

Marielza Ismael Martins

Efeitos do Aspartame no Rim Fetal: Estudo  
Experimental em Ratas

São José do Rio Preto  
2007

Marielza Ismael Martins

Efeitos do Aspartame no Rim Fetal: Estudo  
Experimental em Ratas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

São José do Rio Preto  
2007

Martins, Marielza Ismael

Efeitos do aspartame no rim fetal: Estudo experimental em ratas/ Marielza Ismael Martins

São José do Rio Preto, 2007

\_\_\_\_ p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

1 Aspartame.; 2.Rim ; 3. Morfometria.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	ii
Agradecimentos .....	iii
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabela e Quadro.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>01</b>
1.1. Objetivos .....	12
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>13</b>
2.1. Animais e Dieta .....	14
2.1.1 Período de Adaptação .....	14
2.1.2 Período de Acasalamento.....	15
2.1.3 Determinação do Primeiro Dia de Prenhez da rata.....	15
2.1.4 Tratamento.....	15
2.1.5 Técnica de Dissecção e pesagem.....	16
2.2 Métodos.....	16
2.2.1 Técnica Histológica.....	16
2.2.2 Técnica Morfométrica.....	17
2.2.2.1 Volume Glomerular.....	17
2.2.2.2 Cariometria.....	18

2.2.2.3	Estereologia.....	20
<b>3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>Apêndices .....</b>	

“Deus, conceda-me serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso, e sabedoria para reconhecer a diferença entre uma e outra”.

### **Oração da Serenidade**

- ✓ A Deus que com teus olhos cuida de mim, ouve minha oração e sem merecer estende-me a mão.
  
- ✓ Ao meu marido João Luis, por fazer o amor valer a pena.
  
- ✓ Aos meus filhos Mariana, Rafael e Lucas, que me fazem acreditar no aprendizado constante de amor, fé e esperança.
  
- ✓ Aos meus pais Amud e Elza, pelo amor de uma vida inteira. Pela oportunidade que nunca tiveram e ofereceram.

## **Agradecimentos Especiais**

---

- ✓ Ao Professor Azoubel:

Obrigado pelo incentivo, por compreender minhas limitações e por ser um exemplo próximo de competência, inteligência e educação. Poucas são as palavras para descrever minha admiração e agradecimento.

- ✓ Aos Professores Reinaldo e Lina Azoubel:

Às vezes precisamos saber que devemos ser humilde mas não submisso, ser pacífico e não passivo, ser determinado e não teimoso, ser obediente mas não cego, ser moldável mas não tolo, ser introspectivo mas não enclausurado. Obrigado por ensinar-me!

*Custa tanto ser uma pessoa plena que muitos poucos são aqueles que têm luz ou coragem de pagar o preço.*

*É preciso abandonar por completo a busca da segurança e correr o risco de viver com os dois braços.*

*É preciso abraçar o mundo como um amante.*

*É preciso aceitar a dor como condições da existência.*

*È preciso cortejar a duvida e a escuridão como preço do conhecimento.*

*É preciso ter uma vontade obstinada no conflito, mas também uma capacidade de aceitação total de cada conseqüência do viver e do morrer.*

**J.Powell**

## ***Agradecimentos***

---

- ✓ Aos Professores Doutores Domingo Marcolino Braile, Humberto Liedtke Junior, Emmanuel de Almeida Burdmann e Moacir Godoy, expresso minha admiração e respeito na digna missão de conduzir a Famerp.
  
- ✓ A Professora Doutora Claudia Bernardi Cesarino pelo incansável crédito em minhas potencialidades, pela amizade e colaboração constante.
  
- ✓ Aos amigos do Grupo de Pesquisa – FAMERP, professores Vera Fugita, Alex Tadeu Martins, Fernando Batigaglia, José Germano Ferraz de Arruda, João Armando Padovani, Rosana Anzolin, Vânia Del Arco Paschoal, Marcelo Alexandre Matos, Mario Góes e Fabiola Leme pela colaboração na produção desta pesquisa.
  
