine signaling by amphetamine inhibits feeding by hungry mice. *Neuron*, 44:509-520, 2004.

Carvalho J.B.C., Siloto R.M.P., Ignacchetti I., Brenelli S.L., Carvalho C.R.O., Leite A., Velloso L.A., Gontijo J.A.R., Saad M.J.A., Insulin modulates leptin-induced STAT-3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett.*, 500:119-124, 2001.

Cervo L., Rozio M., Ekalle-Soppo C.B., Carnovali F., Santangelo E., Samanin R. Stimulation of serotonin1B receptors induces conditioned place aversion and facilitates cocaine place conditioning in rats. *Psychopharmacology* (Berl), 163:142-150, 2002.

Christianson J.P., Ragole T., Amat J., Greenwood B.N., Strong P.V., Paul E.D., Fleshner M., Watkins L.R., Maier S.F. 5-Hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. *Biol. Psychiatry*, 67:339-345, 2010.

Clemmons D.R. Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 6:620-625, 2006.

Cohen S.M. Saccharin: past, present, and future. *J. Am. Diet Assoc.*, 86:929-931, 1986.

Coker G.T. 3rd, Studelska D., Harmon S., Burke W., O'Malley K.L. Analysis of tyrosine hydroxylase and insulin transcripts in human neuroendocrine tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 8(2):93-98, 1990.

Colditz G.A., Willett W.C., Stampfer M.J., London S.J., Segal M.R., Speizer F.E. Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51:1100-1105, 1990.

Collison K.S., Makhoul N.J., Zaidi M.Z., Al-Rabiah R., Inglis A., Andres B.L. Interactive effects of neonatal exposure to monosodium glutamate and aspartame on glucose homeostasis. *Nutr. Metab. (London)*, 9:58, 2012a.

Collison K.S., Makhoul N.J., Zaidi M.Z., Saleh S.M., Andres B., Inglis A. Gender dimorphism in aspartame-induced impairment of spatial cognition and insulin sensitivity. *PLoS One*, 7:e31570, 2012b.

Coppari R., Ichinose M., Lee C.E., et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.*, 1(1):63-72, 2005.

Corkey B.E. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? *Diabetes*, 61(1):4-13, 2012.

Coutinho W.F., Benchimol A.K. Obesidade mórbida e afecções associadas. In: Garrido Junior, A.B., Ferraz, E.M., Barros, F.L., Marchesini, J.B., Szego, T. *Cirurgia da Obesidade*. São Paulo: Atheneu, 2006. p.13-17.

Covasa M. Deficits in gastrointestinal responses controlling food intake and body weight. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 299:R1423-1439, 2010.

Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411(6836):480-484, 2001.

da Silva C.C., Lazzaretti C., Fontanive T., Dartora D.R., Bauereis B., Gamaro G.D. Estrogen-dependent effects on behavior, lipid-profile, and glycemic index of ovariectomized rats subjected to chronic restraint stress. *Behav. Processes*, 103:327-333, 2014.

Dalamaga M., Chou S.H., Shields K., Papageorgiou P., Polyzos S.A., Mantzoros C.S. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab.*, 18(1):29-42, 2013.

Dalamaga M., Chou S.H., Shields K. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab.*, 18(1):29-42, 2013.

Damasceno D.C., Goncalves M.A., Durante L.C., Castro N.C., Moura C.H., Oliveira C.B. Effects of a saccharin and cyclamate mixture on rat embryos. *Vet. Hum. Toxicol.*, 45:157-159, 2003.

Davidson T.L., Martin A.A., Clark K., Swithers S.E. Intake of high-intensity sweeteners alters the ability of sweet taste to signal caloric consequences: Implications for the learned control of energy and body weight regulation. *Q. J. Exp. Psychol.*, 64(7):1430-1441, 2011.

de la Peña C. Artificial sweetener as a historical window to culturally situated health. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1190:159-165, 2010.

de Lartigue G., de La Serre C.B., Raybould H.E. Vagal afferent neurons in high fat diet induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin. *Physiol. Behav.*, 105:100-105, 2011.

