



PAULA CATIRINA GERMANO MAGALHÃES



***Interação do edulcorante aspartame com o estado nutricional, no
cérebro em desenvolvimento: análise comportamental e
eletrofisiológica em ratos.***

**Recife
2017**

PAULA CATIRINA GERMANO MAGALHÃES

***Interação do edulcorante aspartame com o estado nutricional, no
cérebro em desenvolvimento: análise comportamental e
eletrofisiológica em ratos.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes

Prof. Titular do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco

Co-orientador: Dr. Ricardo Abadie Guedes

Prof. Adjunto do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2017

M188i	Magalhães, Paula Catirina Germano. Interação do edulcorante aspartame com o estado nutricional, no cérebro em desenvolvimento: análise comportamental e eletrofisiológica em ratos / Paula Catirina Germano Magalhães.– 2017. 75 f.: il.; 30 cm. Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017. Inclui referências e anexos. 1. Aspartame. 2. Ansiedade. 3. Desnutrição. 4. Excitabilidade cerebral. 5. Sistema nervoso. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título.	
612.3	CDD (23.ed.)	UFPE (CCS2017-257)

INTERAÇÃO DO EDULCORANTE ASPARTAME COM O ESTADO
NUTRICIONAL, NO CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO:
ANÁLISE COMPORTAMENTAL E ELETROFISIOLÓGICA EM
RATOS.

Tese de PAULA CATIRINA GERMANO MAGALHÃES, aprovada em
23/02/2017

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araujo Rodrigues
Depto. De Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Prof^a. Dr^a. Ângela Amâncio do Santos
PG - Nutrição - UFPE

Prof^a. Dr^a. Carol Virgínea Goes Leandro
PG - Nutrição - UFPE

Prof. Dr. José Antônio dos Santos
CAV. Vitória de Santo Antão

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
LIKA PG Bioquímica e Fisiologia da UFPE

RECIFE-2017

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pois até aqui tem me ajudado, verdadeiramente tem me ensinado que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Ele, mesmo que muitas vezes não entendamos as aflições e até mesmo pensamos em desistir, mas somente nEle encontrei forças para prosseguir.

Ao meu marido, *Jefferson Geovanazy Magalhães*, pelo seu grande amor e principalmente pela paciência que foi derramada em minha vida com suas atitudes em todo tempo, mesmo muitas vezes sem merecer através do descontrole emocional em que fui submetida proveniente da grande carga de *stress*. Fica minha profunda gratidão, és o melhor marido do mundo.

Aos meus pais, pelo investimento que fizeram em minha vida mesmo em dificuldades financeiras fizeram de tudo, sem vocês jamais teria chegado onde estou, tenho muito orgulho de ser sua filha. Obrigada.

Às amigas do LAFFINT, *Noranege, Rose, Elian, Andreia, Kássia, Denise e Mariana* pelos esclarecimentos quanto às técnicas de cirurgia da DAC, obrigada.

Aos estagiários, *Manuel e Aline*, pela grande colaboração nos experimentos e cuidados dos animais. Obrigada.

Ao meu querido orientador *prof.º Rubem*, pela paciência, disponibilidade, ensinamentos repassados e contribuição do início ao final do estudo, perceptível e enunciável por trás de tantas ideias. Se não fosse ele, eu não estaria aqui, pois sou eternamente grata por ter me recebido desde a minha adolescência. Obrigada professor por acreditar em mim, mesmo quando era tão imatura. Nunca me esquecerei de tudo o que fez por mim. Meu respeito, admiração e carinho. É com emoção que lhe agradeço.

Ao meu querido co-orientador *prof.º Ricardo*, um professor exemplar e capacitado que em um ano analisou os meus registros eletrofisiológicos em quanto meu orientador estava em um intercâmbio, sem o meu co-orientado, esse sonho não seria concretizado. Rico fica minha eterna gratidão, muito obrigada!

A todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui. Muito obrigada.

Dedico este trabalho ao meu querido esposo, pois sempre estive ao meu lado acompanhando cada etapa da minha vida.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições nutricionais distintas (ratos nutridos e desnutridos durante o desenvolvimento), os possíveis efeitos do aspartame sobre parâmetros comportamentais sugestivos de ansiedade e eletrofisiológicos (fenômeno da depressão alastrante cortical; DAC). Fatores como deficiência nutricional e o consumo do edulcorante não calórico aspartame são potencialmente danosos para o sistema nervoso. Ratos Wistar, nutridos (n=40) e desnutridos (n=40) no início da vida foram divididos em 4 grupos para cada condição nutricional, tratados por gavagem, durante a lactação, respectivamente com 75 mg/kg/d ou 125 mg/kg/d de aspartame (grupos ASP75 e ASP125), ou volume equivalente de água (grupo água), ou sem tratamento (grupo ingênuo). Testes comportamentais (labirinto em cruz elevado [LCE] e campo aberto [CA]) foram realizados aos 85-95 dias de idade e a DAC foi registrada entre 96 e 115 dias. O aspartame reduziu o peso corporal, em comparação com os grupos controle (água e ingênuo), sugerindo impacto negativo sobre o desenvolvimento corporal dos animais. Esse edulcorante aumentou comportamento sugestivo de ansiedade (menor permanência nos braços abertos do LCE) e desacelerou a DAC (menores velocidades de propagação). Alguns parâmetros foram mais afetados nos animais desnutridos. Conclui-se que o consumo precoce de aspartame afeta negativamente o desenvolvimento do organismo, com efeitos em parâmetros comportamentais e eletrofisiológicos cerebrais. Os resultados sugerem cautela no consumo de aspartame por lactantes e seus filhos nos primeiros anos de vida.

Palavras chaves: Aspartame. Ansiedade. Desnutrição; Excitabilidade cerebral. Sistema nervosa.

ABSTRACT

The development of the mammalian nervous system occurs predominantly in the early stages of life. In this period, factors such as nutritional deficiency and consumption of the non-caloric sweetener aspartame are potentially harmful to the nervous system. Some studies suggest an association between aspartame intake and adverse neural effects. The objective of this study was to evaluate the possible effects of aspartame on behavioral parameters suggestive of anxiety and electrophysiology (phenomenon of cortical spreading depression, DAC) under different nutritional conditions (nourished and malnourished rats during development). Wistar rats, nourished (n = 40) and malnourished (n = 40) were used early in life. In each nutritional condition, the animals were divided into 4 groups, treated by gavage, during lactation, respectively with 75 mg / kg / d or 125 mg / kg / d aspartame (groups ASP75 and ASP125), or equivalent volume of water (Water group), or without treatment (naive group). Behavioral tests (elevated plus-maze [EPM] and open field [OF]) were performed at 85-95 days of age and CAD was triggered and recorded between 96 and 115 days. Aspartame reduced body weight compared to control (water and naive) groups, suggesting a negative impact on the animal's development. Aspartame also caused behavioral changes suggestive of anxiety (shorter stays in the open arms of the EPM) and slowed the CSD (slower propagation speeds). Some of these parameters were more affected in malnourished animals. It is concluded that the early consumption of aspartame adversely affects the development of the organism, with effects on cerebral behavioral and electrophysiological parameters. Data suggest caution in the aspartame consumption by lactating mothers and their infants.

Key words: Aspartame. Anxiety. Cerebral excitability. Malnutrition. Nervous system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Delineamento experimental	24
Figura 2- Pesos corporais	50
Figura 3- Labirinto em Cruz elevado	51
Figura 4- Campo Aberto	52
Figura 5- Registros eletrofisiológicos	53
Figura 6- Velocidades de propagação da Depressão Alastrante Cortical.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amplitude e duração da depressão alastrante cortical

38

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA Análise de variância

ECoG Eletrocorticograma

SNC Sistema Nervoso Central

VLV Variação lenta de voltagem

ASP Aspatame

L₉ Litter of 9 rats

L₁₅ Litter of 9 rats

N9 Ninhada de 9 animais

N15 Ninhada de 15 animais.

DAC Depressão Alastrante Cortical

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 REREFÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1 Aspartame	15
2.2 Aspartame, Estado Nutricional e Sistema Nervoso	16
2.3 Aspartame e comportamento de ansiedade	19
2.4 Aspartame e a Depressão Alastrante Cortical	20
3 MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Condições de aleitamento	22
3.3 Tratamento por gavagem	22
3.4 Determinações ponderais	24
3.5 Labirinto em cruz elevado	24
3.6 Aparelho de campo aberto	25
3.7 Registro da depressão alastrante cortical	25
3.8 Análise Estatística	26
4 Behavioral and electrophysiological evidence of aspartame effects on the developing rat brain: an anxiety-like and spreading depression analysis	27
5 Aspartame and the nervous system: a systematic review	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A- Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais	73
ANEXO B- Declaração de aceito do artigo de revisão pela revista	75
ANEXO C- Comprovante de submissão do artigo original	77

1 APRESENTAÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso de mamíferos ocorre predominantemente nas fases iniciais da vida. Nesse período, o consumo do edulcorante não calórico aspartame, associado ou não à deficiência nutricional, pode ser prejudicial para o sistema nervoso. O aspartame teve seu consumo como edulcorante aprovado na década de 1980. Desde então, o número de produtos alimentícios contendo aspartame vem aumentando.

Ainda hoje os pesquisadores divergem quanto a possíveis efeitos nocivos do aspartame sobre a função neuronal. Algumas pesquisas sugerem associação da sua ingestão com prejuízos metabólicos para o sistema nervoso central (SNC), tais como alterações em complexos e atividades enzimáticas e de neurotransmissores (JACOB; STECHSCHULTE, 2008; SUN-EDELSTEIN; MAUSKOP, 2009). Considerando as possíveis reações adversas neuronais do aspartame, torna-se importante a caracterização dos efeitos biológicos desse edulcorante sobre o desenvolvimento e as funções do SNC. Dessa forma, esta tese constitui uma tentativa de integrar aspectos comportamentais e eletrofisiológicos com a manipulação nutricional, para uma melhor compreensão das possíveis alterações neurofisiológicas induzidas pelo aspartame.

A desnutrição materna acomete uma parcela da população de baixa renda que não tem acesso aos alimentos em quantidade e qualidade adequados ao crescimento e desenvolvimento dos sistemas fisiológicos (MORGANE et al., 1993; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000; COUTINHO, GENTIL, TORAL, 2008). Observa-se também, embora em menor proporção, que mesmo algumas mulheres de maior renda e/ou algumas daquelas que supervalorizam a imagem corporal têm aporte energético insuficiente durante a gestação e a lactação no intuito de evitar maior ganho de peso (ABRAHAM, 2001; SENIOR, 2005).

O conhecimento de que alterações nutricionais podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso é bem estabelecido, porém o mesmo não acontece com relação aos efeitos neurais do aspartame. De acordo com a literatura, observam-se resultados conflitantes acerca do envolvimento do aspartame em distúrbios neurológicos. Se admitirmos que o aspartame e seus metabólitos estejam

envolvidos com alterações neuronais, pode existir uma relação entre o seu consumo e modificações comportamentais sugestivas de ansiedade, (LABUDA; HALE, 2000), bem como na atividade elétrica cerebral, avaliada por meio da propagação do fenômeno da depressão alastrante cortical (DAC). Esse fenômeno eletrofisiológico parece ter mecanismos com pontos em comum com aqueles de doenças neurológicas como a epilepsia e a migrânea (GUEDES, 2005 LEÃO, 1944; LEHMENKUHLE; GROTEMEYER; TEGTMEIER, 1993). Como o aspartame pode estar envolvido no desencadeamento de cefaléia e sintomas epiléticos em humanos (BLUMENTHAL; VANCE, 1997; CAMFIELD et al., 1992; ESHEL; SAROVA-PINHAS, 1993; GABY et al., 2007; JACOB; STECHSCHULTE, 2008; MORTELMANS et al., 2008; SUN-EDELSTEIN; MAUSKOP, 2009; TOLLEFSON; BARNARD, 1992; WALTON, 1986), pretende-se neste trabalho analisar se a ingestão desse produto durante o desenvolvimento cerebral pode influenciar comportamentos sugestivos de ansiedade e o fenômeno da DAC.

Como já brevemente mencionado acima, a DAC vem sendo bastante estudada na procura por conhecimentos sobre os mecanismos desse fenômeno que auxiliem na compreensão de doenças neurológicas humanas importantes, tais como epilepsia, a migrânea e a isquemia cerebral. O presente trabalho se faz pertinente, se considerarmos as conexões com o aspartame citadas acima, o elevado número de pessoas expostas a este edulcorante artificial - a exemplo de indivíduos saudáveis e usuários crônicos, como os diabéticos e obesos, - e os estudos que indicam reações adversas à sua utilização. Portanto, com este estudo, espera-se contribuir para os conhecimentos dos efeitos do aspartame no sistema nervoso central. Em longo prazo, este estudo poderia contribuir para o desenvolvimento de ações preventivas e terapêuticas concernentes aos efeitos neurais do aspartame, associados ou não à desnutrição.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspartame

O aspartame (*L-asparthyl-L-phenylalanine methyl ester*) foi aprovado como aditivo alimentar (edulcorante) pela FDA em 1981. Atualmente, este adoçante pode ser encontrado em mais de seis mil produtos, incluindo refrigerantes, bebidas em pó, gomas de mascar, doces, gelatinas, misturas para sobremesa, pudins e recheios, sobremesas congeladas, iogurtes, adoçantes de mesa e em alguns produtos farmacêuticos como vitaminas e pastilhas contra tosse (ASPARTAME INFORMATION CENTER, 2010). A sua ingestão diária aceitável é de 50 mg/kg de peso corporal, o que equivale a 18-19 latas (1 lata = 355 ml) de refrigerante dietético (FDA, 1996; MATTES; POPKIN, 2009). Para a Organização de Saúde e Bem-estar do Canadá (*Health and Welfare Canada*), a ingestão diária aceitável é 40 mg/kg de peso corporal.

Muitos produtos contendo aspartame como aditivo são indicados para consumo por indivíduos diabéticos ou por aqueles que, por apresentarem excesso de peso corporal, precisam reduzir o teor de açúcar na dieta. Por esta razão, esse edulcorante vem sendo utilizado em larga escala, não somente por esses grupos, mas também pela população sadia (HUMPHRIES; PRETORIUS; NAUDÉ, 2008). Além disso, informações sobre a quantidade de edulcorantes artificiais não nutritivos, presentes em alimentos e bebidas, nem sempre são apresentadas nas embalagens desses produtos.

A respeito da utilização de edulcorantes na alimentação de crianças e adolescentes, há insuficiência de estudos conclusivos quanto aos efeitos desses aditivos em longo prazo no crescimento e no desenvolvimento. No entanto, há suspeitas, por exemplo, da associação entre o uso do aspartame e aparecimento de convulsões ou irritabilidade em crianças e risco de ultrapassar a dose diária máxima aceita (VITOLLO, 2008). A quantidade máxima diária para uma criança de 3 anos, com 14kg, (à dose de 40mg/kg/dia), seria facilmente excedida pelo consumo de 1 lata de refrigerante dietético, 1 porção de doce dietético, 1 porção de iogurte dietético e 3 envelopes de edulcorante para adoçar líquidos, total de 517mg (VITOLLO, 2014; THOMPSON, 1998).

2.2. Aspartame, Estado Nutricional e Sistema Nervoso

O debate sobre a utilização do aspartame existe desde sua aprovação pelo FDA e atualmente ainda persistem controvérsias sobre sua segurança. Algumas evidências sugerem possíveis efeitos neurológicos e comportamentais adversos devido aos componentes metabólicos do aspartame (fenilalanina, ácido aspártico, *diketopiperazine* e metanol), os quais são produzidos durante sua quebra. Algumas pesquisas sugerem que o aspartame não seria citotóxico (HUMPHRIES; PRETORIUS; NAUDÉ, 2008). Magnuson et al. (2007), em uma extensa revisão concluíram que os dados disponíveis não suportariam a associação entre o aspartame, como componente da dieta humana, e efeitos neurotóxicos. Por outro lado, Humphries et al (2008) observaram em diversos estudos que o aspartame perturba a função neuronal e modifica as concentrações cerebrais de catecolaminas. Também se relatou que o aspartame e seus produtos de degradação indiretamente causam aumento na taxa de despolarização neuronal. Os autores concluíram que, diante das dúvidas e controvérsias acerca dos efeitos adversos causados por este edulcorante, mais pesquisas são necessárias para eliminar toda e qualquer controvérsia acerca deste produto.