- ✓ Aos meus amigos da Clínica da Dor – Dr. Sebastião C. Silva Junior, Lílian Chessa Dias (e Vitor), Dra. Ana Márcia Cunha, Professor Marcos H. D. Foss, Michelle Detoni, Jaqueline Ourives, pelo afeto, apoio e incentivo sempre.
  
- ✓ Em nome das amigas Terapeutas Ocupacionais Lisabelle Manente Mazaro, Susilene Tonelli Nardi, Maria de Fátima Guerreiro Godoy, Nilza Marques Sartori, Zosima Fontana Fernandes, Márcia Valente, Adriana Maira Marini agradeço todos que me apoiaram e incentivaram meu percurso.



- ✓ Aos senhores Onivaldo Bizzutti e Domingos Zanqueta Neto pela dedicação aos experimentos realizados.
  
- ✓ Aos funcionários da Pós-Graduação José Antonio Silistino, Rosimere Souza Desidério, Fabiana Cristina Godoy, Guilherme Martins e Carlos Rodrigo da Silva Viana pelos incansáveis esclarecimentos, consideração e respeito por mim.
  
- ✓ As Professoras Lívia Cais Burdmann e Adília Maria Pires Sciarra, pela amizade e colaboração.
  
- ✓ Ao Professor Dr. Waldir Tognolla, Departamento de Ciências Neurológicas, incentivador unânime dos profissionais da saúde.
  
- ✓ Ao Professor Doutor José Antonio Cordeiro, pela contribuição estatística e importantes sugestões.
  
- ✓ As amigas da clinica, Maria Amélia Fecuri Saes, Marta Alves Arroyo, Juliana Moraes de Oliveira, Isabel Cristina Figueiredo, pela participação desta trajetória como verdadeiras e preciosas amigas.

- ✓ Aos amigos do Projeto Gato de Botas e Equipe Ding Down, em especial a amiga Professora Lana Cristina de Paula Bianchi, pelo exemplo de luta e coragem.
  
- ✓ Em nome das amigas – Rita de Cássia Helu M. Ribeiro, Maria de Fátima Furlan, Josimerci Ittavo, Elaine Regonaschi, saúdo a todas as Docentes do Curso de Enfermagem da Famerp pelas atenções especiais e pelo sentimento de fraternidade com que sempre me receberam.
  
- ✓ Em nome da minha irmã Regina e sobrinhas Daniela e Raphaela, presença fiel e apoio em todos os momentos, e a todos meus familiares que não pouparam apoio e palavras de estímulo.
  
- ✓ Ao Professor Doutor Antonio Augusto Cais dos Santos, referência profissional e humana que norteia minha caminhada.
  
- ✓ A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização desta pesquisa.

**Obrigada!!!**

**Lista de Figuras**

---

Figura 1.	Molécula do aspartame.....	3
Figura 2.	Metabolismo do aspartame.....	8
Figura 3.	Conjunto constituído por uma Câmara-clara acoplada ao Microscópio de luz (A).	19
Figura 4.	Representação gráfica da grade idealizada por Merz (1968)....	22
Figura 5.	Corte de rim fetal do grupo controle – Glomérulo. Coloração hematoxilina-eosina.....	29
Figura 6.	Corte de rim fetal do grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C - Glomérulo edemaciado. Coloração hematoxilina-eosina.....	29
Figura 7.	Modelo da marcação dos pontos considerando o núcleo, citoplasma, luz e outros elementos das estruturas renais estudadas.....	34