De Meyts P. The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia*, 37 Suppl 2:S135-148, 1994.

Dhingra R., Sullivan L., Jacques P.F., Wang T.J., Fox C.S., Meigs J.B., D'Agostino R.B., Gaziano J.M., Vasan R.S., Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic

risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation*, 116(5):480-488, 2007.

Di Matteo V., Di Giovanni G., Pierucci M. Esposito E. Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies. *Prog. Brain Res.*, 172:7-44, 2008.

Dixon, J.B. The effect of obesity on health outcomes. *Mol. Cell Endocrinol.*, 316:104-108, 2010.

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. *Am. J. Clin. Nutr.* 59:338-345, 1994.

Duffey K.J., Popkin B.M. Adults with healthier dietary patterns have healthier beverage patterns. *J. Nutr.*, 136(11):2901-2907, 2006.

Duffey K.J., Steffen L.M., Van Horn L., Jacobs D.R. Jr, Popkin B.M. Dietary patterns matter: diet beverages and cardiometabolic risks in the longitudinal Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 95(4):909-915, 2012.

Egerton A., Ahmad R., Hirani E., Grasby P.M. Modulation of striatal dopamine release by 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonists: [<sup>11</sup>C]raclopride PET studies in the rat. *Psychopharmacology*, 200:487-496, 2008.

Ely, D.R., Dapper, V., Marasca, J., Corrêa, J.B., Gamaro, G.D., Xavier, M.H. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.*, 61:395-398, 1997.

Enerbäck S., Jacobsson A., Simpson E.M., Guerra C., Yamashita H., Harper M.E., Kozak L.P. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 387(6628):90-94, 1997.

European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. *Opinion of the Scientific Committee on Food: Update on the Safety of Aspartame*. European Commission on Food, 2002.

Farooqi I.S., Jebb S.A., Langmack G. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 341(12):879-884, 1999.

Farooqi I.S., Matarese G., Lord G.M. Beneficial effects of leptin on obesity, t cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.*, 110(8):1093-1103, 2002.

Fernandez A.M., Kim J.K., Yakar S., Dupont J., Hernandez-Sanchez C., Castle A.L., Filmore J., Shulman G.I., Le Roith D. Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.*, 15:1926-1934, 2001.

Fink, K.B., Gothert, M., 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.*, 59:360-417, 2007.

Fletcher P.J., Azampanah A., Korth K.M. Activation of 5-HT(1B) receptors in the nucleus accumbens reduces self-administration of amphetamine on a progressive ratio schedule. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71(4):717-725, 2002.

Forshee R.A., Storey M.L. Total beverage consumption and beverage choices among children and adolescents. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 54:297-307, 2003.

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*, 16:1894-1900, 2008.

Friedrich, M.J. Epidemic of obesity expands its spread to developing countries. *JAMA*, 287:1382-1386, 2002.

Gambarana, C., Masi, F., Leggio, B., Grappi, S., Nanni, G., Scheggi, S., De Montis, M.G., Tagliamonte, A. Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neuroscience*, 121:179-187, 2003.

Ganong W.F. *Review of Medical Physiology*, 18.ed. Appleton and Lange: Stanford, Connecticut, 1997.

Gardner C., Wylie-Rosett J., Gidding S.S., Steffen L.M., Johnson R.K., Reader D., Lichtenstein A.H. Nonnutritive sweeteners: current use and health perspectives: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 35:1798-1808, 2012.

Garfield A.S., Patterson C., Skora S. Neurochemical characterization of body weight-regulating leptin receptor neurons in the nucleus of the solitary tract. *Endocrinology*, 153(10):4600-4607, 2012.

German J.P., Thaler J.P., Wisse B.E. Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology*, 152(2):394-404, 2011.

Giorgetti M., Tecott L.H. Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur. J. Pharmacol.*, 488:1-9, 2004.

Giraudo S.Q., Kotz C.M., Grace M.K., Levine A.S., Billington C.J. Rat hypothalamic NPY mRNA and brown fat uncoupling protein mRNA after high-carbohydrate or high-fat diets. *Am. J. Physiol.*, 266:1578-1583, 1994.

