

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Caroline Azzolin Bressan

**AVALIAÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE OS PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVOS FRENTE À
ADMINISTRAÇÃO A LONGO PRAZO DE ASPARTAME**

Santa Maria, RS
2018

Caroline Azzolin Bressan

**AVALIAÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE OS PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVOS FRENTE À ADMINISTRAÇÃO A LONGO
PRAZO DE ASPARTAME**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração em Toxicologia e Nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Amália Pavanato

Santa Maria, RS
2018

Caroline Azzolin Bressan

**AVALIAÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE OS PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVOS FRENTE À ADMINISTRAÇÃO A LONGO
PRAZO DE ASPARTAME**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração em Toxicologia e Nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 31 de janeiro de 2018:

Maria Amália Pavanato, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Alencar Kolinski Machado, Dr (UNIFRA)

Guilherme Vargas Bochi, Dr (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

A minha família, por todo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir chegar até aqui, por acompanhar, me dar forças, abençoar e iluminar meu caminho durante todo o percurso na concretização deste sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão citadas aqui, pois através delas obtive muito aprendizado e alegrias.

A minha mãe, Rosa, por todo esforço e dedicação, incentivo e apoio na busca de meus objetivos. Certamente sem ela ao meu lado, os meus dias seriam bem menos alegres e inspiradores. Agradeço a ela por ser essa mulher guerreira, responsável, correta, honesta... um exemplo a ser seguido.

Ao meu irmão, pelo companheirismo e amizade e por todas as risadas, discussões e maratonas de filmes.

Aos meus avós, Ítalo e Joana Catarina, por todo apoio, amor, orações e por compreenderem quanto não pude estar lá.

Ao meu pai, Leonel, pelo incentivo, apoio e preocupação pelo meu bem-estar.

A minha orientadora, Maria Amália Pavanato, pelo apoio, incentivo, conhecimentos, paciência, carinho e amizade durante todo esse percurso. Foste a tua confiança em mim e tua constante motivação que me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Aos colegas de laboratório, Isabela Andres Finamor, Juliana Andrade, Karine Ariotti, Lauren Pês, Micáila Bolzon, Tanise da Silva Pês, Vanessa Medeiros da Rosa e Victor dos Santos Barboza; e as ex-colegas, Etiane M. Hundertmarck Saccol e Giovana de Moraes Ourique pelo companheirismo, incentivo, conhecimentos compartilhados, apoio e risadas. Vocês fizeram parte diariamente do meu crescimento pessoal e intelectual.

Ao prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves e Kalyne Bertolin por abrirem as portas do BioRep e auxiliarem na produção deste trabalho.

Aos professores, membros efetivos e suplentes da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para a análise deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação.

À Zeli Carvalho pelos auxílios prestados e dedicação como secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

À Elisia Gomes e Rejane Foletto por todo apoio e atenção prestados durante a realização deste curso.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de realizar este curso.

A todos que não foram citados, mas que fizeram parte desta jornada, meus mais sinceros agradecimentos!

*“Se as coisas são inatingíveis...
Ora, não é motivo para não querê-las...
que tristes os caminhos,
se não fora a presença distante das estrelas...”*

Mário Quintana

RESUMO

AVALIAÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E OXIDATIVOS FRENTE À ADMINISTRAÇÃO A LONGO PRAZO DE ASPARTAME

AUTORA: Caroline Azzolin Bressan
ORIENTADORA: Maria Amália Pavanato

O aspartame é um edulcorante sintético amplamente utilizado por indivíduos com dietas de restrição de sacarose, glicose ou frutose ou por aqueles que buscam a perda de peso. Muitos estudos têm indicado que seu uso está relacionado com alterações a nível do sistema nervoso central, bem como com a indução de estresse oxidativo. No entanto, os mecanismos responsáveis para tais efeitos não estão totalmente esclarecidos, bem como o potencial de compostos antioxidantes, tais como a N-acetilcisteína, em amenizar esses danos. Assim, este estudo avaliou os efeitos da N-acetilcisteína (NAC) (163 mg/kg, i.p.) sobre parâmetros comportamentais e oxidativos frente a administração a longo prazo (90 dias) de aspartame (80 mg/kg, v.o.) em regiões cerebrais de camundongos. Para tanto, camundongos Swiss albinos machos foram divididos em três grupos: controle – receberam ambos veículos, o do aspartame e o da N-acetilcisteína; ASP – receberam o aspartame, e o veículo da N-acetilcisteína; e ASP-NAC – receberam ambos tratamentos, aspartame e N-acetilcisteína. O aspartame foi administrado durante 90 dias, enquanto a NAC foi injetada apenas nos últimos 30 dias. Na última semana do período experimental, os animais tiveram seu comportamento avaliado através do teste de campo aberto. Ao fim dos 90 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a remoção do encéfalo e separação das seguintes regiões: córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, nas quais foi realizada a pesquisa por biomarcadores de estresse oxidativo e a expressão gênica da subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase (Gclc), da cistationina γ -liase (Cth) e da tioredoxina 1 (Trx1). Os resultados obtidos demonstraram que os camundongos tratados com aspartame e NAC apresentaram uma diminuição no número de *crossings* e um aumento no tempo gasto na área central em relação aos animais do controle e tratados somente com aspartame. Apesar de não ter alterado o sistema da tioredoxina, a administração de aspartame causou uma severa depleção nos níveis de tióis não proteicos, assim como na atividade da glutatona peroxidase. Ambas alterações foram restauradas pelo tratamento com a NAC. O aspartame também desencadeou uma diminuição nos níveis de mRNA da Gclc e da Cth e o tratamento com a NAC restaurou os níveis de Gclc. Conclui-se a partir destes resultados que, apesar de não ter alterado o sistema da tioredoxina, o tratamento com aspartame causou uma severa depleção dos níveis de GSH, o que pode ser devido a diminuição dos níveis de mRNA da Gclc e da Cth, demonstrando que o mecanismo de ação da toxicidade do aspartame está mais relacionado ao sistema da GSH. Além disso, os resultados sugerem um efeito ansiolítico da NAC em animais tratados com aspartame. A NAC foi capaz de restaurar a maioria das alterações no sistema relacionado a GSH em regiões cerebrais após a ingestão a longo prazo de aspartame.

Palavras-chave: Glutaciona. Adoçantes de baixa caloria. Tiorredoxina. Regiões cerebrais

ABSTRACT

N-ACETYLCYSTEINE EVALUATION ON BEHAVIORAL AND OXIDATIVE PARAMETERS FRONT LONG TERM ADMINISTRATION OF ASPARTAME

AUTHOR: Caroline Azzolin Bressan

ADVISOR: Maria Amália Pavanato

Aspartame is a synthetic sweetener widely used by individuals with restriction diets of sucrose, glucose or fructose or by those seeking weight loss. Several studies have indicated that its use is related to changes in the central nervous system, as well as to the induction of oxidative stress. However, the mechanisms responsible for such effects are not fully understood, as well as the potential of antioxidant compounds, such as N-acetylcysteine, in mitigating such damages. Thus, this study evaluated the effects of N-acetylcysteine (NAC) (163 mg/kg, i.p) on behavioral and oxidative parameters against the long-term (90 days) administration of aspartame (80 mg/kg, v.o) in brain regions of mice. For this purpose, Swiss albino male mice were divided in three groups: control – received both aspartame and N-acetylcysteine vehicles; ASP – received aspartame, and the N-acetylcysteine vehicle; and ASP-NAC – received both treatments, aspartame and N-acetylcysteine. Aspartame was administered for 90 days, while NAC was injected only in the last 30 days. In the last week of the experimental period, the animals had their behavior evaluated through the open field test. At the end of the 90 days, the animals were anesthetized and euthanized for the removal of the brain and separation of the following regions: cerebral cortex, hippocampus and cerebellum, in which was held the research of the oxidative stress biomarkers and the gene expression of catalytic subunit of glutamate cysteine ligase (Gclc), cystathionin γ -lyase (Cth) and thioredoxin 1 (Trx1). The results showed that the mice treated with aspartame and NAC presented a decrease in the number of crossings and an increase in the time spent in the central area in relation to the control animals and treated with aspartame alone. Although it did not alter the thioredoxin system, the administration of aspartame caused severe depletion in non-protein thiois (NPSH) levels as well as glutathione peroxidase (GPx) activity. Both changes were restored by treatment with NAC. Aspartame also triggered a decrease in Gclc and Cth mRNA levels. Treatment with NAC restored Gclc levels. It is concluded from these results that, although it did not alter the thioredoxin system, treatment with aspartame caused a severe depletion of NPSH levels, which may be due to the decrease in Gclc and Cth mRNA levels, demonstrating that the mechanism of action of aspartame toxicity is more related to the GSH system. In addition, the results suggest an anxiolytic effect of NAC in animals treated with aspartame. NAC was able to restore most of the changes in the GSH-related system in brain regions after long-term ingestion of aspartame.

Keywords: Glutathione. Low-calorie sweeteners. Thioredoxin. Brain regions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Molécula do aspartame	17
Figura 2 – Redução do oxigênio molecular a água	21
Figura 3 – Esquema da via da transsulfuração e síntese da glutatona	25
Figura 4 – N-acetilcisteína, molécula precursora da cisteína, aminoácido limitante da síntese de GSH	27

MANUSCRITO

Figura 1 – Effect of N-acetylcysteine on GPx (A), GR (B) activities and NPSH (C) content in the cortex, and on GPx (D), GR (E) activities and NPSH (F) content in cerebellum of aspartame-treated mice	47
Figura 2 – Effect of N-acetylcysteine on GCLc (A) and CTH (B) mRNA levels in cortex of aspartame-treated mice	48
Figura 3 – Effect of N-acetylcysteine on GCLc (A) and CTH (B) mRNA levels in hippocampus of aspartame-treated mice	49

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 – qRT-PCR primer sequences	42
Tabela 2 – Effect of NAC in locomotor activity and anxiety behavior of aspartame-treated mice by open field	43
Tabela 3 – Lipid hydroperoxides content in cortex and cerebellum for the experimental groups treated with ASP and NAC	44
Tabela 4 – Thioredoxin reductase activity in cortex and cerebellum for experimental groups treated with ASP and NAC	45
Tabela 5 – mRNA expression of Thioredoxin1 (Trx1) in cortex and hippocampus for experimental groups treated with ASP and NAC	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
^{35}S	Isótopo de enxofre radiomarcado
5-HT	Serotonina
ADH3	Formaldeído desidrogenase dependente de glutathione
ASP	Aspartame
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
Cth	Cistationina γ -liase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	Dihidrofenilalanina
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCL	Glutamato cisteína ligase
Gclc	mRNA da glutamato cisteína ligase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H ₂ O	Molécula da água
IDA	Ingestão diária aceitável
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
NAAT	Transportador de aminoácidos neutros grandes
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NPSH	Tiois não proteicos
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Ânion radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
SOD	Superóxido dismutase
THB	Tetrahidrobiopterina
Trx	Tiorredoxina
Trx1	Tiorredoxina 1
Trx2	Tiorredoxina 2
Trx3	Tiorredoxina 3
TrxR	Tiorredoxina redutase
TrxR1	Tiorredoxina redutase 1
x _c ⁻	Transportador cistina-glutamato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 ADITIVOS ALIMENTARES: EDULCORANTES.....	16
2.1.1 Aspartame	16
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	20
2.2.1 Sistema da tiorredoxina	22
2.2.2 Sistema antioxidante relacionado a GSH	23
2.3 N-ACETILCISTEÍNA	25
3 MANUSCRITO	28
4 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Os produtos dietéticos estão no mercado brasileiro há mais de 40 anos, tendo sua produção alavancada a partir de 1980. Em 1969, um decreto-lei, de número 986, definiu alimentos dietéticos como sendo aqueles elaborados para fins de regimes especiais e destinado a ser ingerido por pessoas sãs. Já no ano de 1988, os edulcorantes que até então eram registrados na Divisão Nacional de Medicamentos, passaram a ser registrados na Divisão Nacional de Alimentos. A partir deste momento, a comercialização e a utilização dos edulcorantes tornaram-se mais amplas (VIGGIANO, 2003).

Todas essas mudanças no mercado de produtos dietéticos proporcionaram uma melhora na qualidade de vida de indivíduos com dietas de restrição de sacarose, glicose ou frutose, como os portadores de *diabetes mellitus*, e por aqueles que buscam perda de peso, possibilitando que desfrutem alimentos e bebidas saborosos e ainda, assim cumprir as exigências quanto sua restrição alimentar (BUTCHKO et al., 2002).

Atualmente, no Brasil, é permitido o uso de 15 aditivos edulcorantes em alimentos, de origem natural e sintética (BRASIL, 2008). Entre os sintéticos está o aspartame (ASP). O ASP (L-aspartil-L-fenilalanina metil éster) foi descoberto acidentalmente em 1965, e é um dos adoçantes artificiais de baixa caloria mais comumente utilizado, desde sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1981 (ABDEL-SALM et al., 2012; ASHOK et al., 2015;). Ele é metabolizado no intestino em fenilalanina (50%), ácido aspártico (40%) e metanol (10%) (HUMPHRIES et al., 2008). Extensas pesquisas farmacológicas e toxicológicas em animais de laboratório foram realizadas antes e após sua aprovação por órgãos reguladores, e baseando-se nestes dados, foi estabelecida uma ingestão diária aceitável (IDA) de 40 mg/kg na União Europeia, enquanto que nos Estados Unidos foi adotada a IDA de 50 mg/kg (BUTCHKO et al., 2002).

