

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

Carlos Eduardo de Souza Brener

**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA
NO SISTEMA DA GLUTATIONA EM RIM DE CAMUNDONGOS
SOB ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ASPARTAME**

Santa Maria, RS
2017

Carlos Eduardo de Souza Brener

**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA
NO SISTEMA DA GLUTATIONA EM RIM DE CAMUNDONGOS
SOB ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ASPARTAME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amália Pavanato
Coorientadora: Dr^a. Isabela Andres Finamor

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Souza Brener, Carlos Eduardo
Efeito da N-acetilcisteína no sistema da glutathiona em rim de camundongos sob administração crônica de aspartame / Carlos Eduardo de Souza Brener.- 2017.
66 p.; 30 cm

Orientador: Maria Amália Pavanato
Coorientador: Isabela Andres Finamor
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2017

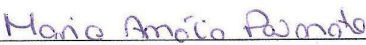
1. Aspartame 2. Glutathiona 3. N-acetilcisteína 4. Rim
5. Administração crônica I. Pavanato, Maria Amália II.
Andres Finamor, Isabela III. Título.

Carlos Eduardo de Souza Brener

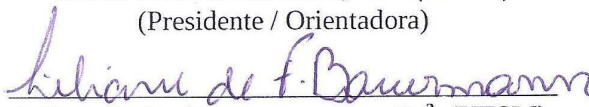
**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA
NO SISTEMA DA GLUTATIONA EM RIM DE CAMUNDONGOS
SOB ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ASPARTAME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

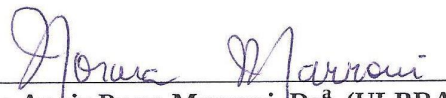
Aprovada em 24 de março de 2017:



Maria Amália Pavanato, Dr^a. (UFSM)
(Presidente / Orientadora)



Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)



Norma Anair Possa Marroni, Dr^a. (ULBRA)

Santa Maria, RS
2017

"Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano."

- Osho

AGRADECIMENTOS

Aos orixás. Sem eles, nada faz sentido e o mundo não se transforma. Obrigado pela força e pelo desejo da renovação e da evolução de cada dia.

Ao tempo.

À minha família, em especial minha mãe e minha avó Therezinha, pelo amor total e incondicional, por serem meu porto seguro e por me incentivarem sempre.

Às amadas e eternas Tia Beth e Tia Garé (*in memoriam*), por tudo o que elas representam para mim. Que estejam sempre ao meu lado. Amor eterno. Saudades.

À minha orientadora, *Prof^a. Maria Amália Pavanato*, pela atenção, pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha sempre quando necessários, pela oportunidade de realizar este trabalho e por permitir meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos. Eu amo cada um de vocês. Obrigado por tudo. Por estarem comigo. Por fazer feliz a minha existência. Por dividirem cada alegria e cada angústia. Cada felicidade e cada tristeza. Por evoluirmos juntos. Pelas mãos dadas. Pela parceria. Pelo amor.

À minha coorientadora, *Isabela Andres Finamor*, pela troca de conhecimento, pelas ideias, pela atenção e pelo incentivo.

Aos colegas do *LabFOx* pela ajuda na realização dos experimentos e das análises. Por terem sido meu braço direito e esquerdo até o fim. Pelos momentos felizes e por tudo que eu vivi ao lado de vocês.

À *Prof^a. Liliane de Freitas Bauermann* e à *Prof^a. Norma Anair Possa Marroni*, pela disponibilidade e por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho.

Às minhas amigas, professoras, incentivadoras e mentoras: *Prof^a. Thaís Scotti do Canto-Dorow* e *Prof^a. Jumaida Maria Rosito*. Obrigado pelas conversas, pelos conselhos e acima de tudo, por chegarem ao meu mundo e por me transformarem em uma pessoa melhor. Se todos fossem iguais a vocês, que maravilha seria viver.

À *Prof^a. Míriam dos Santos Meira*, pelo carinho e atenção desde a época da graduação. À *Prof^a. Isabella Martins de Albuquerque* pelo exemplo de profissional, pelo amor com que exerce a profissão e pelo dom de despertar o fascínio nos seus alunos. À *Prof^a. Roselei Fachinetto* por ter mostrado de forma ímpar e exímia o universo da Farmacologia. À *Prof^a. Katia Padilha Barreto* pela amizade e incentivo.

À querida *Zeli Carvalho*, secretária do PPG Farmacologia, pela atenção, disponibilidade, carinho e o sorriso de sempre. À *Rejane Foletto*, pelas conversas e pelas risadas nos corredores no Departamento.

Aos colegas do *LaFEx* e à *Prof^a. Liliane de Freitas Bauermann*, que sempre estiveram de portas abertas com muitas risadas, guloseimas e chimarrões, me proporcionando momentos de descontração.

E por fim, à vida e ao destino.

RESUMO

EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA NO SISTEMA DA GLUTATIONA EM RIM DE CAMUNDONGOS SOB ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ASPARTAME

AUTOR: Carlos Eduardo de Souza Brener

ORIENTADORA: Maria Amália Pavanato

Atualmente, muitos indivíduos diabéticos, obesos e/ou aqueles que procuram um estilo de vida mais saudável buscam alimentos com o sabor doce, mas sem a adição de energia, preferindo utilizar adoçantes, como o aspartame (ASP). O ASP encontra-se amplamente distribuído em produtos disponíveis no mercado, especialmente naqueles que apresentam ausência de sacarose, e seu consumo está aprovado há mais de 20 anos pela FDA (*Food and Drug Administration*). No entanto, existem preocupações e evidências que sugerem possíveis efeitos adversos dos metabólitos do ASP, resultando inclusive em alterações no sistema de defesa antioxidante, especialmente, em decorrência da depleção dos níveis de glutathione (GSH) e da atividade das enzimas dependentes dela, podendo ocasionar danos oxidativos. Considerando que os indivíduos obesos e/ou diabéticos substituem o uso da sacarose por adoçantes artificiais, como o ASP, o qual produz metabólitos capazes de causar possíveis efeitos adversos, é de fundamental interesse a utilização de compostos antioxidantes que reduzam os efeitos lesivos causados por esse adoçante, os quais sejam capazes de proteger os constituintes celulares. Assim, destaca-se a *N*-acetilcisteína (NAC), um excelente antioxidante que demonstrou ser efetivo ao restabelecer os níveis de GSH e das enzimas relacionadas ao seu metabolismo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da *N*-acetilcisteína sobre os parâmetros bioquímicos e oxidativos em tecido renal de camundongos que receberam administração oral crônica de aspartame. Para isso, foram utilizados camundongos ($n = 30$), divididos em três grupos: Controle, tratado com ASP (80 mg.kg^{-1} , v.o.) e tratado com ASP e NAC (163 mg.kg^{-1} , intraperitoneal), durante 90 dias. A partir do 60º dia de tratamento, os animais do grupo ASP-NAC começaram a receber a dose de 163 mg.kg^{-1} . Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e seus rins removidos para as análises posteriores. O teste de Levene foi utilizado para verificar se os dados são paramétricos. Realizou-se a análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Tukey para avaliar as diferenças entre os grupos. Os dados deste trabalho mostraram ausência de diferença significativa entre grupos estudados no conteúdo de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e proteínas carbonil, indicando que não houve danos nos lipídios e proteínas no tratamento com ASP em camundongos. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi semelhante no grupo ASP e nos animais tratados com ASP-NAC quando comparados ao grupo controle. O presente estudo mostrou que a administração oral de ASP (80 mg.kg^{-1}) leva a uma significativa diminuição na atividade da CAT no tecido renal. Há também uma diminuição do conteúdo de tióis não proteicos nos animais tratados com ASP. A atividade de enzimas relacionadas à glutathione como a glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione redutase (GR) mostrou uma diminuição no grupo ASP, assim como o que acontece com a enzima tioredoxina redutase (TrxR). O tratamento com NAC reverteu a atividade das enzimas CAT, GPx, GST, GR e TrxR, mostrando que este fármaco é um potencial no tratamento de distúrbios causados pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: Aspartame; Glutathione; *N*-acetilcisteína; Rim.

ABSTRACT

EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON THE GLUTATHIONE SYSTEM IN KIDNEY OF MICE UNDER CHRONIC ASPARTAME ADMINISTRATION

AUTHOR: Carlos Eduardo de Souza Brener

ADVISOR: Maria Amália Pavanato

Currently, many diabetic, obese, and/or those seeking a healthier lifestyle are looking for foods with a sweet taste, but without the addition of energy, preferring to use sweeteners such as aspartame (ASP). The ASP is widely distributed in products available in the market, especially in those that lack sucrose, and its consumption has been approved for more than 20 years by the FDA (*Food and Drug Administration*). However, there are concerns and evidences that suggest possible adverse effects of ASP metabolites, resulting in alterations in the antioxidant defense system, especially due to the depletion of glutathione levels (GSH) and the activity of the enzymes dependent on it, causing oxidative damages.

Considering that obese and/or diabetic individuals replace the use of sucrose by artificial sweeteners, such as ASP, which produces metabolites capable of causing possible adverse effects, it is of fundamental interest to use antioxidant compounds that reduce the harmful effects caused by the sweetener, which are capable of protecting cellular constituents. Thus, N-acetylcysteine (NAC), an excellent antioxidant, has been shown to be effective in restoring the levels of GSH and enzymes related to its metabolism.

Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of N-acetylcysteine on biochemical and oxidative parameters in renal tissue of mice receiving chronic oral administration of aspartame. For this, mice ($n = 30$) were divided into three groups: Control, treated with ASP (80 mg.kg^{-1} , vol) and treated with ASP and NAC (163 mg.kg^{-1} , intraperitoneally), during 90 days. From the 60th day of treatment, the animals of the ASP-NAC group started receiving the dose of 163 mg.kg^{-1} . After the experimental period, the animals were euthanized and their kidneys removed for further analysis. Levene's test was used to verify whether the data were parametric. Two-way analysis of variance followed by Tukey's test was performed to assess the differences among the groups. The data of this work showed absence of significant difference between groups studied in the content of substances that react to thiobarbituric acid and carbonyl proteins, indicating that there was no damage in the lipids and proteins in the treatment with ASP in mice. Myeloperoxidase activity (MPO) was similar in the ASP group and in the animals treated with ASP-NAC when compared to the control group. The present study showed that oral administration of ASP (80 mg.kg^{-1}) leads to a significant decrease in CAT activity in renal tissue. There is also a decrease in the content of non-protein thiols in animals treated with ASP. The activity of glutathione-related enzymes such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) showed a decrease in the ASP group, as does the enzyme thioredoxin reductase (TrxR). The NAC treatment reversed the activity of the CAT, GPx, GST, GR and TrxR enzymes, showing that this drug is a potential in the treatment of disorders caused by oxidative stress.