Glaum S.R., Hara M., Bindokas VP, Lee CC, Polonsky KS, Bell GI, Miller RJ. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol. Pharmacol.*, 2:230-235, 1996.

Goldstein D.J., Rampey A.H., Enas G.G., Potvin J.H., Fludzinski L.A., Levine L.R. Fluoxetine: a randomized clinical trial in the treatment of obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 18:129-135, 1994.

Goncalves G.H., Li W., Garcia A.V. Hypothalamic agouti-related peptide neurons and the central melanocortin system are crucial mediators of leptin's antidiabetic actions. *Cell Rep.*, 7(4):1093-1103, 2014.

Gostin L.O. Law as a tool to facilitate healthier lifestyles and prevent obesity. *JAMA*, 297:87-90, 2007.

Grignaschi G., Sironi F., Samanin R., Stimulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the paraventricular hypothalamus attenuate neuro peptide Y-induced hypophagia through activation of corticotrophin releasing factor. *Brain Res.*, 708:173-176, 1996.

Grillo C.A., Piroli G.G., Evans A.N., Macht V.A., Wilson S.P., Scott K.A., Sakai R.R., Mott D.D., Reagan L.P. Obesity/ hyperleptinemic phenotype adversely affects hippocampal plasticity: effects of dietary restriction. *Physiol. Behav.*, 104(2):235-241, 2011a.

- Grillo, C.A., Piroli, G.G., Kaigler, K.F., Wilson, S.P., Wilson, M.A., Reagan, L.P. Downregulation of hypothalamic insulin receptor expression elicits depressive-like behaviors in rats. *Behav. Brain Res.*, 222(1):230-235, 2011b.
- Grillo C.A., Tamashiro K.L., Piroli G.G., Melhorn S., Gass J.T., Newsom R.J., Reznikov L.R., Smith A., Wilson S.P., Sakai R.R., Reagan L.P. Lentivirus-mediated downregulation of hypothalamic insulin receptor expression. *Physiol. Behav.*, 92:691-701, 2007.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*, 416:396-400, 2002.
- Halldorsson I.T., Strøm M., Petersen SB., Olsen S.F. Intake of artificially sweetened soft drinks and risk of preterm delivery: a prospective cohort study in 59,334 Danish pregnant women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 92:626-633, 2010.
- Halpern, A., Mancini, M.C. Treatment of obesity: an update on anti-obesity medications. *Obes. Rev.*, 4:25-42, 2003.
- Hawkins M.F., Uzelac S.M., Hearn J.K. Baumeister A.A. Effects of selective serotonin2 ligands on behaviors evoked by stress in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 90:632-639, 2008.
- Hawkins R.A., Mans A.M., Biebuyck J.F. Regional transport and other neutral amino acids across the blood-brain barrier. In: Wurtman R.J., Ritter-Walker E. (eds). *Dietary Phenylalanine and Brain Function*. Birkhauser: Basel., 1988. p. 63-67.
- Hayes D.J., Graham D.A., Greenshaw A.J. Effects of systemic 5-HT(1B) receptor compounds on ventral tegmental area intracranial self-stimulation thresholds in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 604:74-78, 2009.
- Haynes W.G., Morgan D.A., Walsh S.A. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J. Clin. Invest.*, 100(2):270-278, 1997.
- Heisler L.K., Zhou L., Bajwa P., Hsu J., Tecott L.H. Serotonin 5-HT(2C) receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes Brain Behav.*, 6:491-496, 2007.
- Hensler J.G. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 30:203-214, 2006.



Hill J.W., Xu Y., Preitner F. Phosphatidyl inositol 3-kinase signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons contributes to the regulation of glucose homeostasis. *Endocrinology*, 150(11):4874-4882, 2009.

Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine serotonin. *Pharmacol. Rev.*, 46:157-203, 1993.

Hukshorn C.J., van Dielen F.M., Buurman W.A. The effect of pegylated recombinant human leptin (peg-ob) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 26(4):504-509, 2002.