Embora a comercialização do aspartame, como alimento, tenha sido aprovada, relatos de casos de dores de cabeça, tonturas, sintomas gastrointestinais, alterações de humor, reações alérgicas e até mesmo alterações no ciclo menstrual vêm sendo relacionados ao consumo de aspartame (MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, 1984). Tais sintomas foram associados aos potenciais efeitos da fenilalanina sobre as funções cerebrais, uma vez que esta é precursora da família das catecolaminas (dopamina, norepinefrina e epinefrina) (NELSON E COX, 2010). Além disso, foi evidenciado que a fenilalanina, aspartato e o metanol podem causar distúrbios fisiológicos (HUMPHRIES et al., 2008), resultando inclusive em alterações

no sistema antioxidante, especialmente, em decorrência da depleção dos níveis de glutatona e da atividade das enzimas dependentes dela, podendo ocasionar danos oxidativos (ABHILASH et al., 2011; MOURAD, 2011; MOURAD E NOOR, 2011; RUIZ et al., 2008). O dano oxidativo vem sendo associado de forma unânime tanto ao consumo agudo (ASHOK et al., 2015) quanto ao consumo crônico de doses altas (ABHILASH et al., 2011; ABHILASH et al., 2013; IYYSWAMY E RATHINASAMY, 2012; RUIZ et al., 2008), aceitáveis (ASHOK e SHEELADEVI, 2014; FINAMOR et al., 2014; MOURAD, 2011; MOURAD e NOOR, 2011;) e até mesmo, baixas de aspartame (ABDEL-SALAM et al., 2012), estando também relacionado a diversos outros distúrbios, tais como convulsões, doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, doenças hepáticas, entre outros (WU et al., 2004).

Tendo em vista que o consumo de aspartame causa estresse oxidativo, e danos a homeostase do organismo, torna-se evidente a necessidade de buscar compostos com propriedades antioxidantes que possam compor terapias alternativas para melhorar esta condição. Neste contexto, destaca-se a N-acetilcisteína (NAC), a qual tem apresentado grande potencial terapêutico e cuja administração aumenta o fornecimento de cisteína, eleva a síntese de GSH e previne a deficiência da mesma em uma ampla diversidade de distúrbios, tais como, intoxicação por acetaminofeno, fibrose cística, dano por isquemia-reperusão, esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, entre outras (LASRAM et al., 2015; RUSHWORTH e MEGSON, 2014; SAMUNI et al., 2013; SHAHRIPOUR et al., 2014).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da N-acetilcisteína sobre parâmetros comportamentais e oxidativos em diferentes regiões cerebrais de camundongos tratados com aspartame.

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar o perfil comportamental quanto à atividade locomotora e ansiedade através do teste de campo aberto em camundongos dos grupos controle, ASP e ASP-NAC;
- Verificar o dano oxidativo através da determinação do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em homogenatos de córtex e cerebelo de camundongos dos diferentes grupos experimentais;
- Avaliar a atividade da glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), tiorredoxina redutase (TrxR) e o conteúdo de tiois não proteicos (NPSH) em homogenatos de córtex e cerebelo de camundongos dos diferentes grupos experimentais;
- Verificar a expressão gênica da subunidade catalítica da glutamato cisteína ligase (Gclc), cistationina gamma-liase (Cth) e tiorredoxina1 (Trx1) em homogenatos de córtex e hipocampo de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ADITIVOS ALIMENTARES: EDULCORANTES

Os aditivos alimentares são quaisquer ingredientes que são adicionados intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante todos os processos pelos quais o alimento passa antes de chegar até o consumidor, como por exemplo, antioxidantes, corantes, aromatizantes, edulcorantes, reguladores de acidez, entre outros (BRASIL, 1997). Para grande parte da população que opta por consumir produtos processados, os aditivos alimentares são componentes onipresentes, com o potencial de causar efeitos em sua saúde. A segurança no uso de aditivos é primordial, e supõe-se que antes de ser autorizado, um aditivo deva passar por uma severa avaliação toxicológica, em que se devem levar em consideração aspectos tais como, efeitos cumulativos, sinérgicos e de proteção, decorrentes de seu uso (BRASIL, 1997; MAHER e WURTMAN, 1987).

Os edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce aos alimentos (BRASIL, 1997). Em 1988, os edulcorantes passaram a ser considerados alimentos, uma vez que até então eram considerados fármacos (BRASIL, 1988), possibilitando assim um maior acesso a todos os tipos de público. Atualmente, no Brasil, é autorizada a utilização de 15 tipos de edulcorantes em alimentos, sendo eles de origem natural, como o sorbitol, o manitol, a taumarina, os glicosídeos de esteviol, o xilitol, o eritrol, o maltitol, o isomaltitol e o lactitol, e de origem sintética, como o acesulfame de potássio, o aspartame, o ciclamato, a sacarina, a sucralose e o neotame (BRASIL, 2008).

Esses edulcorantes podem ser classificados em nutritivos e não nutritivos, dependendo da quantidade de energia que fornecem. Os edulcorantes nutritivos, como o sorbitol e o maltitol, contêm carboidratos, fornecendo um sabor doce e uma fonte de energia, enquanto os edulcorantes não nutritivos, como a taumarina e o aspartame, possuem o sabor doce fornecendo pouca ou nenhuma energia. Esse fato faz com que os edulcorantes não nutritivos também sejam denominados de “edulcorantes de alta intensidade”, pois são capazes de adoçar com quantidades mínimas, fornecendo quantidades de energia insignificantes (ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS, 2012).

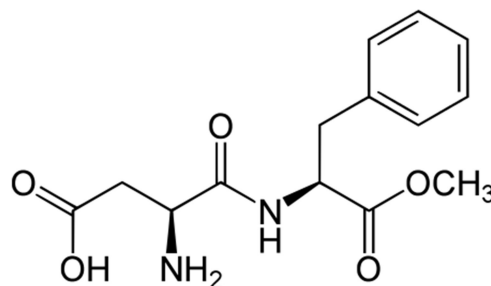
2.1.1 Aspartame

O aspartame é um dipeptídeo (L-aspartil-L-fenilalanina metil éster) que possui um grupo amino na posição α do carbono da ligação peptídica (α -aspartame), cuja capacidade de adoçar é 200 vezes maior que a da sacarose, e sendo o seu isômero, β -aspartame, não doce (Figura 1) (EFSA, 2013; MAGNUSON et al., 2007). Seu conteúdo calórico é semelhante ao da sacarose (aproximadamente 4 kcal/g), porém em função de sua capacidade de adoçar, as quantidades de energia ganhas no consumo são quase nulas (MAGNUSON et al., 2016).

O aspartame é um dos adoçantes mais utilizados ao redor do mundo, estando presente na forma de adoçante de topo de mesa ou em sobremesas, refrigerantes, gomas de mascar e até mesmo em mais de 600 produtos farmacêuticos (CHOUDHARY e PRETORIUS, 2017). Apesar da grande quantidade de produtos contendo aspartame, a média de consumo mesmo para aqueles que consomem muito, ainda permanece abaixo dos valores de IDA recomendados pelos órgãos reguladores. A ingestão diária aceitável de 40 mg/kg foi estabelecida pelo *Joint Food and Agriculture Organization of United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives* (JECFA), enquanto a IDA de 50 mg/kg foi estabelecida pela FDA, porém as doses médias de consumo real foram estimadas para serem entre 1,3 a 5,3 mg/kg/dia (EFSA, 2013) na Europa e 4,9 mg/kg/dia nos Estados Unidos (MAGNUSON et al., 2007). Dentre os indivíduos que mais consomem aspartame, estas médias podem chegar a 15,6 mg/kg/dia (EFSA, 2013), porém mesmo para estes indivíduos, o consumo permanece abaixo dos 50% das IDAs.

Após ingestão, o aspartame é rapidamente metabolizado por esterases e peptidases do trato gastrointestinal em fenilalanina (50%), ácido aspártico (40%) e metanol (10%), fazendo com que as quantidades de aspartame intacto que entram na corrente sanguínea sejam indetectáveis (EFSA, 2013).

Figura 1 – Molécula do α -aspartame.



Fonte: Adaptado de EFSA, 2013.

A fenilalanina é um aminoácido essencial, que pode seguir duas vias de absorção no organismo. Uma parte da fenilalanina é convertida em tirosina no fígado pela fenilalanina hidroxilase; e a outra parte é transportada através da barreira hematoencefálica ligada a um transportador de aminoácidos neutros grandes (NAAT) (HUMPHRIES et al., 2008). Tanto a fenilalanina quanto a tirosina são constituintes normais do plasma, e tem sua conversão cinco vezes mais rápida em roedores do que em humanos (FERNSTROM et al., 1989), e por isso a maior parte da fenilalanina adquirida pela dieta passa para a circulação sistêmica inalterada em humanos.

Embora a comercialização do aspartame tenha sido aprovada, ele tem sido associado em inúmeros relatos de casos de dores de cabeça, tonturas e alterações de humor (MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, 1984), os quais vêm sendo relacionados aos potenciais efeitos da fenilalanina sobre as funções cerebrais. Se uma alta concentração de aspartame é consumida através da dieta, cerca de 50% da quebra da molécula será fenilalanina. Após sua conversão parcial em tirosina, esta poderá ser transportada através da barreira hematoencefálica, onde será convertida pela tirosina hidroxilase em dihidrofenilalanina (DOPA) com a ajuda de co-fatores de oxigênio, ferro e tetrahidrobiopterina (THB) (HUMPHRIES et al., 2008).

A dopamina é formada a partir da DOPA, e uma vez que altas concentrações de dopamina inibem a tirosina hidroxilase, por meio de sua influência sobre o co-fator THB (*feedback* negativo), há uma interferência no sistema que controla a produção de dopamina. Por outro lado, grandes quantidades de fenilalanina competirão com a tirosina pelo NAAT, resultando em uma produção de dopamina prejudicada, já que a fenilalanina possui maior afinidade pelo transportador quando em altas concentrações. Além disso, a produção de serotonina (5-HT) também pode ser afetada pelas altas concentrações de fenilalanina, uma vez que o triptofano utilizado na síntese de 5-HT também é transportado pelo NAAT (HUMPHRIES et al., 2008). No entanto, não se é observado na literatura um padrão consistente a respeito dos efeitos adversos do aspartame sobre a neuroquímica do cérebro. Por exemplo, Coulombe e Sharma (1986) demonstraram que os níveis de catecolaminas, principalmente, dopamina e norepinefrina, estavam aumentados no hipotálamo de camundongos após a administração de aspartame nas doses de 130 e 650 mg/kg; enquanto Fernstrom et al. (1983) demonstrou que após uma dose de 200 mg/kg, a razão de formação da dopamina e norepinefrina de ratos sofreu mínimos efeitos.

O metabólito ácido aspártico do aspartame é um aminoácido excitatório, cujo metabolismo é similar ao do adquirido através da dieta, ou seja, convertido a L-lisina e L-

metionina pela enzima hepática aspartato quinase. Altas concentrações deste metabólito também podem ser transportadas através da barreira hematoencefálica e se ligar ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) ou outros sítios de ligação do glutamato, causando influxo de Ca^{2+} para dentro das células (MAGNUSON et al., 2017). Assim como o glutamato, seu semelhante em estrutura, o aspartato é capaz de induzir necrose neuronal em camundongos recém-nascidos (DAABEES et al., 1985). Um estudo conduzido por Reynolds e colaboradores (1976) demonstrou que a administração de aspartame nas doses de 1000 a 2500 mg/kg a camundongos recém-nascidos também induziu necrose neuronal hipotalâmica, possivelmente, estando relacionado as altas concentrações de aspartato presentes no plasma destes animais.

Em relação ao metanol, diversos estudos têm demonstrado sua toxicidade tanto em humanos quanto em modelos animais, principalmente nas células hepáticas, onde é convertido a formaldeído, e em seguida a formato (SKRZYDLEWSKA, 2003; TEPHLY, 1991), havendo diferenças entre o metabolismo do metanol em humanos e roedores. Em humanos, o metanol é convertido a formaldeído pela enzima álcool desidrogenase, enquanto em roedores a conversão se dá via atividade peroxidativa da enzima catalase, a qual também possui atividade antioxidante (BRADFORD et al., 1993; CEDERBAUM e QURESHI, 1982). O formaldeído é rapidamente convertido em um metabólito altamente tóxico, o formato, por um mecanismo semelhante em ambas as espécies, através da enzima formaldeído desidrogenase dependente de glutathione reduzida (ADH3) (HARRIS et al., 2004). O formato, por sua vez, pode ser convertido a metabólitos não tóxicos, como dióxido de carbono e água, com a participação de duas enzimas dependentes de tetraidrofolato (H4 folato), a 10-formyl sintetase e desidrogenase (SKRZYDLEWSKA, 2003).