**Lista de Tabelas e Quadro**

Tabela 1.	Valores médios dos pesos corporais iniciais(I) e finais(F) das ratas(g) dos grupos: controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C no final da prenhez.....	26
Tabela 2.	Valores médios do peso da placenta (g) e, a medida do cordão umbilical (cm) das ratas do dos grupos: controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C no final da prenhez.....	27
Tabela 3.	Valores das medianas dos volumes nucleares dos glomérulos ( $\mu\text{m}^3$ ) de fetos de ratas do grupo controle, grupo tratado á temperatura ambiente e, grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.....	28
Tabela 4.	Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.....	31
Tabela 5.	Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos túbulos contorcidos distais de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.....	32
Tabela 6.	Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C	33

Tabela 7. Quadro geral dos valores das medianas dos parâmetros estereológicos das células do glomérulo, túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e ducto coletor de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.....	35
Quadro 1. Indicações e contra-indicações do aspartame.....	6

**Lista de Abreviaturas e Símbolos**

---

<b>A</b>	- área
<b>cm</b>	- Centímetros
<b>D</b>	- Diâmetro maior
<b>d</b>	- Diâmetro menor
<b>D/d</b>	- Relação entre diâmetros maior e menor
<b>E</b>	- Excentricidade
<b>F</b>	- Coeficiente de forma
<b>g</b>	- gramas
<b>I</b>	- Índice de contorno
<b>M</b>	- Diâmetro geométrico médio
<b>mm</b>	- Milímetros
<b>mL</b>	- Mililitros
<b>Mg/Kg</b>	- Miligramas por Kilograma
<b>n°</b>	- Número
<b>P</b>	- Perímetro
<b>p</b>	- Probabilidade de significância
<b>t</b>	- Toneladas
<b>V</b>	- volume
<b>V/A</b>	- Relação entre volume e área

$\mu\text{m}$	Micrômetros
%	Por cento
$\sqrt{\quad}$	Raiz quadrada

**Introdução:** O aspartame é um edulcorante artificial amplamente usado em muitos produtos como alimentos e bebidas sendo 200 vezes mais doce que o açúcar. **Objetivo:** avaliar o efeito do aspartame em rins de fetos de ratas considerando as alterações morfológicas no glomérulo, túbulos contorcidos proximais e distais e ducto coletor. **Material e Método:** 15 ratas grávidas, pesando em média 240gr foram divididas em 3 grupos: grupo controle(n=5), grupo tratado com aspartame á temperatura ambiente(n=5) e, grupo tratado com aspartame aquecido á 40°C (n=5). Os animais foram expostos ao aspartame nos 9°, 10° e 11° dias de prenhez. A dosagem é de 14 mg/kg de peso durante a organogênese. No 20° dia da prenhez, os animais foram mortos e os fetos fixados em solução Alfac, e os rins incluídos em parafina, cortados e estabilizados com hematoxilina-eosina. O método utilizado foi a morfometria pelas técnicas cariométrica e estereológica. **Resultados:** Houve diminuição significativa no peso dos fetos do grupo tratado com aspartame á temperatura ambiente ( $p=0,004$ ) comparado com o grupo controle. A cariometria permitiu avaliar as modificações dos núcleos celulares, com variações significantes nos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e, em menor grau nos ductos coletores dos fetos tratados. Os parâmetros estereológicos mostraram um aumento no volume celular e redução na densidade numérica celular quando os grupos controle e tratado com aspartame aquecido a temperatura de 40°C foram comparados estatisticamente. **Conclusão:** Estes resultados



mostraram que o uso do aspartame produz alterações em todas as estruturas renais sugerindo nefrotoxicidade.

**Palavras-Chave:** 1.Aspartame; 2.Rim ; 3.Morfometria.

**Introduction:** Aspartame is a widely used artificial sweetener added to many products of foods and beverages, being 200 times as sweet as sugar.

**Objective:** evaluating the effect of aspartame in kidneys of rats fetuses considering morphometric changes of glomeruli, proximal and distal convoluted tubules and, collecting duct.

