

# Efecto de aspartame, fenilalanina y ácido aspártico sobre los niveles de glutatión y peroxidación de lípidos en cerebro de rata

Norma Angélica Labra Ruiz<sup>1</sup>, Araceli Vences Mejía<sup>2</sup>, Nancy Leticia Hernández-Martínez<sup>1</sup>, Josefina Gómez-Garduño<sup>2</sup>, Víctor Manuel Dorado-González<sup>2</sup>, Norma Osnaya-Brizuela<sup>3</sup>, Raquel García-Álvarez<sup>3</sup>, Gerardo Barragán-Mejía<sup>1</sup>, David Calderón Guzmán<sup>1</sup>

## RESUMEN

En la actualidad la ingesta de alimentos y bebidas elaborados con edulcorantes se ha incrementado, el aspartame (Asp) es el edulcorante más utilizado en la elaboración de alimentos para niños y adultos, en más de 90 países. Estudios recientes han relacionado el consumo de Asp con el desarrollo de alteraciones metabólicas e incremento de desórdenes neurológicos asociados con la producción de radicales libres y productos de lipoperoxidación. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del Asp en cerebro de ratas mediante la determinación de los niveles de glutatión (GSH) y concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, mediante la peroxidación de lípidos (TBARS). *Material y métodos:* se utilizaron ratas *Wistar* macho de 21 días de edad a las que se administró Asp 75mg/kg, Asp 125mg/kg, fenilalanina 62.5mg/kg, ácido aspártico 50mg/kg, todos por vía oral, durante 30 días continuos. Al término del estudio los animales fueron sacrificados, se midió los niveles de GSH y TBARS en homogeneizado de cerebro. *Resultados:* los niveles de GSH disminuyeron de forma significativa ( $p<0.05$ ), en todos los grupos que recibieron Asp, fenilalanina y ácido aspártico, con respecto al grupo control. La concentración de TBARS se incrementó de manera significativa sólo en los animales con tratamiento de Asp en dosis de 125 mg/kg vs grupo control. *Conclusión:* los resultados obtenidos sugieren que el consumo de dosis elevadas de Asp desprotegen al cerebro, exponiéndolo a daño oxidativo.

**Palabras clave:** aspartame, radicales libres, GSH, cerebro.

## EFFECT OF ASPARTAME, PHENYLALANINE, AND ASPARTIC ACID ON GLUTATHIONE AND LIPID PEROXIDATION LEVELS IN RAT BRAIN

## ABSTRACT

At the present time the ingestion of foods and drinks manufactured with sweeteners has been increased, and aspartame (Asp) is the most used sweetener in food elaboration for children and adults, in more than 90 countries. Recent studies have related the consumption of Asp to the development of metabolic alterations and the increase of neurological disorders associated with the production of free radicals and lipid peroxidation products. The aim of this study was to evaluate the effect of the Asp in the brain of rats by means of the determination of the levels of Glutathion (GSH) and the concentration of thiobarbituric acid reactive substances

Recibido: 6 noviembre 2007. Aceptado: 3 diciembre 2007.

<sup>1</sup>Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Pediatría (INP), Secretaría de Salud (SSA), México. <sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología Genética. INP. SSA. México. <sup>3</sup>Laboratorio de Patología Experimental. INP. SSA. México. Correspondencia: David Calderón Guzmán. Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Pediatría. Avenida Imán #1, 3<sup>er</sup> piso, Col. Insurgentes Cuiculco, C.P. 04530 México D.F. E-mail: solodavid2001@yahoo.com.mx

through the lipid peroxidation (TBARS). *Material and methods:* male Wistar rats of 21 days old were administered with Asp 75mg/kg and 125mg/kg, phenylalanine 62.5mg/kg, Aspartic acid 50mg/kg, all by oral route, for 30 consecutive days. At the end of the study the animals were sacrificed and the brain was homogenated for GSH and TBARS levels determination. *Results:* The GSH levels were significantly decreased ( $p < 0.05$ ), in all the groups that received Asp, phenylalanine and aspartic acid, with respect to the control group. The TBARS concentration was significantly increased only in the animals with treatment with Asp in 125mg/kg dose versus group control. *Conclusion:* the results suggest that the administration of high doses of Asp unprotect the brain, exposing it to oxidative damage.