A utilização do aspartame tem sido relacionada com dores de cabeça, ataques de pânico e convulsões (SUN-EDELSTEIN; MAUSKOP, 2009; JACOB; STECHSCHULTE, 2008; BLUMENTHAL; VANCE, 1997; TOLLEFSON; BARNARD, 1992; DRAKE, 1986; WALTON, 1986), bem como detrimento da memória em ratos pela exposição crônica (CHRISTIAN et al., 2004). Seu consumo foi também relacionado a ataques epilépticos (MORTELMANS et al., 2008; GABY et al., 2007; ESHEL; SAROVA-PINHAS, 1993; CAMFIELD et al., 1992), neurotoxicidade (LAU et al., 2006) e risco genotóxico (BANDYOPADHYAY; GHOSHAL; MUKHERJEE, 2008; ALSUHAIBANI, 2010).

Em relação à indução de malignidade no cérebro, Lim et al. (2006), em estudo de coorte, constataram que seus achados não apóiam a hipótese de que o aspartame aumenta risco de câncer hematopoiético ou cerebral. No entanto, Soffritti et al (2007) verificaram que o aspartame aumenta significativamente os riscos de tumores em roedores, especialmente linfomas e tumores mamários,

com um risco dobrado naqueles em que a exposição se inicia no período pré-natal. Como conclusão os autores afirmam que o FDA deveria rever a aprovação desse edulcorante.

Alterações no metabolismo do sistema nervoso central (SNC), como consequência da ingestão de aspartame, têm também sido descritas. Dados obtidos por Vences-Mejía et al. (2006) demonstraram que um consumo diário de aspartame abaixo da quantidade recomendada pela FDA, em 30 dias, provoca um incremento substancial nas enzimas do citocromo P450 (CYP) no cérebro e no fígado. Esse complexo enzimático é responsável pelo metabolismo molecular no SNC, a exemplo do metabolismo de xenobióticos. Os autores afirmam que consequências biológicas desse processo, como o aumento da ativação de substâncias tóxicas, devem ser investigadas com vistas ao aumento do número de indivíduos expostos a esse aditivo. As quantidades utilizadas na pesquisa referida acima, 75 e 125mg/kg para ratos, equivalem, respectivamente, a uma quantidade de 15 e 25 mg/kg para humanos, após utilização de um fator de correção ($FC = 5$), ou seja, abaixo da quantidade recomendada pela FDA.

No estudo dos efeitos orgânicos do aspartame, outro ponto a esclarecer refere-se à interação entre seus efeitos e o estado de nutrição do organismo. A nutrição é importante para o desenvolvimento do organismo como um todo. Contudo, em relação ao desenvolvimento do sistema nervoso ela parece exercer um papel de destaque (MORGANE et al., 1993). No período perinatal, o cérebro se desenvolve com grande intensidade. Nessa fase, processos relacionados ao desenvolvimento, como a neurogênese, a gliogênese, a migração neuronal, a mielinização e a organização sináptica se processam com velocidade máxima; o cérebro se torna vulnerável a vários tipos de agressões, inclusive, aquelas de origem alimentar (SMART e DOBBING, 1971; MORGANE et al., 1993). Muitos dos estudos envolvendo variáveis nutricionais têm utilizado modelos experimentais de desnutrição, a fim de melhor compreender a influência daquelas variáveis sobre o funcionamento cerebral. Está bem estabelecido que o impacto da desnutrição sobre o sistema nervoso é potencialmente mais danoso se a desnutrição for imposta nas fases iniciais da vida. Muitos dos danos ocasionados ao sistema nervoso durante o período crítico de desenvolvimento poderão não mais ser revertidos, a depender da

intensidade e duração das alterações nutricionais (MORGANE et al., 1993; GUEDES et al., 1996; ALMEIDA et al., 2002).

A despeito dos índices crescentes de obesidade em todo o mundo, o estudo dos efeitos neurais da desnutrição continua a ter importância, pois a desnutrição ainda atinge um número considerável de indivíduos no Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do país (COUTINHO et al., 2008). Entender como funciona o cérebro submetido à injúria nutricional pode ajudar a minimizar as consequências prejudiciais desse problema tanto para o indivíduo, como para a sociedade. A desnutrição acarreta mudanças bioquímicas (WINICK, 1972), estruturais (MAIA et al., 2006; ROCHA-DE-MELO et al., 2004), comportamentais (TEODÓSIO et al., 1979) e eletrofisiológicas ao sistema nervoso (ROCHA-DE-MELO et al., 2006), modificando até mesmo alguns sistemas de transmissão neuronal (VASCONCELOS et al., 2004; GUEDES e VASCONCELOS, 2008).

Além das alterações bioquímicas e estruturais que podem ocorrer no sistema nervoso em decorrência de insultos nutricionais, os neurotransmissores, que são as substâncias químicas responsáveis pela comunicação neuronal, também podem ser afetados pela desnutrição (GUEDES et al., 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006). Simintzi et al. (2007) observaram que componentes do aspartame podem diretamente ou indiretamente atuar na enzima acetilcolinesterase (AChE) do córtex frontal, que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Essa reação é necessária para que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ativação, evitando uma ação excessiva do neurotransmissor, que produziria superestimulação neuronal e como consequência debilidade e cansaço. Doses altas ou tóxicas do edulcorante notavelmente diminuíram a atividade da enzima. Se for possível comparar os resultados desse estudo *in vitro* à realidade humana, pode-se sugerir que sintomas colinérgicos, tais como rinite, salivação aumentada, miose, lacrimejamento, diaforese, rubor e hiperperistalse intestinal, estejam relacionados ao consumo das doses mencionadas de aspartame (150 ou 200 mg/kg; 30 ou 40mg/kg para humanos).

O nível extracelular de dopamina pode ser reduzido devido à ingestão do aspartame quando administrado sistemicamente em dose única de 500 mg/kg para ratos e de 100 mg/kg para humanos

(BERGSTROM; CUMMINGS; SKAGGS, 2007). É importante observar que, segundo esses autores, a deficiência dopaminérgica é uma condição encontrada em doenças como Mal de Parkinson e Esquizofrenia

2.3 Aspartame e comportamento de ansiedade

Historicamente, o comportamento sugestivo de "medo" ou "reatividade emocional" de roedores tem sido avaliado pela quantificação de respostas como a defecação e a atividade deambulatória em campo aberto (HALL, 1934; BLIZARD et al., 2015). No caso do comportamento em campo aberto (CA), é o conflito entre exploração e aversão contra áreas abertas e brilhantes que determinam o comportamento animal. O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais utilizados para avaliar a ansiedade. Em modelos animais de ansiedade que dependem da deambulação exploratória, a indicação do comportamento relacionado à ansiedade não se baseia exclusivamente na atividade motora reduzida. Assim, ansiedade e atividade locomotora são interligadas no LCE e o teste do CA é também um dos procedimentos mais importantes na psicologia animal (RODGERS, JOHNSON, 2005; ASHOK, SHEELADEVI, WANKHAR, 2015). No teste do CA, pode ser observado várias dimensões comportamentais independentes relacionadas à reatividade motora, exploração e reatividade emocional. Ambos os testes são ferramentas-padrão para analisar o comportamento para a atividade, exploração e emocionalidade, que é frequentemente usado para avaliar drogas quanto ao seu potencial psicofarmacológico (RODGERS, JOHNSON, 2005;).

Potts et al.(1980) mostraram que a administração de aspartame como 9% da dieta por 13 semanas poderia alterar o comportamento de aprendizagem em ratos. Ashok et al. (2015) relataram que o metanol, um subproduto da metabolização do aspartame, tem um efeito no cérebro expresso como alteração na atividade locomotora e no nível de ansiedade (ASHOK, SHEELADEVI, WANKHAR, 2015).

Estudos sobre a ação do aspartame e o comportamento sugestivo de ansiedade ainda são muito escassos; além disso, a pouca literatura disponível apresenta várias divergências. Alguns trabalhos têm

demostrado que o consumo crônico desse edulcorante em roedores aumentou a sua ansiedade. Os animais que consumiram aspartame apresentavam um maior tempo de permanência no braço fechado, bem como um menor número de entradas no braço aberto e maior número de bolos fecais, resultados que sugerem que os animais experimentais ficaram mais ansiosos em relação ao grupo controle (ABU-TAWEELA et al, 2014; ASHOK, SHEELADEVI, WANKHAR, 2015).

2.4 Aspartame e a Depressão Alastrante Cortical

Considerando as possíveis reações neurais adversas do aspartame, torna-se importante a caracterização dos seus efeitos biológicos sobre o desenvolvimento e as funções do SNC, sendo objetivo do presente trabalho, estudar tais efeitos do ponto de vista comportamental e neurofisiológico. Para esta última abordagem, utilizaremos o modelo da “depressão alastrante da atividade elétrica cortical”, ou simplesmente “depressão alastrante cortical” (DAC). Pretende-se, também investigar se tais ações do aspartame seriam modificadas por manipulações do estado nutricional dos animais, durante o período de mais intenso desenvolvimento cerebral.

A DAC foi inicialmente descrita por Aristides Leão (LEÃO, 1944) e consiste em uma diminuição (“depressão”) da atividade elétrica do tecido cerebral, que se propaga (“alastrante”) de forma concêntrica (com velocidade da ordem de 2 a 5 mm/min), do ponto onde se iniciou para todo o restante do tecido neuronal. Em ratos adultos normais a DAC se alastra com velocidades entre 3 e 4 mm/min. Alterações nessa velocidade de propagação indicam modificações neurofisiológicas, que podem ser provocadas por diversas condições de natureza ambiental, hormonal, farmacológica e nutricional. Assim, o fenômeno pode ser de grande utilidade como um modelo experimental. A DAC é um fenômeno reversível e tem sido registrado em inúmeras espécies de vertebrados (BURES et al., 1974; Guedes et al., 2005), inclusive no homem (MAYEVSKY et al., 1996; FABRICIUS et al, 2008). Ela parece estar envolvida na fisiopatologia de importantes doenças neurológicas, tais como a enxaqueca com aura, a epilepsia e a isquemia cerebral (LEÃO, 1944; LEHMENKÜHLER et al., 1993;

GUEDES e CAVALHEIRO, 1997; DREIER et al., 2009). Adicionalmente, sabendo que seus mecanismos ainda não se encontram completamente esclarecidos, estudos que envolvem o fenômeno poderiam contribuir para elucidá-los.

O registro eletrofisiológico da DAC é um instrumento valioso para os estudos sobre aspectos da nutrição que podem influenciar o funcionamento do sistema nervoso. Sabe-se que condições clinicamente relevantes para o ser humano, representadas por variáveis nutricionais e metabólicas, associadas ou não a outras variáveis de natureza ambiental, hormonal e farmacológica, são capazes de afetar o desenvolvimento e/ou as funções cerebrais. Essas condições podem também modificar a capacidade do cérebro em produzir e propagar a DAC (GUEDES, 2011).

Nesse sentido, parece ser de grande relevância investigar o impacto do aspartame sobre a atividade elétrica do sistema nervoso, especialmente através do fenômeno da DAC, pois é sabido que fatores dietéticos podem afetar de forma considerável esse fenômeno (ROCHA-DE-MELO et al., 2006). Diversos estudos têm sido realizados com condições de interesse clínico que facilitam ou dificultam a propagação da DAC, tais como desnutrição (ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997; Guedes, 2011), hiper- e hipoglicemia (COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001), envelhecimento (GUEDES; AMORIM; TEODÓSIO, 1996), entre outras. No entanto, nenhuma informação está disponível na literatura acerca de efeitos dos edulcorantes artificiais sobre a DAC. Assim, o presente trabalho destinou-se a estudar esse tema de interesse mundial.

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 80 ratos albinos, machos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Esses animais foram mantidos sob condições padrão do biotério, em sala à temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$, submetidos a um ciclo artificial claro-escuro de 12/12 horas (o escuro iniciando-se às dezenove horas), com livre acesso à água e comida.

Para as determinações experimentais, os ratos foram distribuídos aleatoriamente, vinte e quatro horas após o parto (primeiro dia de vida, considerando-se o dia de nascimento como dia zero); os filhotes de várias mães foram reunidos e aleatoriamente distribuídos para constituir os dois seguintes grupos, nutricionalmente distintos, por conta das duas diferentes condições de aleitamento descritas a seguir.

3.2 Condições de aleitamento

Conforme a técnica de manipulação do tamanho das ninhadas (DE LUCA; CIOFFI; BURES, 1977; LIMA et al., 2016), os animais foram divididos, em dois grupos, denominados N_9 e N_{15} , conforme o tamanho da ninhada:

-Grupo N_9 ($n=40$): Ninhadas formadas por 9 filhotes, amamentados por uma mesma rata lactante.

-Grupo N_{15} ($n=40$): Ninhadas formadas por 15 filhotes, amamentados por uma mesma rata lactante.

3.3 Tratamento por gavagem

Para o tratamento por gavagem, o aspartame (Asp) foi dissolvido em água (VENCES-MEJÍA et al, 2006). Os 80 filhotes machos deste estudo (sendo 40 N_9 e 40 N_{15}) foram subdivididos em oito grupos ($n=10$ em cada grupo), de acordo com o tratamento a que foram submetidos. Todos esses

grupos estão apresentados na Figura 1. Em cada uma das duas condições de aleitamento, os animais foram subdivididos em quatro grupos, dos quais três receberam tratamento por gavagem. A descrição dos quatro grupos vem a seguir:

- Grupos “ingênuo”, isto é, que não recebeu qualquer gavagem; foi usado para controle de eventuais efeitos do estresse representado pelas introduções diárias da sonda de gavagem no estômago (grupos N9-I e N15-I).

- Grupo veículo, tratado por gavagem com o veículo (água) usado para dissolver o aspartame – os animais receberam gavagem apenas com água do 7º ao 28º dia de vida pós-natal. Esse grupo serviu como controle para o tratamento com aspartame;

- Grupo ASP75, tratado, por gavagem, com 75 mg/kg/dia de aspartame do 7º ao 28º dia de vida pós-natal.

- Grupo ASP125, tratado, por gavagem, com 125 mg/kg/dia de aspartame do 7º ao 28º dia de vida pós-natal.

As duas doses de aspartame utilizadas neste estudo foram as mesmas usadas por Vences-Mejía et al. (2006). Essas doses são nominalmente maiores do que aquelas encontradas no consumo humano devido ao fato de que o rato metaboliza o aspartame mais rapidamente que o homem. Por essa razão, comparações de doses entre essas espécies têm sido geralmente corrigida por um fator de cinco (FERNSTROM, 1989).

Após o desmame (21 dias) os filhotes passaram a receber a dieta materna (Purina Ltda, com 23% de proteína) até o dia do registro da DAC (96-115 dias).

A Figura 1, abaixo, ilustra o delineamento experimental do estudo.