Os primatas não-humanos e os humanos são espécies mais vulneráveis a intoxicação por metanol, quando comparados aos roedores, uma vez que apresentam baixo teor hepático de folato (JOHLIN et al., 1987) e das enzimas necessárias para o seu metabolismo, e em função disso, metabolizam o formato duas vezes mais lentamente que os roedores (McMARTIN et al., 1979). Dessa forma, o acúmulo de formato tem sido considerado responsável pelo padrão de toxicidade por metanol (BUTCHKO et al., 2002).

Trocho e colaboradores (1988) sugeriram uma relação entre o consumo de aspartame e riscos à saúde humana, sendo que as funções celulares são afetadas mesmo quando em forma assintomática, e que houve acúmulo de adutos de formaldeído formados em proteínas e ácidos nucleicos em diferentes tecidos de ratos. Além disso, ambos os metabólitos da oxidação do metanol se apresentam de forma a produzir um aumento na formação de espécies reativas de

oxigênio (EROs), podendo levar a morte celular. Por outro lado, a intoxicação por metanol também reduz as defesas antioxidantes através da diminuição do conteúdo de glutathione reduzida (GSH) e da atividade das enzimas relacionadas ao seu metabolismo, resultando em uma condição conhecida como estresse oxidativo (PARTHASARATHY et al., 2006; SAITO et al., 2005; SKRZYDLEWSKA et al., 1998; SKRZYDLEWSKA e FARBISZEWSKI, 1997).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

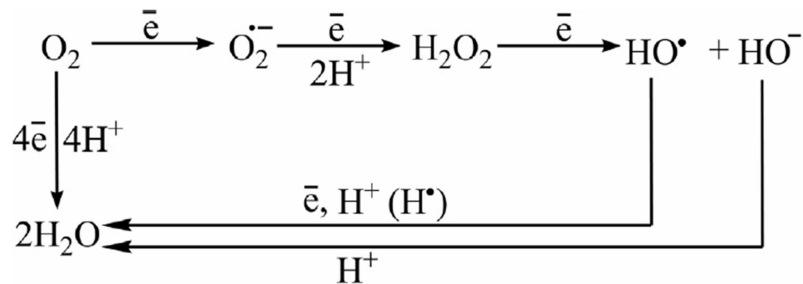
Os organismos vivos possuem sistemas regulados para manter os níveis dos oxidantes muito baixos, ou seja, produção e eliminação equilibradas, resultando em um nível de EROs no estado estacionário. No entanto, em determinadas circunstâncias, o equilíbrio necessário para manter o estado estacionário é perturbado, e dentre as razões para isso estão: (i) aumento dos níveis de compostos endógenos e exógenos que entram em auto-oxidação, juntamente com a produção de EROs; (ii) esgotamento das reservas de antioxidantes de baixo peso molecular; (iii) inativação das enzimas antioxidantes; (iv) diminuição na produção de enzimas antioxidantes e dos antioxidantes não enzimáticos; (v) e certas combinações de dois ou mais destes fatores, levando ao desenvolvimento de estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014). O estresse oxidativo é uma perturbação no equilíbrio entre a produção de oxidantes e das defesas antioxidantes em favor dos primeiros, levando a uma interrupção na sinalização redox ou danos moleculares (SIES, 2015).

As EROs estão presentes em um estado estacionário, pois são formadas durante os processos normais de oxidação biológica necessários a vida, como na produção da adenosina trifosfato (ATP), a qual ocorre no interior da mitocôndria pelo processo de respiração celular acoplada a fosforilação oxidativa. Durante esse processo, o O_2 é reduzido até H_2O recebendo quatro elétrons de uma só vez através da citocromo oxidase. Entretanto, em função de sua configuração eletrônica, o O_2 possui uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários muito reativos. Dentre estes compostos intermediários se podem encontrar espécies radicalares, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), e espécies não radicalares, como o oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 2) (LUSHCHAK, 2014).

O $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro intermediário formado pela redução parcial do O_2 através da atividade enzimática da xantina oxidase, NADPH oxidase ou mesmo pela quebra da cadeia respiratória, a partir da qual serão, por reações sequenciais, formadas as demais EROs

(HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2008). O H_2O_2 , por sua vez, é o segundo intermediário, capaz de difundir-se facilmente entre as células, podendo inclusive gerar OH^\bullet em processos catalisados na presença de metais de transição (Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss). Em condições fisiológicas (1 – 10 nM), o H_2O_2 é considerado o principal metabólito na detecção, sinalização e regulação redox, entretanto, quando em excesso (>100 nM), pode levar ao dano às biomoléculas, a qual excede a capacidade celular de reparo (SIES, 2017). Por fim, o OH^\bullet é um dos oxidantes mais potentes do sistema biológico, a sua alta reatividade faz com que este reaja imediatamente no local em que foi formado (DIPLOCK et al., 1998).

Figura 2 – Redução do oxigênio molecular a água.



Fonte: Adaptado de LUSHCHAK, 2014.

O potencial reativo destas espécies, como diz o próprio nome, faz com que, ao interagir com biomoléculas, gere condições que variam desde o estresse oxidativo basal a variantes mais excessivas e tóxicas, como o estresse oxidativo de alta intensidade (SIES, 2015). Dentre os processos que desencadeiam quando em excesso, estão a peroxidação lipídica das membranas, a qual leva a alterações na permeabilidade e função secretora; reações oxidativas em proteínas, as quais desencadeiam alterações dos grupos carbonila, estados conformacionais e conseqüentemente no funcionamento das proteínas; e também o ataque ao ácido desoxirribonucleico (DNA), induzindo mutações e a formação de 8-hidroxideoxiguanosina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2008).

A fim de neutralizar os pró-oxidantes e mantê-los em níveis fisiológicos, os organismos aeróbicos desenvolveram uma diversidade de defesas antioxidantes (SIES, 1991). Um antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas às do substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a

oxidação daquele substrato. Os antioxidantes podem agir de três formas: prevenindo a formação de EROs, interceptando-as quando formadas, e/ou reparando os danos macromoleculares. Os sistemas biológicos de defesa antioxidantes são compostos por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam em conjunto de forma a proteger as células contra danos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2008).

O sistema antioxidante enzimático é composto, dentre outras enzimas, pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST), tiorredoxina (Trx) e tiorredoxina redutase (TrxR). A SOD é responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , o qual é convertido em O_2 e água pela ação da enzima CAT (PISOSCHI e POP, 2015). A GPx, por sua vez, catalisa a conversão de hidroperóxidos orgânicos a produtos menos reativos, utilizando a GSH como substrato, além de remover H_2O_2 quando em concentrações mais baixas. A glutaciona oxidada (GSSG) produzida nesse processo é reciclada a GSH pela ação da enzima GR, a qual é uma enzima dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) (TOWNSEND et al., 2003). A GST constitui uma família de enzimas de detoxificação de fase II, que catalisa a conjugação de compostos eletrofilicos, como radicais livres e xenobióticos, com a GSH (HABIG et al., 1974). A Trx, a TrxR e o NADPH formam um sistema que utiliza grupos tiois para manter intracelularmente um estado redox redutor, atuando como antioxidantes e agentes redutores na sinalização redox (LILLIG e HOLMGREN, 2007).

O sistema antioxidante não enzimático é formado por antioxidantes lipossolúveis, como, o α -tocoferol, assim como por hidrossolúveis, tais como o ácido ascórbico e a GSH, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2008). O α -tocoferol é um dos *scavenger* de radicais mais importantes in vivo. Sua ação antioxidante se dá pela reação de transferência de átomos de hidrogênio para os radicais livres, obtendo assim um produto não radical e um radical, que podem reagir com outros radicais para gerar um produto estável, atacar lipídios ou reagir com um agente redutor para regenerar o α -tocoferol (NIKI, 2014). O ácido ascórbico é capaz de reagir diretamente com as EROs e vários produtos formados durante a peroxidação lipídica (NIKI, 1991). A GSH, por sua vez, está implicada em diversos processos de detoxificação e manutenção do status redox (SIES, 1999).

Os sistemas da tiorredoxina e da glutaciona desempenham um papel muito importante no balanço redox no cérebro, assim como papéis importantes em alguns processos celulares básicos, como a síntese do DNA, maturação proteica e sinalização celular (BENHAR et al., 2016). Desta forma, quando se é observada uma desregulação de um desses sistemas, esta

desregulação pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, incluindo distúrbios psiquiátricos. Em alguns casos, ambos os sistemas se comunicam e servem de apoio um para outro, uma vez que a GSH juntamente com a glutarredoxina 1 pode reduzir a Trx1 quando a TrxR1 está inibida (DU et al., 2012). Em situações como o consumo a longo prazo de aspartame, o sistema da glutathione é o principal afetado, porém nada se sabe ainda sobre os efeitos do consumo de aspartame no sistema da tioredoxina.

2.2.1 Sistema da Tiorredoxina (Trx)

As tioredoxinas são proteínas antioxidantes de baixo peso molecular (12 kDa), altamente conservadas com um motivo Cys-Gly-Pro-Cys em seu sítio ativo, sendo os dois resíduos de cisteína importantes para a sua atividade e conformação (LILLIG e HOLMGREN, 2007; MATSUZAWA, 2017). Na forma inativa e oxidada da Trx, formam-se ligações dissulfeto entre as duas porções tio das cisteínas. A Trx oxidada é transformada na forma ativa e reduzida ao receber elétrons da NADPH na presença da enzima TrxR. A Trx reduzida, por sua vez, pode transferir equivalentes redutores para muitos substratos, tais como insulina, fatores de coagulação, receptores de glicocorticoides, entre outros (KOHÁRYOVÁ e KOLLÁROVÁ, 2015).

Em células de mamíferos existem três formas de Trx: a Trx1, que está localizada no citosol; a Trx2, que está localizada nas mitocôndrias e a Trx3, que é específica dos testículos. Para cada uma destas existe uma forma correspondente da TrxR (REN et al., 2017).

As TrxR são flavoproteínas homodiméricas com peso molecular de aproximadamente 115 kDa. Em sua estrutura há um resíduo de selenocisteína, o qual é de extrema importância para que a TrxR exerça a sua atividade de redutase (REN et al., 2017). Além de sua atividade como redutora da Trx, a TrxR também participa de processos de regeneração de algumas moléculas antioxidantes, tais como o diidroascorbato (MAY et al., 1997; MAY et al., 1998) e o ácido lipoico (ARNÉR et al., 1996). O cérebro é mais suscetível ao dano oxidativo comparado aos demais órgãos, devido a sua alta demanda de oxigênio, altos níveis de ferro encontrados em algumas regiões e alto teor de ácidos graxos insaturados, acompanhados de baixa atividade de algumas enzimas antioxidantes, tais como a SOD, CAT e GPx (DRINGER et al., 2000; SILVA-ADAYA et al., 2014). Tanto a Trx quanto a TrxR estão amplamente expressas em tecidos e órgãos, sendo sua distribuição tecido e célula específicas, incluindo o cérebro onde estas enzimas são encontradas (ROZELL et al., 1985) A atividade da TrxR no cérebro de ratos pode ser mantida em um determinado nível sob condições severas de

deficiência em selênio. O mesmo não ocorre com outras selenoproteínas, como a GPx, a qual perde a maior parte de sua atividade, indicando que a TrxR é de grande importância para o cérebro (LU et al., 2009).

2.2.2 Sistema antioxidante relacionado a GSH

Dentre os antioxidantes, a GSH é um dos mais importantes quando se fala nos efeitos em longo prazo do aspartame. A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular, composto pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. O grupo tiol presente nesta molécula faz com que ela seja um potente agente redutor (TOWNSEND et al., 2003). A GSH é o tiol de baixo peso molecular mais abundante nas células, sendo sua maior parte presente no citosol (85-90%) e o restante distribuído em organelas, incluindo a mitocôndria, a matriz nuclear e os peroxissomos (LU, 2009). Sua síntese ocorre em todos os tipos celulares a partir de duas reações enzimáticas sequenciais. Na primeira reação, a enzima glutamato cisteína ligase (GCL) utiliza os aminoácidos glutamato e cisteína como substratos para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína, e na segunda reação ocorre a inserção do aminoácido glicina, catalisada pela enzima glutationa sintetase. Ambas reações ocorrem com gasto energético (ATP) (GRIFFITH, 1999).