**Keywords:** aspartame, free radicals, GSH, brain.

**E**l aspartame (L-asparthyl-L-phenylalanine methyl ester; Asp) es 200 veces más dulce que el azúcar común, empleado en la elaboración de más de 5000 productos disponibles en el mercado mundial<sup>1</sup>. Este edulcorante se obtiene de forma sintética por la combinación de ácido aspártico, fenilalanina y metanol. Una vez que ha ingresado al organismo, es rápido y por completo metabolizado por esterasas y péptidasas intestinales en sus tres componentes principales, las cuales son sustancias que están normalmente presentes en la dieta. Aunque se ha considerado al Asp como inocuo en las últimas décadas, diversos estudios han reportado de manera particular que sus aminoácidos actúan de manera individual o combinada en el sistema nervioso central (SNC) provocando efectos adversos que incluyen alteraciones neuronales, desórdenes conductuales y enfermedades neurodegenerativas<sup>2-4</sup>. Si bien, no se han determinado los mecanismos de acción del Asp o sus metabolitos en estos eventos, se ha descrito que la función de ambos aminoácidos en el SNC es de tipo excitador<sup>5</sup> y que el incremento plasmático de ambos aminoácidos provenientes de la ingesta de alimentos y bebidas elaborados con este edulcorante, ocasiona sobre-excitación neuronal debido a la entrada de iones  $Ca^{2+}$  en la célula, favoreciendo una cascada de reacciones con generación de radicales libres (RL). El mecanismo de daño celular de los RL se atribuye a los procesos de lipoperoxidación (LPO), los cuales son en particular destructivos y acentuados, ya que alteran la fluidez, permeabilidad y por último la función metabólica de la célula<sup>6-8</sup>. La producción de RL debida a procesos de degradación y/o lipoperoxidación de metabolitos o

compuestos exógenos puede ocurrir tanto en la fase oxidativa (fase I) como en la fase de conjugación (fase II) del metabolismo. Aunque el SNC cuenta con sistemas enzimáticos antioxidantes el nivel es moderado, por lo que la presencia de los sistemas antioxidantes no enzimáticos, cuya protección se basa en la transferencia de electrones, que es fundamental para el equilibrio ReDox en la célula<sup>9</sup>. Debido a la localización y concentración en las células de los mamíferos y a su importante participación en los procesos de neutralización de RL, los niveles celulares de glutatión (g-L-glutamyl-L-cystein glicine; GSH) se han utilizado como un indicador de estrés oxidativo conjuntamente con la evaluación de la integridad lipídica debido a que la LPO es un proceso en que los sistemas biológicos puede ocurrir mediante control enzimático o no enzimático, y es el último proceso que acompaña a la lesión celular<sup>10-14</sup>. Con base a lo anterior, el presente estudio evaluó el daño oxidativo del Asp, fenilalanina y ácido aspártico, mediante la determinación de los niveles de GSH y TBARS en cerebro de ratas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas Wistar machos de 25 días de edad, que fueron divididos en 5 grupos de 6 animales cada uno, con los siguientes tratamientos: grupo I control, NaCl 0.9%; grupo II, Asp 75 mg/kg; grupo III, Asp 125 mg/kg; grupo IV fenilalanina, 62.5 mg/kg; y grupo V, ácido aspártico 50 mg/kg. Todos administrados por vía oral durante 30 días, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, llevando el registro de peso corporal durante todo el estudio, y con fotoperiodos de 12/12 horas luz/oscuridad. Al término del tratamiento, los grupos de animales fueron sacrificados por decapitación y los cerebros colocados en 0.9% NaCl. La disección del cerebro se realizó en corte sagital. El corte derecho se homogeneizó en 5 volúmenes de ácido perclórico ( $HClO_4$ ) 0.1 M para la determinación de GSH, y el corte izquierdo para el ensayo de peroxidación de lípidos en 5 volúmenes de TRIS-HCl 0.05 M, pH 7.2. Todo procedimiento experimental cumplió con la norma del comité para uso y cuidado de animales de bioterio de la institución.