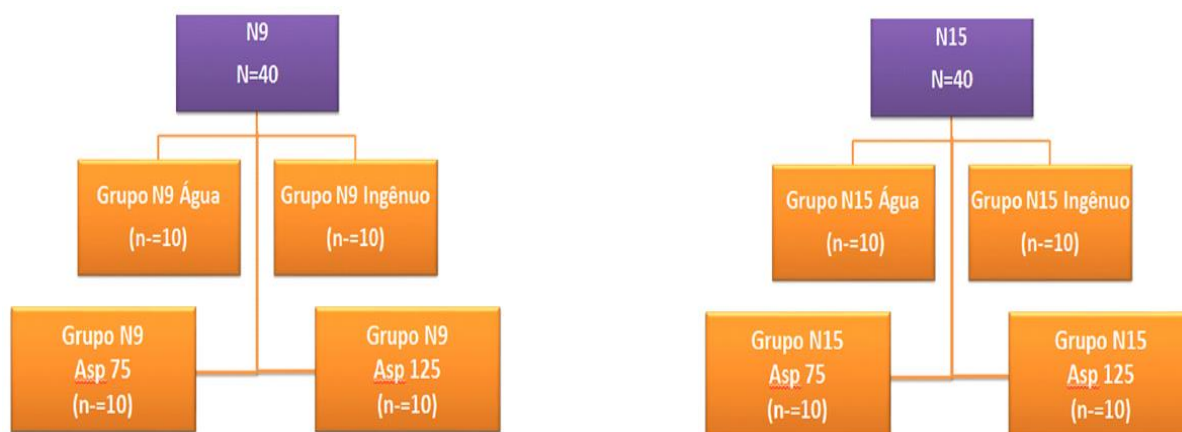


Figura 1. Delineamento experimental. O n equivale ao número de animais. N9 e N15 são os grupos nutricionalmente distintos, amamentados respectivamente em ninhadas com 9 e 15 filhotes.

3.4 Determinações ponderais

O peso corporal foi obtido aos 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias de vida em todos os grupos. Os pesos foram obtidos em balança eletrônica (Marte, Mod.54.000, com sensibilidade até 0,1g).

3.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Entre 85-90 dias de vida, os animais foram submetidos ao teste do LCE em uma sala com redução de luminosidade e atenuação de ruídos. O LCE consiste em um aparato de madeira em forma de cruz e com quatro braços (49x10cm cada), elevado a 55 cm do solo. Dois dos braços eram abertos e outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, eram fechados por paredes laterais de 50 cm de altura. Os braços eram unidos por uma plataforma central de 10x10cm. No início do teste, cada animal foi colocado individualmente na área central do labirinto, com a cabeça direcionada para um dos braços abertos, podendo explorar livremente o equipamento durante 5 min. Os testes foram registrados por uma câmera de vídeo digital localizada verticalmente acima do LCE e conectada a um computador, onde os vídeos foram armazenados. Entre um teste e outro, o aparato foi limpo com papel toalha embebido em álcool etílico a 70%. Os vídeos dos testes foram analisados através do software AnyMaze (version 4.99 m). Foram quantificados os seguintes parâmetros: número de entradas no

braço aberto, o tempo de permanência no braço aberto (s) e o número de bolos fecais expelidos pelo animal durante os 5 minutos do teste.

3.6 Aparelho de campo aberto

Os animais (90-95 dias de vida) foram testados no aparelho de campo aberto. O aparato consiste em uma arena circular com 100 cm de diâmetro e paredes com 52 cm de altura, localizado em uma sala com redução de luminosidade e atenuação de ruídos. No início do teste, o animal foi posicionado no centro do aparato, e seu comportamento foi registrado durante 5 min por uma câmera digital localizada verticalmente acima do campo aberto. Após cada teste, o aparelho era limpo com papel toalha e etanol a 70%. A análise dos dados foi realizada pelo software ANYmaze (version 4.99m), que quantificou o número de entradas na zona central do aparato, o tempo gasto (s) na zona central, a distância total percorrida (m) e o número de bolos fecais expelidos pelo animal durante os 5 minutos do teste.

3.7 Registro da depressão alastrante cortical

No dia do registro (96-115 dias de idade), os animais foram anestesiados com solução de Uretana a 10% e Cloralose a 0,4% na dose de 10 ml/Kg de peso corporal (1 g/Kg de Uretana + 40 mg/kg de cloralose) por via intraperitoneal. Foram trepanados 3 orifícios no lado direito do crânio. O primeiro orifício de 2-3 mm de diâmetro, na região frontal, foi utilizado para a estimulação com KCl, necessária à deflagração da DAC. Os outros dois orifícios, de 3-4 mm de diâmetro, na região parietal, foram destinados à colocação de dois eletrodos através dos quais se realizou o registro eletrofisiológico.

A cada 20 minutos, a DAC foi desencadeada por estimulação química: uma pelota de algodão (com 1-2 mm de diâmetro), embebida em solução de KCl a 2%, foi colocada em contato com a superfície cortical, através do orifício de estimulação, durante um minuto. Após esse tempo, o estímulo

químico foi retirado e a região enxugada com algodão a fim de remover o excesso de KCl. Essa estimulação, realizada na região frontal, provoca usualmente uma única “onda” de DAC que, ao se propagar, foi registrada pelos eletrodos colocados na região parietal. A variação lenta de voltagem (VLV) que acompanha a DAC foi registrada continuamente por um período de 4 horas. Os dois eletrodos utilizados para o registro e o eletrodo de referência comum (localizado no osso nasal) foram do tipo “prata-cloreto de prata” (ABADIE-GUEDES et al., 2008). Esses eletrodos consistiram de pipetas plásticas cônicas (5 cm de comprimento, 0,5 mm de diâmetro interno na ponta e 4 mm de diâmetro na abertura superior), preenchidas com solução de Ringer solidificada com 0,5% de agar. Um fio de prata recoberto por uma camada de AgCl foi introduzido em cada eletrodo e estabelecia o contato com o sistema de registro (ver abaixo). Um par de pipetas plásticas foi colado com cola de cianoacrilato, de modo que a distância entre os eletrodos foi mantida constante. O par de eletrodos foi fixado à haste seguradora de eletrodos do aparelho estereotáxico. Esta haste é acionada pelo giro de um parafuso de forma que as pontas dos eletrodos podiam ser posicionadas suavemente sobre a superfície cerebral, sem qualquer pressão excessiva sobre o tecido cortical.

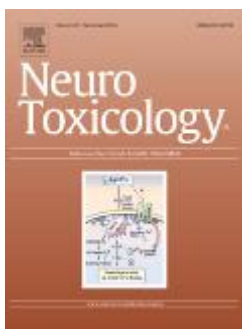
Os registros foram realizados em um sistema digital (EMG systems do Brasil Ltda), que permite o registro em computador. A velocidade de propagação da DAC foi calculada dividindo-se a distância entre os dois pontos corticais de registro (distância fixa para cada experimento) pelo tempo necessário para que a onda da DAC percorra essa distância.

3.8 Análise Estatística

Com a utilização do programa estatístico ‘Sigmastat’®, foi empregada a análise de variância (ANOVA) para a comparação dos dados eletrofisiológicos e, quando indicado, foi realizado um pós-teste (Holm-Sidak). Em todos os casos, o nível de significância considerado para rejeição da hipótese nula foi de 5%.

4 Behavioral and electrophysiological evidence of aspartame effects on the developing rat brain: an anxiety-like and spreading depression analysis

Artigo submetido para publicação na Revista Neurotoxicology



TITLE: Behavioral and electrophysiological evidence of aspartame effects on the developing rat brain: an analysis of anxiety-like behavior and cortical spreading depression

AUTHORS:

Paula Catirina Germano Magalhães¹, Ricardo Abadie-Guedes², Manoel Augusto Barbosa da Costa Mendonça¹, Aline Duarte de Souza¹, Rubem Carlos Araújo Guedes^{1, CA}

AFFILIATION:

¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife PE, Brazil.

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife PE, Brazil.

^{CA}Corresponding author. ¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife PE, Brazil.

Telephone: + 55-81-2126-8936; Fax: + 55-81-2126-8473;

e-Mail: guedes.rca@gmail.com

Words count: 4,751

Number of figures: 5

Number of tables: 1

Abstract

The non-caloric sweetener aspartame can be potentially harmful to the developing brain, as some studies suggest an association between aspartame intake and adverse neural effects. This study aimed to evaluate the possible effects of aspartame, with or without associated nutritional deficiency, on behavioral parameters suggestive of anxiety and electrophysiological features of the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD). Newborn Wistar rats ($n = 80$) were suckled under favorable (L_9) or unfavorable lactation conditions (L_{15}), consisting of litters with 9 or 15 pups, respectively. In each lactation condition, animals were divided into 4 groups that received per gavage, from postnatal day 8 to 28, 75 mg/kg/d or 125 mg/kg/d aspartame (groups ASP75 and ASP125), or equivalent volume of water (vehicle group), or no treatment (naive group). Behavioral tests (elevated plus-maze [EPM] and open field [OF]) were performed at postnatal days 86-95 and CSD was recorded between postnatal days 96-115. Compared to the control groups, aspartame dose-dependently reduced body weight, suggesting a negative impact on animal development; aspartame also caused behavioral changes suggestive of anxiety (shorter stay in the open arms in the EPM) and decelerated CSD (lower propagation speed). Some of these parameters were more affected in L_{15} animals, suggesting an interaction among aspartame and lactation condition. We concluded that early consumption of aspartame adversely affects development of the organism, with actions on behavioral (anxiety-like) and cerebral electrophysiological (CSD) parameters. The data suggest caution in aspartame consumption by lactating mothers and their infants.

Key words: Aspartame; Anxiety behavior; Brain excitability; Lactation conditions; Nervous system; Spreading depression

Introduction

The artificial sweetener aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) has been used in food products as an alternative to sugar. The quantity of aspartame needed to produce a sweet taste is much lower than that of sucrose, as aspartame is approximately 200 times sweeter. Aspartame was first approved for use in dry goods and soft drinks in the 1980's by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), followed by approval as a general sweetener in 1996 (FDA, 1996; Schernhammer et al., 2012). Currently, the sweetener can be found in more than six thousand products including soft drinks, powdered drinks, chewing gums, gelatins, dessert mixes, puddings and fillings, frozen desserts, yogurt, tabletop sweeteners, and some pharmaceutical products such as vitamins and cough tablets (Aspartame Information Center, 2005). The use of aspartame has been associated with various neurological disturbances such as those involved in Parkinson's disease (Bergstrom et al., 2007), panic attacks (Drake, 1986), memory impairment (Christian et al., 2004) and brain-excitability-related diseases, such as migraines (Blumenthal and Vance, 1997; Edelstein and Mauskop, 2009) and convulsions (Walton, 1986; Camfield et al., 1992; Tollefson and Barnard, 1992; Eshel and Sarova-Pinhas, 1993; Gaby, 2007; Mortelmans et al., 2008). When administered intraperitoneally in a single dose of 500 mg/kg for rats and orally 100 mg/kg for humans, aspartame reduces extracellular dopamine levels, a condition that is associated with Parkinson's disease and schizophrenia (Bergstrom et al., 2007). In view of these findings, some researchers criticize the consumption of aspartame by developing organisms (Araujo et al., 2014; von Poser Toigo et al., 2015; Paolini et al., 2016). In animals, aspartame influences behavioral responses such as learning behavior (Potts and Bloss, 1980) and anxiety-like responses (Ashok et al., 2015), although some conflicting results are in the literature (Ashok et al., 2014). In rats, the developing brain is substantially vulnerable to external challenges such as nutritional deficiency and pharmacological agents (Amaral et al., 2009).

Malnutrition affects a considerable portion of the low-income world population that has no access to food in the quantity and quality adequate for the growth and development of physiological systems

(see Morgane et al., 1993 for a review). The effects of aspartame on the developing brain, however, have not been well investigated in terms of electrophysiological aspects. Here we addressed this issue using the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD).

Cortical spreading depression is a neuronal depolarization response that can be elicited via electrical, mechanical or chemical stimulation of one point of the cortical tissue (Leão, 1944). Cortical spreading depression has been demonstrated in various species of mammals, including the human species (Mayevsky et al., 1996; Fabricius et al., 2008). The cortical tissue usually resists the propagation of CSD, and certain experimental treatments can either increase or decrease such tissue resistance, which results respectively in CSD deceleration and acceleration (Guedes and do Carmo, 1980; Guedes, 2011). Therefore, measuring CSD velocity of propagation along the cortex of experimental animals is an easy and useful way to evaluate the brain's susceptibility to CSD. This parameter may help us understand brain excitability-dependent physiological phenomena, as well as neurological diseases related to brain excitability, such as migraines and epilepsy (Guedes and Cavaleiro, 1997; Guedes, 2011).

In this study, we analyzed the possible influence of neonatal treatment with aspartame on anxiety-like behavior in rats by evaluating behavioral reactions in the elevated plus-maze and open field tests; in addition, we analyzed cortical excitability by investigating how aspartame affects CSD parameters (velocity of propagation, amplitude and duration of the negative slow potential shift).

Materials and methods

Animals and Experimental Groups

Experimental procedures were approved by the institutional Ethics Committee for Animal Research of our university (approval protocol no. 23076014638/2013-72), in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Newborn Wistar rats of both

sexes, born from distinct dams, were pooled and assigned to be suckled under normal or unfavorable conditions according to litter size. Litter size was nine pups (L9 groups) for normal conditions and 15 pups (L15 groups) for unfavorable conditions. Weaning occurred on postnatal day 21. Weaned pups were separated by sex and housed in polypropylene cages (51 cm × 35.5 cm × 18.5 cm; three rats per cage) under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h light:12-h dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). They had free access to water and the same commercial lab chow, with 23% protein, that was offered to their dams (Purina Ltd.). In this study, we analyzed data from male pups only: 37 L9 and 39 L15 rats originated from eight and seven litters, respectively. The animals were weighed on days 7, 14, 21, 25 and on the day of the CSD recording (96–115 days of life).

Gavage treatment

Each litter group was divided into 4 sub-groups, three of which were treated by gavage with either 75 mg/kg/day of aspartame, 125 mg/kg/day of aspartame (Sigma, St Louis, USA; groups Asp75 and Asp125, respectively), or vehicle (water; group W). The fourth group was not treated (naïve; group Nv). In every litter, some of the pups were assigned to the aspartame gavage groups (75 or 125 mg/kg/day), whereas other litter-mates were assigned to the vehicle and naïve groups. The gavage procedure (modified from Francisco and Guedes, 2015) was carried out daily, from postnatal day 8 to 28, between 7 – 9 a.m.

Elevated plus- maze test

The elevated plus-maze is frequently used for evaluating risk assessment and anxiety behavior (Wall and Messier, 2001). The cross-shaped elevated plus-maze apparatus consisted of four arms (two closed arms and two open arms), each measuring 49 cm long × 10 cm wide, raised 55 cm above the floor. A central squared platform (10 × 10 cm wide) connected the open and closed arms. When the rats were

86-90 days old, they were individually placed onto the central platform facing one of the open arms and were observed for 5 min while they freely explored the maze. A video camera recorded behavioral activity. Recordings were stored in a computer and subsequently analyzed with the software ANYmaze™ (version 4.99 m). The animal was considered to have entered one arm when its four limbs were inside the arm. The time spent in open arms, number of entries in open arms and number of fecal boluses expelled by the animal were measured during the 5-min test period. After each test, we cleaned the apparatus with a 70:30 ethanol:water solution.

Open field test

The open field apparatus consisted of a circular arena (100 cm diameter) with a 52-cm-high circular wall, located in a room with a dim light and sound-attenuation. When the rats were 91-95 days old, they were individually positioned in the center of the arena and their movements were captured using a digital video camera for 5 min. After each test, the open field was wiped with a paper cloth soaked with 70% ethanol. Recordings were stored in a computer and subsequently analyzed with the software ANYmaze™ (version 4.99 m). The following parameters were measured: total distance traveled, number of entries in the central zone, time spent in the central zone and number of fecal boluses expelled by the animal during the 5-min test period.