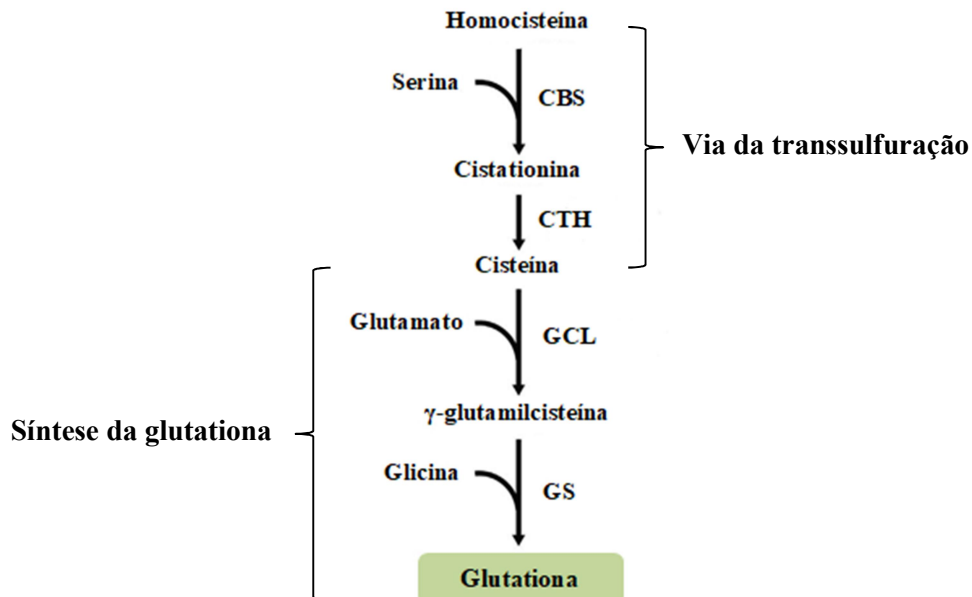
Em condições fisiológicas normais, a síntese de GSH será determinada por dois principais fatores: a atividade da GCL e a disponibilidade de cisteína. A enzima GCL é um heterodímero composto de uma subunidade catalítica (GCLc), a qual inclui o sítio ativo responsável pela união do grupo amino da cisteína e o grupo γ -carboxílico do glutamato, e uma subunidade moduladora (GCLm), a qual não possui atividade enzimática, mas possui uma importante função reguladora, aumentando a eficiência catalítica da GCLc (VULCANO, 2013). O aminoácido cisteína, por sua vez, pode ser absorvido através da dieta, mas quando insuficiente, estima-se que cerca de 50% da cisteína na produção de GSH hepática seja derivada da metionina via transsulfuração (PAJARES e PÉREZ-SALA, 2018).

A via de transsulfuração (figura 3) no cérebro até recentemente era considerada não funcional. No entanto, alguns estudos tem demonstrado o oposto. A via da transsulfuração funcionaria como capacidade reserva, onde forneceria cisteína para a síntese de GSH quando o fornecimento proveniente do fígado via transportador cistina-glutamato (x_c^-) fosse limitado ou quando o estresse oxidativo demandasse uma síntese de GSH maior (KANDIL et al., 2010; VITVITSKY et al., 2006). Além disso, Vitvitsky e colaboradores (2006) demonstraram através de ensaio com metionina radiomarcada (^{35}S) que houve incorporação do átomo de

enxofre na glutatona sintetizada em astrócitos, neurônios e cortes de cérebro, demonstrando a existência de uma via da transsulfuração completa e funcional.

Diwakar e Ravindranath (2007) também demonstraram uma depleção de 38% nos níveis de GSH (6 h após a administração) em cérebro de camundongos tratados com o inibidor da enzima cistationina γ -liase (CTH), DL-propargilglicina, acompanhada de redução de sua atividade. O mesmo foi observado no estudo de Vitvisky e colaboradores (2006), fornecendo assim mais uma evidência de que a via de transsulfuração não só é funcional no cérebro, mas também tem importante participação na síntese de GSH.

Figura 3 – Esquema da via da transsulfuração e síntese da glutatona.



Fonte: autoria própria

Legenda: CBS – cistationina β -sintase; CTH – cistationina γ -liase; GCL – glutamato cisteína ligase; GS – glutatona sintetase.

2.3 N-ACETILCISTEÍNA

O estresse oxidativo principalmente devido à deficiência de GSH, tem sido associado a inúmeros distúrbios, tais como doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, *diabetes mellitus* e câncer (WU et al., 2004), sendo este fato a base para as terapias antioxidantes (SIES, 1999).

Estas terapias têm sido extensivamente estudadas a fim de que possam ser propostas como um método para amenizar e conter os danos celulares causados pelo estresse oxidativo. Neste contexto, diversos antioxidantes como o α -tocoferol, ácido ascórbico e o ácido lipoico têm sido utilizados, atingindo os mais variados graus de sucesso, no tratamento e prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo. Entretanto, mesmo que estes antioxidantes possam atuar diretamente sobre as EROs, eles não são capazes de reestabelecer os níveis de cisteína necessários para a síntese e reposição de glutathione reduzida (HALLIWELL, 1996). Para isso, a N-acetilcisteína destaca-se entre os demais antioxidantes, uma vez que sua administração leva a um aumento no fornecimento de cisteína e síntese de GSH, conseguindo desta forma prevenir a deficiência de GSH em uma grande diversidade de distúrbios em humanos e animais (RUSHWORTH E MEGSON, 2014; SAMUNI et al., 2013; SHAHRIPOUR et al., 2014).

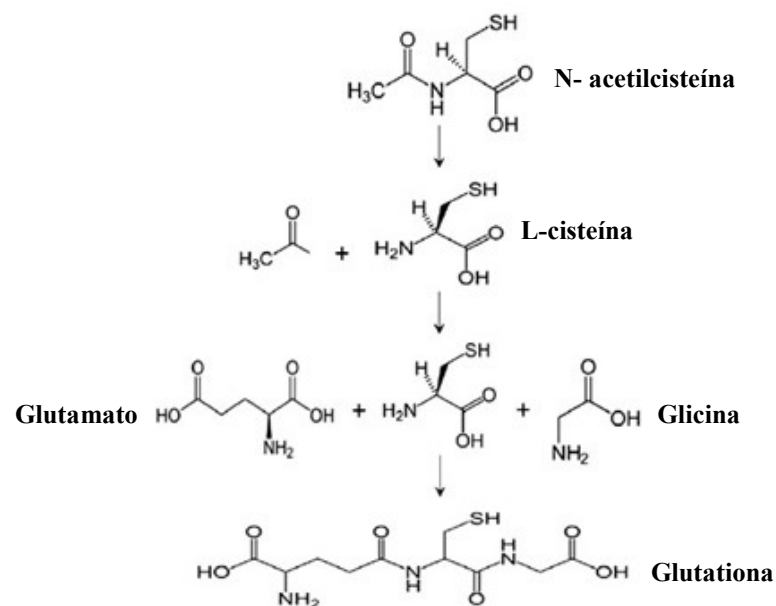
A N-acetilcisteína (Figura 4) é um precursor acetilado do aminoácido cisteína, estando farmacologicamente disponível nas formas intravenosa, oral e inalatória. Ela é utilizada na prática terapêutica a mais de 40 anos (LASRAM et al., 2015), primeiramente como agente mucolítico em pacientes com fibrose cística e posteriormente como antídoto para intoxicação por acetaminofeno (HUST et al., 1967). Diversos estudos vêm demonstrando o caráter promissor da NAC, uma vez que ela apresenta uma diversidade de efeitos positivos relacionados ao seu perfil “multi-alvo”, a qual apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatória, agindo também sobre a neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica (DEAN et al., 2011; SALEH, 2015).

A N-acetilcisteína sendo fonte de grupos sulfidril, estimula a atividade da glutathione S-transferase e conseqüentemente promove a detoxificação e age como *scavenger* de radicais livres devido a sua interação direta com as EROs (DODD et al., 2008). Porém, são necessárias concentrações dez vezes maiores desse antioxidante para exercer atividade equivalente à GSH como *scavenger* de EROs (GIBSON et al. 2009). Portanto, é provável que a maioria dos efeitos antioxidantes atribuídos à N-acetilcisteína seja devido ao aumento dos níveis intracelulares de GSH (RUSHWORTH E MEGSON, 2014), uma vez que é difícil discernir os efeitos diretos exercidos pela N-acetilcisteína daqueles desempenhados pela GSH (SAMUNI et al., 2013).

Apesar disso, estudos recentes têm indicado que a N-acetilcisteína pode aumentar a resiliência ao estresse (MOCELIN et al., 2015) e agir com um ansiolítico (SANTOS et al.,

2017). Do mesmo modo, a NAC foi capaz de aumentar a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) no córtex de ratos e reverter a atrofia induzida pela administração de aspartame. Este aumento na expressão do BDNF, o qual é importante para a proteção dos neurônios e para aprendizagem e memória de longo prazo, se deve aos efeitos anti-neuroinflamatório e neuroprotetor da NAC (SALEH, 2015). Sendo assim, a N-acetilcisteína com seu perfil “multi-alvo”, parece ser uma opção interessante a ser estudada, uma vez que sua administração pode fornecer uma nova estratégia terapêutica de neuroproteção para as alterações causadas pela neurotoxicidade do aspartame.

Figura 4 – N-acetilcisteína, precursora de cisteína, aminoácido limitante na síntese da GSH.



Fonte: Adaptada de LASRAM et al., 2015.

3 MANUSCRITO

O manuscrito está disposto conforme as normas requisitadas pela revista *Nutritional Neuroscience*, a qual foi submetido para publicação.

Effects of N-acetylcysteine on behavior, thioredoxin and glutathione-related antioxidant systems in brain regions of aspartame-treated mice

Caroline Azzolin Bressan¹, Tanise da Silva Pês¹, Kalyne Bertolin², Salvador Pérez Garrido³, Clarissa Vasconcelos de Oliveira⁴, Jéssica Grigoletto⁵, Victor dos Santos Barboza¹, Paulo Bayard Dias Gonçalves², Mauro Schneider Oliveira¹, Susana Francisca Llesuy⁶, Isabela Andres Finamor¹, Maria Amália Pavanato^{1,*}

¹*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil*

²*Department of Clinical of Large Animals, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil*

³*Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain*

⁴*Department of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Palmeira das Missões, Rio Grande do Sul 98300-000, Brazil*

⁵*Faculdade do Centro Mato-Grossense (FACEM), Sorriso, Mato Grosso 78890-000, Brazil*

⁶*Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, University of Buenos Aires (UBA), Buenos Aires, Argentina*

*Corresponding author: Maria Amália Pavanato

Tel./fax: + 55 55 32209381

E-mail address: amaliapavanato@yahoo.com.br

Effects of N-acetylcysteine on behavior, thioredoxin and glutathione-related antioxidant systems in brain regions of aspartame-treated mice

Objectives: Aspartame is one of the most popular sweeteners in the world. Several studies have linked its use to a dysregulation of glutathione homeostasis in the brain, making it more susceptible to oxidative stress. The aim of the present study was to evaluate the effects of N-acetylcysteine (NAC) on mice behavior as well as on thioredoxin and glutathione-related antioxidant systems in brain regions of aspartame-treated mice.

Methods: Adult Swiss mice were treated with aspartame (80 mg/kg, v.o.) for 90 days, and from day 60 to day 90, immediately after aspartame treatment, the mice received NAC (163 mg/kg, i.p.). After the last doses, the animals were subject to the open-field test. After it, they were anesthetized and euthanized for brain removal. The analyzes were performed in cortex, cerebellum and hippocampus. **Results:** Mice treated with aspartame plus NAC showed a decrease in the number of crossings and an increase the percentage of time spent in the center in relation to both control and aspartame-treated animals. Aspartame administration caused a severe depletion of non-protein thiols levels, as well as glutathione peroxidase activity. Both changes were restored by NAC treatment. Aspartame also triggered a decrease in the mRNA levels of catalytic subunit of glutamate cysteine ligase (Gclc) and cystathionine gamma-lyase (Cth). NAC treatment restored Gclc mRNA levels.

Conclusion: NAC treatment restored most of changes in glutathione-related system in brain regions of mice after chronic intake of aspartame.

Keywords: N-acetylcysteine; aspartame; behavior; glutathione; thioredoxin; cortex; cerebellum; hippocampus.

Introduction

Nowadays, with increasing rates of obesity and diabetes mellitus, low and no-calorie sweeteners have attracted attention as alternatives to sucrose in calorie and sugar restriction diets¹. Aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) is one of the most widely used low-calorie sweeteners in the world, being present in a range of products such as tabletop sweeteners, beverages, desserts, chewing gums, and more than 600 pharmaceutical products². It is metabolized by esterases and peptidases in the gastrointestinal tract to phenylalanine (50%), aspartic acid (40%) and methanol (10%)³. Although aspartame is approved by the

FDA since 1981, its use is still controversial, since the aspartame has been associated with neurological and behavioral symptoms such as a headache, dizziness, mood swings and even convulsions, which are related to the effect of phenylalanine from aspartame on brain functions⁴.

Several studies have shown the harmful effects of aspartame metabolites on the brain after the consumption of this artificial sweetener^{3,5}. The first two metabolites, phenylalanine, and aspartic acid are amino acids that are captured through the blood-brain barrier and can trigger important changes in monoamines levels and neuronal necrosis induced by excitotoxicity, respectively⁶⁻⁷. Methanol, on the other hand, is metabolized into formaldehyde and formic acid, which are extremely cytotoxic, and have been associated with severe depletion of glutathione levels and altered activity of glutathione-related enzymes, resulting in a situation known as oxidative stress⁸⁻⁹.

Indeed, a research from our group showed that oxidative stress in the whole brain is associated with chronic aspartame intake¹⁰. Our group also described that such consumption causes glutathione depletion and significant changes in glutathione-related system¹⁰⁻¹¹ by blocking the trans-sulphuration pathway in two-steps: cystathionine gamma-lyase, and methionine adenosyltransferases. It also decreases Gclc mRNA and protein levels in the liver. This blockage results in a reduction in cysteine levels, which is a limiting precursor of glutathione synthesis in the liver¹¹. However, the effects of the aspartame on thioredoxin-related system are unknown. Such studies revealed that NAC restored glutathione levels, glutathione-related enzymes and impairment of the trans-sulphuration pathway. Such effects are also unknown in the different brain regions.