Keywords: Aspartame; Glutathione; N-acetylcysteine; Kidney.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	Estrutura química do aspartame	17
Figura 2	Estrutura química da glutathiona	21
Figura 3	Estrutura química da N-acetilcisteína	23

MANUSCRITO

Figure 1	Effects of N-acetylcysteine on CAT (A), GPx (B), GST (C), GR (D), TrxR (E) activities and NPSH content (F) in the kidney of control and rats chronically treated with aspartame	49-50
----------	---	-------

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1	Effects of N-acetylcysteine on CP and TBARS levels in the kidney of control and rats chronically treated with aspartame	51
Table 2	Effects of N-acetylcysteine on MPO activity in the kidney of control and rats chronically treated with aspartame	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
ADH	Álcool desidrogenase
ALT	Alanina aminotransferase ou alanina transaminase
ASP	Aspartame
AST	Aspartato aminotransferase ou aspartato transaminase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase (<i>Catalase</i>)
CP	Carbonilação de proteínas (<i>Carbonyl protein</i>)
CDNB	2,4-Dinitroclorobenzeno (<i>2,4-Dinitrochlorobenzene</i>)
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNPH	2,4-Dinitrofenil-hidrazina (<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>)
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (<i>5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i>)
EO	Estresse oxidativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDH	Formaldeído desidrogenase
GPx	Glutationa peroxidase (<i>Glutathione peroxidase</i>)
GR	Glutationa redutase (<i>Glutathione reductase</i>)
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase (<i>Glutathione S-transferase</i>)
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IDA	Dose de ingestão diária aceitável (<i>Acceptable Daily Intake</i>)
KCl	Cloreto de potássio
MeOH	Metanol
MPO	Mieloperoxidase (<i>Myeloperoxidase</i>)
NAC	N-acetilcisteína (<i>N-acetylcysteine</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NPSH	Tióis não proteicos (<i>Non-protein thiols</i>)
O₂	Oxigênio
O₂•-	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxil
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase

TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase (<i>Thioredoxin reductase</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Aspartame	16
3.2 Sistemas de defesa antioxidante	19
3.2 Glutathiona	21
3.3 N-acetilcisteína	23
3.4 Fisiologia da depuração renal.....	24
4 MANUSCRITO	25
<i>N-acetylcysteine restores glutathione depletion and glutathione-related enzymes in the mice kidney after chronic administration of aspartame</i>	26
<i>Abstract</i>	27
<i>Introduction</i>	28
<i>Materials and methods</i>	29
<i>Results</i>	35
<i>Discussion</i>	36
References	39
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO GERAL	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos indivíduos diabéticos, obesos e/ou aqueles que procuram um estilo de vida mais saudável buscam alimentos com o sabor doce, mas sem a adição de energia, preferindo utilizar adoçantes, que não oferecem energia ou a oferecem em quantidades imperceptíveis, e que adoçam com pequeno volume, chamados de adoçantes não nutritivos ou de alta intensidade, dentre os quais, o acesulfame-K, o neotame, o ciclamato, a sacarina, a sucralose e o aspartame (ASP) possuem o consumo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (ADA, 2004).

O ASP encontra-se amplamente distribuído em produtos disponíveis no mercado, especialmente naqueles que apresentam ausência de sacarose. De acordo com Humphries e colaboradores (2008), a ingestão do ASP não é indicada para consumidores obesos, diabéticos e que buscam uma vida mais saudável. A ingestão de 40 mg.kg^{-1} de ASP (considerada a dose de ingestão diária aceitável (IDA) pela FDA) por ratos durante 45 dias resultou em aumento dos níveis plasmáticos de glicose e induziu o estresse oxidativo no cérebro dos animais (FINAMOR et al., 2014).

O consumo de ASP está aprovado há mais de 20 anos pela FDA, mas existem preocupações e evidências que sugerem possíveis efeitos adversos dos metabólitos do ASP: ácido aspártico ou aspartato, fenilalanina e metanol (MeOH). A fenilalanina pode causar alterações na produção de importantes neurotransmissores; os níveis de aspartato, um neurotransmissor excitatório, parecem aumentar, induzindo distúrbios neuroendócrinos; e o MeOH e, principalmente, seu produto de quebra, o formato, podem ser muito citotóxicos, resultando inclusive em alterações no sistema de defesa antioxidante, especialmente, em decorrência da depleção dos níveis de glutathiona (GSH) e da atividade das enzimas dependentes dela, podendo ocasionar danos oxidativos (HUMPHRIES et al. 2008; RUIZ et al., 2008; ABHILASH et al., 2011; IMAN, 2011; IMAN e NOOR, 2011; ASHOK e SHEELADEVI, 2014; FINAMOR et al., 2014).

Em humanos, o MeOH é inicialmente metabolizado a formaldeído via álcool desidrogenase (ADH). Os roedores, por sua vez, metabolizam o MeOH através da atividade peroxidativa da enzima catalase (CAT), resultando na liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CEDERBAUM e QURESHI, 1982). O formaldeído produzido é convertido a formato, um metabólito altamente tóxico, via formaldeído desidrogenase (FDH), uma enzima

dependente de GSH, cujo mecanismo é similar em ambas as espécies (HARRIS et al., 2004). Os primatas não humanos e os humanos são as espécies mais sensíveis à intoxicação por MeOH, uma vez que apresentam baixo conteúdo hepático de folato (JOHLIN et al., 1987), e metabolizam o formato duas vezes mais lentamente do que os ratos (MC MARTIN et al., 1979). Sendo assim, o acúmulo de formato nessas espécies tem sido considerado o responsável pelo clássico padrão de toxicidade por MeOH, que inclui a depressão do Sistema Nervoso Central (SNC) e posterior desenvolvimento de deficiência visual e acidose metabólica, podendo levar, inclusive à morte (BUTCHKO et al., 2002).

Considerando que os indivíduos obesos e/ou diabéticos substituem o uso da sacarose por adoçantes artificiais, como o ASP, o qual produz metabólitos capazes de causar possíveis efeitos adversos, é de fundamental interesse a utilização de compostos antioxidantes que reduzam os efeitos lesivos causados por esse adoçante, os quais sejam capazes de proteger os constituintes celulares. Assim, destaca-se a *N*-acetilcisteína (NAC), um excelente fármaco antioxidante que demonstrou ser efetivo ao restabelecer os níveis de GSH e das enzimas relacionadas ao seu metabolismo (FINAMOR et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da *N*-acetilcisteína sobre os parâmetros bioquímicos e oxidativos em tecido renal de camundongos que receberam administração oral crônica de aspartame.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da administração da NAC sobre o dano oxidativo pela medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteínas carbonilas em

homogenatos de tecido renal de camundongos dos grupos controle, aspartame e aspartame tratado com N-acetilcisteína;

Mensurar a atividade da mieloperoxidase (MPO) em homogenatos de tecido renal de camundongos dos diferentes grupos experimentais;

Determinar a atividade das enzimas catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona-S-transferase (GST), glutaciona redutase (GR) e tiorredoxina redutase (TrxR) em homogenatos de tecido renal de camundongos dos diferentes grupos experimentais;

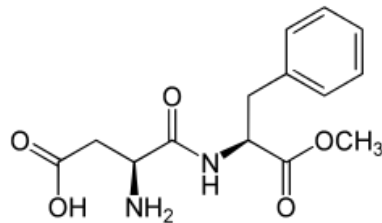
Analisar o conteúdo de tióis não-protéicos (NPSH) em homogenatos de tecido renal de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspartame

O ASP (L- α -aspartil-L-fenilalanina metil éster) foi descoberto acidentalmente por Mazar e Schlatter em 1965, na busca do desenvolvimento de um fármaco anti-úlceras. Desde então ele foi o aditivo alimentar mais bem estudado antes de sua aprovação pela FDA em 1981, primeiramente como adoçante para uma série de preparações secas (adoçante de mesa, cereais, gelatinas e pudins) e gomas de mascar. Essa aprovação foi ampliada em 1983 para incluir bebidas carbonatadas e mais tarde, em 1996, foi aprovado como “um adoçante de uso geral” para utilização em todos os alimentos e bebidas (ADA, 2004).

Figura 1 – Estrutura química do aspartame



Fonte: IUPAC

Previamente a sua aprovação, pesquisas farmacológicas e toxicológicas extensas foram feitas em animais de laboratório usando doses muito maiores de ASP do que as pessoas poderiam possivelmente consumir. Baseado nos resultados dessas avaliações, a IDA de 50 mg.kg⁻¹ de peso corporal foi estabelecida para o ASP nos Estados Unidos, enquanto 40 mg/kg foi adotada pela União Européia (BUTCHKO et al., 2002).

Posterior a essas determinações, inquéritos alimentares com mais de 5000 indivíduos por ano foram feitos de 1984 a 1992 para monitorar os níveis de ingestão do ASP nos Estados Unidos e revelaram que a média da ingestão diária de ASP na população geral foi de 2 a 3 mg.kg⁻¹ de peso corporal e em crianças de 2 a 5 anos foi de 2,5 a 5 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia (BUTCHKO et al., 2002). O consumo do ASP também foi monitorado em diversos outros países, inclusive no Brasil, onde a ingestão mediana pelos usuários normais foi calculada em 2,9%, pelos diabéticos em 2,6% e em indivíduos em regime de controle de peso em 3,2% da IDA (TOLEDO e IOSHI, 1995).

O ASP é aproximadamente 160 a 220 vezes mais doce que a sacarose e é usado como adoçante não nutritivo sintético em mais de 90 países do mundo em mais de 6000 produtos (MAGNUSON et al., 2007). Conforme Ranney e colaboradores (1976), o ASP é absorvido e completamente hidrolisado no intestino, sendo, posteriormente, metabolizado da mesma forma em roedores, primatas e humanos, e resultando em três constituintes alimentares comuns: fenilalanina (50%), aspartato (40%) e metanol (10%). Por sua vez, a fenilalanina é convertida em tirosina, o aspartato em alanina e o metanol em formaldeído e então em ácido fórmico (MARTINS e AZOUBEL, 2006; TROCHO et al., 1998). Os aminoácidos que o compõem são metabolizados para fornecer 4 kcal.g⁻¹. Dessa forma, esse adoçante fornece energia. No entanto, por causa de sua intensa doçura, apenas quantidades mínimas precisam ser adicionadas e a quantia de energia derivada é insignificante (ADA, 2004).

Embora a comercialização do ASP tenha sido aprovada, ele foi implicado em numerosos relatos de casos em decorrência de dores de cabeça, tonturas e alterações de humor (Massachusetts Medical Society, 1984), os quais foram associados aos efeitos potenciais da PHE sobre as funções cerebrais, uma vez que a tirosina é precursora da família das catecolaminas, que inclui a dopamina, a norepinefrina, e a epinefrina (NELSON e COX, 2002). Além disso, o consumo do ASP foi ligado ao aumento dos níveis plasmáticos de aspartato, os quais resultaram em necrose neuronal hipotalâmica (REYNOLDS et al., 1976). Dentre os metabólitos do ASP, o metanol é a substância que causa toxicidade sistêmica (KRUSE, 1992). Além disso, ele é cada vez mais reconhecido como uma substância que causa dano às células hepáticas, onde ele é oxidado a formaldeído e, então, a formato (TEPHLY, 1991).

Um estudo realizado por Trocho e colaboradores (1998) sugeriu que o consumo de ASP pode constituir um risco à saúde humana, afetando as funções celulares mesmo quando os consumidores não tenham experimentado nenhum sintoma, uma vez que a quantidade de formaldeído formado em proteínas e ácidos nucleicos de diferentes tecidos foi cumulativa em ratos. O efeito citotóxico do formaldeído também foi demonstrado por Saito e colaboradores (2005), que revelaram que o formaldeído induziu um incremento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), eventualmente, levando à morte celular. Além disso, diversas pesquisas indicaram que o conteúdo de GSH e a atividade das enzimas relacionadas ao seu metabolismo estavam diminuídos em diferentes tecidos de ratos com intoxicação por metanol, resultando em uma situação conhecida como estresse oxidativo (SKRZYDLEWSKA e FARBISZEWSKI, 1997; SKRZYDLEWSKA et al., 1998; PARTHASARATHY et al., 2006).