**Material and Method:** Fifteen pregnant Wistar rats weighting around 240gr divided into three groups: control group (n = 5), treated group with aspartame at room temperature (n = 5) and treated group with aspartame heated to 40°C (n = 5). The treatment with aspartame occurred on the 9<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> and 11<sup>o</sup> day of pregnancy. A dose of 14mg/Kg of body weight during organogenesis. In the 20<sup>th</sup> day of pregnancy, animals were sacrificed and the fetuses were fixed in Alfac solution and the kidneys included in paraffin, sectioned and stained with hematoxiline-eosine. A morphometric study used karyometry and stereology.

**Results:** There were significant decreases in fetal weight in treated group with aspartame at room temperature ( $p=0,004$ ) when compared with control group. The Karyometric have allowed evaluation modification of cell nuclei with significant variation in the glomeruli, proximal and distal convoluted tubules and, lower degree in the collecting ducts of treated fetuses. Stereological parameters showed an increase in the cellular volume and reduction in the numerical cellular density when the control and treated groups with aspartame heated to 40°C are statistically compared.

**Conclusions:** These results showed that use of aspartame produced alterations in every kidney structures suggesting nephrotoxicity.

**Key-Words:** 1. Aspartame; 2. Kidney; 3. Morphometry.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Considerações Gerais**

Nas duas últimas décadas intensificou-se a substituição de produtos de origem agrícola e, nesta dinâmica de substituição, os adoçantes artificiais foram os mais inseridos no mercado.<sup>(1)</sup>

Tem sido introduzidas na dieta estas substâncias artificiais de menor valor nutritivo e calórico e o aspartame está entre os adoçantes mais consumidos mundialmente e seu uso continua crescendo.<sup>(1,2)</sup>

O novo paradigma corporal do corpo esguio e esbelto, instaurado principalmente a partir dos anos 90, incrementa as indústrias da beleza, alimentícia e farmacêutica que cada vez mais diversificam e aumentam sua produção para atender necessidades impostas pelo novo padrão estético e alimentar.<sup>(3)</sup>

Este padrão estético corporal contemporâneo impõe uma dieta leve, magra, isenta de gordura, "light". Este excessivo consumo levou pesquisadores a preocuparem-se em investigar o limite de cada um destes produtos na ingestão diária e, se está relacionada com a presença de impurezas provenientes da extração ou das reações químicas para obtê-los.<sup>(4,5)</sup>

Com o aumento do mercado de produtos dietéticos e o desenvolvimento de novos edulcorantes sintéticos, a análise de seus efeitos em muitos órgãos ainda não foram exploradas. Assim verificar os riscos e benefícios de uma substância tão presente no nosso dia a dia, como o aspartame, remetem-nos á

preocupação da ação de seus metabólitos (ácido aspártico, fenilalanina e metanol) no nosso organismo.

## 1.2. O Aspartame

O aspartame ou éster metílico de N-alfa-aspartil-L-fenilalanina é um polipeptídeo e, foi descoberto acidentalmente em 1965, pelo químico pesquisador James Schlatter, da companhia G. D. Searle & Co, durante a síntese de um tetrapeptídeo para tratamento de úlcera gástrica.<sup>(6,7)</sup>

Tem sido amplamente utilizado como edulcorante artificial/intenso, pois são sintetizados e, possuem poder adoçante superior ao da sacarose e teores calóricos nulos ou desprezíveis.<sup>(6,8)</sup>

Os edulcorantes intensos distinguem-se pelo seu elevado poder adoçante e os mais usados são a sacarina, ciclamato, aspartame e o acessulfame- K.<sup>(8,9)</sup>

O aspartame é um pó branco, cristalino e possui excelente solubilidade em água e álcool,<sup>(10)</sup> mas é insolúvel em óleos e gorduras.<sup>(11)</sup> A substância é composta por 50% de fenilalanina(Phe), 40% de ácido aspártico (Asp) e 10% de metanol ( sob a forma de éster).<sup>(6,10,12)</sup>

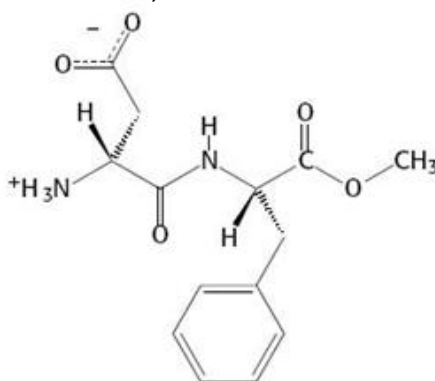


Figura 1. Molécula do aspartame.