### Procedimiento para medir glutatión (GSH)

Los niveles de GSH se midieron a partir del sobrenadante de tejido homogeneizado en  $HClO_4$ , obtenido después de centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos, en una centrífuga mikro 12-42, Germany, de acuerdo a una modificación de la técnica reportada

por Hissin y Hif<sup>15</sup>. En un tubo de ensayo se colocaron 1.8 ml de *buffer* de fosfatos pH 8.0 con EDTA 0.2%, y una alícuota del sobrenadante de  $\text{HClO}_4$  y 100ml de ortoftaldialdehído (OPT) en concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  en metanol. Toda la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad total; al término de la incubación las muestras fueron leídas en un espectrofluorómetro Perkin Elmer Ls 55, con longitudes de excitación 350 nm y emisión 420 nm. Se utilizó un sistema *FL Win Lab* versión 4.00.02. Los valores fueron inferidos en una curva estándar y reportados como nM/g de tejido húmedo.

#### Procedimiento para medir peroxidación de lípidos (TBARS)

La determinación de TBARS se llevó a cabo mediante la técnica modificada de Gutteridge, et al<sup>16</sup> descrita a continuación: se tomó 1ml de homogenado al 10% en *buffer* de fosfatos pH 7.4, el cual se agregó a 2 ml de una solución formada de 1.25 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 40 g de ácido tricloroacético (TCA) y 6.25 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl), aforada en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. Después de realizar incubación durante 30 min a temperatura de ebullición en un Thermomix 1420, las muestras se colocaron en baño de hielo durante 5 min y se centrifugaron a 3000 g durante 15 min en una centrífuga Sorvall RC-5B, Dupont. Las muestras del sobrenadante fueron leídas por triplicado a 532 nm en un espectrofotómetro Helios- $\alpha$  de UNICAM. Las lecturas de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron expresadas en  $\mu\text{M}$  de malondialdehído/g de tejido húmedo.

#### Sustancias químicas

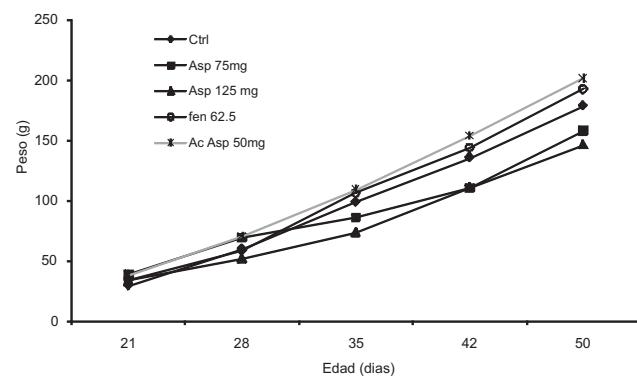
Aspartame (L-aspartyl-L-phenylalanine- methyl ester; sigma), fenilalanina (L-phenylalanine; sigma), ácido aspártico (*L-aspartic acid; sigma*), glutatión reducido; ácido tiobarbitúrico (sigma); ácido clorhídrico (Merck); acetato de sodio (Merck); EDTA (Sigma), ácido tricloroacético (técnica química); Tris-HCl (Merck); ácido perclórico (Merck); ortoftalaldehído (OPT; sigma); metanol (Merck).

#### Análisis estadístico

La estrategia consistió en evaluar los valores de GSH y TBARS utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA), con sus respectivos contrastes mediante la prueba de Dunnett. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos. Se utilizó el programa SSPS 10.0 para Windows<sup>17</sup>.