Portanto, passados 30 anos da aprovação do ASP, persistem os debates relacionados ao potencial efeito tóxico exercido por cada um dos componentes provenientes de sua metabolização sobre a saúde humana. Recentemente, diversos estudos têm reportado que o consumo de ASP durante longo prazo de tempo, tanto em doses abusivas (RUIZ et al., 2008; ABHILASH et al. 2011; IYASWAMY e RATHINASAMY, 2012; ABHILASH et al., 2013), quanto em aceitáveis (IMAN, 2011; IMAN e NOOR, 2011; ASHOK e SHEELADEVI, 2014; FINAMOR et al., 2014), ou até mesmo em baixas (ABDEL-SALAM et al., 2012) está associado ao estresse oxidativo, especialmente, devido a alterações no sistema dependente de GSH.

3.2 Sistemas de defesa antioxidante

Um grande número de doenças tem sido correlacionado à presença de radicais livres. Estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos (GUTTERIDGE, 1993). Os radicais livres estão envolvidos nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares (ROSEN et al, 1995; BLAKE e WINYARD, 1995).

A formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve manter um equilíbrio, que deve ser regulado de um modo que os processos metabólicos e reações possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). No entanto, pode haver o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, acarretando um estado pró-oxidante que pode favorecer a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo, inclusive, resultar na morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; GUTTERIDGE, 1993).

Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, que caracteriza uma condição em que ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (SIES, 1986). Em muitas patologias a natureza da espécie radicalar que amplifica a lesão primária é desconhecida. Por conseguinte, o planejamento correto e adequado da utilização de fármacos com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente o radical livre torna-se difícil, impedindo sua reação com alvos celulares ou interrompendo as cadeias radicalares e assim, evitando a propagação das lesões provocadas por esses radicais (SUN, 1990). A utilização apropriada destes fármacos e de estratégias terapêuticas depende de fatores como o entendimento dos processos dependentes dos radicais livres envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças, identificação das fontes celulares geradoras das espécies radicalares potencialmente tóxicas, identificação dos compostos que possam atuar como antioxidantes, assim como a sua distribuição nos tecidos, localização subcelular e mecanismo de ação (GUTTERIDGE, 1993; SUN, 1990). Assim, os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos.

Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathiona, como a glutathiona peroxidase, glutathiona S-transferase e glutathiona redutase. Estudos demonstraram

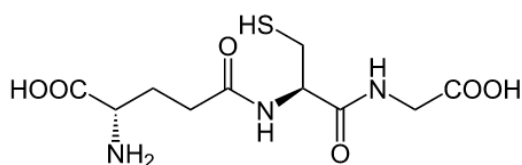
também que outras enzimas antioxidantes, como a glicose-6-fosfato-dehidrogenase (G6PD), apresentaram propriedades protetoras similares à glutationa peroxidase (SENTUERKER et al., 1997; WELLS et al., 1997). Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes operando em conjunto com as enzimas supracitadas incluem a superóxido dismutase (SOD), dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} como cofatores, onde ocorre a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, bem como a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular nas hemácias (MEISTER, 1983). Algumas reações radiculares prejudiciais *in vivo* podem ser evitadas ou modificadas pela ação de agentes inibidores ou antioxidantes. No caso de superóxidos, a enzima superóxido dismutase age como agente de defesa contra esta espécie, enquanto as enzimas catalase e peroxidase atuam sobre H_2O_2 .

Tratando-se dos sistemas não-enzimáticos, há ainda a proteção realizada por pequenas moléculas, dentre as quais as mais utilizadas estão as vitaminas E (α -tocoferol) e C (ácido L-ascórbico). A vitamina E é uma molécula lipossolúvel e tende a se concentrar no interior das membranas, agindo sinergisticamente com ascorbato. Os carotenoides destacam-se também como agentes antioxidantes, dentre os quais o β -caroteno é o carotenoide mais abundante e de maior atividade, exibindo uma boa capacidade de captura de radicais livres a pressões parciais normais de oxigênio no ar, o que é comumente encontrado na maior parte dos tecidos biológicos sob condições fisiológicas (CARDOSO, 1997).

3.2 Glutathiona

A GSH (γ -glutamilcisteinilglicina) é um tiol de baixo peso molecular, abundante em células de mamíferos, onde sua concentração intracelular é, aproximadamente, 0,5 mM, podendo alcançar níveis de até 10 mM. A GSH desempenha diversas funções catalíticas, atuando como co-fator de enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona-S-transferase (GST).

Figura 2 – Estrutura química da glutathiona



Fonte: IUPAC

Além disso, está envolvida no metabolismo do ácido ascórbico; na comunicação intracelular; parece participar também do transporte intracelular de cobre, quelando os íons cúpricos (Cu^{2+}) e diminuindo sua disponibilidade para geração de ERO; e, finalmente, pode reagir por via não-enzimática com essas ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Sendo assim, sua depleção aumenta a vulnerabilidade celular ao estresse oxidativo, causando excessivo dano oxidativo, como a peroxidação lipídica, as reações oxidativas às proteínas e as lesões ao DNA (OYAMA et al., 2002).

Alterações na concentração da glutathiona podem indicar certas desordens fisiológicas, como anemias causadas por infecção ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes (HALL e MALIA, 1986), no monitoramento da eficácia de alguns tratamentos usando N-acetilcisteína (NAC) durante o metabolismo do paracetamol (BURGUNDER et al., 1989), no tratamento de pacientes com artrite reumatóide (MUNTHE et al., 1981) e na investigação do estresse oxidativo do miocárdio (CURELLO et al., 1987). A diminuição dos níveis de GSH em hemácias e plasma de pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência (HIV-1) associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi relatada por Roederer e colaboradores (1990). Os autores sugerem que a diminuição observada nos níveis de GSH correlacionava-se com a progressão da AIDS devido ao tratamento com drogas oxidantes como

o NAC, inibindo a replicação do vírus.

Um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres, envolve a enzima glutatona peroxidase (GPx) (MANNERVICK, 1985), encontrada em muitos tecidos de origem animal. A atividade enzimática de GSH-Px é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares (MEISTER e ANDERSON, 1983; COHEN e HOCHSTEIN, 1963; HOHER et al., 2001). A enzima glutatona peroxidase possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima.

Outra enzima que age conjuntamente com a glutatona peroxidase é a enzima glutatona redutase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (MEISTER e ANDERSON, 1983).

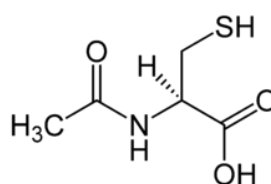
A glutatona e as enzimas que fazem parte do seu ciclo catalítico deste apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo. Estas alterações implicam em lesões de DNA gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer (SENTUERKER et al., 1997; MEISTER, 1991) Assim, a quantificação de glutatona pode indicar uma possível correlação entre a diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase, e o aumento nos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo, comprovando a hipótese de que reações que levam à formação de radicais livres podem aumentar a quantidade de células malignas (ARAI et al., 1999; LIPINSKI et al., 1999).

Visto que o uso do ASP possui efeitos lesivos, como a depleção da GSH e a acumulação de metabólitos tóxicos, a NAC tem sido utilizada como fármaco antioxidante, por reverter os danos causados pelo consumo do aspartame.

3.3 N-acetilcisteína

A NAC é uma variante acetilada da cisteína, um aminoácido de ocorrência natural, e é uma excelente fonte de grupos sulfidrílicos (-SH). A cisteína é responsável pela grande atividade metabólica da NAC, enquanto o grupo amino-acetilado substituído torna a molécula mais estável contra a oxidação (AREMU et al., 2008).

Figura 3 – Estrutura química da N-acetilcisteína



Fonte: IUPAC

Nesse contexto, a NAC desempenhou um excelente papel antioxidante frente ao dano oxidativo causado pelo ASP ao ser capaz de restabelecer os níveis de GSH e das enzimas relacionadas ao seu metabolismo (FINAMOR et al., 2014). Sendo assim, destaca-se a importância da utilização de compostos antioxidantes, principalmente, por indivíduos obesos e/ou diabéticos que necessitam consumir esse tipo de adoçante artificial.

Historicamente, a NAC teve suas primeiras aplicações no tratamento de uma variedade de doenças respiratórias, sendo reconhecida como um mucolítico; entretanto, ela pareceu também causar benefícios em condições caracterizadas pela diminuição dos níveis de GSH ou de estresse oxidativo. A NAC é capaz estimular a síntese de GSH, e atuar diretamente sobre as ERO. Sua administração como um fármaco antioxidante está se tornando promissora como agente terapêutico, sendo cada vez mais popular em casos de distúrbios relacionados com o estresse oxidativo (KELLY et al., 1998). A atividade antioxidante da NAC é dada principalmente por dois mecanismos: 1) redução direta das ERO, formando radicais sulfúricos ou cisteína; 2) promoção da biossíntese de GSH (ARUOMA, 1989).

3.4 Fisiologia da depuração renal

O sistema renal é formado por dois órgãos denominados de rins, os quais realizam a maior parte das funções de excreção, filtrando o sangue e recolhendo deste os resíduos metabólicos de todas as células do nosso corpo (GUYTON e HALL, 2011). Os rins asseguram que substâncias em excesso ou nocivas sejam excretadas na urina em quantidades apropriadas. Como órgãos reguladores, os rins mantêm a constância do volume e da composição dos líquidos corporais por meio de variações da excreção de água e de solutos. Finalmente, como órgãos endócrinos, os rins sintetizam e secretam três hormônios: renina, eritropoetina e 1,25-dihidroxicolecalciferol (COSTANZO, 2014).

A urina produzida pelos rins é o veículo no qual este aparelho controla a eliminação de água, sais minerais, íons, resíduos, metabólicos, enfim, substâncias que em excesso causam um desequilíbrio fisiológico em nosso organismo (GUYTON e HALL, 2011). A excreção renal é considerada uma via principal de eliminação para muitos medicamentos (MORRISSEY et al., 2013; TUCKER, 1981; VARMA et al., 2009).

A depuração (ou clearance) é um conceito geral que descreve a velocidade pela qual substâncias são removidas (ou depuradas) do plasma. Assim, a depuração de todo o corpo significa a intensidade ou velocidade total resultante de remoção de uma substância, por todos os órgãos, a depuração hepática significa a intensidade de remoção pelo fígado, e a depuração renal significa a intensidade de remoção de substâncias pelos rins. Por definição, depuração renal é o volume de plasma completamente depurado pelos rins de uma substância por unidade de tempo. Quanto maior a depuração renal, mais plasma será depurado da substância. As substâncias com depurações renais mais altas podem ser completamente removidas em uma só passagem do sangue pelos rins; substâncias com menores depurações renais não serão removidas em sua maior parte (COSTANZO, 2014).