CSD recording

On postnatal days 96-115, each animal was anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of 1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, and three trephine holes were drilled in the right side of the skull. This anesthetic mixture has been routinely used in our laboratory because in the rat it provides a very stable and long-lasting anesthesia, which is very convenient for CSD recording in acute experiments (in which the recovery of the animal from anesthesia is not required). Furthermore,

this anesthetic mixture does not block CSD, in contrast to other anesthetic agents, such as ketamine (Hernández-Cáceres et al., 1987). The trephine holes were aligned in the frontal-to-occipital direction and parallel to the midline. One hole (2-3 mm diameter) was positioned on the frontal bone and was used to apply the stimulus (KCl) to elicit CSD. The other two holes (3-4 mm in diameter) were drilled in the parietal bone and were used to record the CSD propagating wave. Rectal temperature was continuously monitored and remained at 37 ± 1 °C. CSD was elicited at 20-min intervals by 1 min application of a cotton ball (1–2 mm in diameter) soaked with 2% KCl solution (approximately 270 mM) to the anterior hole. The direct current (DC) slow potential change accompanying CSD was recorded for 4 hours using two Ag–AgCl agar–Ringer electrodes (one in each hole) against a common reference electrode of the same type, placed on the nasal bones. Velocity of propagation was calculated from the time required for a CSD wave to pass the distance between the two cortical electrodes. We used the initial point of each DC-negative rising phase as the reference point to calculate the CSD velocities. In addition, we calculated amplitude and duration of the CSD waves, as previously reported (Francisco and Guedes, 2015).

Statistics

The data were compared between groups by using a two-way analysis of variance (ANOVA), including as factors lactation conditions (L9 and L15) and gavage treatment (naïve, water, Asp75 and Asp125) followed by a post hoc test (Holm-Sidak), where indicated. We considered P values less than 0.05 as significant.

Results

Body weight

Figure 1 shows body weight at different time points, as described in materials and methods. L15 animals displayed lower body weights than the L9 groups ($p < 0.05$). In the L9 animals, aspartame treatment reduced body weight in comparison to the control groups ($P < 0.05$). On postnatal days 14 and 25, the Asp-125 L9 group presented with significantly lower body weight compared to the Asp-75 L9 group ($P < 0.05$).

Please insert Fig. 1 about here

Elevated plus - maze test

In the L9 rats, the mean $\pm$ SD time spent in the open arms (as percentage of the total duration of the test; Fig. 2A) was $27.85 \pm 4.51\%$, $29.44 \pm 5.29\%$, $18.40 \pm 6.30\%$ and $14.78 \pm 2.74\%$ for the naïve, water-treated, ASP75 and ASP125 groups, respectively. In the L15 rats the values were respectively $9.77 \pm 3.86\%$, $11.72 \pm 3.68\%$, $8.31 \pm 1.43\%$ and $10.50 \pm 6.45\%$. An ANOVA indicated a significant reduction in the values of the L9 aspartame-treated groups compared to the L9 naïve and water controls ($F[3, 60] = 10.599$; $p < 0.001$). In the L15 condition, no intergroup difference in the percentage of time spent in the open arms was observed ($p > 0.05$). The L9 versus L15 comparison revealed that the L15 naïve, water and ASP75 groups remained in the open arms for shorter times than the corresponding L9 groups ($p < 0.05$).

The number of entries in the open arms (Fig. 2B) was also reduced ($p < 0.05$) in the L9 ASP75 and ASP125 (which entered 3.50 ± 0.93 and 2.67 ± 1.63 times, respectively) in comparison with the L9 naïve and water controls (which entered 7.60 ± 3.21 and 8.63 ± 3.14 times, respectively). In the L15 condition, no intergroup difference was observed ($p > 0.05$). Compared with the respective L9 groups, the L15 ASP75 and ASP125 groups displayed a higher number of entries in the open arms (5.57 ± 0.98

and 6.00 ± 1.41 , respectively), while the L15 naïve and water groups entered a reduced number of times in the open arms (5.14 ± 1.46 and 6.25 ± 1.04 , respectively) ($p < 0.05$).

During the 5-min observation, the L9 ASP75 and ASP125 animals expelled a greater number of fecal boluses (3.22 ± 0.83 and 3.33 ± 0.50 , respectively) than the L9 naïve and water controls (respectively 1.22 ± 0.67 and 1.29 ± 0.49) ($p < 0.05$). In the L15 condition, no intergroup difference was observed ($p > 0.05$). The L9 versus L15 comparison revealed that the L15 ASP75 and ASP125 groups expelled fewer fecal boluses (respectively 2.43 ± 0.53 and 2.50 ± 0.55) than the corresponding L9 groups ($p < 0.05$). The L15 animals that had been treated with aspartame expelled a lower number of fecal boluses than the corresponding L9 groups. These results are in Fig. 2C.

Please insert Fig. 2 about here

Open field test

In the open field (Fig. 3), aspartame-treated animals of both L9 and L15 groups traveled a shorter distance, spent more time in the center and expelled a higher number of fecal boluses in comparison with the corresponding controls. The mean $\pm$ SD features for L9 animals were as follows: time percentage spent in the center of the open field in the Asp75 group, $8.46 \pm 1.38\%$; Asp125 group, $9.22 \pm 1.83\%$; water, $3.14 \pm 1.49\%$; naïve, $4.04 \pm 3.11\%$; for the L15 animals, Asp75, $11.19 \pm 1.66\%$; Asp125, $11.03 \pm 0.68\%$; water, $5.03 \pm 1.54\%$; naïve, $4.33 \pm 2.70\%$. The traveled distance was: for the L9 groups, Asp75, 9.67 ± 2.49 m; Asp125, 8.52 ± 1.34 m; water, 13.69 ± 2.08 m; naïve, 13.73 ± 2.82 m; for the L15 animals, Asp75, 9.14 ± 2.64 m; Asp125, 7.62 ± 0.91 m; water, 23.07 ± 4.12 m; naïve, 23.35 ± 4.34 m. The number of fecal boluses was: for the L9 group, Asp75, 2.30 ± 0.67 ; Asp125, 2.78 ± 0.67 ; water, 1.33 ± 0.71 ; naïve, 1.22 ± 0.67 ; for the L15 animals, Asp75, 2.89 ± 0.78 ; Asp125, 3.22 ± 0.67 ; water, 1.78 ± 0.67 ; naïve, 1.67 ± 0.50 .

Please insert Fig. 3 about here

CSD features

In all groups, topical application of 2% KCl for 1 min at the frontal cortex (on a circular area with 2–3 mm diameter) reproducibly elicited a single CSD wave, which was recorded by the two electrodes, located 5–12 mm posteriorly, at the parieto-occipital region, in the stimulated hemisphere. At the end of the recording session, visual exploration of meninges at the KCl application point revealed only minor signs of hyperemia. Figure 4 depicts electrophysiological recordings showing the slow potential change accompanying CSD on the cortical surface of four L9 and four L15 animals. The slow potential recordings confirmed the presence of CSD after each KCl-stimulation.

Please insert Fig. 4 about here

In the L9 rats, the mean $\pm$ SD CSD velocities (in mm/min) were 3.27 ± 0.19 and 3.31 ± 0.07 for the water and naive groups, respectively, and 3.16 ± 0.14 and 2.87 ± 0.12 for the 75 mg/kg/day and 125 mg/kg/day Aspartame-treated groups. In the L15 rats, the mean $\pm$ SD CSD-velocities (in mm/min) were 4.35 ± 0.14 and 4.34 ± 0.10 for the water and naive groups, respectively, and 4.04 ± 0.10 and 3.76 ± 0.11 for the 75 mg/kg/day and 125 mg/kg/day aspartame-treated groups. The data for all groups are presented in Figure 5.

The CSD effect of Aspartame was dose-dependent and was modified by the nutritional status of the animals (L15 > L9). In the L9 condition, only the aspartame dose of 125 mg/kg significantly reduced the velocity of propagation of CSD when compared to the control groups ($P < 0.05$). In the L15 condition, however, both doses of Aspartame (75 mg/kg/day and 125 mg/kg/day) reduced the CSD velocities significantly in comparison with the L15 controls (Fig. 5).

Please insert Fig. 5 about here

Amplitude and duration of CSD waves

Table 1 shows amplitude and duration of the negative slow potential change, which is the hallmark of CSD. The mean amplitude varied from 7.1 ± 1.9 mV to 10.3 ± 2.6 mV in the L9 groups and from 10.0 ± 1.9 mV to 13.4 ± 2.9 mV in the L15 groups (Table 1). The mean duration varied from 49.8 ± 4.8 s to 65.30 ± 5.1 s in the L9 groups and from 45.0 ± 3.4 s to 63.9 ± 3.6 s in the L15 groups. An ANOVA revealed that aspartame treatment was associated with lower amplitude and longer duration in comparison with the respective controls. An ANOVA also indicated higher CSD amplitudes and shorter durations in L15, in comparison with L9 rats.

Table 1 - Amplitude and duration of the negative slow potential change of cortical spreading depression in adult rats (96–115 days) in different experimental groups.

Treatment groups	Amplitude (mV)		Duration (s)	
	L9	L15	L9	L15

Nv	10.2 ± 2.1 (9)	13.3 ± 2.7 (9)+	49.8 ± 4.8 (9)	45.3 ± 2.0 (10)+
W	10.3 ± 2.6 (10)	13.4 ± 2.9 (10)+	51.0 ± 4.7 (9)	45.0 ± 3.4 (10)+
ASP 75	10.1 ± 2.4 (9)	11.0 ± 1.8 (8)	59.0 ± 4.2 (9) ***	56.2 ± 1.8 (8)***
ASP 125	7.1 ± 1.9 (10) ***	10.0 ± 1.9 (8)**+	65.3 ± 5.1 (10)***	63.9 ± 3.6 (10)***

Treatments were per gavage

L₉ and L₁₅ are groups previously suckled under normal or unfavorable lactation conditions (respectively, in litters with 9 and 15 pups). Data are expressed as the mean ± standard deviation, with the number of animals in parentheses. + significant intergroup difference (L₁₅ different from L₉). ** significantly different from the two control groups in the same lactation condition. *** significantly different from the two controls and from the Asp75 group ($p < 0.05$, ANOVA plus Holm-Sidak test).

Discussion

In this experiment, we explored the behavioral and electrophysiological effects that were associated with a 21-day administration of two distinct doses of aspartame in developing rats. By testing rats in the elevated plus-maze and open field apparatus we characterized behavioral responses suggestive of increased anxiety. By recording CSD propagation in anesthetized animals, we demonstrated a CSD decelerating effect of aspartame that is suggestive of excitability changes in the cerebral cortex. To the best of our knowledge, these findings, observed in developing animals, have not been reported before. Reports in the literature on the effect of aspartame on body weight are rather conflicting, with some authors describing aspartame-associated increases in weight gain, while others report reduced weight gain in relation to controls (von Poser Toigo et al., 2014). Our data indicate that the consumption of aspartame early in life reduced body weight gain in developing rats compared with control groups (Fig 1). This could be the consequence of reduced milk ingestion by the aspartame-treated rats, as aspartame may interfere with metabolism (Araujo et al., 2014), liver function and appetite of animals, increasing satiety and thus reducing food intake (Alkafafy et al., 2015). Regarding discrepancies

between studies, these may be due to methodological factors such as distinct aspartame doses, different methods of drug administration, varied animal species and distinct periods of treatment over different phases of life (Beck et al., 2002).

In the elevated plus-maze paradigm, a decrease in open arm entries indicates enhanced anxiety of the animal (Ari et al., 2016; Zhao et al., 2016). Increased emotional activity and fear result in increased defecation as a consequence of activation of parasympathetic activity (Sanberg et al., 2001). In the present study, data from the elevated plus maze test revealed more anxious behavior in the L9, but not L15 groups that were treated with aspartame, as indicated by the shorter permanence in the open arms, and higher number of expelled fecal boluses (Fig. 2). Accordingly, in the open field test (Fig. 3) we observed that aspartame-treated groups traveled a smaller distance and expelled a higher number of fecal bolus. There is substantial evidence that high levels of fear and anxiety are indicated by fewer visits to the open arms and high defecation scores (Ashok et al., 2015). Therefore, it is reasonable to suggest that our aspartame-treated animals are experiencing more anxiety than the control groups. It is possible that aspartame (or resulting metabolites) acts at the central nervous system as an anxiogenic agent by activating N-methyl-D-aspartate (NMDA)-receptors, as recently suggested (Collison et al., 2016). An alternative interpretation of the behavioral findings could include aspartame-induced decrease of monoamine synthesis and imbalance of ionic concentration in the brain (Kristova et al., 1998; Abhilash et al., 2014). Further specific investigation is needed to test those possibilities.

Our group previously described the facilitating effects of nutritional deficiency on CSD propagation early in life in rats (Francisco and Guedes, 2015; Guedes, 2011). In the present study, the higher CSD velocity and amplitude, as well as the shorter duration, from the L₁₅ animals confirms the facilitating action of early malnutrition that was induced by suckling the pups in large litters. In addition, we were able to demonstrate, for the first time, that chronic aspartame administration early in life impairs CSD propagation later in adulthood (lower CSD velocity and amplitude, and longer duration). This novel, long-lasting neural action of aspartame is dose-dependent (Asp₁₂₅ > Asp₇₅) and is influenced by the lactation condition (L₁₅ > L₉; Fig 5). If this last observation could be shown to occur in the human

species, then the possibility would exist that a determined anti-migraine or an anti-epileptic drug could have different degrees of effectiveness, depending on previous nutritional status (Guedes et al., 1992). Regarding the underlying mechanisms that mediate the CSD effects of malnutrition, discussions frequently involve morphological changes in the brain that increase cell-packing density (Rocha-de-Melo et al., 2006), reduce the extracellular space (Mazel et al., 2002) and cortical myelination (Merkler et al., 2009) and impair glial function (Largo et al., 1977). Interestingly, all these factors facilitate CSD and, more importantly, CSD velocity is modulated dichotomously, with unfavorable lactation (L15 condition) accelerating CSD in comparison with normal lactation (L9 condition), and favorable lactation (suckling in litters with three pups only; Rocha-de-Melo et al., 2006) decelerating CSD.

Our CSD findings in the aspartame-treated animals can be explained by a number of mechanisms, the most plausible of which involves redox imbalance that occurs in the brain when aspartame is metabolized. Although in the present study we have not measured brain redox status, it is reasonable to suppose that daily administration of aspartame over 21 days might have produced some degree of redox imbalance. In fact, repeated aspartame administration to mice may cause impaired memory performance and enhanced brain oxidative stress as indicated by increased levels of malondialdehyde and nitric oxide, and decreased levels of reduced glutathione (Abdel-Salam et al., 2012). Interestingly, aspartame has been causally linked to migraine triggering via redox imbalance (Borkum, 2016) and CSD has long been postulated as being the physiological mechanism underlying migraines (Charles and Baca, 2013) and perhaps other headache disorders (Chen and Ayata, 2016). However, our data do not allow us to exclude the possible involvement of other mechanisms such as aspartame action on cellular elements (Rycerz and Jaworska-Adamu, 2013), neurotransmitters (Abhilash et al., 2014; Simintzi et al., 2007), or neurotransmitter receptors (Collison et al., 2016). In conclusion, our findings support the hypothesis of an anxiogenic action of aspartame on the brain of developing rats.

Additionally, this study describes a novel effect of aspartame on the excitability-related CSD phenomenon. Our CSD data allow us to draw four conclusions. First, aspartame administration early in

life decelerates CSD at adult age, suggesting a long-lasting action. Second, the aspartame effect on CSD is dose-dependent. Third, unfavorable lactation (suckling in large litters) accelerates CSD, which confirms previous reports. Fourth, an unfavorable lactation condition intensifies the aspartame effect on CSD, suggesting changes in the electrophysiological features of the brain. The data suggest caution in the aspartame consumption by lactating mothers and their infants.

Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq no. 445101/2014-8), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no.4191), and Capes (Edital 043/2013 Ciências Do Mar II and BEX 2036/15-0). RCA Guedes is Research Fellow from CNPq (No. 303636/2014-9).