N-acetylcysteine (NAC) is an acetylated precursor of the amino acid L-cysteine. It is used in the clinic as an antidote to acetaminophen poisoning and in the treatment of a wide range of pathologies, such as cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease, diabetes mellitus, HIV/AIDS and some psychiatric disorders¹². The diversity of beneficial effects described for NAC to date is due to its “multi-target” profile. Several studies have demonstrated that NAC is able to modulate the antioxidant, inflammatory, glutamatergic and neurotrophic pathways¹³⁻¹⁵. The antioxidant activity attributed to NAC is due to its ability to interact directly with reactive oxygen species, acting as a scavenger; but its main role as a therapeutic antioxidant stems from its role as a precursor of cysteine, the limiting amino acid of glutathione synthesis¹⁶. The aim of this study was to determine the effect of NAC on mice behavior, thioredoxin and glutathione-related antioxidant system in brain regions of aspartame-treated mice.

Material and Methods

Chemicals

All reagent-grade chemicals for oxidative parameters assays were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Animals

Male Swiss mice (30±6 g b.w.) were obtained from Central Animal Facility of Federal University of Santa Maria (Brazil). The animals were kept in polypropylene cages with access to water and standard rodent chow (Supra, São Leopoldo, Brazil) *ad libitum*. Ideal conditions of temperature and humidity were maintained, as well as a light/dark cycle of 12 hours. The study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Santa Maria (#001/2015).

Experimental protocol

Mice (n=24) were randomly divided into three groups with eight animals each: control, aspartame (ASP) and aspartame treated with NAC (ASP-NAC). The first group received vehicle (0.9% NaCl) by gavage for 90 days, whereas the others groups received aspartame (80 mg/kg, 2.5 mL/kg, prepared in 0.9% NaCl solution). In the last 30 days of experimental period, animals from ASP-NAC group immediately after administration of aspartame received NAC (163 mg/kg, pH 6.8-7.2) intraperitoneally, whereas the others received vehicle. All treatments were prepared daily before administration. During the last week of the experimental period, the mice were subject to the open field test.

At the end of experimental period and three hours after the last treatment, mice were anesthetized with isoflurane inhaled at 3% and euthanized by exsanguination and the cortex, cerebellum and hippocampus were immediately dissected.

Behavioral test

The open field test was performed as described by Rubin et al. (2004)¹⁷. The latency to leave the central area and to begin exploration of the open field was measured as an index of anxiety-like behavior, as well as the time spent in the central areas. The numbers of crossings

by the areas, as well the number of rearings were recorded for 10 minutes. All of these parameters were used to assess spontaneous locomotor activity and anxiety-like behavior.

Assays

Determination of oxidative parameters

Frozen cortex and cerebellum samples were individually homogenized in 154 mmol L⁻¹ KCl containing 1 mmol L⁻¹ phenylmethylsulfonyl fluoride and centrifuged at 700g for 10 min at 4°C to discard the nucleus and cell debris. The supernatant were frozen at -80°C to future measurements.

Lipid peroxidation was determined at 560 nm, as the amount of lipid hydroperoxides (LOOH), according the method of xylenol orange¹⁸. Lipid hydroperoxides were expressed as nmol mg protein⁻¹.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using a reaction coupled with GR, in presence of GSH and NADPH, as described by Flohé and Gunzler (1984)¹⁹. GPx uses NADPH as a cofactor in the reduction of *t*-butyl hydroperoxide, generating the oxidized glutathione. The reduction of NADPH to NADP⁺ results in a decrease in absorbance at 340 nm. GPx activity was expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ using $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mmol cm}^{-1}$.

Glutathione reductase (GR) activity was measured by the NADPH consumption ratio at 340 nm using $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mmol cm}^{-1}$, as described by Carlberg and Mannervick (1985)²⁰. GR activity was expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

Thioredoxin reductase (Trx-R) activity was measured by the reduction of 5,5'-dithiobis-(2-dinitrobenzoic acid) (DTNB) in the presence of NADPH, as described by Holmgren and Björnstedt (1995)²¹. The reduction of DTNB to TNB results in an increase in absorbance at 412 nm. Trx-R activity was expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ using $\epsilon_{412} = 13.6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Content of non-protein thiols (NPSH) are an indirect measure of GSH, where DTNB forms a complex yellow colored with GSH, whose absorbance peak occurs at 412 nm (Ellman, 1959)²². The content of non-protein thiols were expressed as $\text{nmol mg protein}^{-1}$ using $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mmol cm}^{-1}$.

Protein content of cortex and cerebellum was measured by the method of Lowry et al. (1951)²³ to normalize LOOH, GPx, GR, NPSH and TrxR, using bovine serum albumin as standard.

RNA isolation, Reverse Transcription and Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Total RNA from cortex and hippocampus was extracted using TRIzol® as per instructions of manufacturer. Quantification of RNA was performed using a Nano-Drop spectrophotometer, and the RNA purity was assessed by the 260/280 nm absorbance ratio (Thermo Scientific). RNA was treated with 0.1U DNase Amplification Grade (Invitrogen) for 15 min at 27°C, followed by DNase inactivation with 1µl of EDTA at 65°C for 10min. Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 300 ng of total RNA with random hexamer primers using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative polymerase chain reactions (qRT-PCR) were conducted in a CFX384 thermocycler (BioRad) using BRYT Green® dye and Taq DNA polymerase from GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation), with 12.5 ng of cDNA in 10µl. A common thermal cycling program (standard two-step qRT-PCR with initial denaturation at 95°C for 3 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute) was used to amplify each transcript. Melting curve analyses were performed to verify product identity. Primers were validated by standard curves and the sequences are listed in Table 1. Reactions with a coefficient of determination (R²) higher than 0.98 and efficiency between 85 to 110% were considered optimized. Samples were run in duplicate and the results are expressed relative to Gapdh levels. Data were then normalized to a calibrator sample using $\Delta\Delta C_q$ method as previously described by Pfaffl (2001)²⁴.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed in Statistica® 7.0 software. Levene's test was used to verify the homogeneity of variances. When parametric, data were compared by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer Multiple Comparisons test. When non-parametric, the data were compared by Kruskal-Wallis ANOVA. Results are reported as mean \pm standard error of mean (SEM) and differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of NAC on spontaneous locomotor activity and anxiety-like behavior of aspartame-treated mice

No significant differences in latency to leave the center area and in the number of rearings were observed in aspartame plus NAC treated mice. The animals treated with aspartame plus NAC showed a decrease in the number of crossings and an increase in the percentage of time spent in the center related to the control and ASP groups ($P < 0.05$) (Table 2).

Effect of NAC on lipid peroxidation in brain of aspartame-treated mice

Lipid hydroperoxides content was unchanged across the different experimental groups in both cortex and cerebellum ($P < 0.05$). All data are shown in Table 3.

Effect of NAC on glutathione-related system in brain of aspartame-treated mice

Aspartame administration caused a decrease in GPx activity in the cortex ($P = 0.000140$ vs control) and cerebellum ($P = 0.016190$ vs control) (Fig. 1A and Fig. 1D, respectively). NAC treatment was able to restore its activity in both cortex ($P = 0.000140$ vs ASP) and cerebellum ($P = 0.000426$ vs control; $P = 0.000140$ vs ASP). GR activity was unchanged across the different experimental groups in both cortex and cerebellum ($P > 0.05$) (Fig. 1B and Fig. 1E, respectively). Aspartame administration also led to a severe depletion in non-protein thiols in cortex ($P = 0.004994$ vs control) and cerebellum ($P = 0.004110$ vs control) (Fig. 1C and Fig. 1F, respectively). NAC treatment restored such depletion in aspartame-treated mice, leading to normal NPSH levels in both cortex ($P = 0.004307$ vs ASP) and cerebellum ($P = 0.004849$ vs ASP).

Effect of NAC on thioredoxin-related system in brain of aspartame-treated mice

Trx-R activity was unchanged across the different experimental groups in both cortex and cerebellum ($P > 0.05$) (Table 4). Trx1 mRNA levels were unchanged across the different experimental groups in both cortex and hippocampus ($P > 0.05$) (Table 5).

Effect of NAC on gene expression of γ -glutamylcysteine ligase and cystathionine γ -lyase in brain of aspartame-treated mice

Aspartame administration caused a downregulation of Gclc ($P = 0.0326657$ vs control) and Cth ($P = 0.005002$ vs control) mRNA levels in cortex (Fig. 2A and Fig. 2B, respectively). NAC

treatment restored Gclc mRNA levels in cortex ($P=0.009195$ vs ASP) (Fig. 2A). Aspartame administration also led to a decrease in Gclc ($P=0.023873$ vs control) and Cth ($P=0.000229$ vs control) mRNA levels in hippocampus (Fig. 3A and Fig. 3B, respectively). NAC treatment did not be able to restore Gclc and Cth mRNA levels ($P>0.05$) (Fig. 3A and Fig. 3B, respectively).

Discussion

The Food and Drug Administration (FDA) approved the intake of aspartame in 1981 as a sweetener and flavor enhancer. Since then people worldwide have consumed it, including diabetic individuals⁴. However, aspartame has been linked to brain toxicity. Aya-Ramos et al. (2017)²⁵, for example, described that the combination of early stress and the exposure to aspartame is a risk factor for the development of diabetes mellitus and behavior alterations. Moreover, Ashok and Sheeladevi (2014)⁵ showed that long-term intake of aspartame causes brain apoptosis through mitochondrial oxidative stress, changing its antioxidant status, leading, in special, to GSH depletion. Such effect was ascribed to methanol, whose levels were found high in the plasma of the aspartame-treated rats. Indeed, GSH depletion is a key feature in the aspartame-induced brain toxicity^{26,10,5}. Nevertheless, the effects of NAC administration on mice behavior, thioredoxin and GSH-related antioxidant systems in brain regions of aspartame-treated mice are still unknown.

Thioredoxin and GSH systems play a very important role in redox balance in the brain, as well as important roles in basic cellular processes such as DNA synthesis, protein maturation and cellular signaling²⁷. In this way, the dysregulation of one of these systems may contribute to the development of several diseases, including psychiatric disorders²⁸. In fact, in some cases, both systems intercommunicate and back each other up, since GSH together with the glutaredoxin 1 can reduce thioredoxin 1 (Trx1) when thioredoxin reductase (TrxR1) is inhibited²⁹. Our results suggest that different from GSH, thioredoxin-related system is not related to aspartame toxicity, since after aspartame treatment no changes are observed in the Trx1 mRNA levels and TrxR activity.

As mentioned before, GSH depletion is a hallmark of aspartame-induced toxicity. Recently, a research from our group found that a reason for such modification is related to the blockade of the trans-sulphuration pathway in the liver¹¹. The trans-sulphuration pathway in the brain until recently was considered as not functional, however, it is now known that, although on a smaller scale than the liver, the trans-sulphuration pathway is actually

functional in the brain³⁰. Our results reinforce that GSH depletion results from the impairment of the trans-sulphuration pathway, since aspartame causes decrease in Gclc and Cth mRNA levels. Under normal physiological conditions, the synthesis of GSH will be determined by two main factors: the activity of GCL and the availability of cysteine. The GCL is an enzyme responsible for producing γ - glutamylcysteine from glutamate and cysteine in the first reaction of GSH synthesis, making its presence extremely important for GSH production²⁸. The CTH, on the other hand, is one of the last enzymes of trans-sulphuration pathway, responsible for the conversion of cystathionine to cysteine. The cysteine produced by this enzyme contributes less to GSH synthesis in the brain (23-40%) compared to the liver (50%), but this contribution is no less significant³⁰. Therefore, our results suggest that the downregulation of Cth mRNA could cause reduction in cysteine levels. On the other hand, the downregulation of Gcl mRNA could result in less production of γ -glutamylcysteine, thus impairing GSH synthesis. GSH is a substrate for GPx, thus our results suggest that GSH depletion could be the responsible for the diminution in its enzymatic activity.

Considering the role of GSH levels depletion in the mechanism of action of aspartame, drugs that increase GSH levels and GSH-related enzymes may be useful. NAC is able to increase the cysteine supply, raising the GSH levels and preventing its deficiency in a wide variety of disorders in which it is used and presented great therapeutic potential^{12,16}. In addition, a growing number of clinical data have demonstrated its antidepressant and anxiolytic properties³¹⁻³². Our results suggest an anxiolytic effect of NAC in aspartame-treated animals, which showed a reduction in the number of crossings and an increase in the time spent on center area. Such effect could be attributed to the glutamatergic modulatory property of NAC, which promotes glutamate release, extra-synaptically stimulating mGlu_{2/3} receptor, thereby decreasing glutamatergic neurotransmission¹⁵.

In conclusion, although aspartame did not alter the thioredoxin system, its administration led to a severe GSH depletion, which could be due to a decrease in Gclc and Cth mRNA levels. Such GSH depletion results in the reduction of the GPx activity. Moreover, NAC exhibited an anxiolytic effect in aspartame-treated animals. Nevertheless, NAC restored most of changes in GSH-related system in brain regions of mice after chronic intake of aspartame.