Com o poder adoçante em torno de 200 vezes superior ao da sacarose, contém um sabor residual considerado menos intenso do que outros edulcorantes como o ciclamato e a sacarina.<sup>(6,13,14)</sup>

O aspartame que foi descoberto em 1965 só obteve sua patente de edulcorante em 1969, levou 17 anos para ser aprovado para consumo pelo Food and Drug Administration /FDA (em 1981) e pela União Européia em 1994.<sup>(14,15)</sup> Esta aprovação vinculava seu uso a produtos desidratados (adoçantes de mesa, mistura para preparação de pudins, gelatinas, gomas de mascar). Foi em 1983, que obteve a aprovação para o uso do aspartame em bebidas carbonatadas.<sup>(14,16)</sup> Este período foi marcado por controvérsias a respeito de sua inocuidade, o que levou á pedidos de pesquisas toxicológicas, as quais ocorrem até hoje.

No Brasil o livre comércio de dietéticos, entre eles os que continham aspartame foi autorizado em 1988. Até então estes produtos eram vendidos em farmácias mediante receitas médicas.<sup>(17)</sup>

Atualmente o aspartame está estabelecido pelas maiores indústrias de refrigerantes mundiais na formulação dos produtos "light" como o único edulcorante empregado.<sup>(17,18)</sup>

Seu uso é aprovado em produtos farmacêuticos e cerca de 6000 produtos alimentares e, dentre seus consumidores estão aqueles que substituem alimentos naturais por alimentos "light".<sup>(17-19)</sup>

Depois da sacarina o aspartame é o segundo adoçante mais utilizado no mundo, estimando-se que mais de 8000 toneladas de aspartame são consumidas a cada ano nos Estados Unidos.<sup>(18,20)</sup> Em termos de consumo

mundial representa 62% do valor de venda de edulcorante intenso. Dentre seus maiores consumidores 84% são mulheres, contra 16% de homens. Em relação á classe social, a classe A representa 10% do consumo; a B 35%, a C 41% e a D 14%. Por faixa etária, o consumo é maior acima de 30 anos, mas o uso por menores de 24 anos está crescente.<sup>(3,21)</sup>

De acordo com o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) que é um comitê misto FAO (Normas de Identidade e Pureza para Aditivos) e WHO (Avaliação Toxicológica) de Peritos em aditivos para alimentos estabeleceram a IDA ( ingestão diária aceitável) que é a quantidade que pode ser ingerida na alimentação, sem qualquer dano à saúde humana, ,foi estabelecida a dose de 50mg/Kg diário de peso nos Estados Unidos e, 40mg/Kg diário de peso na Europa e Brasil.<sup>(22,23)</sup> Esta divergência na determinação da IDA da-se ao fato de que vários estudos fazem objeções quanto a dose de segurança.<sup>(20)</sup>

Na ultima atualização de Segurança do Aspartame, realizada pelo Comitê Científico em Alimentos Europeu (2002)<sup>(24)</sup> , revisaram-se artigos do período de 1984 a 2000, levantando possibilidade de toxicidade do metanol, que é um dos metabólitos do aspartame,<sup>(25,26)</sup> assim como elevações de concentrações no plasma de fenilalanina (Phe) e ácido aspártico,. Estes estudos relatam que pode ocorrer um aumento no transporte destes aminoácidos dentro do cérebro. Esta reação alteraria a composição neuroquímica deste órgão e a possibilidade de mudanças neuroendócrinas, particularmente aumentando as concentrações de catecolaminas no cérebro, gânglio sináptico e medula adrenal derivadas da Phe e seu produto hidroxilado, a tirosina, mas nenhum destes fatos foram

relevantes para mudança da ingestão diária aceitável que permaneceu 40mg/Kg de peso/diário.