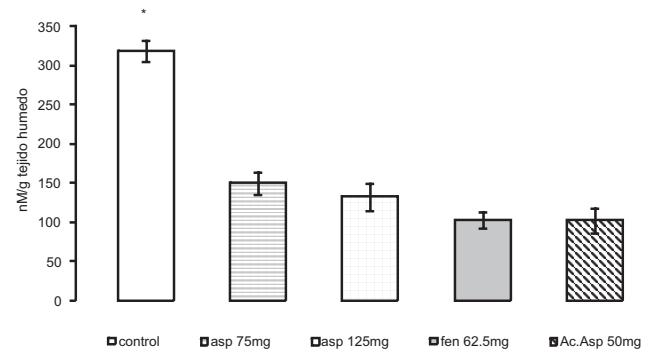
## RESULTADOS

En la figura 1, se registro el peso corporal de ratas tratadas con Asp, fenilalanina y ácido aspártico, se observó que a partir de la tercera semana de estudio, los animales tratados con ambas dosis de Asp (75 y 125 mg/kg) mostraron menor ganancia de peso corporal no significativa, comparada con el resto de los grupos incluyendo al grupo control.



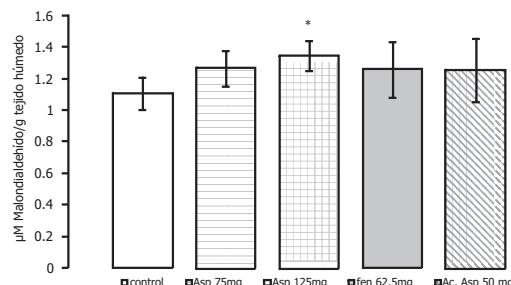
**Figura 1.** Peso corporal de ratas tratadas con aspartame, fenilalanina y ácido aspártico durante 30 días de tratamiento. Valores promedio. Asp 75mg = aspartame 75 mg/kg, Asp 125mg= aspartame 125 mg/kg, fen 62.5 = fenilalanina 62.5 mg/kg ácido aspártico 50 mg = ácido aspártico 50mg/kg.

Los niveles de GSH en cerebro de ratas tratadas con Asp, fenilalanina y ácido aspártico (figura 2). Se encontraron significativamente ( $p < 0.05$ ) por debajo del grupo control en todos los grupos experimentales, siendo los animales tratados con fenilalanina y ácido aspártico los que muestran mayor reducción en la concentración de este indicador biológico. En los grupos tratados con Asp en dosis de 75 y 125 mg/kg se observó un efecto dosis-dependiente.



**Figura 2.** Niveles de GSH en cerebro de ratas con tratamiento de aspartame, fenilalanina, y ácido aspártico. Asp 75mg = aspartame 75 mg/kg; Asp 125mg = aspartame 125 mg/kg; fen 62.5 mg = fenilalanina 62.5 mg/kg y Ac. Asp 50 mg = ácido aspártico 50 mg/kg. Valores promedio ± D.E. \* $p < 0.05$ . ANOVA.

Respecto a los niveles de peroxidación de lípidos en cerebro de ratas tratadas con Asp, fenilalanina y ácido aspártico (figura 3), todos los tratamientos mostraron un incremento, respecto al grupo control, aunque estadísticamente sólo se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre el grupo control y el grupo correspondiente al tratamiento con 125 mg/kg de Asp.



**Figura 3.** Niveles de TBARS en cerebro de ratas con tratamiento de aspartame, fenilalanina y ácido aspártico. Asp 75mg = aspartame 75 mg/kg; asp 125mg = aspartame 125 mg/kg; fen 62.5 mg = fenilalanina 62.5 mg/kg y ácido aspártico 50 mg = ácido aspártico 50 mg/kg. Valores promedio  $\pm$  D.E. \* $p < 0.05$ . ANOVA.

## DISCUSIÓN

El consumo de Asp se ha declarado seguro y apto para la población en general, siendo reportadas como dosis de ingesta diarias permisibles recomendadas por la FDA 50 mg/kg de peso y por la OMS 40 mg/kg de peso como máximas<sup>18,19</sup>. La elección de las dosis de 75 y 125 mg/kg empleadas en este estudio fue debido a que los roedores metabolizan de manera más rápida Asp que los humanos, por lo que las dosis estudiadas en animales de experimentación, usualmente son corregidas por el factor 5<sup>20,21</sup>.