Huo L., Gamber K., Greeley S. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. *Cell Metab.*, 9(6):537-547, 2009.

Iacobellis G., Ribaldo M.C., Assael F., Vecchi E., Tiberti C., Zappaterreno A. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(11):5163-5168, 2003.

Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35:129-150, 2010.

Institute of Medicine. Weighing the Options: *Criteria for Evaluating Weight-Management Programs*. Washington DC: National Academies Press, 1995.

Ionescu E., Rohner-Jeanrenaud F., Proietto J., Rivest R.W., Jeanrenaud B. Taste-induced changes in plasma insulin and glucose turnover in lean and genetically obese rats. *Diabetes*, 37(6):773-779, 1988.

Iyer R.N., Bradberry C.W. Serotonin-mediated increase in prefrontal cortex dopamine release: pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277(1):40-47, 1996.

Jang H.J., Kokrashvili Z., Theodorakis M.J., Carlson O.D., Kim B.J., Zhou J., Kim H.H., Xu X., Chan S.L., Juhaszova M. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(38):15069-15074, 2007.

Jang H.J., Kokrashvili Z., Theodorakis M.J., Carlson O.D., Kim B.J., Zhou J. Gut expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(38):15069-15074, 2007.

Johnson R.J., Nakagawa T., Sanchez-Lozada L.G., Shafiu M., Sundaram S., Le M. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*, 62:3307-3315, 2013.

Just T., Pau H.W., Engel U., Hummel T. Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation? *Appetite*, 51(3):622-627, 2008.

Kauffman G.B., Priebe P.M. The discovery of saccharin: a centennial retrospect. *Ambix*, 25:191-207, 1978.

Kaufman L. Michael Sveda, the Inventor Of Cyclamates, Dies at 87. *New York Times*, August, 1999.

Kievit P., Howard J.K., Badman M.K. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMCexpressing cells. *Cell Metab.*, 4(2):123-132, 2006.

Kim Y.B., Uotani S., Pierroz D.D., Flier J.S., Kahn B.B. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*, 141:2328-2339, 2000.

Kranz G.S., Kasper S., Lanzenberger R. Reward and the serotonergic system. *Neuroscience*, 166:1023-1035, 2010.

Kroger M., Meister K., Kava R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 5:35-47, 2006.

Kyriazis G.A., Soundarapandian M.M., Tyrberg B., Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109 (8):E524-E532, 2012.

Lakshmy R. Metabolic syndrome: role of maternal under nutrition and fetal programming. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 14:229-240, 2013.

Lavin J.H., French S.J., Read N.W. The effect of sucrose- and aspartame sweetened drinks on energy intake, hunger and food choice of female, moderately restrained eaters. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 21:37-42, 1997.

- Lawton C.L., Wales J.K., Hill A.J., Blundell J.E. Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating pattern: effect of fluoxetine in obese female subjects. *Obes. Res.*, 3:345-356, 1995.
- Lean M.E. Sibutramine - a review of clinical efficacy. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 21:S30-S36, 1997.
- Lean, M.E. How does sibutramine work? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 25 (Suppl 4):S8-S11, 2001.
- Lechin F., van der Dijs B., Hernandez-Adrian G. Dorsal raphe vs. Median raphe serotonergic antagonism anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: relevance for neuropharmacological therapy. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 30:565-585, 2006.
- Lehninger A.L. *Princípios de Bioquímica*. 6.ed. São Paulo: Sarvier, 2014.
- Leibowitz S.F., Weiss G.F., Shor-Posner G. Hypothalamic serotonin: pharmacological, biochemical and behavioral analysis of its feeding-suppressive action. *Clin. Neuropharmacol.*, 11:S51-S71, 1988.
- Leibowitz S.F.; Wortley K.E. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 25:473-504, 2004.
- Lenoir M., Serre F., Cantin L., Ahmed S.H. Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One*, 2(8):e698, 2007.
- LeRoith D., Gavrilova O. Mouse models created to study the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38:904-912, 2006.
- Lesage J., Del-Favero F., Leonhardt M., Louvart H., Maccari S., Vieux D. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J. Endocrinol.*, 181:291-296, 2004.
- Ludwig D.S. Examining the health effects of fructose. *JAMA*, 310:33-4, 2013.
- Lutsey P.L., Steffen L.M., Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*, 117(6):754-761, 2008.