References

1. Abdel-Salam, O. M. E., Salem, N. A., El-Shamarka, M. E. S., Hussein, J. S., Ahmed, N. A. S., El-Nagar, M. E. S., 2012. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice *Europ. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16, 2092-2101.
2. Abhilash, M., Alex, M., Mathews, V. V., Nair, R. H., 2014. Chronic Effect of Aspartame on Ionic Homeostasis and Monoamine Neurotransmitters in the Rat Brain. *Int. J. Toxicol.* 33, 332-341.
3. Abu-Taweela, G. M., Zyadah, M. A., Ajaremb, J. S., Ahmad. M., 2014. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 42, 60–67.
4. Alkafafy, M. S., Ibrahim, Z. S., Ahmed, M. M., El-Shazly S. A., 2015. Impact of aspartame and saccharin on the rat liver: biochemical, molecular, and histological approach. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 28, 247-255.
5. Amaral, A.P.B., Barbosa, M.S.S., Souza, V.C., Ramos, I.L.T., Guedes, R.C. ., 2009. Drug/nutrition interaction in the developing brain: Dipyrone enhances spreading depression in rats. *Exp. Neurol.* 219,492-498.
6. Araújo, J.R., Martela, F., Keating, E., 2014. Exposure to non-nutritive sweeteners during pregnancy and lactation: Impact in programming of metabolic diseases in the progeny later in life. *Reproductive Toxicol.* 49, 196-201.
7. Ari, C., Kovács, Z., Juhasz, G., Murdun, C., Goldhagen, C. R., Koutnik, A. M., Poff, A. M., Kesi, S. L., D'Agostino, D. P., 2016. Exogenous Ketone Supplements Reduce Anxiety-Related Behavior in Sprague-Dawley and Wistar Albino Glaxo/Rijswijk Rats. *Front. Mol. Neurosci.* 9:137. doi: 10.3389/fnmol.2016.00137. eCollection 2016.

8. Ashok, I., Wankhar, D., Wankhar, W., Sheeladevi, R., 2015. Neurobehavioral changes and activation of neurodegenerative apoptosis on long-term consumption of aspartame in the rat brain. *J. Nutr. Intermed. Metabol.* 2, 76-85.
9. Ashok, I., Sheeladevi, R., Wankhar, D., 2014. Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. *Biomed. Prev. Nutr.* 4, 39-43.
10. Aspartame Information Center, 2005. Products. Available in:
http://www.aspartame.org/aspartame_products.html.
11. 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, 967-974.
12. Blumenthal, H. J., Vance, D. A., 1997. Chewing gum headaches. *Headache.* 37, 665-666.
13. Borkum, J. M., 2016. Migraine Triggers and Oxidative Stress: A Narrative Review and Synthesis. *Headache.* 56, 12-35.
14. Camfield, P. R., Camfield, C. S., Dooley, J. M., Gordon, K., Jollymore, S., Weaver, D. F., 1992. Aspartame exacerbates EEG spike-wave discharge in children with generalized absence epilepsy. *Neurology.* 42, 1000-1003.
15. Charles, A. C., Baca, S. M., 2013. Cortical spreading depression and migraine *Nat. Rev. Neurol.* 9, 637-644.
16. Chen, S.-P., Ayata, C., 2016. Spreading Depression in Primary and Secondary Headache Disorders. *Curr. Pain Headache Rep.* 20, 44 DOI 10.1007/s11916-016-0574-8
17. Christian, B., Mcconnaughey, K., Bethea, E., Brantley, S., Coffey, A., Hammond, L., Harrell, S., Metcalf, K., Muehlenbein, D., Spruill, W., Brinson, L., Mcconnaughey, M., 2004. Chronic aspartame affects T-maze performance, brain cholinergic receptors and Na⁺, K⁺-ATPase in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 121-127.

18. Collison, K.S., Inglis, A., Shibin, S., Andres, B., Ubungen, R., Thiam, J., Mata, P., Al-Mohanna, F.A., 2016. Differential effects of early-life NMDA receptor antagonism on aspartame-impaired insulin tolerance and behavior. *Physiol. Behav.* 167, 209-221.
19. Coulombe, R.A., Sharma, R.P., 1986. Neuro biochemical alterations induced by the artificial sweetener aspartame (NutraSweet). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83, 79-85.
20. Drake, M. E., 1986. Panic attacks and excessive aspartame ingestion. *Lancet.* 328, 631. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)92456-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(86)92456-6)
21. Edelstein, C. S.; Mauskop A., 2009. Foods and Supplements in the Management of Migraine Headaches. *Clin. J. Pain.* 25, 446-452.
22. Eshel, Y., Sarova-Pinhas, I., 1993. Aspartame and seizures. *Neurology.* 43, 2154-2155.
23. Fabricius, M., Fuhr, S., Willumsen, L., Dreier, J. P., Bhatia, R., Boutelle, M. G., Hartings, J. A., Bullock, R., Strong, A. J., Lauritzen, M., 2008. Association of seizures with cortical spreading depression and periinfarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clin. Neurophysiol.* 119, 1973-1984.
24. FDA (Food and Drug Administration), 1996. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; aspartame. *Federal Register.* 61, 33654-33656.
25. Francisco, E.S., Guedes, R.C.A., 2015. Neonatal taurine and alanine modulate anxiety-like behavior and decelerate cortical spreading depression in rats previously suckled under different litter sizes. *Amino Acids.* 47, 2437-2445.
26. Gaby, A. R., 2007. Natural Approaches to Epilepsy. *Alternative Medicine Review.* 12, 9-24.
27. Guedes, R. C. A., 2011. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin (eds.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition.* 2343-2355. DOI 10.1007/978-0-387-92271-3_148.
28. Guedes, R. C. A., Cavalheiro, E. A., 1997. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epil. Res.* 27, 33-40.

29. Guedes, R. C. A., Do Carmo, R. J., 1980. Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Exp. Brain Res.* 39, 341-349.
30. Guedes, R. C. A.; Vasconcelos, C. A. C., 2008. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: A dose–response study. *Neuroscience Letters.* 442, 118-122.
31. Hernández-Cáceres, J., Macias-González, R., Brozek, G., Bures, J., 1987. Systemic ketamine blocks cortical spreading depression but does not delay the onset of terminal anoxic depolarization in rats. *Brain Res.* 437, 360-364.
32. Kristova, V., Kriska, M., Babal, P., Jezova, D., 1998. Early postnatal glutamate Treatment Results in altered Vascular Responsiveness to Serotonin and Noradrenalin in adult rats. *Endocr. Regul.* 32, 133-139.
33. LaBuda, C.J., Hale, R.L., 2000. Anxiety in mice following acute aspartame and ethanol exposure. *Alcohol.* 20, 69-74.
34. Largo, C., Ibarz, J. M., Herreras, O., 1997. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J. Neurophysiol.* 78, 295-307.
35. Leão, A.A.P, 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359-390.
36. Luo, D.D., An, S.C., Zhang, X., 2008. Involvement of hippocampal serotonin and neuro-peptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Res. Bull.* 77, 8-12.
37. Mayevsky, A., Doron, A., Manor, T., Meilin, S., Zarchin, N., Ouaknine, G. E., 1996. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res.* 740, 268-274.
38. Mazel, T., Richter, F., Vargová, L., Syková, E., 2002. Changes in extracellular space volume and geometry induced by cortical spreading depression in immature and adult rats. *Physiol. Res.* 51(Suppl 1), 85-93.

39. Merkler, D., Klinker, F., Jürgens, T., Glaser, R., Paulus, W., Brinkmann, B. G., Sereda, M. W., Stadelmann-Nessler, C., Guedes, R. C. A., Brück, W., Liebetanz, D., 2009. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann. Neurol.* 66, 355-365.
40. Morgane, p. j., Austin-laFrance, r., bronzino, j., tonkiss, j., diaz-Cintra, S., kemper, t., galler, J. r., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 91-128.
41. Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2, 2137-2230.
42. Mortelmans, L. J., Van, L. M., De Cauwer, H. G., Merlevede, K., 2008. Seizures and hyponatremia after excessive intake of diet coke. *Europ. J. Emergency Med.* 15, 51. doi: 10.1097/MEJ.0b013e3282703645.
43. Palmnäs, M. S. A., Cowan, T. E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R. A., Vogel, H. J., Hittel, D. S., Shearer, J., 2014. Low-Dose Aspartame Consumption Differentially Affects Gut Microbiota-Host Metabolic Interactions in the Diet-Induced Obese Rat. *Plos One.* 9, doi: 10.1371/journal.pone.0109841. eCollection 2014.
44. Paolini, M., Vivarelli, F., Sapone, A., Canistro, D., 2016. Aspartame, a bittersweet pill. *Carcinogenesis.* 1–2 doi:10.1093/carcin/bgw025.
45. Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Waas, T., Melchior, K., Ziska, T., 1999. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J. Neuroendocrinol.* 11, 541-546.
46. Potts, W. J., Bloss J. L., 1980. Nutting, Biological properties of aspartame: I. Evaluation of central nervous system effects, *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 3, 341-353.
47. Rogers, P. J., Pleming, H. C., Blundell, J. E., 1990. Aspartame Ingested Without Tasting Inhibits Hunger and Food Intake. *Physiol. Behav.* 47, 1239-1243.

48. Rycerz, K., Jaworska-Adamu, J.E., 2013. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathol.* 51, 10-17.
49. Sanberg, P.R., Newman, J.J.M.B., Manresa, S.E., Potts, F., Alvarez, D.W. Cahill, R.D. Shytle, 2001. Mecamylamine effects on haloperidol-induced catalepsy and defecation, *Int. J. Neurosci.* 109, 81-90.
50. Schernhammer, E. S., Bertrand, K. A., Birmann, B. M., Sampson, L., Willett, W. C., Feskanich, D., 2012. Consumption of artificial sweetener– and sugar-containing soda and risk of lymphoma and leukemia in men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 96,1419-1428.
51. Simintzi, I., Schulpis, K. H., Angelogianni, P., Liapi, C., Tsakiris, S., 2007. The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An in vitro study. *Food and Chem. Toxicol.* 45, 2397–2401.
52. Sun-Edelstein, C., Mauskop, A., 2009. Foods and supplements in the management of migraine headaches. *Clin. J. Pain.* 25, 446-52.
53. Tollefson, L., Barnard, R. J., 1992. An analysis of FDA passive surveillance reports of seizures associated with consumption of aspartame. *J. Amer. Diet. Assoc.* 92, 598-601.
54. Tordoff, M. G., Alleva, A. M., 1990. 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.
55. 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.
56. Wall, P. M., Messier, C., 2001. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 275-286.
57. Walton, R. G., 1986. Seizure and mania after high intake of aspartame. *Psychosomatics* 27, 218-220.

58. Wang, D., An, S.C., Zhang, X., 2008. Prevention of chronic stress-induced depression like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci. Lett.* 433, 59–66.
59. Zhao, T.T., Shin, K.S., Park, H.J., Yi, B. R., Lee, K. E., Lee, M. K., 2016. Effects of (–)-Sesamin on Chronic Stress-Induced Anxiety Disorders in Mice. *Neurochem. Res.* DOI 10.1007/s11064-016-2146-z

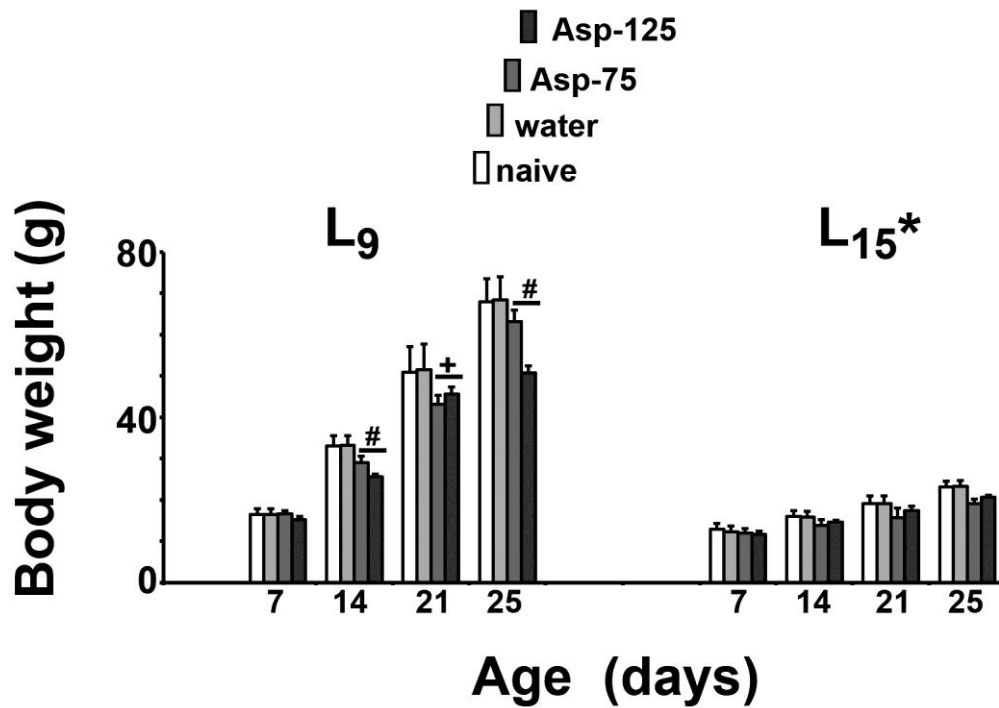


Figure 1- Body weight of L₉ and L₁₅ rats (suckled in litters formed by 9 and 15 pups, respectively). In both suckling conditions, four groups were studied: naïve (no gavage treatment), and water, Asp-75 and Asp-125 that received per gavage water, 75 mg/kg/d aspartame and 125 mg/kg/d aspartame, respectively, from postnatal day 8 to 28. Body weights were measured on days 7, 14, 21 and 25. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The asterisk indicates that all L₁₅ values are significantly lower than the corresponding L₉ controls. + = significantly different from the controls (naïve and water). # = significant intergroup differences, as follows: Asp-125 < Asp-75 < water = naïve ($P < 0.05$; ANOVA plus Holm-Sidak test).

ELEVATED PLUS-MAZE

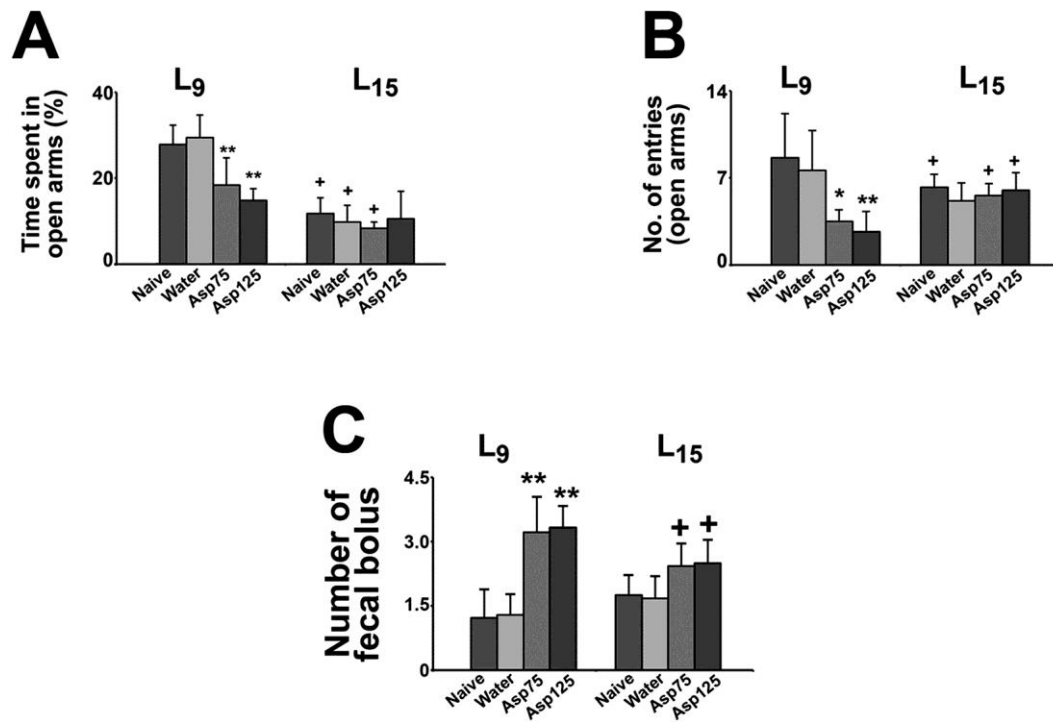


Figure 2- Behavioral activity (elevated plus maze) of adult rats that were previously suckled in litters with 9 and 15 pups (respectively L₉ and L₁₅ condition). In both suckling conditions, four groups were studied: naïve (no gavage treatment), and water, Asp-75 and Asp-125 that received per gavage water, 75 mg/kg/d Aspartame and 125 mg/kg/d Aspartame, respectively, from postnatal day 8 to 28. **A-** percentage of time spent in the open arms, **B-** number of open arm entries, **C-** number of fecal boluses. Data are expressed as the mean $\pm$ SD. * significantly different from the naïve group; ** significantly different from the naïve and water groups. + significantly different from the corresponding L₉ group. ($P < 0.05$; ANOVA plus Holm-Sidak test).