En el presente estudio la administración individualizada de fenilalanina y de ácido aspártico, no afectó la ingesta de alimento, ni el aumento de peso corporal y a pesar de observarse un ligero incremento en la gráfica de peso que no fue significativo. Sin embargo, los grupos tratados con Asp a dosis de 75 y 125 mg/kg a partir de la tercera semana de tratamiento, mostraron una menor ganancia de peso corporal, sin afectar la ingesta de alimento, esto se comprobó con el monitoreo diario del consumo de alimento de cada grupo experimental. En apariencia, esta ligera variación de peso en los animales tratados con ambas dosis de Asp pueden ser debido a que el gasto energético para metabolizar la molécula de Asp, es mayor a la energía que este edulcorante aporta al organismo, debido a sus propiedades de tipo hipocalórico<sup>22</sup>.

Con respecto a la disminución en los niveles de GSH en cerebro, todos los grupos experimentales mostraron una disminución significativa, dando como consecuencia que el cerebro se encuentre desprotegido de la presencia de RL, como lo sugieren los resultados obtenidos en las determinaciones de TBARS, en las cuales, todos los tratamientos mostraron un ligero aumento que no llegó a ser significativo, a excepción del grupo tratado con 125 mg de Asp, que si tuvo un incremento significativo. Los animales tratados con fenilalanina y ácido aspártico tuvieron el mismo comportamiento al evaluar GSH y TBARS, y no mostraron importantes cambios.

## CONCLUSIÓN

Los datos del presente estudio sugieren que el consumo de dosis excesivas de Asp por tiempo prolongado, altera mecanismos antioxidantes relacionados con la generación de RL en cerebro.

## REFERENCIAS

1. Butchko HH, Stargel WW, Comer CP, Mayhew DA, Benninger C, Blackburn GL, et al. Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35 (pt 2):51-93.
2. Bradstock MK, Serdula MK, Marks JS, Barnard RJ, Crane NT, Remington PL, et al. Evaluation of reactions to food additives: the aspartame experience. *Am J Clin Nutr* 1986; 43:464-9.
3. Maher TJ, Wurtman RJ. Possible Neurologic effects of aspartame a widely used food additive. *Environ Health Perspect* 1987; 75:53-7.
4. Columbe RA Jr, Sharma RP. Neurobiochemical alterations induced by the artificial sweetener aspartame (Nutrasweet). *Toxicol App Pharmacol* 1986; 83;(1):79-85.
5. Krebs MO. Excitatory amino acids and brain 5-hydroxyindoles. *Am J Clin Nutr* 1984, 40:1-7.
6. Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.
7. Kehler JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23:21-48.
8. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998;106 (5):1229-34.
9. Viant D, Fonseca Clavel IC. Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *MEDISAN* 1999;3(3):5-11.
10. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52,711-60.
11. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiol* 2000; 62:649-71.
12. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Minireview Eur J Biochem* 2000; 267, 4904-11.
13. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Minireview. Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4912-6.
14. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;(7)15s-725s.

15. Hissin PJ, Hif R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissue. *Anal Biochem* 1974; 214-26.
16. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990;15:129-35.
17. Castilla Serna L. Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. Ed. Trillas 2º edición. México, D.F. 1999.
18. Potts WJ, Bloss JL, Nutting EF. Biological properties of aspartame: I Evaluation of central nervous system effects. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 3: 341-53.
19. FDA (Food and drug administration). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; aspartame. *Fed Regist* 1986; 61:33654-6.
20. Ranney Re, Oppermann JA. A review of the metabolism of the aspartyl moiety of aspartame in experimental animals and man. *J environ Pathol Toxicol* 1979; 2:979-85.
21. Fernstrom JD. Oral aspartame and plasma phenylalanine: Pharmacokinetic difference between rodents and man, and relevance to CNS effects of phenylalanine. *J Neural Transm* 1989; 75:159-164.
22. Blackburn GL, Kanders BS, Lavin PT, Keller SD, Whatley J. The effect of aspartame as a part of a multidisciplinary weight control program on short long term body weight. *Am J Clin Nutr* 1997;65:409-18.