Mace O.J., Affleck J., Patel N., Kellett G.L., Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J. Physiol.*, 582 (Pt 1):379-392, 2007.

Macor J.E., Burkhart C.A., Heym J.H., Ives J.L., Lebel L.A., Newman M.E., Nielsen J.A., Ryan K., Schulz D.W., Torgersen L.K., Koe B.K. 3-1,2,5,6-Tetrahydropyrid-4-yl.pyrrol3.2-b.pyrid-5-one: a potent and selective serotonin 1B agonist and rotationally restricted phenolic analogue of 5-methoxy-31,2,5,6-tetrahydropyrid-4-yl indols. *J. Med. Chem.*, 33:2087-2093, 1990.

Magnuson B.A., Burdock G.A., Doull J., Kroes R.M., Marsh G.M., Pa Riza 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. *Crit. Rev. Toxicol.*, 37:629-727, 2007.

Malaisse W.J., Vanonderbergen A., Louchami K., Jijakli H., Malaisse-Lagae F. Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets. *Cell Signal.*, 10(10):727-733, 1998.

Malik V.S., Popkin B.M., Bray G.A., Despre's J.P., Hu F.B. Sugar-sweetened beverages, obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation*, 121:1356-1364, 2010.

Margolskee R.F., Dyer J., Kokrashvili Z., Salmon K.S., Ilegems E., Daly K., Maillet E.L., Ninomiya Y., Mosinger B., Shirazi-Beechey S.P., T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (38):15075–15080, 2007.

Marks A.D., Smith C., Lieberman M. *Bioquímica Médica: Uma Abordagem Clínica*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

Masaki T., Chiba S., Yasuda T. Tsubone T., Kakuma T., Shimomura I., Funahashi T., Matsuzawa Y., Yoshimatsu H. Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice. *Diabetes*, 52: 2266-2273, 2003.

Masaki T., Yoshimatsu H. Neuronal histamine and its receptors in obesity and diabetes. *Curr. Diabetes Rev.*, 3:212-216, 2007.

Masaki T., Yoshimatsu H. The hypothalamic H1 receptor: a novel therapeutic target for disrupting diurnal feeding rhythm and obesity. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27:279-284, 2006.

Maslova E., Strom M., Olsen S.F., Halldorsson T.I. Consumption of artificially-sweetened soft drinks in pregnancy and risk of child asthma and allergic rhinitis. *PLoS One*, 8:e57261, 2013.

Mattes R. Effects of aspartame and sucrose on hunger and energy intake in humans. *Physiol. Behav.*, 47:1037-1044, 1990.

Mazur R.H., Goldkamp A.H, James P.A, Schlatter J.M. Structure-taste relationships of aspartic acid amides. *J. Med. Chem.*, 13:1217-1221. 1970.

McTavish D.; Heel R.C., Dexfenfluramine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in obesity. *Drugs*, 43:713-733, 1992.

Melanson K.J., Westerterp-Plantenga M.S., Saris W.H.M. Blood glucose patterns and appetite in time blinded humans: carbohydrate versus fat. *Am. J. Physiol.*, 227:337-345, 1999.

Mischke M., Plosch T. More than just a gut instinct – the potential interplay between a baby's nutrition, its gut microbiome, and the epigenome. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 304:R1065-1069, 2013.

Mitsutomi K., Masaki T., Shimasaki T., Gotoh K., Chiba S., Kakuma T., Shibata H. Effects of a non-nutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism*, 63(1):69-78, 2014.

Mittendorfer B., Horowitz J.F., DePaoli A.M. Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 60(5):1474-1477, 2011.

Moon H.S., Dalamaga M., Kim S.Y., Polyzos S.A., Hamnvik O.P., Magkos F., Paruthi J., Mantzoros C.S. Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr. Rev.*, 34(3):377-412, 2013.