OPEN FIELD

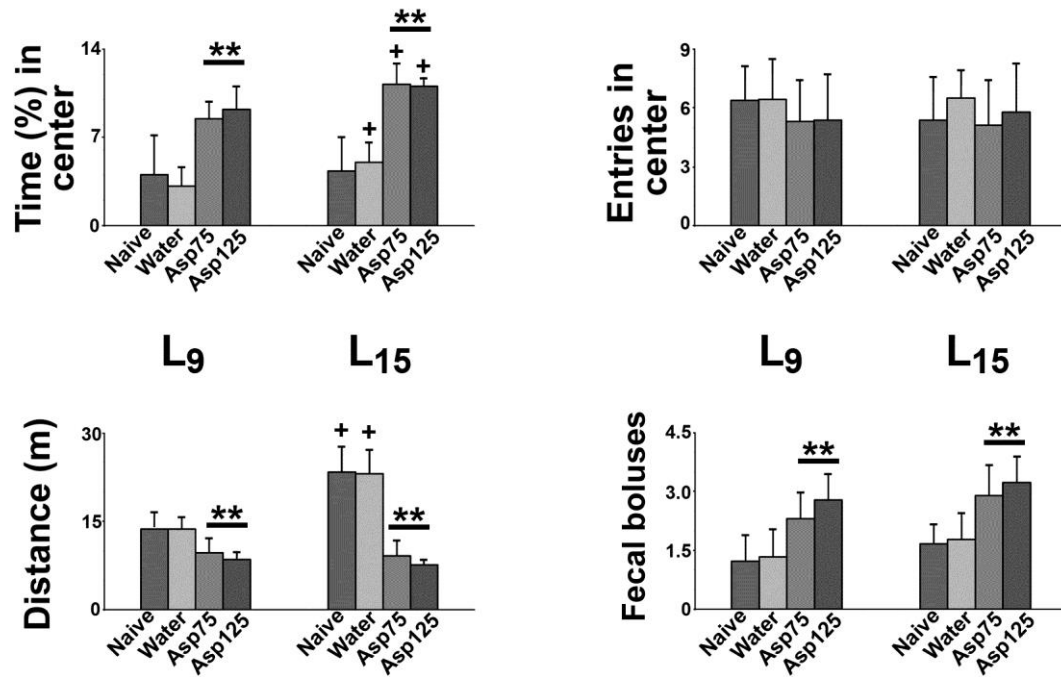


Figure 3- Behavioral responses (on Open field apparatus) of adult rats that were previously suckled in litters with 9 and 15 pups (respectively, L₉ and L₁₅ condition). Water, Asp 75 and Asp125 are rats treated per gavage from postnatal days 8–28 with water, or aspartame at the doses of 75 and 125 mg/kg/ day, respectively. Bars represent mean values $\pm$ standard deviation. ** significantly different from the naive and vehicle (water) groups. + significantly different from the respective L₉ group. ($P < 0.05$; ANOVA plus Holm-Sidak test).

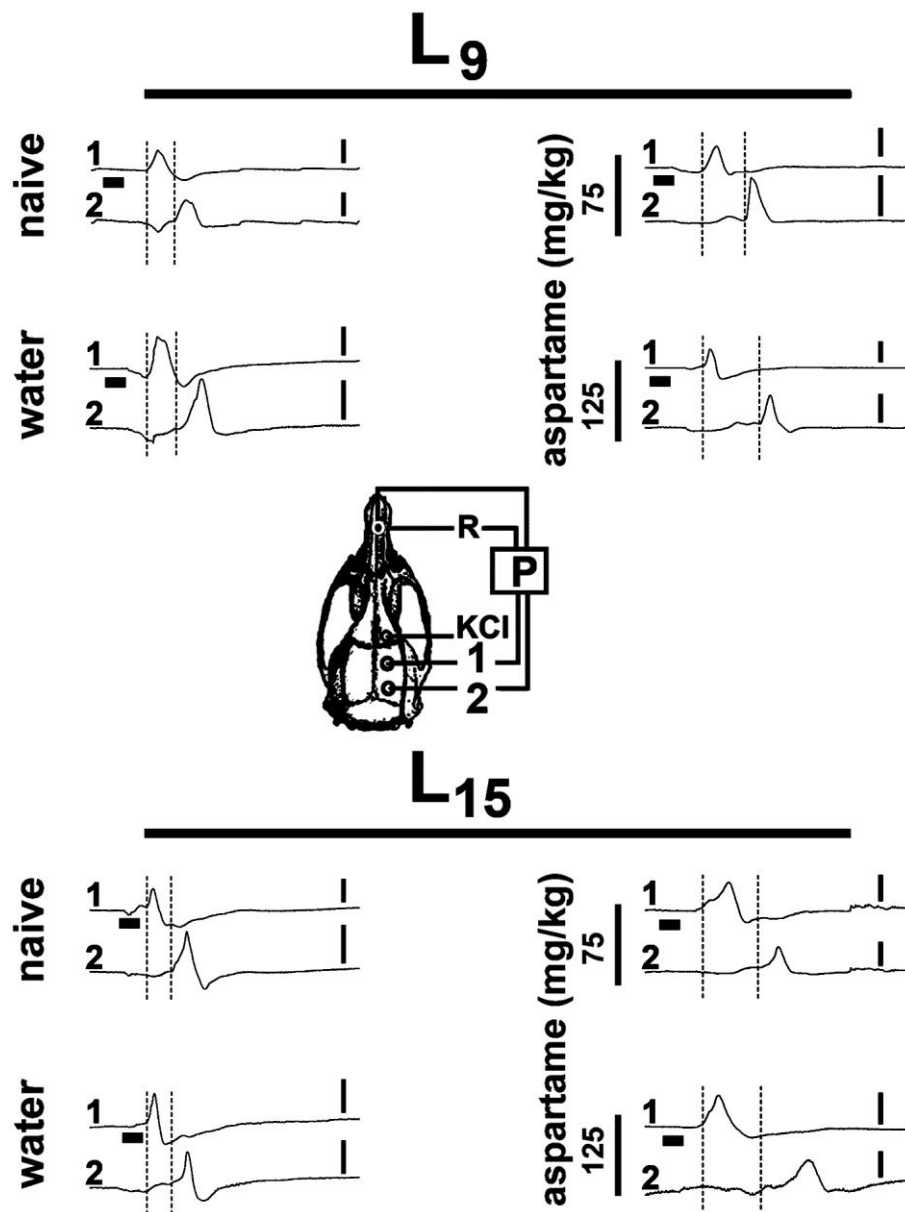


Figure 4- Slow potential change, recorded during cortical spreading depression (CSD), in 96–115-day-old L₉ and L₁₅ rats, which received, from the 8th to the 28th postnatal days, 75 mg/kg/day or 125 mg/kg/day of Aspartame, or distilled water, or were gavage-free (naïve). The horizontal bars show the period of stimulation (1 min) with 2% KCl necessary to elicit CSD. The vertical bars equal -10 mV (negative upwards). The place of KCl application and of the reference electrode (R) is indicated in the skull diagram, which also shows the recording points 1 and 2 (from which the traces marked with the same numbers were recorded). The interelectrode distance was 6.5 mm in all cases.

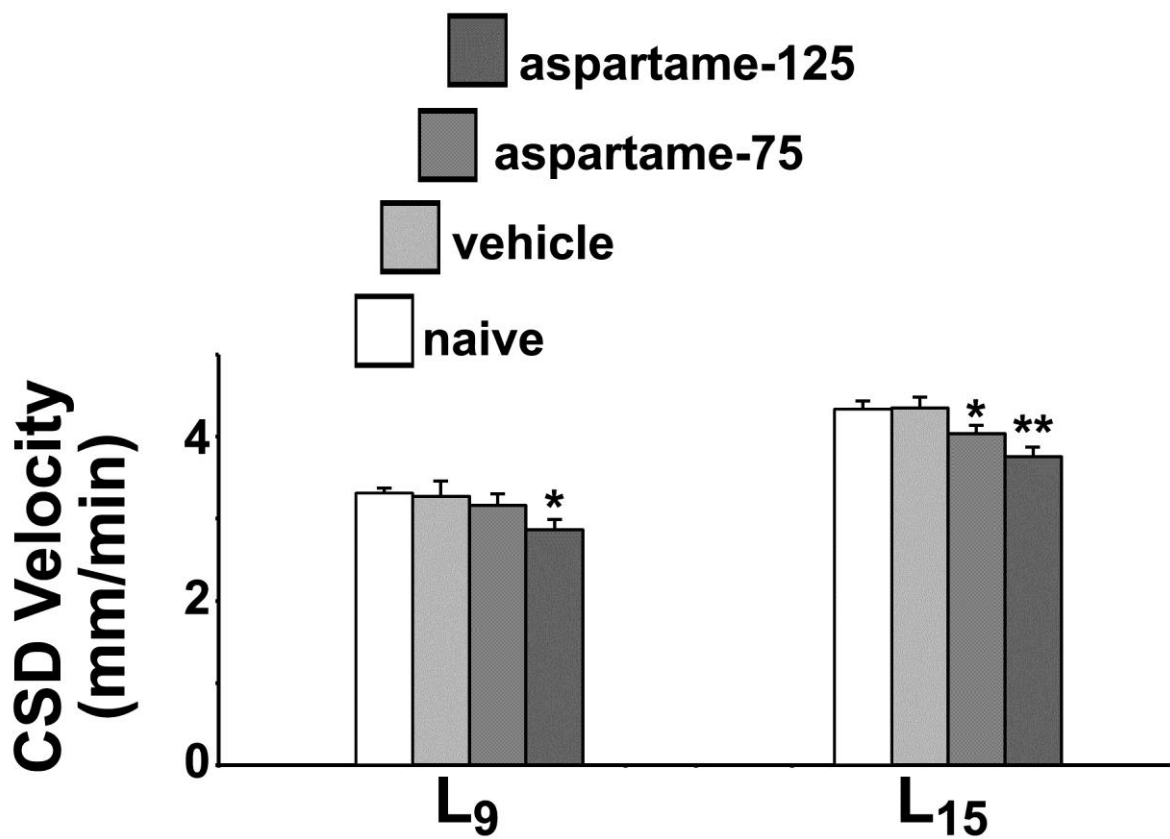


Figure 5- Velocity of propagation of cortical spreading depression (CSD; mean $\pm$ SD) of L₉ and L₁₅ 96–115-day-old rats (previously suckled in litters formed by 9 and 15 pups, respectively), which received, per gavage from the 8th to the 28th postnatal days, 75 mg/kg/day or 125 mg/kg/day of aspartame, or distilled water (water-control). Another control group did not receive any gavage (naïve group). * significantly different from the controls. ** significantly different from the control and from the Asp75 groups ($P < 0.05$; ANOVA plus Holm-Sidak test).

5 Aspartame and the nervous system: a systematic review

Paula Catirina Germano Magalhães¹, Ricardo Abadie-Guedes², Manoel Augusto Barbosa da Costa Mendonça¹, Aline Duarte de Souza¹, Rubem Carlos Araújo Guedes¹

¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

ABSTRACT

Introduction: The consumption of food products containing the non-caloric sweetener aspartame has increased since the 80's, when these products were introduced in the market. Since then, several pieces of evidence suggest that aspartame may be potentially harmful to the nervous system, although some controversy on this subject still persists. Some research suggests an association between aspartame intake and metabolic damage to the central nervous system (CNS), such as changes in enzyme and neurotransmitter activities. Considering the possible adverse neuronal actions of aspartame, we consider it important to study the biological effects of this sweetener on the functional aspects of the CNS. **Objective:** To analyze the pertinent literature on important aspects of the possible neurophysiological alterations associated with aspartame consumption. **Methods:** We conducted a search for studies, whose strategy was developed for Embase, Medline, Lilacs and Pubmed databases, according to the descriptors: *Aspartame, brain function and nervous system*. We present here a narrative review of the literature over the period from 1992 to 2012. **Conclusion:** experimental and clinical studies indicate the risk of neural adverse reactions, which are associated with the use of aspartame, even in relatively low doses. This risk might be higher in developing organisms. Because of such evidence we recommend that the sweetener consumption, if any, should be performed with moderation and caution, under the guidance of a nutritionist or a medical doctor, in order to avoid aspartame-associated deleterious effects on brain function, mainly in children.

Keywords: Aspartame; nervous system; brain function; brain development; brain excitability

INTRODUCTION

Artificial sweeteners are substances with a high sweetening power when compared to sucrose. They are used as sugar substitute in foods and dietary beverages in order to reduce their caloric value ¹. In Brazil, several sweeteners are permitted for use in foods and beverages, among which the two most sold are the mixture of saccharin plus cyclamate and aspartame ¹. This last sweetener (aspartame) is the subject of the present systematic review.

The non-caloric sweetener Aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) was randomly discovered in 1965 in the United States by James Schlatter, a researcher from the pharmaceutical company G. D. Searle Laboratories. Schlatter was attempting to find a new drug for treating gastric ulcer when he licked his fingers to pick up a piece of paper; the licked fingers contained a small amount of a newly synthesized compound and Schlatter immediately noticed the intense sweet taste of that compound, which was identified as being aspartame. The consumption of Aspartame as sweetener was authorized in the United States of North America in 1981 by the Food and Drug Administration (FDA), after various toxicological studies. In Brazil, the free trade of low-calorie products and sweeteners, including those containing aspartame, was authorized in 1988 ². Currently, the consumption of Aspartame-containing diet- and light-products has become a great success due to their taste characteristics that are similar to sucrose, and help to reduce the energy value of food ^{1,3,4}. The calorific value of Aspartame is equal to sucrose (4 kcal / g). However, the quantity of aspartame needed to produce a sweet taste is much lower than sucrose, as Aspartame is about 200 times sweeter. Therefore, the caloric contribution of Aspartame is negligible, in comparison with that of sucrose. Aspartame can be consumed by diabetic patients, but it should be avoided by patients suffering from phenylketonuria, the genetic disease that alters the metabolism of phenylalanine ^{2,5}.