4 MANUSCRITO

O manuscrito originado desta dissertação é intitulado “*N-acetylcysteine restores glutathione depletion and glutathione-related enzymes in the mice kidney after chronic administration of aspartame*” e está disposto conforme as normas requisitadas pela revista *Appetite*, à qual foi submetido para publicação. Esta revista possui fator de impacto “3.125” e é classificada pelo Sistema WebQualis da CAPES como “B1” na categoria Ciências Biológicas II.

N-acetylcysteine restores glutathione depletion and glutathione-related enzymes in the mice kidney after chronic administration of aspartame

Carlos Eduardo S. Brener¹, Caroline A. Bressan¹, Érika P. Londero¹, Victor S. Barboza¹,
Camila C. Dalla Pozza², Gabriela Trevisan¹, Susana Francisca Llesuy³, Isabela A. Finamor⁴ e
Maria Amália Pavanato^{1,5}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria,

Roraima Avenue 1000, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil;

carloveduardo.biologia@gmail.com, carolineazzolin@gmail.com, erikaplondero@gmail.com,
victorbarboza10@gmail.com, gabitrev@hotmail.com, amaliapavanato@yahoo.com.br

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria,

Roraima Avenue 1000, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil;

milacamponogara@gmail.com

³ Department of Analytical Chemistry and Physicochemical, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,

University of Buenos Aires, Junín 954 Street, Buenos Aires, Argentina;

slesuy@ffyb.uba.ar

⁴ Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia,

Av. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

isabela.finamor@gmail.com

⁵ Corresponding author

ABSTRACT

Chronic intake of aspartame causes glutathione (GSH) depletion in mice kidney. N-acetylcysteine (NAC) provides the cysteine that is required for the production of GSH, being effective in treating disorders associated with oxidative stress. We investigated the effects of NAC treatment (163 mg kg⁻¹, i.p.) on oxidative stress biomarkers in mice kidney after chronic aspartame administration by gavage (80 mg kg⁻¹). NAC resulted in an elevation of glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase and thioredoxin reductase activities, as well as non-protein thiols, which were decreased after aspartame exposure. In conclusion, NAC treatment was able to restore GSH levels and GSH-dependent enzymes in mice kidney after chronic treatment with aspartame.

Highlights

- Chronic intake of aspartame causes glutathione depletion in mice kidney.
- NAC could be beneficial to individuals that consume aspartame chronically.
- NAC was able to restore GSH levels and GSH-associated enzymes in mice kidney after chronic treatment with aspartame.

Keywords: Aspartame; N-acetylcysteine; Glutathione; Kidney

Introduction

Aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester) is a food additive belonging to the class of artificial sweeteners, which are substances used as a substitute for sugar. Since its use was approved and regulated by the FDA, aspartame has been consumed in more than 6,000 products, among them carbonated drinks and tabletop sweeteners. However, there are controversies about its safety. The use of this food additive has been related to the appearance of complications such as hyperglycemia (Kim et al., 2011), neurological and behavioral disorders (Humphries et al., 2008), headaches and hypersensitivity reactions (Eeden et al., 1994; Walton, 1988). Moreover, aspartame was confirmed as multipotential carcinogenic (Soffritti et al., 2006). The same authors show that renal function may also be impaired by aspartame intake (Soffritti et al., 2007).

Aspartame is metabolized in the gastrointestinal tract by the action of esterases and peptidases on amino acids aspartic acid (40%) and phenylalanine (50%) and on small amounts of methanol (10%) (Ranney et al., 1976). Among the metabolites resulting from the breakdown of aspartame, methanol is capable of causing systemic toxicity (Kruse, 1992). It is metabolized into formaldehyde and soon thereafter in formate (Parthasarathy, 2006). The accumulation of methanol metabolites may cause glutathione (GSH) depletion and changes GSH-related enzymes, which are involved in the elimination of ROS in rats (Harris et al., 2004; Parthasarathy et al., 2006; Skrzydlewska et al., 1998). Indeed, methanol has been pointed out as the main responsible for aspartame induced-GSH depletion and changes in the GSH-related enzymes in several rat tissues, including kidney (Iman, 2011; Saleh, 2014). Furthermore, recent research from our laboratory revealed that GSH depletion results from the downregulation of the catalytic subunit of the glutamate cysteine ligase and decreased

cysteine levels. It was also reported that aspartame triggered blocked of the transsulphuration pathway at two steps, cystathionine γ -lyase and methionine adenosyltransferases (Finamor et al., 2017).

GSH (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) is a naturally occurring thiol corresponding to a major part in animal and plant cells (Anderson & Meister, 1983), and plays a role in signal transduction, gene expression and apoptosis (Arrigo, 1999; Sen et al., 2000; Voehringer, 1999; Bojes et al., 1997; Blackburn et al., 1999; Ballatori et al., 2009), among others. GSH is a non-enzymatic antioxidant that plays a critical role in cellular defense. (Finamor et al., 2014).

Several studies have reported that aspartame causes oxidative stress (Finamor et al., 2014; Ashok & Sheeladevi, 2014; Iman, 2011; Soffritti et al., 2007). Hence, considering that aspartame consumption is indispensable for diabetic individuals, the need to focus attention in compounds to protect cells against oxidative stress becomes evident. N-acetylcysteine (NAC) is the acetylated precursor of L-cysteine, an amino acid responsible for sustaining GSH synthesis (Samuni et al., 2013). Previous research from our laboratory showed that NAC exerted a protective effect against the aspartame-induced oxidative damage in rat brain (Finamor et al., 2014). Thus, the aim of this study was to investigate the effect of N-acetylcysteine on oxidative damage to lipids and proteins and the antioxidant status of mice kidney after chronic administration of aspartame.

Materials and methods

Animals

Male Swiss mice (30±6 g b.w.) were obtained from Central Animal Facility of the Federal University of Santa Maria (Brazil). They were fed on a standard rodent chow (Supra, São Leopoldo, Brazil) and tap water *ad libitum*, in temperature and humidity controlled under a 12h light-dark cycle. The Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (Brazil) approved the study protocol (#001/2015).

Experimental protocol

Mice (n = 30) were divided into three groups with ten animals each one: control; aspartame (Sigma-Aldrich, St Louis, USA); and aspartame treated with NAC (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Control group received vehicle (0.9% NaCl) by gavage for 90 days, whereas aspartame and aspartame treated with NAC groups received aspartame (80 mg.kg⁻¹, prepared in 0.9% NaCl solution). From day 60 until the 90 days immediately after administration of aspartame, the mice of the third group received NAC (163 mg.kg⁻¹, pH 6.8-7.2) intraperitoneally, whereas the others received its vehicle intraperitoneally.

All treatments were prepared daily prior to administration. Prior to euthanasia, mice were anesthetized with isoflurane inhaled at 3% and subsequently the animals were sacrificed through exsanguination 3h after the last treatment, for removal of the kidneys to further analysis.

Tissue homogenization

Kidneys were homogenized in 154 mmol.L⁻¹ KCl containing 1 mmol.L⁻¹ phenylmethylsulfonyl fluoride and centrifuged at 3000×g for 10 min at 4°C. The supernatant fraction obtained was used for measurements.

Protein assay

Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) by using bovine serum albumin as standard, and the results were reported as mg.mL⁻¹.

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was estimated based on the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Buege & Aust, 1978). Briefly, the sample aliquots (0.25 mL) were added to a tube containing 0.75 mL of 1.22 mol.L⁻¹ trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 ml of 46 mmol.L⁻¹ thiobarbituric acid. The mixture was heated for 15 min at 100°C. After cooling, the precipitate was removed by centrifugation. The absorbance of the organic phase was measured at 535 nm, and the results were expressed as nmol.mg protein⁻¹.

Carbonyl protein assay

Kidney homogenates were incubated with 0.8 mL of 10 mmol.L⁻¹ DNPH in 2.5 mol.L⁻¹ HCl solution for 1 h at room temperature, in the dark. Samples were vortexed every 15 min. Then, 1 ml of 1.2 mol.L⁻¹ TCA solution was added in the tube samples, left in ice for 10 min and centrifuged for 5 min at 1,000×g to collect the protein precipitates. Another wash was

performed with 0.8 mL of 0.61 mol.L⁻¹ TCA. The pellet was washed three times with 0.8 mL of ethanol: ethyl acetate (1:1). The final precipitates were dissolved in 0.4 mL of 6 mol.L⁻¹ guanidine hydrochloride solution, left for 10 min at 37°C and read at 360 nm (Reznick & Packer, 1994). The results were expressed as nmol.mg protein⁻¹.

Myeloperoxidase assay

Myeloperoxidase (MPO) activity was determined using an assay described previously (Oliveira et al., 2014). Kidney samples were homogenized in acetate buffer (80 mM, pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and kept at 4°C. Immediately before the assay, the tissue homogenate was centrifuged at 11,000×g for 20 min and the supernatant was then collected for assay. An aliquot of 10 µL of supernatant was incubated with 200 µl of acetate buffer and 40 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution (18.4 mM) for 3 min at 37 °C. The reaction was stopped on ice by addition of 30 µL acetic acid. The color formed was analyzed by a spectrophotometer at 630 nm. Reaction was read on a Fisher Biotech Microkinetics BT 2000 microplate reader. Values were expressed as optical densities and corrected by homogenized protein grams (g).

Antioxidant enzymes

Catalase (CAT) activity was evaluated by measuring the decrease in the absorption at 240 nm. Sample aliquots (0.1 mL) were added to 1.9 mL of a reaction medium consisting of 50 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) and 2 mmol.L⁻¹ H₂O₂ at a final concentration, thereby providing information to determine the pseudo-first-order reaction constant (k') of the

decrease in H₂O₂ absorption (Chance et al., 1979). The results were reported as pmol.mg protein⁻¹.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by using a coupled reaction with GR in the presence of GSH and NADPH, as described previously by Flohé and Gunzler (1984). The oxidized glutathione (GSSG) produced upon reduction of t-butyl hydroperoxide by GPx is reduced by GR using NADPH as a cofactor. The oxidation of NADPH to NADP⁺ results in a decrease in the absorbance at 340 nm. Sample aliquots (0.1 mL) were added to 1.2 ml of the assay mixture containing 100 mmol.L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.7), 1 mmol.L⁻¹ EDTA, 0.2 U.mL⁻¹ of GR, 2 mmol.L⁻¹ of GSH, 0.2 mmol.L⁻¹ NADPH at a final concentration. Subsequently t-butylhydroperoxide was added to a final concentration of 0.5 mmol.L⁻¹ and the change in the absorbance was recorded at regular intervals of a period of 3 min. The enzyme activity was expressed as $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

Glutathione-S-transferase (GST) activity was assayed based on the conjugation reaction with GSH, using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate (Habig et al., 1974). Sample aliquots (0.1 mL) were added to 1.2 mL of the assay mixture containing 100 mmol.L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.5), GSH and CDNB at a final concentration of 1 mmol.L⁻¹ each. The activity was calculated from the changes in absorbance at 340 nm. It was expressed as $\text{pmol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

Glutathione reductase (GR) activity was expressed as $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ and measured by the rate of NADPH consumption at 340 nm. Samples aliquots (0.1 mL) were added to 0.9 mL of a reaction medium consisted of phosphate buffer (pH 8.0), 10 mmol.L⁻¹ EDTA, 0.25 mmol.L⁻¹ GSSG and 0.1 mmol.L⁻¹ NADPH in 238 mmol.L⁻¹ NaHCO₃ at a final concentration (Carlberg & Mannervick, 1985).