References

- 1 Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr Rev* 2016 Nov; 74 (11): 670-689.
- 2 Choudhary AK, Pretorius E. revisiting the safety of aspartame. *Nutr Rev* 2017 Sep 1;75 (9):718-730.
- 3 Abdel-Salam OM, Salem NA, El-Shamarka ME, Hussein JS, Ahmed NA, El-Nagar ME. Studies on effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Dec; 16(15):2092-101.
- 4 Butchko HH, Stargel WW, Comer CP, Mayhew DA, Benninger C, Blackburn GL, *et al*. Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2002 Apr; 35(2 Pt 2): S1-93.
- 5 Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. *Redox Biol*. 2014 Apr;2:820-831.
- 6 Coulombe RA Jr, Sharma RP. Neurobiochemical alterations induced by the artificial sweetener aspartame (NutraSweet). *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986 Mar 30;83(1):79-85.
- 7 Daabees TT, Finkelstein MW, Stegink LD, Applebaum AE. Correlation of glutamate plus aspartate dose, plasma amino acid concentration and neuronal necrosis in infant mice. *Food Chem Toxicol*. 1985 Oct; 23(10): 887-93.
- 8 Skrzydlewska E, Farbiszewski R. Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. *Arch Toxicol*. 1997; 71(12):741-5.
- 9 Skrzydlewska E, Witek A, Farbiszewski R. The comparison of the antioxidant defense potential of brain to liver of rats after methanol ingestion. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1998 Aug;120(2):289-94.
- 10 Finamor IA, Ourique GM, Pês TS, Saccol EMH, Bressan CA *et al*. The protective effect of *N*-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. *Neurochem Res*. 2014 Sep;39(9):1681-90.
- 11 Finamor IA, Pérez S, Bressan CA, Brenner CE, Rius-Pérez S, Brittes PC *et al*. Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:701-707.
- 12 Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of *N*-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Aug;1830(8):4117-29.

- 13 Chen G, Shi J, Hu Z, Hang C. Inhibitory effect on cerebral inflammatory response following traumatic brain injury in rats: a potential neuroprotective mechanism of N-acetylcysteine. *Mediators Inflamm.* 2008 Mar; 2008:1-8
- 14 Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Dec;8(12):1955-62.
- 15 Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 2011 Mar;36(2):78-86.
- 16 Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther.* 2014 Feb;141(2):150-9.
- 17 Rubin MA, Barlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TLB *et al.* Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci.* 2004 Mar;24(9):2328-2334.
- 18 Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1991 Oct;26(10):853-6.
- 19 Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
- 20 Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985;113:484-90.
- 21 Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 1995;252:199-208.
- 22 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 May;82(1):70-7.
- 23 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
- 24 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- 25 Aya-Ramos L, Contreras-Vargas C, Rico JL, Dueñas Z. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct.* 2017 Jul 19;8(7):2592-2600.
- 26 Mourad IM, Noor NA. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. *Int J Pharm Biomed Sci.* 2011 Apr;2(1):4-10.

- 27 Benhar M, Shytaj IL, Stamler JS, Savarino A. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV. *J Clin Invest*. 2016 May 2;126(5):1630-9.
- 28 Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015 Jan;18(1):89-95.
- 29 Du Y, Zhang H, Lu J, Holmgren A. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):38210-9.
- 30 McBean GJ. The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino Acids*. 2012 Jan;42(1):199-205.
- 31 Mocelin R, Herrmann AP, Marcon M, Rambo CL, Rohden A, Bevilaqua F et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015 Dec;139 Pt B:121-6.
- 32 Santos P, Herrmann AP, Benvenuti R, Noetzold G, Giongo F, Gama CS et al. Anxiolytic properties of N-acetylcysteine in mice. *Behav Brain Res*. 2017 Jan 15;317:461-469.

Figure 1. Effect of N-acetylcysteine on GPx (A), GR (B) activities and NPSH (C) content in the cortex, and on GPx (D), GR (E) activities and NPSH (F) content in cerebellum of aspartame-treated mice. Each bar represents the Mean \pm S.E.M. (n=8). * Denotes that the data are significantly different from the control group at P<0.05. # Denotes that the data are significantly different from ASP group at P<0.05.

Figure 2. Effect of N-acetylcysteine (163 mg/kg) on Gclc (A) and Cth (B) mRNA level in cortex of aspartame-treated mice. Each bar represents the Mean \pm S.E.M. (n=8). * Denotes that the data are significantly different from the control group at P<0.05. # Denotes that the data are significantly different from ASP group at P<0.05.

Figure 3. Effect of N-acetylcysteine (163 mg/kg) on Gclc (A) and Cth (B) mRNA level in hippocampus of aspartame-treated mice. Each bar represents the Mean \pm S.E.M. (n=8). * Denotes that the data are significantly different from the control group at P<0.05. # Denotes that the data are significantly different from ASP group at P<0.05.

Table 1. qRT-PCR primer sequences

Targets	Sequences
<i>Gclc</i>	F – CCATCACTTCATTCCCCAGA
	R – GATGCCGGATGTTTCTTGTT
<i>Cth</i>	F – TTTGAATACAGCCGCTCTGGA
	R – GGTAATCGTAATGGTGGCAGC
<i>Txn1</i>	F – CCAATGTGGTGTTTCCTTGAA
	R – AGGCTTCAAGCTTTTCCTTG
<i>Gapdh</i>	F – GGGCATCTTGGGCTACAC
	R – GGTCCAGGGTTTCTTACTCC

Abbreviations: *Gclc*, catalytic subunit of glutamate cysteine ligase; *Cth*, Cystathionine γ -lygase; *Txn1*, thioredoxin 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Table 2. Effects of N-acetylcysteine in locomotor activity behavior of aspartame-treated mice by open field.

Parameter	Control	ASP	ASP-NAC
Latency	5.00±0.41	7,57±1,94	8,86±1,97
Crossing	190.57±9,67	164.71±8,53	106.43±10.42* [#]
Rearing	23.00±3.63	14.50±3,51	27.40±9,79
% time spent on center	15.09±1,29	13.48±1.09	21.57±1.57* [#]

Data are presented as the Mean ± S.E.M. (n=8). * Denotes that the data are significantly different from control group at P<0.05. [#] Denotes that the data are significantly different from ASP group at P<0.05.

Table 3. Lipid hydroperoxides content in cortex and cerebellum for the experimental groups treated with ASP alone or in combination with NAC.

Experimental groups		
	Cortex	Cerebellum
Control	2.40±0.37	2.17±0.26
ASP	2.53±0.31	2.71±0.22
ASP-NAC	1.82±0.24	2.14±0.28

Lipid hydroperoxides content (nmol mg protein⁻¹). Data are presented as Mean ± S.E.M. (n=8). Mean obtained showed no significant difference (P>0,05).

Table 4. Thioredoxin reductase activity in cortex and cerebellum for the experimental groups treated with ASP alone or in combination with NAC

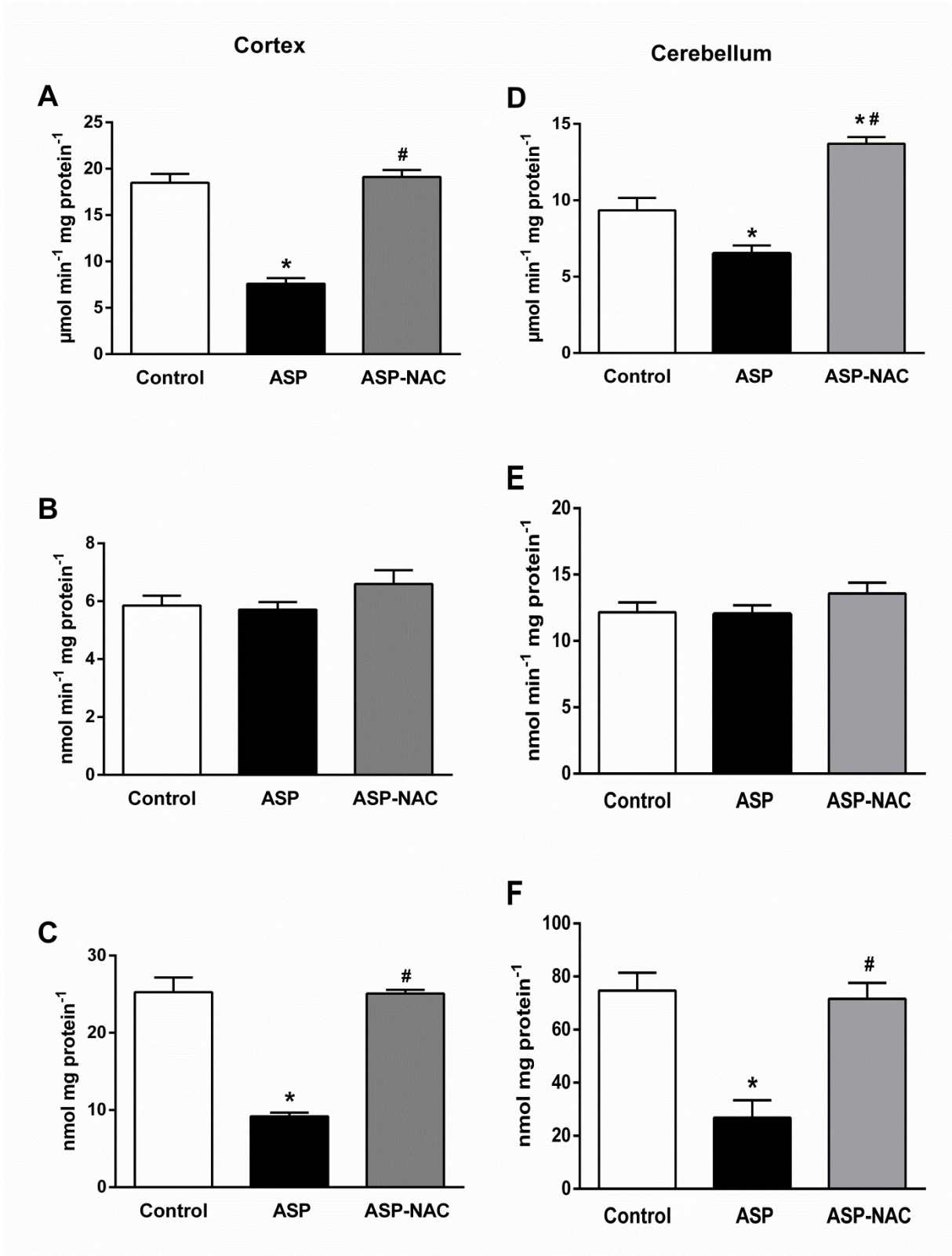
Experimental groups	Cortex	Cerebellum
Control	0.08±0.02	0.07±0.003
ASP	0.05±0.005	0.06±0.004
ASP-NAC	0.06±0.01	0.07±0.004

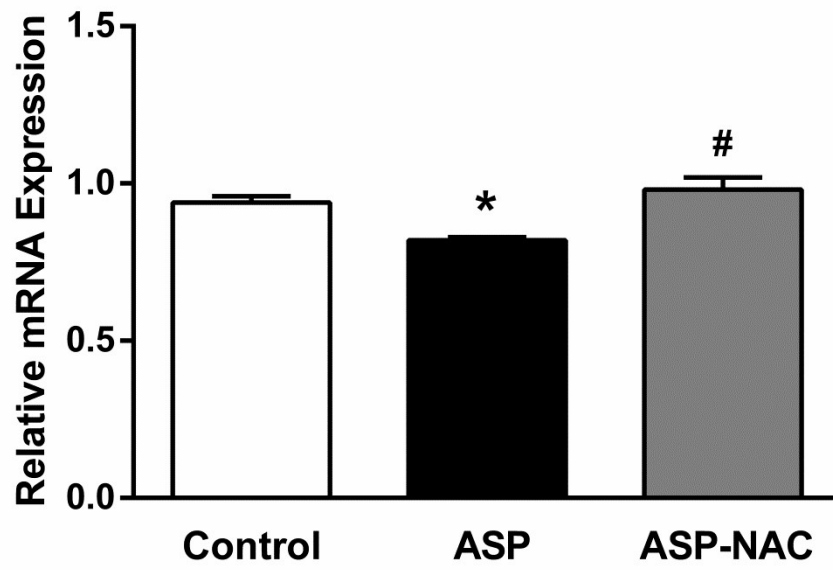
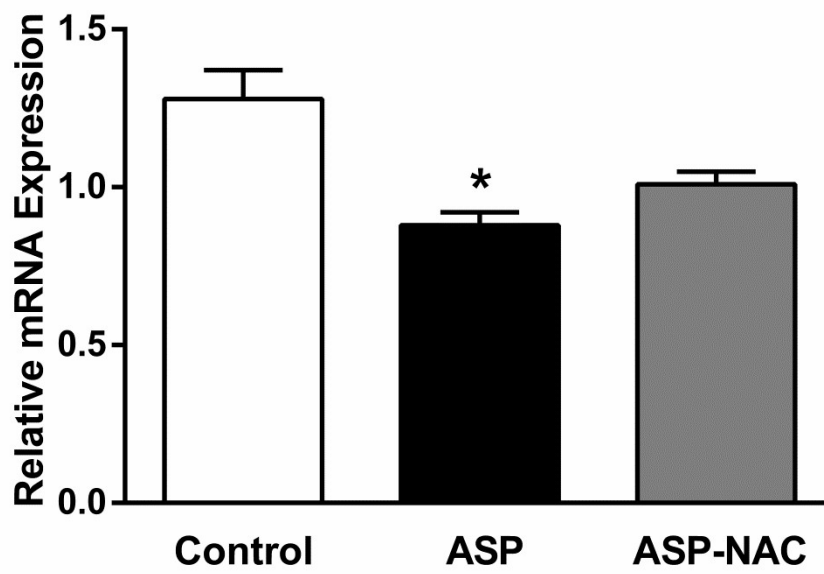
Thioredoxin reductase ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$). Data are presented as Mean \pm S.E.M. (n=8). Mean obtained showed no significant difference ($P>0,05$).