Moon H.S., Matarese G., Brennan A.M. Efficacy of metreleptin in obese patients with type 2 diabetes: cellular and molecular pathways underlying leptin tolerance. *Diabetes*, 60(6):1647-1656, 2011.

Morton G.J., Cummings D.E., Baskin D.G., Barsh G.S., Schwartz M.W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109):289-295, 2006.

Moses A.C. Insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: is there a therapeutic role for IGF-1?, *Endocr. Dev.*, 9:121-134, 2005.

Muroya S., Yada T., Shioda S., Takigawa M. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.*, 264:113-116, 1999.

Nakagawa Y., Nagasawa M., Yamada S., Hara A., Mogami H., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Shigemura N., Ninomiya Y., Kojima I., Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*, 4 (4): e5106, 2009.

National Heart, Lung and Blood Institute Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults, 1998.

Nettleton J.A., Lutsey P.L., Wang Y., Lima J.A., Michos E.D., Jacobs Jr 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*, 32:688-694, 2009.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease. Study 2013. *Lancet*, 384:766-781, 2014.

Ojeda, E., Lopez, S., Rodriguez, P., Moran, L., Rodriguez, J. M., Delucas, P. Prevalence of sleep apnea syndrome in morbidly obese patients. *Chest*, 145(3 Suppl.):601A, 2014.

Oron-Herman M., Kamari Y., Grossman E., Yeger G., Peleg E., Shabtay Z. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am. J. Hypertens.*, 21:1018-1022, 2008.

Palmer J.R., Boogs D.A. Sugar-sweetened beverages and incidence of type 2 diabetes mellitus in African American women. *Arch. Intern. Med.*, 168(14):1487-1492, 2008.

Palmiter, R.D. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci.*, 30:375-381, 2007.

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*, 9 (10): e109841, 2014.

Pedersen D. *Alternative Sweeteners. Biotechnology and Food Ingredients*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269(5223):540-543, 1995.

Pepino M.Y., Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 14:391-395, 2011.

Pereira M.A., Odegaard A.O. Artificially sweetened beverages—do they influence cardiometabolic risk? *Curr. Atheroscler. Rep.*, 15:375, 2013.

Perez C., Fernandez-Galaz C., Fernandez-Agullo T., Arribas C., Andres A., Ros M., Carrasco J.M., Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes*, 53:347-353, 2004.

Perez-Torres I., Ibarra B., Soria-Castro E., Torrico-Lavayen R., Pavon N., Diaz-Diaz E. Effect of glycine on the cyclooxygenase pathway of the kidney arachidonic acid metabolism in a rat model of metabolic syndrome. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 89:899-910, 2011.

Pfaus, J.G. Pathways of sexual desire. *J. Sex. Med.*, 6:1506-1533, 2009.

Popkin B.M., Nielsen S.J. The sweetening of the world's diet. *Obes. Res.*, 11:1325-1332, 2003.

Popkin B.M., Adair L.S., Ng S.W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr. Rev.*, 70:3-21, 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. *Physiol. Behav.*, 29:293-300, 1982.

Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *J. Acad. Nutr. Dietetics*, 112:739-758. 2012.

Raben A., Vasilaras T.H., Moller 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. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76:721-729, 2002.

Reinhardt R.R., Bondy C.A. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier.

*Endocrinology*, 35:1753-1761, 1994.

Roberts H. J. Aspartame-induced thrombocytopenia. *South. Med. J.*, 100(5):543, 2007.

Rocha B.A., Goulding E.H., O'Dell L.E., Mead A.N., Coufal N.G., Parsons L.H., Tecott L.H. Enhanced locomotor, reinforcing, and neurochemical effects of cocaine in serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor mutant mice. *J. Neurosci.*, 22:10039-10045, 2002.

Rogers P.J., Pleming H.C., Blundell J.E. Aspartame ingested without tasting inhibits hunger and food intake. *Physiol. Behav.*, 47(6):1239-1243, 1990.

Rolls B.J. Effects of intense sweeteners on hunger, food intake, and body weight: a review. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:872-878, 1991.