Thioredoxin reductase (TrxR) activity was assayed using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and NADPH. The method is based on the reduction of DTNB in TNB, a yellow color compound which can be detected spectrophotometrically at 412 nm. A reaction medium (pH 7.0) containing DTNB (72 mmol.L⁻¹), NADPH (47 mmol.L⁻¹) and EDTA (200 mmol.L⁻¹) were prepared in which the TNB formation reaction was measured for 1 minute. A unit of TrxR is defined as 1 μmol of TNB formed per minute. Data were expressed as μmol.min⁻¹ mg protein⁻¹ (Holmgren & Bjornstedt, 1995).

Non-enzymatic antioxidants

Non-protein thiols (NPSH) represent an indirect measure of GSH. Proteins were eliminated by adding 0.5 mmol.L⁻¹ perchloric acid to the homogenates and centrifuging the mixture at 700×g for 5 min. To the supernatants (0.1 mL), 0.9 mL of 0.2 mol.L⁻¹ phosphate buffer (pH 8.0) and 0.18 mmol.L⁻¹ 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at a final concentration were added and vortexed. The DTNB formed a yellow complex with GSH, and the absorbance was measured at 412 nm. NPSH content was expressed as nmol.mg protein⁻¹ (Ellmann, 1959).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed by using the software Statistica® 7.0. Levene's test was used to verify whether the data were parametric. Two-way analysis of variance followed by Tukey's test was performed to assess the differences among the groups. The results are expressed as mean ± standard error. The minimum significance level was set at 95 % (P < 0.05).

Results

Carbonyl protein and lipid peroxidation

The carbonyl protein and TBARS showed no significant differences among the groups ($P < 0.05$) (Table 1).

Myeloperoxidase

The MPO activity showed no significant differences among the groups ($P < 0.05$) (Table 2).

Antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidants

Catalase

The CAT activity was lower in ASP than in the control group ($P < 0.05$). The ASP–NAC animals showed a higher CAT activity when compared to ASP ($P < 0.05$) (Fig. 1A).

Glutathione peroxidase

The GPx activity was lower in ASP than in the control group ($P < 0.05$). The ASP–NAC animals showed a higher GPx activity when compared to ASP ($P < 0.05$) (Fig. 1B).

Glutathione S-transferase

The GST activity was lower in ASP than in the control group ($P < 0.05$). ASP-NAC mice showed increased GST activity when compared to ASP ($P < 0.05$) (Fig. 1C).

Glutathione reductase and thioredoxin reductase

The GR (Fig. 1D) and TrxR (Fig. 1E) activities were similar in ASP and control group. However, ASP-NAC group showed a higher GR (Fig. 1D) and TrxR (Fig. 1E) activities when compared to ASP ($P < 0.05$).

Non-protein thiols

The NPSH levels were lower in ASP than in the control group ($P < 0.05$). The ASP-NAC group showed higher NPSH levels when compared to ASP ($P < 0.05$) (Fig. 1F).

Discussion

Aspartame is an artificial sweetener composed by the amino acids aspartic acid and phenylalanine, and also methanol (Butchko et al., 2002). It is consumed around the world by millions of people (Butchko and Stargel, 2001; Fry, 1999). It has been suggested that aspartame consumption caused the impairment of renal function in rats, which was related to lipid peroxidation and GSH depletion (Iman, 2011; Saleh, 2014).

However, the data from the present work showed the absence of oxidative damage to lipids and proteins, as measured by TBARS and carbonyl proteins, respectively. Moreover, the MPO activity was similar in all studied groups, indicating aspartame also was unable to cause inflammatory reaction in the mouse renal tissue, since it is a marker of polymorphonuclear cells (mainly neutrophil) infiltration to the tissue (Suzuki et al., 1983).

On the other hand, the data from the present research show decreased GSH content in the renal tissue of aspartame-treated animals. Since GSH is employed as a substrate for GST and GPx activities, GSH insufficiency might cause a diminution in their activities, as observed in the present study. Finamor et al. (2017) also found that aspartame triggered GSH depletion, but in mice liver. Furthermore, these authors exhibited that aspartame did not change the redox status of GSH (GSSG and GSH ratio). So, in the present research, it is believed the lower GSH levels were also maintained in its reduced form through GR, whose activity was found reduced after aspartame treatment. Additionally, it could explain the lack of damage to lipids and proteins, and inflammatory response. Such findings are in accordance with Iman (2011), which describe that rat renal tissue was less sensitive and affected by aspartame than the hepatic one. Furthermore, the protection of the renal tissue against aspartame-induced damage could be elucidated by reduced CAT activity, which probably results from the attempt to prevent hydrogen peroxide accumulation through its degradation in molecular oxygen and water, thus protecting it against damage.

It is widely used in several areas of medical care, N-acetylcysteine (NAC) is a low-cost compound with high availability and a low rate of the adverse effects that are prominent among the antioxidant drugs, being initially employed as a mucolytic agent and, then as an antidote to acetaminophen overdose. This compound is currently used to prevent renal dysfunction induced by radiocontrast agents. (Moreira et al., 2016; Sun et al., 2013). N-

acetylcysteine plays an important role in the production of GSH, since it provides the cysteine required for its synthesis. Indeed, after NAC treatment GSH levels and GSH-related enzymes as well as TrxR were restored to normal levels. Besides GSH, thioredoxin (Trx) is also responsible for maintaining the redox balance of cells, being reduced through Trx reductase (TrxR) (Masutani et al., 2005). The present findings are in agreement with previous studies found in the literature (Finamor et al., 2014; Saleh, 2014; Finamor et al., 2017), suggesting that it could be beneficial to individuals that consume aspartame chronically.

In conclusion, despite having caused GSH depletion, aspartame did not triggered oxidative damage to lipids and proteins or neutrophil infiltration. Furthermore, NAC was able to restore GSH levels and GSH-associated enzymes in mice kidney after chronic treatment with aspartame.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) and the Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). I.A.F. received a fellowship from Programa de Pós-Doutorado no Exterior, which belongs to the CNPq.

References

Anderson M.E., Meister A. (1983) Transport and direct utilization of c-glutamylcysteine for glutathione synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 707–711.

Arbind K.C., Sheeladevi R. (2014) Imbalance of oxidant-antioxidant status by aspartame in the organs of immune system of *Wistar* albino rats. Afr J Pharm Pharmacol.; 7:3019-25.

Arrigo A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state, Free Radic. Biol. Med. 27 936–944.

Ashok I., Sheeladevi R. (2012) Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in brain discrete regions of albino rats, Journal of Biosciences 37(4) 1–10.

Ashok I., Sheeladevi R. (2014) Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain, Redox Biology 2 820–831.

Ashok I., Sheeladevi R., Wankhar D. (2013) Long term effect of aspartame (artificial sweetener) on membrane homeostatic imbalance and histopathology in the rat brain, Free Radicals and Antioxidants 3 S42–S49.

Ballatori N., Krance S.M., Marchan R., Hammond C.L. (2009) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2): 13–28.

Blackburn R.V., Spitz D.R., Liu X., Galoforo S.S., Sim J.E., Ridnour L.A., Chen J.C., Davis B.H., Corry P.M., Lee Y.J. (1999) Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells. *Free Radic Biol Med*; 26:419–430.

Bojes H.K., Datta K., Xu J., Chin A., Simonian P., Nunez G., Kehrer J.P. (1997) Bcl-xL overexpression attenuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal. *Biochem J*; 325 (Pt 2):315–319.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.

Butchko H.H., Stargel W.W., Comer C.P., Mayhew D.A., Benninger C., Blackburn G.L., Sonnevile L.M., Geha R.S. (2002) Aspartame: review of safety. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35 S1-S93.

Butchko H.H., Stargel W.W. (2001) Aspartame scientific evaluation in the postmarketing period. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 34 221-233.

Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484–499.

Chance B., Sies H.; Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Reviews*. 59, 527-601.

Choudhary A.K., Sundareswaran L., Sheeladevi R. (2016) Aspartame induced cardiac oxidative stress in Wistar albino rats, *Nutrition clinique et métabolisme* 30: 29–37.

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

Dröge, W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 82(1), 47-95.

Ellman, G. L. (1959) Tissue sulphydryl groups. *Arch of Biochem and Biophys*. 82, 70-77.

Fagherazzi G., Vilier A., Saes Sartorelli D., Lajous M., Balkau B., Clavel-Chapelon F. (2013) Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes. *Am J Clin Nut*; 97:517–23.

Farbyszewski R., Witek A., Skrzydlewska E. (2000) N-Acetylcysteine or trolox derivate mitigate the toxic effects of methanol on the antioxidant system of rat brain. *Toxicology* 156:47–55.

Finamor I., Pérez S., Bressan C.A., Brenner C.E., Rius-Perez S., Brittes P.C., Cheiran, G., Rocha M.I., Veiga M., Sastre J., Pavanato M.A. (2017) Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice. *Redox Biology* 11 (2017) 701–707.

Finamor I.A., Ourique G.M., Pês T.S., Saccol E.M.H., Bressan C.A., Scheid T., Baldisserotto B., Llesuy S.F., Pavanato M.A. (2014) The protective effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in the rat brain caused by the long-term intake of aspartame by rats. *Neurochem. Res.* 39 1681-1690.

Flohé L., Gunzler W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. In: Packer L (ed) *Methods in enzymology*. Academic Press, San Diego, pp 114–121.

Fry J. (1999) The world market for intense sweeteners. *World Review of Nutrition and Dietetics*, v. 85, p. 201-211.

Habig W.H., Pabts M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249, 7130-7139.

Harris C., Dixon M., Hansen J.M. (2004) Glutathione depletion modulates methanol, formaldehyde and formate toxicity in cultured rat conceptuses. *Cell Biology and Toxicology* 20(3) 133–145.

Holmgren A. (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem.* 54: 237-271.

Holmgren A., Björnstedt M. (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252: 199-208.

Humphries P., Pretorius E., Naud E.H. (2008) Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 451-462.

Iman M.M. (2011) Effect of aspartame on some oxidative stress parameter in liver and kidney of rats, *Afr J Pharm Pharmacol.*; 5:678-82.

Iman M.M., Naveen A.N. (2011) Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in cerebral cortex. *Int J Pharm Biomed Sci.*; 2:4-10.

Jones, D.P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 295, 849-868.

Kim J.Z., Seo J., Cho K.H. (2011) Aspartame-fed zebrafish exhibit acute deaths with swimming defects and saccharin-fed zebrafish have elevation of cholesteryl ester transfer protein activity in hypercholesterolemia. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2899-2905.

Kruse J.A. (1992) Methanol poisoning. Review article [J] *Intensive Care Med.*; 18(7):391–397.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265–275.

Masutani H., Ueda S., Yodoi J. (2005) The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1:991-8.

Moreira, M.A., Irigoyen M.C., Saad K.R., Saad P.F., Koike M.K., Montero E.F.S., Martins J.L. (2016) N-acetylcysteine reduces the renal oxidative stress and apoptosis induced by hemorrhagic shock, *Journal Of Surgical Research* 203: 113-120.

Oliveira, S.M, Silva, C.R., Wentz, A.P., Paim, G.R., Correa, M.S., Bonacorso, H.G., Prudente, A.S. Otuki, M.F., Ferreira J. (2014) Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-tri fluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analogin models of pathological pain. *Pharmacol. Biochem Behav.* 124,396–404.