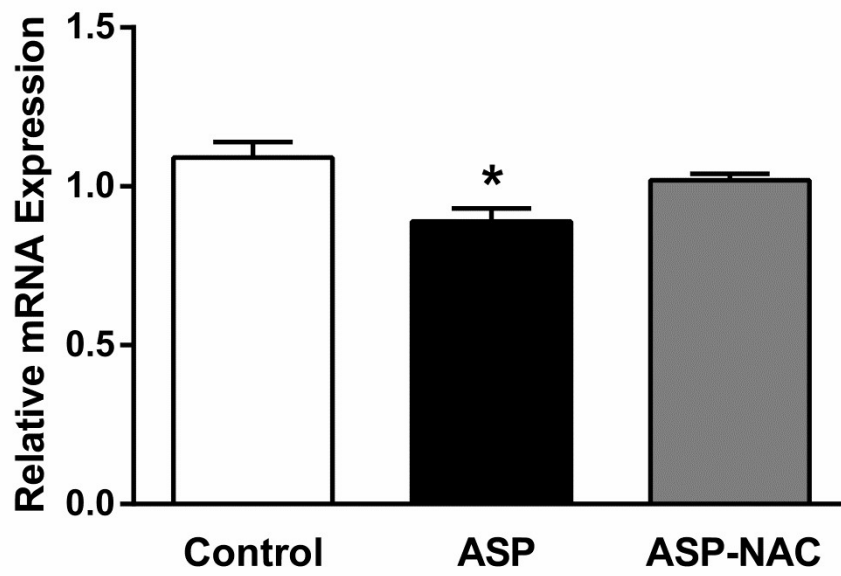
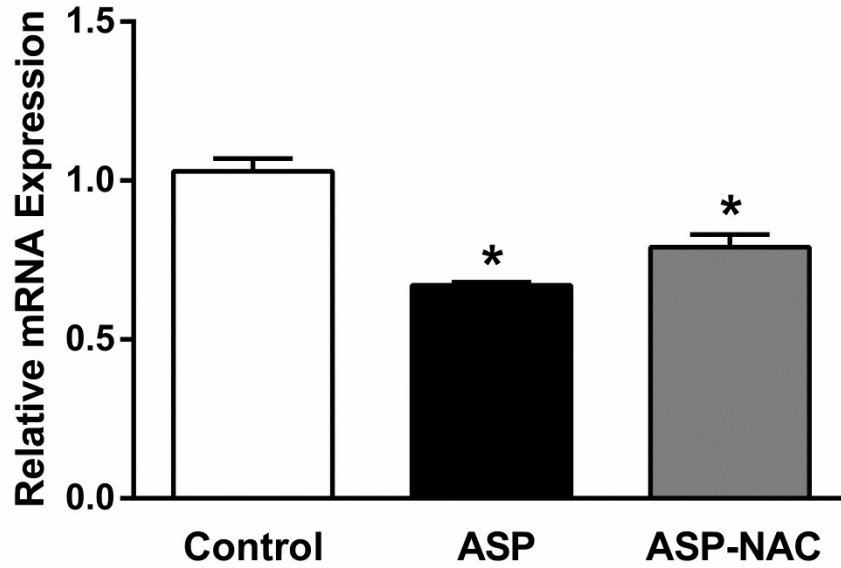
Table 5. mRNA expression of Thioredoxin 1 (*Txn1*) in cortex and hippocampus for the experimental groups treated with ASP alone or in combination with NAC.

Experimental groups	Cortex	Hippocampus
Control	1.05±0.05	0.96±0.02
ASP	0.86±0.05	0.88±0.03
ASP-NAC	1.10±0.09	0.82±0.04

Gene is presented by relative expression corrected by amplification of GAPDH. Data are presented as Mean ± S.E.M. (n=8). Mean obtained showed no significant difference (P>0,05).



A**B**

A**B**

5 CONCLUSÃO

O consumo a longo prazo de 80 mg/kg de aspartame por camundongos induz alterações no sistema antioxidante relacionado a glutathione, através da depleção dos níveis de tiois não proteicos e a consequente diminuição da atividade da glutathione peroxidase, assim como através de sua interferência na expressão gênica da Gclc e da Cth. Neste estudo, se buscou saber os efeitos da administração de aspartame sobre o sistema da tioredoxina, porém os resultados sugerem que os mecanismos de ação da toxicidade do aspartame parecem estar mais relacionados ao sistema da glutathione. No entanto, considerando que apesar dos diversos efeitos negativos a saúde, este edulcorante é essencial para muitos indivíduos, como portadores de diabetes mellitus, obesidade mórbida, ou mesmo aqueles que buscam o controle e a perda de peso, os resultados deste estudo fornecem algumas evidências de que a N-acetilcisteína é capaz de reverter a maior parte das alterações causadas por este edulcorante. Estudos adicionais são necessários para elucidar as vias de sinalização envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O.M.E et al. Studies on effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.16, n.15, p. 2092-101, Dec. 2012. Disponível em: < <http://www.europeanreview.org/article/1241>>. Acesso em: 15 jul. 2017.
- ABHILASH, M. et al. Effect of long-term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. **Food Chem Toxicol**, v.49, n. 6, p. 1203-1207, Jun. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511000639?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 jan. 2017. DOI: 10.1016/j.fct.2011.02.019.
- ABHILASH, M. et al. Long-term consumption of aspartame and brain antioxidant defense status. **Drug Chem Toxicol**, v. 36, n. 2, p. 135-140, Apr. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01480545.2012.658403>>. Acesso em: 25 jan. 2017. DOI: 10.3109/01480545.2012.658403.
- ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. **J Acad Nutr Diet.**, v. 112, n. 5, p. 739-758, May 2012. Disponível em: < <http://www.eatrightpro.org/resource/practice/position-and-practice-papers/position-papers/use-of-nutritive-and-nonnutritive-sweeteners>>. Acesso em: 23 dez. 2017. DOI: 10.1016/j.jand.2012.03.009.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. **J Am Diet Assoc.**, v. 104, n. 2, p. 255-275, Feb. 2004. Disponível em: < [http://jandonline.org/article/S0002-8223\(03\)01658-4/fulltext](http://jandonline.org/article/S0002-8223(03)01658-4/fulltext)>. Acesso em: . DOI: 10.1016/j.jada.2003.12.001
- ARNÉR, E. R.; NORDBERG, J.; HOLMGREM, A. Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 225, n. 1, p. 268-274, Aug. 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X96911651?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 nov. 2017. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1165.
- ASHOK, I.; SHEELADEVI, R.; WANKHAR, D. Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. **J Biomed Res**, v. 29, n. 5, p. 390-396, Sep. 2015. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4585433/>>. Acesso em: 01 fev. 2016. DOI: 10.7555/JBR.28.20120118.
- ASHOK, I; SHEELADEVI, R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term of aspartame in rat brain. **Redox Biol.**, v. 2, p. 820-831, Apr. 2014. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4085354/>>. Acesso em: 14 out. 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2014.04.011.
- BENHAR, M. et al. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV. **J Clin Invest**, v. 126, n. 5, p. 1630-1639, May 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855928/>>. Acesso em: 02 nov. 2017. DOI: 10.1172/JCI85339.

BRADFORD, B. U. et al. Evidence that catalase is a major pathway of ethanol oxidation in vivo: dose–response studies in deer mice using methanol as a selective substrate. **Arch Biochem Biophys**, v. 303, n. 1, p. 172- 176, May 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986183712695?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 mar. 2016. DOI: 10.1006/abbi.1993.1269.

BRASIL. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 mar. 2016.

BRASIL. Portaria n. 1, de 07 de janeiro de 1988. Dispõe sobre suplementos dietéticos proteicos; produtos para dietas especiais, edulcorantes, produtos dietéticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 jan. 1988. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/68a41d0047458c489594d53fbc4c6735/PORTARIA_01_1988.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 mar. 2016.

BRASIL. Resolução RDC n. 18, de 24 de março de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos com seus respectivos limites máximos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mar. 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/00f52080443f051bb2eab24e461d9186/Microsoft+Word++Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+18,+de+24+de+mar%C3%A7o+de+2008.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 mai. 2016.

BUTCHKO, H. H. et al. Aspartame: review of safety. **Regul Toxicol Pharmacol**, v.35, n. 2, p. S1-S93, Apr. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230002915424>>. Acesso em: 11 fev. 2016. DOI: 10.1006/rtph.2002.1542.

CEDERBAUM, A. I.; QURESHI, A. Role of catalase and hydroxyl radicals in the oxidation of methanol by liver microsomes. **Biochem Pharmacol**, v.31, n. 3, p. 329-335, Feb. 1982. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295282901794?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 mar. 2016. DOI: 10.1016/0006-2952(82)90179-4.

CHOUDHARY, A. K.; PRETORIUS, E. Revisiting the safety of aspartame. **Nutr Rev.**, v. 75, n. 9, p. 718-730, Sep. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nutritionreviews/articleabstract/75/9/718/4101228?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 01 out. 2017. DOI: 10.1093/nutrit/nux035.

COULOMBE, R. A. Jr; SHARMA, R. P. Neurochemical alterations induced by artificial sweetener aspartame (NutraSweet). **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 83, n. 1, p. 79-85, Mar. 1986. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041008X86903248?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 mar. 2016. DOI: 10.1016/0041-008X(86)90324-8.

DAABEES, T. T. et al. Correlation of glutamate plus aspartate dose, plasma amino acid concentration and neuronal necrosis in infant mice. **Food Chem Toxicol.**, v. 23, n. 10, p. 887-893, Oct. 1985. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278691585901036>>. Acesso em: 11 mar. 2016. DOI: 10.1016/0278-6915(85)90103-6.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potencial mechanisms of action. **J Psychiatry Neurosci**, v. 36, n. 2, p. 78-86, Mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3044191/>>. Acesso em: 02 jul. 2016. DOI: 10.1503/jpn.100057.

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **Br J Nutr**, v. 80 (suppl 1), p. S77-112, Aug, 1998. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/functional-food-science-and-defence-against-reactive-oxidative-species/D63DEA9DF99A59E3394F233F15F09418>>. Acesso em: 26 jul. 2016. DOI: 10.1079/BJN19980106.

DIWAKAR, L.; RAVINDRANATH, V. Inhibition of cystathionine-gamma-lyase leads to loss of glutathione and aggravation of mitochondrial dysfunction mediated by excitatory amino acid in the CNS. **Neurochem Int**, v. 50, n. 2, p. 418-426, Jan. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018606002944?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 mai. 2017. DOI: 10.1016/j.neuint.2006.09.014

DODD, S. et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert Opin Biol Ther**, v. 8, n. 12, p. 1955-1962, Dec. 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728220802517901%20>>. Acesso em: 22 out. 2017. DOI: 10.1517/14728220802517901.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 16, p. 4912-4916, Aug. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.2000.01597.x/epdf>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

DU, Y. et al. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. **J Biol Chem**, v. 287, n. 45, p.38210-38219, Nov. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488090/>>. Acesso em: 30 nov. 2017. DOI: 10.1074/jbc.M112.392225.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. **The Journal EFSA**, v. 11, n. 12, p. 3496, 2013. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3496>>. Acesso em: 15 mar. 2016. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3496.

FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H.; GILLIS, M. A. Acute effects of aspartame on large neutral amino acids and monoamines in rat brain. **Life Sci.**, v. 32, n.14, p. 1651-1658, Apr. 1983. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6835009>>. Acesso em: 02 abr. 2016.

FERNSTROM, J. D. Oral aspartame and plasma phenylalanine: pharmacokinetic difference between rodents and man, and relevance to CNS effect of phenylalanine. **J Neural Transm.**, v. 75, n. 2, p. 159-164, Apr. 1989. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01677429>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

FINAMOR, I. A. et al. The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. **Neurochem Res**, v. 39, n. 9, p. 1681-1690, Sep. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-014-1360-9>>. Acesso em: 15 abr. 2016. DOI: 10.1007/s11064-014-1360-9.

GIBSON, K. R. et al. Evaluation of the antioxidant properties of N-acetylcysteine in human platelets: prerequisite for bioconversion to glutathione for antioxidant and antiplatelet activity. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 319-26, Oct. 2009. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=19668088>>. Acesso em: 07 jun. 2016. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181b6e77b.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 922-935, Nov. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584999001768?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 abr. 2016. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00176-8.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov. 1974. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/249/22/7130.long>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

HALLIWELL, B. Commentary Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radic Res**, v. 25, n. 1, p. 57-74, July 1996. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715769609145656>>. Acesso em: 02 jul 2017. DOI: 10.3109/10715769609145656.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine. 4. Ed. New York: Oxford University Press, 2008. 851 p.