De acordo com a World Health Organization (Organização Mundial de Saúde), baseada em estudos fornecidos pela United States Recommended Daily Allowance (USRDA)<sup>(18)</sup> existem contra-indicações ao uso do aspartame como citado abaixo:

Quadro 1. Indicações e contra-indicações do aspartame.

<b>Nome do Edulcorante</b>	<b>Indicações e Contra-indicações</b>
Aspartame	Contra indicado para fenilcetonúricos(*) Contra indicado para gestantes e lactentes Permitido para diabéticos

Fonte: Organização Mundial de Saúde, através da United States Recommended Daily Allowance (USRDA).

Vários estudos têm sido feito com animais de laboratório para verificar a toxicidade do aspartame.<sup>(27-30)</sup> Recentemente um mega experimento<sup>(31)</sup> utilizando 2500 ratos comprovou que o aspartame é um multipotencial agente carcinogênico com a dose diária de 20mg/Kg peso diário, isto é, bem abaixo da dose diária aceitável .

Contrapondo estes resultados outros trabalhos<sup>(32-34)</sup> não mostraram qualquer efeito adverso do aspartame com relação a vários tipos de doenças e condições, tanto em experimentos animais quanto humanos.

Quanto ao uso do aspartame na gravidez somente um número limitado de estudos<sup>(35,36)</sup> foi publicado nos últimos anos.



Lennon *et al.*<sup>(37)</sup> administraram via intragástrica aproximadamente 30mg/Kg de peso/diário de aspartame em ratas fêmeas por sete dias e hamsters fêmeas por cinco dias após o acasalamento não afetando a fertilidade pós-coito, medida pelo número de implantações.

Holder<sup>(38)</sup> corrobora o estudo acima afirmando que a exposição pré-natal ao aspartame consumida moderadamente não afeta o desenvolvimento morfológico dos fetos de ratos.

Outro aspecto debatido é em relação à estabilidade do aspartame. Sabe-se que apresenta boa estabilidade em alimentos secos, mas se decompõe quando exposto prolongadamente a sistemas líquidos, sendo susceptível ao grau de acidez (pH) ou a altas temperaturas. Neste estudo Boehn<sup>(39)</sup> relata que a quantidade de ácido aspártico produzida pelo aspartame aquecido em altas temperaturas(100°C) e pH neutro é elevada.

Estudos com bebidas carbonatadas, como refrigerantes, mostram que o aspartame se degrada em 3-carboximetil-6-benzil-2,5-dicetopiperazina (ciclo Asp-Phe) e em seus componentes aminoacídicos – Phe,β-aspartame, aspartil-L-fenilalanina (Asp-Phe), além do metanol.<sup>(40,41)</sup> Quando estas bebidas são estocadas por 8 semanas a 20° C, persiste 84% a 89% do aspartame original adicionado, sendo que 3/5 a 4% são degradados em ciclo Asp-Phe. Se mantidas a 30° C pelo mesmo período permanecem apenas 62% do adoçante original, sendo 12% convertidos no ciclo Asp-Phe. Apesar desta falta de estabilidade o FDA garante seu uso.