Pankow D., Jagielki S. (1993) Effect of methanol on modifications of hepatic glutathione concentration on the metabolism of dichloromethane to carbon monoxide in rats. *Human Experimental Toxicology*, 12: 227-231.

Parthasarathy J. N., Ramasundaram S. K., Sundaramahalingam M., Pathinasamy S. D. (2006) Methanol induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *Journal of Occupational Health*, 48: 20-27.

Ranney R.E., Oppermann J.A., Muldoon E., McMahon F.G. (1976) Comparative Metabolism of Aspartame in Experimental Animals and Humans. *J Toxicol Environ Health* 2 (2), 441-451. 11.

Reznick A.Z., Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233, 357-363.

Saleh A.A.S. (2014) Synergistic effect of N-acetylcysteine and folic acid against aspartame-induced nephrotoxicity in rats. *Int J Adv Res;* 2:363–73.

Samuni Y., Goldstein S., Dean O.M., Berk M. (2013) The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine, *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 4117–4129.

Sen C.K. (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul;* 36:1–30.

Sies H. (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180-183.

Skrzydłewska E., Witek A., Farbiszewski R (1998) The comparison of the antioxidant defense potential of brain to liver of rats after methanol ingestion. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v. 120, n. 2, p. 289-294.

Soffritti M., Belpoggi F., Esposti D.D., Lambertini L., Tibaldi E., Rigano A. (2006) First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to *Sprague–Dawley* rats. *Environ Health Perspect* 114:379–385.

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

Stegink L.D., Filer L.J., Bell E.F., Ziegler E.E., T.R. Tephly (1989) Effect of repeated ingestion of aspartame-sweetened beverage on plasma amino acid, blood methanol, and blood formate concentrations, *Metabolism* 34(4) 357–363.

Sun Z., Fu Q., Cao L., Jin W., Cheng L., Li Z. (2013) Intravenous N-acetylcysteine for prevention of contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Plos One.*; 8:e55124.

Suzuki K., Ota H., Sasagawa S., Sakatani T., Fujikura T. (1983) Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*; 132:345–52.

Tsakiris S., Giannoulia-Karantana A., Simintzi I., Schulpis K.H. (2006) The effect of aspartame metabolites on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity. *Pharmacological Research*, v. 53, n. 1, p. 1-5.

Van den Dobbelen D.J., Nobel C.S., Schlegel J., Cotgreave I.A., Orrenius S., Slater A.F. (1996) Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem*; 271:15420–15427.

Van den Eeden S.K., Koepsell T.D., Longstreth Jr. W.T., Van Belle G., Daling J. R., McKnight B. (1994) Aspartame ingestion and headaches: A randomized crossover trial. *Neurology* October 1994 (44) 10, 17-87.

Voehringer D.W. (1999) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med*; 27:945–950.

Walton R.G. (1988) The possible role of aspartame in seizure induction. In: *Dietary Phenylalanine and Brain Function* (Eds. R.J. Wurthman, and E. Ritter-Walker), 159-162. Birkhauser, Boston.

Figure Captions

Figure 1. Effects of N-acetylcysteine on CAT (A), GPx (B), GST (C), GR (D), TrxR (E) activities, and NPSH content (F) in the kidney of control and rats chronically treated with aspartame. Each bar represents the mean \pm standard error (n = 10). ^aDenotes that the data are significantly different from the control group at P < 0.05. ^bDenotes that the data are significantly different from ASP at P < 0.05. *CAT* Catalase; *GPx* Glutathione Peroxidase; *GST* Glutathione S-Transferase; *GR* Glutathione Reductase; *TrxR* Thioredoxin Reductase; *NPSH* Non-protein thiols.

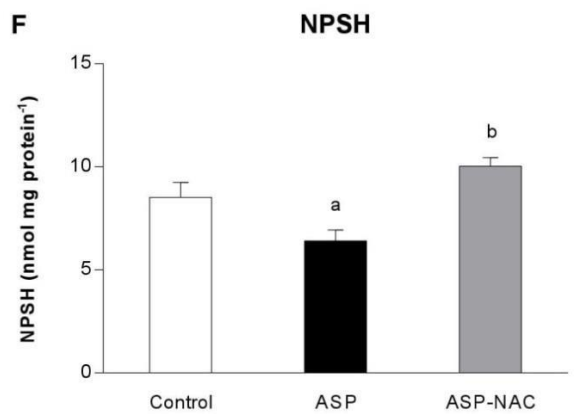
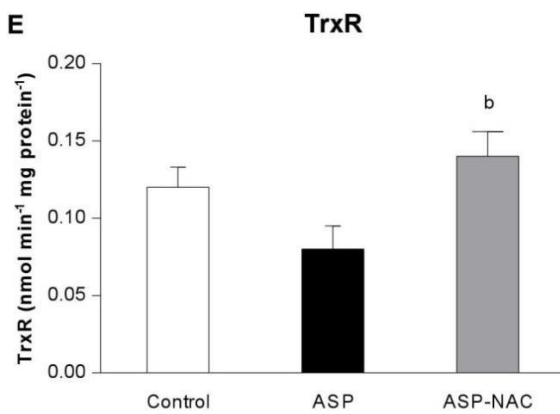
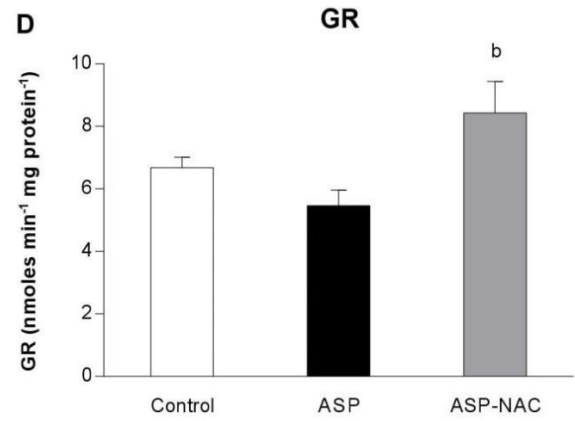
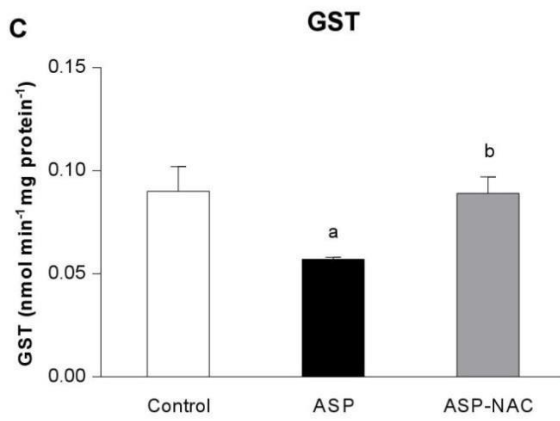
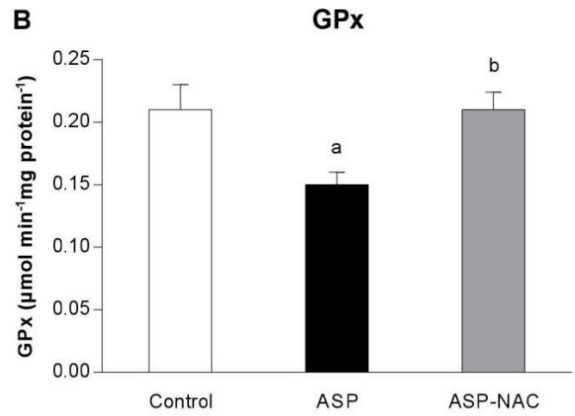
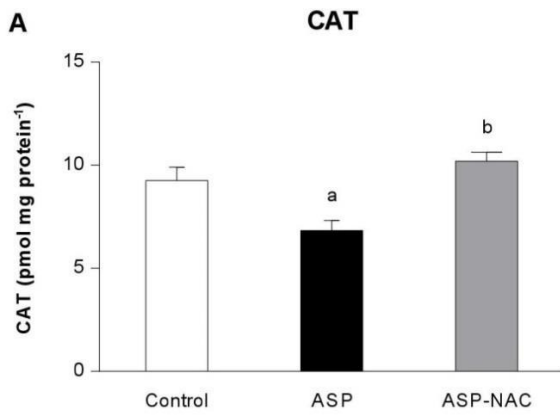


Table 1. Effects of N-acetylcysteine on PC and TBARS levels in the kidney of control and rats chronically treated with aspartame.

Parameters	Experimental groups		
	Control	ASP	ASP-NAC
CP (nmol mg protein ⁻¹)	1.84 ± 0.08	2.04 ± 0.18	1.97 ± 0.24
TBARS (nmol mg protein ⁻¹)	1.09 ± 0.06	1.14 ± 0.04	1.0 ± 0.05

Significance at $P < 0.05$; ^a - compared with Control group; ^b – compared with ASP group. *CP* Carbonyl proteins; *TBARS* Thiobarbituric acid reactive substances.

Table 2. Effects of N-acetylcysteine on MPO activity in the kidney of control and rats chronically treated with aspartame.

Parameter	Experimental groups		
	Control	ASP	ASP-NAC
MPO (MPO mg protein ⁻¹)	0.087 ± 0.003	0.099 ± 0.004	0.089 ± 0.007

Significance at $P < 0.05$; ^a - compared with Control group; ^b – compared with ASP group. *MPO* Myeloperoxidase.

5 DISCUSSÃO

O experimento que originou esta dissertação foi executado com o objetivo de avaliar o efeito da NAC sobre as alterações bioquímicas e oxidativas causadas pela administração crônica de 80 mg.kg^{-1} de aspartame a camundongos.

Durante o metabolismo normal da célula existe a produção de intermediários reativos de oxigênio através de reduções parciais de oxigênio (O_2), tais como o ânion superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\bullet) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que são conhecidos como ERO (CHANCE et al., 1979). As ERO atuam como mediadores reguladores nos processos de sinalização celular, o que demonstra sua importância em baixas concentrações (DRÖGE, 2002). Os danos oxidativos são fisiológicos quando há um equilíbrio entre pró-oxidantes (ERO) e antioxidantes (JONES, 2008). No entanto, se ocorrer alguma perturbação levando a um desequilíbrio entre estes componentes, os níveis de ERO se tornam mais elevados que os níveis fisiologicamente aceitos, levando a uma situação conhecida como estresse oxidativo. Esta situação é definida como dano macromolecular não fisiológico que leva a uma interrupção da sinalização e controle redox (SIES, 2015; WELKER et al., 2013). Biomoléculas como as proteínas e os lipídios podem sofrer danos oxidativos, o que provoca alterações na estrutura e permeabilidade da membrana celular, danos no DNA e interrupção da homeostase celular, levando a lesões e até mesmo à morte celular (LUSHCHAK, 2011).