HARRIS, C.; DIXON, M.; HANSEN, J. M. Glutathione depletion modulates methanol, formaldehyde and formate toxicity in cultured rat conceptuses. **Cell Biol Toxicol**, v. 20, n. 3, p. 133-145, May 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/B:CBTO.0000029466.08607.86>>. Acesso em: 10 mar. 2016. DOI: 10.1023/B:CBTO.0000029466.08607.86.

HUMPHRIES, P; PRETORIUS, E.; NAUDÉ, H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **Eur J Clin Nutr.**, v.62, n. 4, p.451-462, Apr. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1602866>>. Acesso em: 16 mar. 2016. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602866.

HUST, G. A.; SHAW, P. B.; LeMAISTRE, C. A. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine. **Am Rev Respir Dis**, v. 96, n. 5, p. 962-970, Nov. 1967. Disponível em:

<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/arrd.1967.96.5.962?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&>. Acesso em: 01 abr. 2016. DOI: 10.1164/arrd.1967.96.5.962.

IYYASWAMY, A.; RATHINASAMY, S. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. **J Biosci.**, v. 37, n. 4, p. 679-688, Sep. 2012. Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/037/04/0679-0688>>. Acesso em: 01 abr. 2016. DOI: 10.1007/s12038-012-9236-0.

JOHLIN, F. C. et al. Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. **Mol Pharmacol**, v. 31, n. 5, p. 557-561, May 1987. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/content/31/5/557.long>>. Acesso em: 05 mar. 2016.

KANDIL, S.; BRENNAN, L.; McBEAN, G.J. Glutathione depletion causes a JNK and p38^{MAPK}-mediated increase in expression of cystathionine- γ -lyase and upregulation of the transsulfuration pathway in C6 glioma cells. **Neurochem Int**, v. 56, n. 4, p. 611-619, Mar. 2010. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018610000227>. Acesso em: 23 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.01.004.

KOHÁRYOVÁ, M.; KOLLÁROVÁ, M. Thioredoxin system – a novel therapeutic target. **Gen Physiol Biophys**, v. 34, n. 3, p. 221-233, July 2015. Disponível em: <http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=4305&category_id=119&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1>. Acesso em: 01 dez. 2017. DOI: 10.4149/gpb_2015006.

LASRAM, M. M. et al. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. **Clin Biochem.**, v. 48, n. 16-17, p. 1200-1208, Nov. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912015001411?via%3Dihub>>. Acesso em: 07 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2015.04.017.

LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thioredoxin and related molecules – from biology to health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 1, p. 25-47, Jan. 2007. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2007.9.25>>. Acesso em: 23 nov. 2017. DOI: 10.1089/ars.2007.9.25.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Mol Aspects Med**, v.30, n.1-2, p. 42-59, Feb.-Apr. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704241/>>. Acesso em: 02 jul. 2017. DOI: 10.1016/j.mam.2008.05.005.

LU, J. et al. Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver. **FASEB J**, v.23, n. 8, p. 2394-2402, Aug. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717770/>>. Acesso em: 22 nov. 2017. DOI: 10.1096/fj.08-127662.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, v. 224, p. 164-175, Dec. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279714003044?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.

MAGNUSON, B. A. et al. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. **Crit Rev Toxicol.**, v. 37, n. 8, p. 629-727, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408440701516184>>. Acesso em 30 dez. 2017. DOI: 10.1080/10408440701516184.

MAGNUSON, B. A. et al. Biological fate of low-calorie sweeteners. **Nutr Rev.**, v.74, n. 11, p. 670-689, Nov. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/74/11/670/2281652>>. Acesso em: 16 set. 2017. DOI: 10.1093/nutrit/nuw032.

MAHER, T. J.; WURTMAN, R. J. Possible neurologic effects of aspartame, a widely used food additive. **Environ Health Perspect.**, v. 75, p. 53-57, Nov. 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1474447/>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY. Evaluation of consumer complaints related to aspartame use. **MMWR Morb Mortal Wkly Resp.**, v.33, n. 43, p. 605-607, Nov. 1984.

MATSUZAWA, A. Thioredoxin and redox signaling: roles of the thioredoxin system in control of cell fate. **Arch Biochem Biophys**, v. 617, p. 101-105, Mar 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000398611630354X?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 set. 2017. DOI: 10.1016/j.abb.2016.09.011.

MAY, J. M et al. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 36, p. 23039-23045, Sep. 1998. Disponível em: <www.jbc.org/content/273/36/23039.long>. Acesso em: 22 nov. 2017. DOI: 10.1074/jbc.273.36.23039.

MAY, J. M. et al. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. **J Biol Chem**, v. 272, n. 36, p. 22607-22610, Sep. 1997. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/272/36/22607.long>>. Acesso em: 22 nov. 2017. DOI: 10.1074/jbc.272.36.22607.

McMARTIN, K. E. et al. Lack of role for formaldehyde in methanol poisoning in the monkey. **Biochem Pharmacol**, v. 28, n. 5, p. 645-649, Mar. 1979. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295279901497?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 mar. 2016. DOI: 10.1016/0006-2952(79)90149-7.

MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 139 Pt B, p. 121-126, Dec. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305715300435?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 abr. 2016. DOI: 10.1016/j.pbb.2015.08.006.

MOURAD, I. M. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. **Afr J Pharm Pharmacol.**, v. 5, n. 6, p. 678-682, June 2011. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/article/article1380804345_Mourad.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2016.

MOURAD, I. M.; NOOR, N. A. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. **Int J Pharm Biomed Sci.**, v.2, n.1, p.4-10, Apr. 2011.

Disponível em:

<http://scholar.cu.edu.eg/?q=science_sector_publications/publications/aspartame-widely-used-artificial-sweetener-and-oxidative-st>. Acesso em: 10 mar. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. 5. Ed. São Paulo: Ed. Artmed, 2010. 1304 p.

NIKI, E. Action of ascorbic as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **Am J Clin Nutr**, v. 54, n. 6 suppl., p. 1110S-1124S, Dec. 1991. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21192563_Action_of_ascorbic_acid_as_a_scavenger_of_active_and_stable_oxygen_radicals>. Acesso em: 02 fev. 2018. DOI: 10.1093/ajcn/54.6.1119s.

NIKI, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 3-12, Jan. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/236113048_Role_of_vitamin_E_as_lipid-soluble_peroxy_radical_scavengerIn_vitro_and_in_vivo_evidence>. Acesso em: 02 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022.

PAJARES, M. A.; PÉREZ-SALA, D. Mammalian sulfur amino acid metabolism: a nexus between redox regulation, nutrition, epigenetics and detoxification. **Antioxid Redox Signal**, p. 1-129, Jan 2018. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7237>>. Acesso em: 05 jan. 2018. DOI: 10.1089/ars.2017.7237.

PARTHASARATHY, N. J. et al. Effect of methanol induced oxidative stress on the neuroimmune system of experimental rats. **Chem Biol Interact**, v. 161, n. 1, p. 14-25, May 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000927970600038X>>. Acesso em: 11 abr. 2016. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.02.005.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55-74, June 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

REN, X. et al. Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system. **Antioxid Redox Signal**, v. 27, n. 13, p. 989-1010, Nov. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5649126/>>. Acesso em: 01 dez. 2017. DOI: 10.1089/ars.2016.6925.

REYNOLDS, W. A.; BUTLER, V.; LEMKEY-JOHNSTON, N. Hypothalamic morphology following ingestion of aspartame or MSG in the neonatal rodent and primate: a preliminar report. **J Toxicol Environ Health**, v.2, n. 2, p. 471-480, 1976. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287397609529448>>. Acesso em: 02 fev. 2016. DOI: 10.1080/15287397609529448.

ROZELL, B. et al. Immunohistochemical localization of thioredoxin and thioredoxin

reductase in adult rats. **Eur J Cell Biol**, v. 38, n. 1, p. 79-86, July 1985. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/19264750_Immunohistochemical_localization_of_thioredoxin_and_thioredoxin_reductase_in_adult_rat>. Acesso em: 22 nov. 2017.

RUIZ, N. A. L. et al. Efecto de aspartame, fenilalanina y ácido aspártico sobre los niveles de glutatión y peroxidación de lípidos em cérebro de rata. **Arch Neurocién (Mex)**, v.13, n. 2, p. 79-83, 2008. Disponível em: <<http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=25816>>. Acesso em : 22 abr. 2016.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracelular glutathione for antioxidante benefits. **Pharmacol Ther.**, v. 141, n. 2, p. 150-159, Feb. 2014. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813001952?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.006.

SAITO, Y. et al. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. **Toxicology**, v.210, n. 2-3, p. 235-245, June 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X05000934?via%3Dihub>>. Acesso em: 08 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.tox.2005.02.006.

SALEH, A. A. S. Anti-neuroinflammatory and antioxidant effects of N-acetyl cysteine in long-term consumption of artificial sweetener aspartame in the rat cerebral cortex. **J Basic Appl Zool**, v. 72, p. 73-80, Oct. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090989615000351>>. Acesso em: 22 mai. 2016. DOI: 10.1016/j.jobaz.2015.05.001.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim Biophys Acta.**, v.1830, n.8, p. 4117-4129, Aug. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651300144X?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 jun. 2016. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.04.016.

SANTOS, P. et al. Anxiolytic properties of N-acetylcysteine in mice. **Behav Brain Res**, v. 317, p. 461-469, Jan. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432816307835?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 dez. 2017. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.10.010.

SIES, H. Glutathione and its cellular functions. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 916-921, Nov. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158499900177X?via%3Dihub>>. Acesso em: 02 jul. 2017. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00177-X.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biol**, v. 11, p. 613-619, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256672/>>. Acesso em: 22 out. 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035.

SIES, H.. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, v. 4, p. 180-183, Apr. 2015. Disponível em:

<www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231715000038?via%3Dihub>. Acesso em: 12 out. 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, v. 91, n. 3 (suppl. 3), p. S31-38, Sep. 1991. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002934391902812>>. Acesso em: 14 jun. 2016. DOI: 10.1016/0002-9343(91)90281-2.

SILVA-ADAYA, D.; GOSENBATT, M. E.; GUEVARA, J. Thioredoxin system regulation in the central nervous system: experimental models and clinical evidence. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014 (ID 590808), p. 1-13, Feb. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958682/>>. Acesso em: 06 ago. 2017. DOI: 10.1155/2014/590808 .

SHAHRIPOUR, R. B.; HARRIGAN, M. R.; ALEXANDROV, A. V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain Behav.**, v. 4, n. 2, p. 108-122, Mar. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967529/>>. Acesso em: 13 jun. 2016. DOI: 10.1002/brb3.208.

SKRZYDLEWSKA, E.; FARBISZEWSKI, R. Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. **Arch Toxicol**, v.71, n. 12, p. 741-745, 1997. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/13842073_Glutathione_consumption_and_inactivation_of_glutathione-related_enzymes_in_liver_erythrocytes_and_serum_of_rats_after_methanol_intoxication>. Acesso em: 05 mar. 2016.

SKRZYDLEWSKA, E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. **Toxicol Mech Methods**, v. 13, n. 4, p. 277-293, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/713857189>>. Acesso em: 05 mar. 2016. DOI: 10.1080/713857189.

SKRZYDLEWSKA, E.; WITEK, A.; FARBISZEWSKI, R. The comparison of antioxidant defense potential of brain to liver of rats after methanol ingestion. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 120, n. 2, p. 289-294, Aug. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0742841398100087>>. Acesso em: 08 mar. 2016. DOI: 10.1016/S0742-8413(98)10008-7.

TEPHLY, T. R. The toxicity of methanol. **Life Sci.**, v.48, n. 11, p. 1031-1041, 1991. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21157796_The_toxicity_of_methanol>. Acesso em: 05 mar. 2016.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of the glutathione in human disease. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 3-4, p. 145-155, May-June 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333220300043X?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 jul. 2017. DOI: 10.1016/S0753-3322(03)00043-X.

TROCHO, C. et al. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. **Life Sci**, v. 63, n. 5, p. 337-349, June 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320598002823?via%3Dihub>>. Acesso em: 08 mar 2016. DOI: 10.1016/S0024-3205(98)00282-3.

VIGGIANO, C. E. O produto dietético no Brasil e sua importância para indivíduos diabéticos. **Rev Bras Ciên Saúde**, v. 1, n. 1, p. 36-42, jan./jun. 2003. Disponível em: <http://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/494>. Acesso em: 16 mar. 2016.

VITVITSKY, V. et al. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. **J Biol Chem**, v.281, n. 47, p. 35785-35793, Nov. 2006. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/281/47/35785.long>>. Acesso em: 25 mai. 2017. DOI: 10.1074/jbc.M602799200.

VULCANO, L. A. D.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Homeostasis del glutatión. **Acta Bioquím Clin Latinoam**, v. 47, n. 3, p. 529-539, sept. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572013000300007>. Acesso em: 20 jul. 2016. DOI:

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implication for health. **J Nutr**, v. 134, n. 3, p. 489-492, mar. 2004. Disponível em : <<http://jn.nutrition.org/content/134/3/489.long>>. Acesso em: 10 mar. 2016.