Currently, the sweetener can be found in more than six thousand products including soft drinks, powdered drinks, chewing gums, gelatins, dessert mixes, puddings and fillings, frozen desserts, yogurt, tabletop sweeteners, and some pharmaceutical products like vitamins and cough tablets¹. Its acceptable daily intake is 50 mg/kg body weight, which is estimated to be the equivalent of 18-19 cans (1 can =

355 ml) of diet cola ^{8,9}. For the health organization and Canada's welfare (Health and Welfare Canada), the acceptable daily intake is 40 mg/kg body weight ⁹. Many products containing Aspartame as an additive are indicated for consumption by diabetic patients or persons on caloric restriction. This sweetener has been used on a large scale, not only by those groups, but also by the healthy population ⁴. On the other hand, data on the amount of non-nutritive artificial sweeteners that are added to industrialized foods and beverages are not easily accessible ^{8,9}.

The consumption of Aspartame may be potentially damaging to the nervous system. This consumption has increased since the 80's, when these products were introduced in the market. In recent years, consumption of diet- and light-foods has increased neatly, promoting an increment of the research investment aimed at the development of new Aspartame-based products. These products are primarily directed to people who have a disorder in the metabolism of sugars (diabetes); also, in the last two decades healthy consumers are looking for foods with low-calorie¹⁰.

Nowadays, researchers still differ about their ideas on the possible harmful effects of aspartame on neuronal function. Some studies suggest association of aspartame intake with metabolic damage to the central nervous system (CNS), such as changes in enzyme and neurotransmitter activities.^{11,12}. Considering the possible neuronal adverse effects of aspartame, it is important to gain a better understanding of the biological effects of this sweetener on the functions of the CNS. The knowledge that dietary changes can affect the mammalian nervous system is very well established. However, in relation to the involvement of Aspartame consumption on neurological disorders, the data in the literature are conflicting. In view of that, and considering that Aspartame consumption may be causally related to adverse neural effects, we considered it important to clarify the possible biological effects of this sweetener on the functions of the CNS. Thus, the objective of this work is to review the studies about the possible action of aspartame on brain function.

METHODS

We conducted a systematic review according to a protocol that was constructed to ensure the research design. Therefore, the protocol was organized according to the following components: a) the main question of the review; b) inclusion and exclusion criteria; c) strategies for the search of the scientific research universe d) collection and synthesis of data. The searches were conducted on Embase, Medline, Lilacs and Pubmed databases, according to the descriptors: *Aspartame, brain function and nervous system*. The narrative review of the literature was performed for the period from 1992 to 2012. Data were systematized based on their strength of evidence. The process of data synthesis was carried out through a descriptive analysis of selected studies, and the final product presented in a narrative form analysis.

RESULTS

An initial observation seemed very important to us: the fact that many pieces of evidence suggest that Aspartame may be involved in the onset of headache and epileptic symptoms in humans ^[11-19]. Regarding the use of sweeteners in food for children and adolescents, evidence does exist, for example, which indicates the association between the use of aspartame and the appearance of seizures or neural irritability in children, as well as the risk of exceeding the maximum daily dose accepted²⁰. The maximum daily amount for a 3 year old child with 14kg (at a dose of 40mg/kg/day) would be easily exceeded by consuming one can of diet soda, 1 serving of dietary sweet, 1 serving of dietary yogurt and 3 envelopes sweetener to sweeten liquid, total 517mg ^{8,20}. However, there is lack of conclusive studies on the effects of these additives on long-term growth and development.

The use of aspartame has been debated since its approval by the FDA and currently there are still controversies about their safety. Some evidence suggests possible neurological and behavioral adverse effects due to the components of aspartame metabolism in the organism (phenylalanine, aspartic acid, diketopiperazine and methanol). Other pieces of evidence suggest that aspartame would not be cytotoxic ⁴. Magnuson et al. (2007), in an extensive review concluded that the available data did not support an association between aspartame as a component of the human diet, and neurotoxic effects.

On the other hand, in a systematic review Humphries; Pretorius; Naude ⁴ (2008) observed in several studies that aspartame disrupts the neuronal function and modifies the brain concentrations of catecholamines. It is also reported that aspartame and its degradation products indirectly increase the neuronal depolarization rate. The authors concluded that, given the doubts and polemics about the adverse effects of this sweetener, more research is needed to clarify the controversies about it.

The use of aspartame has been associated with headaches, panic attacks and convulsions ^{12, 11, 13, 18, 21, 19}. Also, memory impairment has been reported in rats after chronic exposure to aspartame ²². Its consumption has also been linked to seizures in humans ^{17, 16, 15, 14}, neurotoxicity ²³ and genotoxic risk ^{24, 25}.

Regarding induction of malignancy, Lim et al.²⁶ (2006), in a cohort study, have concluded that their findings did not support the hypothesis that aspartame increases the risk of hematopoietic or brain cancer. In contrast, Soffritti et al. ²⁷ (2008) found that aspartame significantly increases the risk of tumors in rodents, particularly lymphomas and mammary tumors, with a doubled risk in those cases in which the exposition to Aspartame begins in the prenatal period. These authors concluded that the FDA should review the approval of the sweetener.

Changes in metabolism in the central nervous system (CNS), as a result of intake of aspartame, have also been described. Data obtained by Vences-Mejia et al. ²⁸ (2006) demonstrated that a daily intake of aspartame below the amount recommended by the FDA in 30 days, causes a substantial increase in cytochrome P450 (CYP). This enzyme complex is responsible for endogenous and exogenous molecular metabolism in the CNS, such as the metabolism of xenobiotics. The authors state that biological consequences of this phenomenon should be investigated with a view to increasing the number of individuals exposed to the additive. The quantities used in the research referred to above, 75 and 125mg / kg in mice, respectively represent an amount of 15 to 25 mg / kg for humans, after using a correction factor (CF = 5), ie, below the amount recommended by the FDA.

Simintzi et al.²⁷ (2007) observed that aspartame components may be directly and / or indirectly acting on acetylcholinesterase (the enzyme that catalyzes the hydrolysis of the neurotransmitter

acetylcholine) activity in the frontal cortex. This enzymatic reaction is necessary for the cholinergic neuron to return to its resting state after activation, avoiding then excessive neurotransmitter action, which would produce a neuronal overstimulation and as a consequence weakness and fatigue of the organism. Elevated (toxic) doses of the sweetener significantly decreased the activity of the enzyme. If we can compare the results of this *in vitro* study to the human reality, it may be suggested that cholinergic symptoms such as rhinitis, increased salivation, miosis, lacrimation, diaphoresis, flushing, and intestinal hyperperistalsis, are related to the consumption of aspartame in high doses (150 or 200 mg / kg; 30 or 40mg / kg for human).

The extracellular dopamine levels can be reduced by the intake of aspartame when administered systemically in a single dose of 500 mg/kg for rats and 100 mg/kg for humans ²⁹. It is important to note that, according to these authors, the dopaminergic scarcity is a condition found in diseases such as Parkinson's disease and schizophrenia.

CONCLUSION

Given the above, studies indicate adverse reactions to the use of Aspartame on the nervous system. Thus, the sweetener should be consumed moderately and cautiously, under guidance of a nutritionist or a medical doctor, because the consumption of this sweetener doses as low as 75 mg/kg/d can lead to deleterious effects brain function ²⁸. It was observed that there are very few studies on aspartame intake during pregnancy and lactation, thus suggesting that the competent controlling organizations (e.g. FDA) influence the conduct of research on this topic. An important recommendation would be that the food industries inform on the food label, the possible effects of its consumption at this early period of life (gestation and lactation). Regarding the neural effects of Aspartame consumption over the pregnancy and lactation period, studies on the eventual negative consequences for both the mother and child are scarce. Because of that, Aspartame consumption by pregnant women should be restricted to only those pregnant women who are diabetic, and therefore have to use sweeteners. This restriction might help preserving the neurological health of the fetus. We

believe that in the long term this systematic review may contribute to the development of preventive and therapeutic actions regarding the neural effects of aspartame.

3.1 REFERENCES

1. ASPARTAME INFORMATION CENTER. Products. Available in: http://www.aspartame.org/aspartame_products.html.
2. FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; aspartame. Federal Register, v.61, p.33654-56, 1996.
3. MATTES, R. D.; POPKIN, B. M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms¹⁻³. American Journal Clinical Nutrition, v.89, p.1-14, 2009.
4. HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDÉ, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. European Journal of Clinical Nutrition, v.62, p.451-462, 2008.
5. CARDELLO, H. M. A. B.; SILVA, M. A. A. P.; DAMÁSIO, M. H. Avaliação tempo-intensidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência à sacarose em altas concentrações. Curitiba: Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos-CEPPA, v. 19, n. 2, p. 391-410, jul./dez. 2001.
6. CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos para fins especiais: dietéticos. São Paulo: Varela, 1996. p. 115-258.
7. SAMUNDSEN, J.A. Has aspartame an aftertaste? J. Food Sci., v. 50, p. 1510-1502, 1985.
8. THOMSON, D.M.H.; TUNALEY, A. A reappraisal of the use of multidimensional scaling to investigate the sensory characteristics of sweeteners. J. Sensory Stud., v. 2, p. 215-230, 1987.
9. BELL, J. High intensity sweeteners: a regulatory update. Food Technology. Chicago, v. 47, n. 11, p. 136, 1993.
10. NELSON, A. L. Carbohydrate Polymers. Sweetners: Alternative, v. 44, n. 2, p. 172, 2001.
11. [JACOB, S. E](#); [STECHSCHULTE, S](#). Formaldehyde, aspartame, and migraines: a possible connection. [Dermatitis](#), v.19, n.3, p. E10-1, 2008.

12. SUN-EDELSTEIN, C.; MAUSKOP, A. Foods and supplements in the management of migraine headaches. *The Clinical Journal of Pain*, v.25, n.5, p.446-52, 2009.
13. BLUMENTHAL, H. J.; VANCE, D. A. Chewing gum headaches. *Headache*, v. 37, p.665–666, 1997.
14. CAMFIELD, P. R.; CAMFIELD, C. S.; DOOLEY, J. M.; GORDON, K.; JOLLYMORE, S.; WEAVER, D. F. Aspartame exacerbates EEG spike-wave discharge in children with generalized absence epilepsy. *Neurology*, v.42, p.1000–1003, 1992.
15. ESHEL, Y.; SAROVA-PINHAS, I. Aspartame and seizures. *Neurology*, v.43, p.2154–2155, 1993.
16. GABY, A. R. Natural Approaches to Epilepsy. *Alternative Medicine Review*, v. 12, n.1, 2007.
17. [MORTELMANS, L. J.](#); [VAN L. M.](#); [DE CAUWER, H. G.](#); [MERLEVEDE, K.](#) Seizures and hyponatremia after excessive intake of diet coke. **European Journal of Emergency Medicine**, v.15, n.1, p.51, 2008.
18. TOLLEFSON, L.; BARNARD, R. J. An analysis of FDA passive surveillance reports of seizures associated with consumption of aspartame. **Journal [of the American Dietetic Association](#)**, v.92, n.5, p.598– 601, 1992.
19. WALTON, R. G. Seizure and mania after high intake of aspartame. *Psychosomatics*, n.27, p.218–220, 1986.
20. VITOLO, Marcia Regina(ed.) *Nutrição: da gestação ao envelhecimento*. Rio de Janeiro:Ed.Rubio,2008.
21. DRAKE, M. E. Panic attacks and excessive aspartame ingestion. *Lancet*, v.2, p.631, 1986.
22. CHRISTIAN, B.; MCCONNAUGHEY., K.; BETHEA, E.; BRANTLEY, S.; COFFEY, A.; HAMMOND, L.; HARRELL, S.; METCALF, K.; MUEHLENBEIN, D.; SPRUILL, W.; BRINSON, L.; MCCONNAUGHEY, M. Chronic aspartame affects T-maze performance, brain cholinergic receptors and Na⁺,K⁺-ATPase in rats. **Pharmacology Biochemistry [and Behavior](#)**, v.78, p.121–127, 2004.

23. LAU, K.; MCLEAN, W. G.; WILLIAMS, D. P.; HOWARD, C. V. Synergistic Interactions between Commonly Used Food Additives in a Developmental Neurotoxicity Test. *Toxicological sciences*, v.90, n.1, p.178–187, 2006.
24. BANDYOPADHYAY, A.; GHOSHAL, S.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity Testing of Low-Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, and Saccharin. *Drug and Chemical Toxicology*, v.31, p.447–457, 2008.
25. ALSUHAIBANI, E. S. *In Vivo* Cytogenetic Studies on Aspartame. *Comparative and Functional Genomics*, Volume 2010, Article ID 605921, 4 pages doi:10.1155/2010/605921.
26. LIM, U.; SUBAR, A. F.; MOUW, T.; HARTGE, P.; MORTON, L. M.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. CAMPBELL, D.; HOLLENBECK, A. R.; SCHATZKIN, A. Consumption of Aspartame-Containing Beverages and Incidence of Hematopoietic and Brain Malignancies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n.9, 2006.
27. SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; ESPOSTI, D. D.; FALCIONI, L.; BUA, L. Consequences of Exposure to Carcinogens Beginning During Developmental Life. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.102, 118–124, 2008.
28. VENCES-MEJÍA, A.; LABRA-RUÍZ, N.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, N.; DORADO-GONZÁLEZ, V.; GÓMEZ-GARDUÑO, V.; PÉREZ-LÓPEZ, I.; NOSTI-PALACIOS, R.; CAMACHO-CARRANZA, R.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes. *Human & Experimental Toxicology*, v.25, p.453-459, 2006.
29. BERGSTROM, B. P.; CUMMINGS, D. R.; SKAGGS, T. A. Aspartame decreases evoked extracellular dopamine levels in the rat brain: An in vivo voltammetry study. *Neuropharmacology*, v.53, p.967-974, 2007.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo representam um avanço no conhecimento das repercussões cerebrais do uso neonatal do aspartame. As principais conclusões deste trabalho correspondem ao efeito do ASP sobre o comportamento sugestivo de ansiedade e a DAC, isto é, o ASP pareceu aumentar a ansiedade dos animais e reduziu a propagação da DAC. Os resultados comportamentais são interessantes, porque sugerem que o ASP pode aumentar a ansiedade, bem como pode reduzir a capacidade exploratória dos animais. Além disto, foi possível demonstrar que as alterações eletrofisiológicas, comportamentais aqui descritas persistem até a idade adulta e são dependentes da dose e da condição nutricional do animal.

Apesar das limitações para a extrapolação dos dados deste estudo para a saúde humana, considera-se o tema relevante, uma vez que o consumo de edulcorantes a base de ASP em crianças, ainda é observada na prática clínica, principalmente em crianças com diabetes, ou nas crianças lactentes normais cujas mães ingerem aspartame durante a lactação. Desse modo, sugere-se cautela nas indicações de uso do ASP, bem como se recomenda estudos futuros que considerem os aspectos pertinentes à segurança do tratamento crônico com ASP durante o início da vida.

É importante considerar que a compreensão da relação entre o ASP e seus efeitos sobre o cérebro poderá ser útil na otimização de futuras propostas terapêuticas, visto que o ASP está indiretamente envolvida nos mecanismos fisiopatológicos de algumas neuropatias humanas, como a epilepsia (SHAYWITZ et al, 1994), a enxaqueca (ZAEEM; ZHOU; DILLI, 2016) e a doença de Alzheimer (HUMPHRIES; PRETORIUS; NAUDÉ, 2008).