Estudos realizados em modelos animais propuseram o estresse oxidativo como uma das causas da toxicidade por ASP em diferentes tecidos, como o sanguíneo (PROKIC et al., 2014), o encefálico (RUIZ et al., 2008; ABDEL-SALAM et al., 2012; ABHILASH et al., 2013; FINAMOR et al., 2014), o hepático (ABHILASH et al., 2011; IMAN, 2011; EL HALIEM e MOHAMED, 2011) e o renal (IMAN, 2011; SALEH, 2014). A hiperglicemia também foi previamente relatada na literatura após exposição crônica ao ASP (COLLISON et al., 2012). Sintomas neurológicos, perda de memória e ou processo de aprendizagem, dores de cabeça, confusão, dificuldades visuais e tonturas, observados após doses elevadas ou abusivas de consumo de ASP, podem estar relacionados com a diminuição parcial ou notável da atividade da acetilcolinesterase (TSAKIRIS et al., 2006). Vários estudos sugerem associação entre o consumo de ASP e o risco de diabetes tipo 2 (FAGHERAZZI et al., 2013), e indução de alterações histopatológicas nas glândulas salivares (EL-SAKHAWY e SAEID, 2014). A dose oral de 75 mg.kg^{-1} de ASP causou estresse oxidativo no cérebro e fígado (ASHOK e

SHEELADEVI, 2012; ASHOK et al., 2013) e a dose oral de 40 mg.kg⁻¹ causou estresse oxidativo no cérebro (IMAN e NAVEEN, 2001), fígado e rim (IMAN, 2011), órgãos imunes (ARBIND e SHEELADEVI, 2014) e no coração (CHOUDARY et al., 2016), em estudos realizados com ratos e camundongos.

Os antioxidantes e os sistemas de eliminação de radicais livres existem nas células para protegê-las dos efeitos nocivos dos radicais livres (KAPLOWITZ et al., 1996). Entretanto, os animais possuem estratégias de defesa celular contra ERO, que incluem defesas enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD), a CAT, a GST, entre outras, e defesas não enzimáticas como a GSH (SACCOL et al., 2016).

Os dados deste trabalho mostraram ausência de diferença significativa entre grupos estudados no conteúdo de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e proteínas carbonil, indicando que não houve danos nos lipídios e proteínas no tratamento com ASP em camundongos. O conteúdo de proteína carbonil é o marcador geral mais utilizado para verificar a oxidação de proteínas (BEAL et al., 1993). Neste trabalho, a atividade da MPO foi semelhante no grupo ASP e nos animais tratados com ASP-NAC quando comparados ao grupo controle. MPO é uma enzima encontrada em células de origem mielóide e tem sido utilizada como marcador bioquímico de infiltração de células polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) no tecido, indicando uma reação inflamatória (SUZUKI et al., 1983). Assim, nosso trabalho mostra a ausência de inflamação marcada pela MPO, quando o grupo controle e os grupos tratados com ASP e N-acetilcisteína são analisados. Quanto às atividades de enzimas antioxidantes como a CAT, o grupo tratado cronicamente com ASP apresentou diminuição em relação ao grupo controle.

O presente estudo mostrou que a administração oral de ASP (80 mg.kg⁻¹) leva a uma significativa diminuição na atividade da CAT no tecido renal após noventa dias de tratamento. CAT é uma enzima que catalisa a conversão de H₂O₂ em H₂O e oxigênio molecular (MATÉS, 2000). A atividade inadequada da CAT para degradar o H₂O₂ pode levar à formação de mais H₂O₂, que é convertido em OH•, o que pode contribuir para o EO, devido aos metabólitos da quebra do metanol a partir do ASP. Um estudo de Choudary e colaboradores (2016) mostrou uma diminuição da atividade da CAT no coração de animais expostos ao ASP, indicando uma maior depleção de NADPH. De acordo com Gulec e colaboradores (2006), a exposição ao formaldeído conduziu a uma diminuição da atividade da CAT em tecido hepático quando comparado ao controle. A administração de metanol também levou a uma diminuição da atividade da CAT em órgãos linfóides (PARTHASARATHY et al., 2006). Estes dados

corroboram que diminuição da atividade da CAT pode dever-se à formação de formaldeído proveniente da quebra do metanol.

A administração de uma dose de 40 mg.kg^{-1} de ASP induziu estresse oxidativo no fígado e rim de ratos albinos machos, sendo o tecido hepático o mais sensível e rapidamente afetado, do que o renal (IMAN, 2011). Os dados do presente estudo mostram uma diminuição do teor de tióis não proteicos em tecidos de animais tratados cronicamente com a dose de 80 mg.kg^{-1} de ASP. A diminuição da atividade de NPSH que foi observada no presente estudo parece ter sido causada pelo metanol, uma vez que o metabolismo do metanol depende do GSH (PANKOW e JAGIELKI, 1993). Num estudo de Iman (2011), que investigou o efeito do ASP sobre alguns parâmetros oxidativos, o conteúdo de GSH foi menor no grupo tratado com ASP do que no controle, tanto nos tecidos renais como nos tecidos hepáticos. Abhilash e colaboradores (2011) também relataram uma queda significativa semelhante na concentração de GSH no cérebro de ratos após o consumo de ASP. No tecido cardíaco, um estudo de Choudary e colaboradores (2016) mostra uma diminuição no teor de GSH em animais tratados com ASP. A diminuição do teor de GSH aumenta a vulnerabilidade celular ao estresse oxidativo (OYAMA et al., 2002). Num estudo de Finamor e colaboradores (2017), a administração de ASP causou uma diminuição de 30% nos níveis de GSH no fígado. No entanto, a depleção de GSH não foi associada com a oxidação da GSH no fígado, uma vez que o ASP também induziu uma depleção paralela da glutatona oxidada (GSSG) mantendo a razão GSSG/GSH normal. Além disso, a administração crônica de ASP produziu elevação das atividades de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma e depleção de GSH, levando a uma depleção grave na maioria dos metabólitos da via de transulfuração no fígado (FINAMOR et al., 2017).

Adicionalmente, a GSH é empregada como substrato para atividades de GST e GPx, portanto, acreditamos que sua insuficiência pode causar uma diminuição em suas atividades. Assim, a diminuição dos níveis de GSH resultou em diminuição das atividades de GPx e GST, de acordo com os dados obtidos neste estudo. Pankow e Jagielki (1993) mostraram que as atividades de GST em tecidos cerebrais de ratos tratados com ASP foram diminuídas em comparação com os valores do controle, mas uma redução significativa foi observada somente na dose de 100 mg.kg^{-1} 12 h após o tratamento. A GR desempenha um papel importante na proteção antioxidante celular catalisando a redução de GSSG para GSH (CAZENAVE et al., 2006). A concentração da GSH e a atividade da GPx e da GR foram significativamente

reduzidas no fígado de ratos que receberam a dose de 1000 mg.kg⁻¹ de ASP (ABHILASH et al., 2011).

O equilíbrio redox é mantido principalmente pela ação dos sistemas antioxidantes de GSH e tioredoxina (Trx) (MASUTANI et al., 2005). Trx é uma proteína de 12 kDa que tem um sítio dissulfureto/ditiol redox ativo na sua estrutura e que trabalha em conjunto com a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e a enzima tioredoxina redutase (TrxR), formando um sistema de redução eficiente que, em cooperação com peróxidos dependentes de Trx, promove a remoção de H₂O₂ intracelular (HOLMGREN, 1985; HOLMGREN e BJÖRNSTEDT, 1995). Os componentes do sistema Trx não só participam na remoção de ERO do ambiente celular, mas também desempenham papéis reguladores em várias funções celulares através da interação proteína-proteína (MASUTANI et al., 2005). Em nosso estudo, a atividade de TrxR teve um aumento no grupo ASP-NAC em relação ao grupo tratado cronicamente com ASP, indicando que o equilíbrio redox foi restaurado pela ação desta enzima, juntamente com as enzimas relacionadas à GSH.

Assim, a realização deste trabalho confirma a necessidade de buscar compostos que minimizem a toxicidade produzida pelo ASP, visto que sua introdução no mercado melhorou a qualidade de vida de indivíduos diabéticos, obesos, entre outros, tornando-o um dos mais populares edulcorantes artificiais não-calóricos (BUTCHKO et al., 2002).

A NAC é um composto de baixo custo com alta disponibilidade e uma baixa taxa de efeitos adversos que são proeminentes entre os antioxidantes. Teve seu primeiro relato de uso na prática clínica no início da década de 1960, quando mostrou ser efetiva como agente mucolítico em pacientes com fibrose cística (HURST et al., 1967). Estudos posteriores relatam a NAC como um potencial terapêutico no tratamento da intoxicação por acetaminofeno (PRESCOTT et al., 1977, 1979). Este composto é atualmente utilizado para prevenir a disfunção renal induzida por agentes de radiocontraste (MOREIRA et al., 2016; SUN et al., 2013). A NAC age como antioxidante, desempenhando um papel importante na produção da GSH, aumentando seus níveis intracelulares e a atividade da GST e da GPx, que fornece defesa contra o EO, produzindo grupos sulfidril que eliminam diretamente as ERO e participa na desintoxicação de muitas moléculas, como o radical superóxido (O₂•), H₂O₂, e o radical hidroxil (MOREIRA et al., 2016; ALTURFAN et al., 2012; HSU et al., 2012; SPAPEN, 2004; PATERSON et al., 2003; ZAFARULLAH et al., 2003). Sendo assim, sua depleção decorrente da exposição ao ASP é característica comum de estudos encontrados na literatura (RUIZ et al., 2008; ABHILASH et al., 2011; IMAN, 2011; IVYASWAMY e

RATHINASAMY, 2012; ABHILASH et al., 2013; ASHOK e SHEELADEV, 2014; ASHOK et al., 2014), os quais a correlacionam com o aumento da vulnerabilidade celular ao EO. Apesar disso, os mecanismos farmacológicos precisos que sustentam a atividade da NAC ainda não estão totalmente compreendidos e podem nem mesmo estar inteiramente relacionados com a repleção de GSH (WARING et al., 2012; GOSSELIN et al., 2013).

Assim, hipotetizamos que não houve EO no rim porque este órgão é o segundo órgão responsável pela depuração e eliminação de xenobióticos, deixando o fígado responsável por este processo. Além disso, pensamos que o metabolismo do camundongo dentro de um período de noventa dias tenha se adaptado e revertido um possível dano em proteínas e lipídios. Dessa forma, a avaliação dos metabolismos dos animais de experimentação, comparando-os, é uma forma de melhor entender as interações farmacocinéticas dos organismos em estudo.

6 CONCLUSÃO GERAL

Apesar de ter causado a depleção da GSH, a administração crônica de 80 mg.kg^{-1} de ASP a camundongos não provocou danos oxidativos a lipídios e proteínas ou infiltração de neutrófilos em tecido renal. Indivíduos que buscam um estilo de vida mais saudável, bem como aqueles que são diabéticos, fazem uso do ASP, um aditivo alimentar pertencente à classe dos edulcorantes artificiais. No entanto, uma variedade de estudos fornece dados que mostram a toxicidade do ASP e da quebra de seus metabólitos. Assim, os resultados dos experimentos que originaram esta dissertação evidenciam que a administração de 163 mg.kg^{-1} de NAC restaura o sistema da GSH e as enzimas relacionadas a ela em rim de camundongos. Estudos futuros são necessários e importantes no intuito de investigar a interação interespecie no consumo de ASP, bem como o tempo de tratamento e a toxicidade relacionada ao consumo deste aditivo alimentar amplamente distribuído no mundo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, O. M. E. et al. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 16: 2092-2101, 2012.

ABHILASH, M. et al. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. **Food and Chemical Toxicology**, 49: 1203-1207, 2011.