Roman E.A., Reis D., Romanatto T. Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, AND PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Mol. Cell Endocrinol.*, 314(1):62-69, 2010.

Rosito G.A., Massaro J.M., Hoffmann U., Ruberg F.L., Mahabadi A.A., Vasan R.S. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 117(5):605-613, 2008.

Rotwe P., Burge S.K., Milbran J. D., Krau J. E. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:265-269, 1988.

Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6.ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

Rubini M.E. Noncaloric sweetening agents. *Am. J. Clin. Nutr.*, 21:644-645, 1968.

Saris W.H.M. Sugars, energy metabolism, and body weight control. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78:850S-857S, 2003.

Scarpace P.J., Matheny M., Pollock B.H. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am. J. Physiol.*, 273(1 Pt 1):E226-230, 1997.



Schulze M.B., Manson J.E., Ludwig D.S., Colditz G.A., Colditz M.J., Willett W.C. Sugar sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA*, 292:927-934, 2004.

Schwartz M.W., Baskin D.G., Bukowski T.R. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, 45(4):531-535, 1996.

Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr, Seeley R.J., Baskin D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404:661-671, 2000.

Sclafani A., Ackroff K. The relationship between food reward and satiation revisited. *Physiol. Behav.*, 82:89-95, 2004.

Sell H., Deshaies Y., Richard D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36:2098-2104, 2004.

Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*, 29(11-12):1293-1299, 2013.

Silveira P.P., Xavier M.H., Souza F.H., Manoli L.P., Rosat R.M., Ferreira M.B.C. Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:1343-1350, 2000.

Simansky K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav. Brain Res.*, 73:37-42, 1996.

Sjostrom L., Lindroos A.K., Peltonen M. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N. Engl. J. Med.*, 351:2683-2693, 2004.

Small D.M. Toward an understanding of the brain substrates of reward in humans. *Neuron*, 33:668-671, 2002.

Smeets P.A.M., de Graaf C., Stafleu A., van Osch M.J.P., van der Grond J. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82:1011-1016, 2005.

Soffritti M., Belpoggi F., Tibaldi E., Esposti D.D., Lauriola M. Lifespan exposure to low doses of aspartame beginning during prenatal life increases cancer effects in rats. *Environ. Health Perspect.*, 115(9):1293-1297, 2007.

Specchia M.L., Veneziano M.A., Cadeddu C., Ferriero A.M., Mancuso A., Ianuale C., Parente P., Capri S., Ricciardi W. Economic impact of adult obesity on health systems: a systematic review. *Eur. J. Public Health*, 25:255-262, 2015.

Stegink L.D. The aspartame story: a model for the clinical testing of a food additive. *Am. J. Clin. Nutr.*, 46:204-215, 1984.

Stellman S.D., Garfinkel L. Artificial sweetener use and one-year weight change among women. *Prev. Med.*, 15:195-202, 1986.

Strader A.D., Woods S.C. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology*, 128:175-191, 2005.

Striegel-Moore R.H., Thompson D., Affenito S.G., Franko D.L., Obarzanek E., Barton B.A. Correlates of beverage intake in adolescent girls: the National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J. Pediatr.*, 148:183-187, 2006.

Strong P.V., Christianson J.P., Loughridge A.B., Amat J., Maier S.F., Fleshner M., Greenwood B.N. 5-Hydroxytryptamine 2C receptors in the dorsal striatum mediate stress-induced interference with negatively reinforced instrumental escape behavior. *Neuroscience*, 197:132-144, 2011.

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*, 514:181-186, 2014.

Swithers S.E. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol. Metab.*, 24:431-441, 2013.

Swithers S.E., Baker C.R., Davidson T.L. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behav. Neurosci.*, 123(4):772-780, 2009.

Swithers S.E., Davidson T.L. A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav. Neurosci.*, 122(1):161-173, 2008.

Swithers S.E., Martin A.A., Davidson T.L. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol. Behav.*, 100 (1):55-62, 2010.

Swithers S.E., Sample C.H., Davidson T.L. Adverse effects of high-intensity sweeteners on energy intake and weight control in male and obesity-prone female rats. *Behav. Neurosci.*, 127:262-274, 2013.