### 1.3. Metabolismo do Aspartame

Investigações sobre o metabolismo do aspartame têm demonstrado que em roedores, primatas e humanos ele é metabolizado no trato gastro intestinal em três constituintes, o ácido aspártico, a fenilalanina e o metanol que são absorvidos pela circulação sistêmica.<sup>(40,42)</sup>

Para cada molécula de aspartame uma molécula de cada constituinte é produzida. Após a absorção elas são então usadas, metabolizadas e excretadas pelo corpo seguindo os mesmos caminhos metabólicos do que quando consumidas pela dieta normal (Figura 2).<sup>(34,40)</sup>

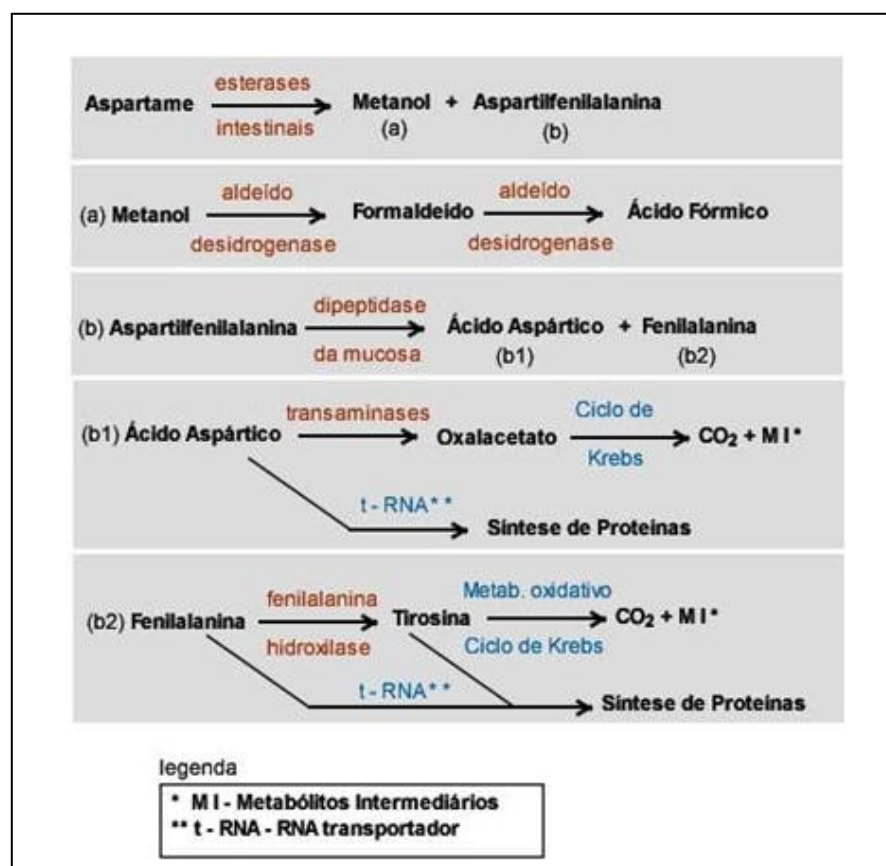


Figura 2. Metabolismo do aspartame.

Desde 1976, vários estudos discutem a necessidade de comentar sobre o metabolismo do aspartame sobre dois aspectos: a produção de fenilalanina e sua relação com a fenilcetonúria e, o surgimento de metanol com a posterior formação do ácido metanóico, composto extremamente tóxico em quantidades relativamente baixas no nosso organismo.<sup>(41-43)</sup>

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido, do tipo essencial, isto é, não é produzida pelo organismo, logo, devem ser obtidos através da alimentação.e, promove, dentre outras coisas a formação de precursores para a produção de melanina, pigmento responsável pela coloração de nossa pele.<sup>(44)</sup>

De acordo com os trabalhos de Filer & Stengik<sup>(45)</sup> a Phe é metabolizada pela maioria da população, mas há uma pequena porcentagem, 1:10.000 indivíduos que não a metabolizam perfeitamente, a qual representa os que possuem a patologia chamada fenilcetonúria (PhenylKetonUria – PKU).