Na tentativa de aprofundar futuramente os conhecimentos referentes aos efeitos do ASP sobre o cérebro, sugerem-se as seguintes perspectivas de estudo:

1. Análise de neurotransmissores e de enzimas relacionadas às vias metabólicas da ASP no cérebro em ratos tratados com ASP;
2. Avaliação comparativa dos efeitos cerebrais do tratamento agudo e crônico com ASP, realizado em animais adultos jovens, em distintos pontos temporais, inclusive na senilidade;
3. Análise imunohistoquímica de possíveis alterações neurogliais associadas ao aspartame;
4. Análise da modulação, pela atividade física, dos efeitos cerebrais causados pelo ASP.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM S. Obstetricians and maternal body weight and eating disorders during pregnancy. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, v.22, p. 159-63, 2001.
- ABU-TAWEELA, G. M., ZYADAH, M. A., AJAREMB, J. S., AHMAD. M. Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice. **Neurotoxicology and Teratology**, 42, 60–67, 2014.
- ALMEIDA R. M. K; MICZEKERIC W.; FISHJOSEPH F. DE BOLD. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ -aminobutyric acid systems. **Psychopharmacology**, v163, p 434–458, 2002.
- ALSUHAIBANI, E. S. inVivo Cytogenetic Studies on Aspartame. **Comparative and Functional Genomics**, p 4 , 2010.
- ASHOK I.; SHEELADEVI R, WANKHAR D. Neurobehavioral changes and activation of neurodegenerative apoptosis on long-term consumption of aspartame in the rat brain. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, 1 e 10, 2015.
- ASPARTAME INFORMATION CENTER. **Products**. Disponível em: http://www.aspartame.org/aspartame_products.html. Acesso em: 9 de agosto de 2010.
- BANDYOPADHYAY, A.; GHOSHAL, S.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity Testing of Low-Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, and Saccharin. **Drug and Chemical Toxicology**, v.31, p.447–457, 2008.
- BERGSTROM, B. P.; CUMMINGS, D. R.; SKAGGS, T. A. Aspartame decreases evoked extracellular dopamine levels in the rat brain: An in vivo voltammetry study. **Neuropharmacology**, v.53, p.967-974, 2007.
- BLIZARD, D.A.; ELDRIDGE, J.C.; JONES, B.C. The Defecation Index as a Measure of Emotionality: Questions Raised by HPA Axis and Prolactin Response to Stress in the Maudsley Model. **Behav Genet.**, v.45, p.368-373, 2015.
- BLUMENTHAL, H. J.; VANCE, D. A. Chewing gum headaches. **Headache**, v. 37, p.665–666, 1997.
- BUREŠ J.; SHIBATA, M. Optimum topographical conditions for reverberating cortical spreading depression in rats. **Developmental Neurobiology**, 1974.
- CAMFIELD, P. R.; CAMFIELD, C. S.; DOOLEY, J. M.; GORDON, K.; JOLLYMORE, S.; WEAVER, D. F. Aspartame exacerbates EEG spike-wave discharge in children with generalized absence epilepsy. **Neurology**, v.42, p.1000–1003, 1992.
- CHRISTIAN, B.; MCCONNAUGHEY, K.; BETHEA, E.; BRANTLEY, S.; COFFEY, A.; HAMMOND, L.; HARRELL, S.; METCALF, K.; MUEHLENBEIN, D.; SPRUILL, W.; BRINSON, L.; MCCONNAUGHEY, M. Chronic aspartame affects T-maze performance, brain

- cholinergic receptors and Na⁺/K⁺-ATPase in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.78, p.121–127, 2004.
- COSTA-CRUZ, R.R.G.; GUEDES, R.C.A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycaemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v.303, p.177-180, 2001.
- COUTINHO, G. J.; GENTIL, C. P.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cad. Saúde Pública**, v 24, p.332-340, 2008.
- DE LUCA, B; CIOFFI, L. A; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Activitas Nervosa Superior**, v.19, n.3, p.130–131, 1977.
- DRAKE, M. E. Panic attacks and excessive aspartame ingestion. **Lancet**, v.2, p.631, 1986.
- DREIER JENS P., SEBASTIAN MAJOR, ANDREW MANNING, JOHANNES WOITZIK, CHRISTOPH DRENCKHAHN, JENS STEINBRINK, CHRISTOS TOLIAS, ANA I. OLIVEIRA-FERREIRA, MARTIN FABRICIUS, JED A. HARTINGS, PETER VAJKOCZY, MARTIN LAURITZEN, ULRICH DIRNAGL, GEORG BOHNER, ANTHONY J. STRONG. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Brain Journal of Neurology**, 2009.
- ESHEL, Y.; SAROVA-PINHAS, I. Aspartame and seizures. **Neurology**, v.43, p.2154–2155, 1993.
- FABRICIUS M, FUHR S, WILLUMSEN L, DREIER J P, BHATIA R, BOUTELLE M G, HARTINGS J A, BULLOCK R, STRONG A J, LAURITZEN M. Association of seizures with cortical spreading depression and periinfarct depolarisations in the acutely injured human brain. **Clin Neurophysiol** 119:1973–1984, 2008.
- FABRICIUS, S. FUHR, L. WILLUMSEN, J.P. DREIER, R. BHATIA, M.G. BOUTELLE, J.A. HARTINGS, R. BULLOCK, A.J. STRONG, M. LAURITZEN. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. **Clinical Neurophysiol**, v. 119, p. 1973–1984, 2008.
- FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; aspartame. **Federal Register**, v.61, p.33654-56, 1996.
- FERNSTROM, J. D. Oral aspartame and plasma phenylalanine: pharmacokinetic difference between rodents and man, and relevance to CNS effects of phenylalanine. **Journal of Neural Transmission**, v.75, p.159-64, 1989.
- GABY, A. R. Natural Approaches to Epilepsy. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n.1, 2007.
- GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, Netherlands, v.38, n.1, p.33–60, 2001.

- GUEDE R C A, CAVALHEIRO E A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Research** ,v(27), p 33–40, 1997.
- GUEDES, R. C. A.; AMORIM, L. F.; TEODÓSIO, N. R. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1407-1412, 1996.
- GUEDES, R. C. A.; MONTEIRO, J. S; CASTRO, R. M.; FILHO, J. E. C. Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. **Rev. bras. saúde matern. infant**, v1,p15-22, 2002.
- GUEDES, R. C. A.; ROCHA-DE-MELO, A. P.; TEODOSIO, N. R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Ciência e Cultura**, v.56, n. 1, p. 32-35, 2004.
- GUEDES, R. C. A.; VASCONCELOS, C. A. C. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: A dose–response study. **Neuroscience Letters**, v442, p118–122, 2008.
- GUEDES, R. C. A; TSURUDOME, K; MATSUMOTO, N. Spreading depression in vivo potentiates electrically-driven responses in frog optic tectum. **Brain Research**, v.1036, p.109-114, 2005.
- GUEDES, RCA. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition. In: Victor R. Preedy, Ronald R Watson and Colin R Martin, **Handbook of Behavior, Food and Nutrition**, p. 2343-2355, 2011.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, Vol 18, p.385-403, 1934.
- HEALTH PROTECTION BRANCH. **Information letter: aspartame**. Health and Welfare Canada, 1987.
- HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDÉ, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.451–462, 2008.
- JACOB, S. E; STECHSCHULTE, S. Formaldehyde, aspartame, and migraines: a possible connection. **Dermatitis**, v.19, n.3, p. E10-1, 2008.
- LABUDA, C.J.; HALE, R.L. Anxiety in mice following acute aspartame and ethanol exposure. *Alcohol*. 2000 Jan;20:69-74.
- LAU, K.; MCLEAN, W. G.; WILLIAMS, D. P.; HOWARD, C. V. Synergistic Interactions between Commonly Used Food Additives in a Developmental Neurotoxicity Test. **Toxicological sciences**, v.90, n.1, p.178–187, 2006.
- LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, New York, v. 7, n.1, 359–390, 1944.
- LEHMENKÜHLER, A; GROTEMEYER, K. H; TEGTMEIER, F. **Migraine: Basic Mechanisms and Treatment** Urban and Schwarzenberg, Munich, v.1112,n.3 ,p.272-282, 1993.
- LIM, U.; SUBAR, A. F.; MOUW, T.; HARTGE, P.; MORTON, L. M.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. CAMPBELL, D.; HOLLENBECK, A. R.; SCHATZKIN, A. Consumption of

- Aspartame-Containing Beverages and Incidence of Hematopoietic and Brain Malignancies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n.9, 2006.
- LIMA, D. S. C.; FRANCISCO, E. S.; LIMA, C. B.; GUEDES, R. C. A. Neonatal l-glutamine modulates anxiety-like behavior, cortical spreading depression, and microglial immunoreactivity: analysis in developing rats suckled on normal size- and large size litters. **Amino Acids**, p 1–10, 2016.
- MAGNUSON, B. A.; BURDOCK, G. A.; DOULL, J.; KROES, R. M.; MARSH, G. M.; PARIZA, M. W.; SPENCER, P. S.; WADDELL, W. J.; WALKER, R.; WILLIAMS, G. M. Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p.629–727, 2007.
- MAIA L. M.S.S., FRAZÃO M. F., SOUZA T K.M., SILVA M. B., ROCHA-DE-MELO A. P., PICANÇO-DINIZ B. C. W., AMÂNCIO-DOS-SANTOS A., GUEDES R. C.A. L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats. **Brain Research**, v1072, p 19–25, 2006.
- MATTES, R. D.; POPKIN, B. M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms1–3. **American Journal Clinical Nutrition**, v.89, p.1–14, 2009.
- MAYEVSKY A, DORON B A, MANORA T, MEILINA S, ZARCHINA N, GEORGE E. OUAKNINE B. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. **Brain Research**, v (740), p268–274 , 1996.
- MORGANE P.J.; AUSTIN-LAFRANCE R.; BRONZINO J.; TONKISS J.; DIAZ-CINTRA S.; KEMPER T.; GALLER A.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**: 91-128, 1993.
- MORTELMANS, L. J.; VAN L. M.; DE CAUWER, H. G.; MERLEVEDE, K. Seizures and hyponatremia after excessive intake of diet coke. **European Journal of Emergency Medicine**, v.15, n.1, p.51, 2008.
- POTTS W.J.; BLOSS J.L.; NUTTING E.F. Biological properties of aspartame: I evaluation of central nervous system effects. **J Environ Pathol Toxicol**, 3:341–53, 1980.
- ROCHA-DE-MELO, A. P. ; CAVALCANTI, J. B.; BARROS, A. S.; GUEDES, R. C. A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutrition Neuroscience**, v.9, n.4, p.155-160, 2006.

- ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES, R. C. A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.5, p.663-9, 1997.
- ROCHA-DE-MELO, AP; PICANÇO-DINIZ, CW; BORBA, JMC; SANTOS-MONTEIRO, J; and GUEDES, RCA. NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropile and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation in different litter sizes. **Nutritional Neuroscience**, v.7, p.207-216, 2004.
- RODGERS R.J.; JOHNSON N.J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, 52:297–303, 2005.
- SANTOS, Â. A.; PINHEIRO, P. C. F.; LIMA, D. S. C.; OZIAS, M. G.; OLIVEIRA, M. B.; GUIMARÃES, N. X.; GUEDES R. C. A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**,
- SENIOR R, BARNES J, EMBERSON JR, GOLDING J, ALSPAC STUDY TEAM. Early experiences and their relationship to maternal eating disorder symptoms, both lifetime and during pregnancy. **Journal Psychiatry**, v.187, p.268-73, 2005.
- SHAYWITZ, B.A.; ANDERSON, G. M.; NOVOTNY, E. J.; EBERSOLE J. S.; SULLIVAN, C. M. Aspartame has no effect on seizures or epileptiform discharges in epileptic children. **Annals of neurology**, v35, p 98–103, 1994.
- SIMINTZI, I.; SCHULPIS, K. H.; ANGELOGIANNI, P.; LIAPI, C.; TSAKIRIS, S. he effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An in vitro study. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.2397–2401, 2007.
- SMART J.L.; DOBBING J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v 28, p 85–95, 1971.
- SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; TIBALDI, E.; ESPOSTI, D. D.; LAURIOLA, M. Life-Span Exposure to Low Doses of Aspartame Beginning during Prenatal Life Increases Cancer Effects in Rats. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.9, 2007.
- SUN-EDELSTEIN, C.; MAUSKOP, A. Foods and supplements in the management of migraine headaches. **The Clinical Journal of Pain**, v.25, n.5, p.446-52, 2009.
- TEODÓSIO, N.R.; CABRAL-FILHO, J.E.; GUEDES, R.C.A.; COSTA, J.A.; COSTA, F.B.R.; SILVA, A.T. Learned and emotional behavior in chronically malnourished rats. Acta Physiologica Latinoamericana v.29, p.255-262, 1979.
- THOMSON, D.M.H.; TUNALEY, A. A reappraisal of the use of multidimensional scaling to investigate the sensory characteristics of sweeteners. **J. Sensory Stud.**, v. 2, p. 215-230, 1987.

- TOLLEFSON, L.; BARNARD, R. J. An analysis of FDA passive surveillance reports of seizures associated with consumption of aspartame. **Journal of the American Dietetic Association**, v.92, p.598– 601, 1992.
- VASCONCELOS C. A. C.; OLIVEIRA J. A. F.; COSTA L. A. O.; GUEDES, R. C. A. Malnutrition and REM-sleep Deprivation Modulate in Rats the Impairment of Spreading Depression by a Single Sub-convulsing Dose of Pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v.7, p.163-170, 2004.
- VENCES-MEJÍA, A.; LABRA-RUÍZ, N.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, N.; DORADO-GONZÁLEZ, V.; GÓMEZ-GARDUÑO, V.; PÉREZ-LÓPEZ, I.; NOSTI-PALACIOS, R.; CAMACHO-CARRANZA, R.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes. **Human & Experimental Toxicology**, v.25, p.453-459, 2006.
- VITOLLO, Marcia Regina (ed.) *Nutrição: da gestação ao envelhecimento*. Rio de Janeiro: Ed. Rubio, 2014.
- WALTON, R. G. Seizure and mania after high intake of aspartame. **Psychosomatics**, n.27, p.218–220, 1986.
- WINICK, M. Nutrition and development. Volume 2, p 245, 1972.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. Bulletin of the **World Health Organization**, 64: 924-941, 2000.
- YANG, Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.83, n.2, p.10-8, 2010.
- ZAEEM, Z.; ZHOU, L.; DILLI, E. Headaches: a Review of the Role of Dietary Factors. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 16, p 101, 2016.

ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 06 de junho de 2013.

Ofício nº 584/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes**
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Nutrição
Processo nº 23076.014638/2013-72

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Interação do edulcorante Aspartame com o estado nutricional".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;
Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos; nº total de
animais: 80

Atenciosamente,


Prof. Tania Rieger
Presidente do CEUACCB-UFPE
SAPE 230824

ANEXO B- Declaração de aceite do artigo de revisão pela revista

**REVISTA NEUROBIOLOGIA**

NEUROBIOLOGIA JOURNAL

www.revistaneurobiologia.com.br



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o artigo original de revisão intitulado: **Aspartame and the nervous system: a systematic review**, de autoria de **Paula Catirina Germano Magalhães, Ricardo Abadie-Guedes, Manoel Augusto Barbosa da Costa Mendonça, Aline Duarte de Souza e Rubem Carlos Araújo Guedes**, foi aceito para publicação na REVISTA NEUROBIOLOGIA, vol. 78 (1-2) Jan./Jun., 2015, *In Press*. O referido é verdade e dou fé.

Recife/Pe, 26 de julho de 2016.

Prof. Dr. Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos

Editor Assistente

ANEXO C– Comprovante de submissão do artigo original

19/01/2017

Submission Confirmation - guedes.rcs@gmail.com - Gmail

Submission Confirmation

Importante

Enviados

Rascunhos

6pm (a)

AMENIDADES

Artigos-LAFINNT.pdf

Nutrição

Pessoal

rc.guedes@terra.com, ...

rguedes@ufpe.br (1....

SCIENCE_DIRECT

Mais

NeuroToxicology

para mim, rguedes

Dear Rubem,

Your submission entitled "Behavioral and electrophysiological evidence of asparta spreading depression" for the category Full Length Article has been received by jc

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier I

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assign

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Professor Joan Cranmer
Editor-in-Chief, NeuroToxicology

For further assistance, please visit our customer support site at
answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive t
assistance from one of our customer support representatives.

NeuroToxicology**Rubem Guedes**

para Paula