Sylvetsky A., Rother K.I., Brown R. Artificial sweetener use among children: epidemiology, recommendations, metabolic outcomes, and future directions. *Pediatr. Clin. North Am.*, 58:1467-1480, 2011.

Sylvetsky A.C., Welsh J.A., Brown R.J., Vos M.B. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96(3):640-646, 2012.

Tecott L.H., Sun L.M., Akana S.F., Strack A.M., Lowenstein D.H., Dallman M.F., Julius D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature*, 374:542-546, 1995.

Tordoff M.G., Alleva A.M. Oral stimulation with aspartame increases hunger. *Physiol. Behav.*, 47:555-559, 1990.

Tordoff M.G., Alleva A.M. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51:963-969, 1990.

Val-Laillet D., Aarts E., Weber B., Ferrari M., Quaresima V., Stoeckel L.E., Alonso-Alonso M., Audette M., Malbert C.H., Stice E. Neuroimaging and neuromodulation approaches to study eating behavior and prevent and treat eating disorders and obesity. *Neuroimage Clin.*, 24:1-31, 2015.

Van Wymelbeke V., Beridot-Therond M.E., La Gueronniere V. Influence of repeated consumption of beverages containing sucrose or intense sweeteners on food intake. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 58:154-161, 2004.

Volkow N.D., Baler R.D. NOW vs LATER brain circuits: implications for obesity and addiction. *Trends Neurosci.*, 38(6):345-352, 2015.

Vucenik I., Stains J.P. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1271:37-43, 2012.

Wang C.P., Hsu H.L., Hung W.C., Yu T.H., Chen Y.H., Chiu C.A. Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. *Clin. Endocrinol.*, 70(6):876-882, 2009.

Wang M.Y., Chen L., Clark G.O. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(11):4813-4819, 2010.

Wang Y., Kuropatwinski K.K., White D.W., Hawley T.S., Hawley R.G., Tartaglia L.A., Baumann H. Leptin receptor action in hepatic cells. *J. Biol. Chem.*, 272:16216-16223, 1997.

White C.L., Kashima K., Bray G.A., York D.A. Effect of a serotonin 1-A agonist on food intake of Osborne–Mendel and S5B/P1 rats. *Physiol. Behav.*, 68: 715-722, 2000.

Whitehouse C.R., Boullata J., McCauley L.A. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AAOHN J.*, 56(6):251-259, 2008.

WHO/FAO. Population-based prevention strategies for childhood obesity: report of a WHO forum and technical meeting, Geneva, 15–17 December 2009.

Williams G., Cai X.J., Elliott J.C., Harrold J.A. Anabolic neuropeptides. *Physiol. Behav.*, 81:211-222, 2004.

Wirtshafter D. The control of ingestive behavior by the median raphe nucleus. *Appetite*, 36:99-105, 2001.

Woods S.C., D'Alessio D.A. Central Control of Body Weight and Appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93: S37-S50, 2008.

Wurtman R.J. Neurochemical changes following high-dose aspartame with dietary carbohydrates. *New Engl. J. Med.*, 309(7):429-430, 1983.

Yan Q.S., Yan S.E. Activation of 5-HT(1B/1D) receptors in the mesolimbic dopamine system increases dopamine release from the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.*, 418(1-2):55-64, 2001.

Yan Q.S., Zheng S.Z., Yan S.E. Involvement of 5-HT1B receptors within the ventral tegmental area in regulation of mesolimbic dopaminergic neuronal activity via GABA mechanisms: a study with dual-probe microdialysis. *Brain Res.*, 1021(1):82-91, 2004.

Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. *Yale J. Biol. Med.*, 83(2):101-108, 2010.

Yoshimatsu H., Egawa M., Bray G.A. Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res.*, 601:121-128, 1993.

Zafra M.A., Molina F., Puerto A. The neural/cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 30:1032-1044, 2006.

Zoratto F., Fiore M., Ali S.F., Laviola G., Macrì S. Neonatal tryptophan depletion and corticosterone supplementation modify emotional responses in adult male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 38:24-39, 2013.