ABHILASH, M. et al. Long-term consumption of aspartame and brain antioxidant defense status. **Drug and Chemical Toxicology**, 36: 135-140, 2013.

ADA, American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. **Journal of the American Dietetic Association**, 104: 255-275, 2004.

ALTURFAN, A.B. et al. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 36: 438-445, 2012.

ARBIND, K.C.; SHEELADEVI, R. Imbalance of oxidant-antioxidant status by aspartame in the organs of immune system of *Wistar* albino rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 7:3019-3025, 2014.

ARAI, M. et al. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 274: 4924-4933, 1999.

AREMU, D.A.; MADEJCZYK, M.S.; BALLATORI, N. N-acetylcysteine as a potential antidote and biomonitoring agent of methylmercury exposure. **Environmental Health Perspectives**, 116: 26-31, 2008.

ARUOMA, O.I. et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. **Free Radicals Biology and Medicine**, 6:593-597, 1989.

ASHOK, I.; SHEELADEVI, R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. **Redox Biology**, 2: 820–831, 2014.

ASHOK, I.; SHEELADEVI, R. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in brain discrete regions of albino rats. **Journal of Biosciences**, 37: 1–10, 2012.

ASHOK, I.; SHEELADEVI, R.; WANKHAR, D. Long term effect of aspartame (artificial sweetener) on membrane homeostatic imbalance and histopathology in the rat brain. **Free Radicals and Antioxidants**, 3: 42–49, 2013.

BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 32: 797– 803, 2002.

BEAL, M.F.; HYMAN, B.T.; KOROSHETZ W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? **Trends in Neurosciences** 16: 125–131, 1993.

BLAKE, D.; WINYARD, P. G.; **Immunopharmacology of Free Radical Species**, Academic Press, 301, 1995.

BURGUNDER, J. M.; VARRIALE, A.; LAUTERBURG, B. H.; Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. **European Journal of Pharmacology**, 36: 127-131, 1989.

BUTCHKO, H.H. et al. Aspartame: review of safety. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 35: 1-93, 2002.

CARDOSO, S. L.; Fotofísica de carotenóides e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, 20: 535-40, 1997.

CAZENAVE, J. et al. Differential detoxication and antioxidant response diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. **Aquatic Toxicology**, 76: 1-12, 2006.

CEDERBAUM, A. I.; QURESHI, A. Role of catalase and hydroxyl radicals in the oxidation of methanol by rat liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, 31: 329-335, 1982.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, 59: 527-601, 1979.

CHOUHARY, A.K.; SUNDARESWARAN, L.; SHEELADEVI, R. Aspartame induced cardiac oxidative stress in *Wistar* albino rats. **Nutrition clinique et métabolisme**, 30: 29–37, 2016.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P.; Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, 2: 1420-1428, 1963.

COLLISON, K.S. et al. Interactive effects of neonatal exposure to monosodium glutamate and aspartame on glucose homeostasis. **Nutrition & Metabolism (London)**, 9:58, 2012.

CURELLO, S. et al. Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress. **Clinical Chemistry**, 33: 1448-1449, 1987.

COSTANZO, L.S. **Fisiologia**. Elsevier, 2014, 1003 p.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, 82:, 47-95, 2002.

EL HALIEM, N.G.A.; MOHAMED, D.S. The effect of aspartame on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rat and the possible protective effect of *Pimpinella anisum* oil. **Egypt Journal of Histology**, 34:715–26, 2011.

EL-SAKHAWY, M.; SAEID, S. Effect of long term administration of aspartame on the parotid salivary glands of male albino rats. **International Journal of Advanced Research**, 2: 850–885, 2014,

FAGHERAZZI, G. et al. Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 97: 517–523, 2013.

FINAMOR, I. et al. Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice. **Redox Biology**, 11: 701–707, 2017.

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. **Neurochemical Research** 39: 1681-1690, 2014.

GOSSELIN, S. et al. Treating acetaminophen overdose: thresholds, costs and uncertainties. **Clinical Toxicology**, 51: 252–378, 2013.

GULEC, M.; GUREL, A.; ARMUTCU, F. Vitamin E protects against oxidative damage caused by a formaldehyde in the liver and plasma of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 290: 61-67, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research Communications**, 19: 141-158, 1993.

GUYTON, A.C; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica 12ª Edição. **Elsevier**, 2011, 1176 p.

HALL, R.; MALIA, R. G.; Medical Laboratory Hematology. **Butterworths**, 294, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HARRIS, C.; DIXON, M.; HANSEN, J.M. Glutathione depletion modulates methanol, formaldehyde and formate toxicity in culture rat conceptuses. **Cell Biology and Toxicology**, 20: 133-145, 2004.

HOHER, N.F. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 24: 112-119, 2001.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review of Biochemistry**, 54: 237-271, 1985.

HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, 252: 199-208, 1995.

HSU, T. et al. N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy in the emergency department. **Internal Medicine**, 51: 2709–2714, 2012.

HUMPHRIES, P.; PRETORIUS, E.; NAUDÉ, H. 2008. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. **European Journal of Clinical Nutrition**, 62: 451-462, 2008.

HURST, G. A.; SHAW, P. B.; LEMAISTRE, C. A. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine. **The American Review of Respiratory Disease**, 96: 962–970, 1976.

IMAN, M.M. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5: 678-682, 2011.

IMAN, M.M.; NOOR, N.A. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, 2: 4-10, 2011.

IYASWAMY, A.; RATHINASAMY, S. Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in the brain of albino rats. **Journal of Biosciences**, 37: 679-688, 2012.

JOHLIN, F. C. et al. Studies on the role of folic acid and folate dependent enzymes in human methanol poisoning. **Molecular Pharmacology**, 31: 557-661, 1987.

JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology**, 295: 849-868, 2008.

KAPLOWITZ, N. et al. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, 377: 267–273, 1996.

KELLY, G.S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, 3: 114-127, 1998.

KRUSE, J.A. Methanol poisoning. **Intensive Care Medicine**, 18: 391–397, 1992.

LIPINSKI, L. J. et al. Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cell. **Nucleic Acids Research**, 27: 3153-3158, 1999.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, 101: 13-30, 2011.

MAGNUSON, B.A. et al. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37: 629-727, 2007.

MARTINS, M. R. I.; AZOUBEL, R. Efeitos do aspartame no rim fetal de ratos – Estudo Cariométrico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 28: 151-157, Set., 2006.

MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY. Evaluation of consumer complaints related to aspartame use. **Morbidity and mortality Weekly Report**, 33: 605-607, 1984.

MASUTANI, H.; UEDA, S.; YODOI, J. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, 12: 991-998, 2005.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, 153: 83–104, 2000.

MC MARTIN, K. E. et al. Lack of role for formaldehyde in methanol poisoning in the monkey. **Biochemical Pharmacology**, 28: 645-649, 1979.

MOREIRA, M.A. et al. N-acetylcysteine reduces the renal oxidative stress and apoptosis induced by hemorrhagic shock. **Journal Of Surgical Research** 203: 113-120, 2016.

MORRISEY, K. et al. Renal transporters in drug development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 53: 503-529, 2013.

MUNTHE, E.; KASS, E.; JELLUM, E. D-penicillamine induced increase in intracellular glutathione correlating to clinical response in rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, 7: 14-19, 1981.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2002. 977p.

OYAMA, Y. et al. Cytotoxic effects of methanol, formaldehyde, and formate on dissociated rat thymocytes: a possibility of aspartame toxicity. **Cell Biology and Toxicology**, 18: 43-50, 2002.

PANKOW, D.; JAGIELKI, S. Effect of methanol on modifications of hepatic glutathione concentration on the metabolism of dichloromethane to carbon monoxide in rats. **Human Experimental Toxicology**, 12: 227-231, 1993.

PARTHASARATHY, N. J. et al. Effect of methanol induced oxidative stress on the neuroimmune system of experimental rats. **Chemico-Biological Interactions**, 161: 14-25, 2006.

PATERSON, R.L.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. **Critical Care Medicine**, 31: 2574-2578, 2003.

PRESCOTT, L. F. et al. Intravenous N-acetylcysteine: The treatment of choice for paracetamol poisoning. **British Medical Journal**, 2: 1097-1100, 1979.

PRESCOTT, L. F. et al. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. **British Medical Journal**, 2: 432-434, 1977.

PROKIC, M. D. et al. Prooxidative effects of aspartame on antioxidant defense status in erythrocytes rats. **Journal of Biosciences**, 39: 859-866, 2014.

RANNEY, R.E. et al. Comparative metabolism of aspartame in experimental animals and humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 2: 441-451, 1976.

REYNOLDS, W. A. et al. Hypothalamic morphology following ingestion of aspartame or MSG in the neonatal rodent and primate: a preliminary report. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 2: 471-480, 1976.

ROEDERER, M. et al. Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87: 4884-4888, 1990.

ROSEN, G. M. et al. Free radicals and phagocytic cells. **The FASEB Journal**, 9: 200-209, 1995

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. **Archivos de Neurociencias (México)**, 13: 79-83, 2008.

SACCOL, E.M.H. et al. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Research**, 47: 1-20, 2016.

SAITO, Y. et al. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. **Toxicology**, 210: 235-245, 2005.

SALEH, A.A.S. Synergistic effect of N-acetylcysteine and folic acid against aspartame-induced nephrotoxicity in rats. **International Journal of Advanced Research**, 2: 363-73, 2014.

SENTUERKER, S. et al. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. **FEBS Letters**, 416: 286-290, 1997.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, 4: 180-183, 2015.

SIES, H.; Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International**, 25: 1058-1071, 1986.

SKRZYDLEWSKA, E. et al. The comparison of the antioxidant defense potential of brain to liver of rats after methanol ingestion. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 120: 289-294, 1998.

SKRZYDLEWSKA, E.; FARBISZEWSKI, R. Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. **Archives of Toxicology**, 71: 741-745, 1997.

SPAPEN, H. N-acetylcysteine in clinical sepsis: a difficult marriage. **Critical Care Medicine**, 8: 229-30, 2004.

SUN, Y.; Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, 8: 583-599, 1990.

SUN, Z. et al. Intravenous N-acetylcysteine for prevention of contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Plos One**, 8: 55124, 2013.

SUZUKI, K. et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**; 132: 345–52, 1983.

TEPHLY, T. R. The toxicity of methanol. **Life Sciences**, 48: 1031-1041, 1991.

TOLEDO, M.C.F.; IOSHI, S.H. Potential intake of intense sweeteners in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, 12: 799-808, 1995.

TROCHO, C. et al. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. **Life Sciences**, 63: 337-349, 1998.

TSAKIRIS, S. et al. The effect of aspartame metabolites on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity. **Pharmacological Research**, 53: 1-5, 2006.

TUCKER, G.; Measurement of the renal clearance of drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 12: 761-770, 1981.

VARMA, M. et al; Physicochemical determinants of human renal clearance. **Journal of Medicinal Chemistry**, 52: 4844-4852., 2009.

WARING, W. S. Criteria for acetylcysteine treatment and clinical outcomes after paracetamol poisoning. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, 5: 311–318, 2012.

WELKER, A.F. et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology**, 165: 384-404, 2013.

WELLS, P. G. et al. Oxidative damage in chemical teratogenesis. **Mutation Research**, 396: 65-78, 1997.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60: 6-20, 2003.