A PKU é uma doença autossômica recessiva, que se caracteriza pelo defeito ou ausência da enzima fenilalanina hidroxilase, a qual converte a fenilalanina em tirosina, dando seqüência as rotas metabólicas do organismo.<sup>(45,46)</sup> Se a PKU não for controlada assim que o bebê nascer, os altos níveis de fenilalanina no sangue podem causar, além de retardo mental irreversível, atraso no desenvolvimento psicomotor, convulsões, hiperatividade, tremor e microcefalia. O paciente com PKU não tratada geralmente mostra sintomas de retardo mental com cerca de um ano de vida.<sup>(47)</sup>

Brandalize *et al.*<sup>(48)</sup> discorrem que em função da formação da fenilalanina decorrente do metabolismo do aspartame, exige-se que os produtos que os contém possuam a seguinte frase: “Contém fenilalanina”.

Outro produto do metabolismo do aspartame que é o alvo de várias pesquisas é o metanol, composto de função álcool e de fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{OH}$ .<sup>(49,50)</sup>

Este composto é liberado no intestino quando o grupo ester metílico do aspartame encontra a enzima quimiotripsina. Sua absorção é livre e rápida e, dentro do corpo ele é oxidado em ácido fórmico e formaldeído.<sup>(51)</sup>

Estudos liderados por Roberts<sup>(52,53)</sup> referem que mais da metade da população adulta atualmente consomem produtos com aspartame. Reações alérgicas ocorreram em 20% das pessoas que o consumiram, em seus estudos realizados com mais de 830 pessoas. Os sintomas incluem edema de lábios, língua, e garganta; urticária, agravo de alergias respiratórias e, até mesmo edema de glândulas salivares. Reações similares ocorreram com 7.300 indivíduos que se ofereceram voluntariamente para avaliar reações dos produtos com aspartame tem sido relatadas ao FDA. Um número considerável destes pacientes teve as mesmas sensações com aspartame e glutamato monosódico que se manifestaram com crise convulsiva. Estas reações podem ter sido causadas pela molécula de aspartame, seus três componentes, ou por aproximadamente 10 substâncias resultantes da quebra de molécula, que ocorre com o aquecimento e a armazenagem prolongada. Conclui que o aspartame e os produtos de sua degradação no organismo podem ser tóxicos ou causar hipersensibilidade, e as repercussões neurológicas tem sido relacionadas aos aminoácidos fenilalanina e aspartil, presentes no adoçante. O aspartil aumenta significativamente os níveis de aspartato e glutamato (neurotransmissores) no plasma sanguíneo. Tal elevação ocorre após ingerir

aspartame ou produtos do ácido glutâmico livre, aumentando a quantidade desses neurotransmissores em áreas cerebrais.<sup>(53,54)</sup> O acúmulo permite a entrada de grande quantidade de cálcio nos neurônios disparando enorme volume de radicais livres que acabam destruindo-os.

Por outro lado são encontrados vários trabalhos na literatura que ressaltam a produção de metanol quando metabolizado. Estes relatam que o metanol promove a formação de um ácido extremamente tóxico ao nosso organismo, mas que seus níveis produzidos pelo metabolismo do aspartame são baixos o suficiente para garantir nenhum problema com a formação mínima de ácido fórmico no organismo, se respeitado, evidentemente, o nível diário de consumo desta substância.<sup>(55-57)</sup>

#### 1.4. O Rim

Os rins regulam a composição química do meio interno por um processo múltiplo que envolve filtração, absorção ativa, absorção passiva e secreção.<sup>(58)</sup>

Sasaki *et al.*<sup>(59)</sup> avaliaram quanto a toxicidade em vários órgãos como o rim, estômago, fígado, bexiga, cólon, pulmão, cérebro e medula óssea de ratos, trinta e nove aditivos alimentares, entre eles o aspartame. Este estudo revelou que após 3 e 24 horas da sua administração, em dose única oral de 2000mg/Kg ocorreram danos significativos ao ácido desorribonucleico de células constituintes do rim, bexiga, estômago e cólon.

Silva *et al.*<sup>(60)</sup> estudando a estrutura renal de ratos submetidos a restrição de dieta durante o envelhecimento verificou que a região renal mais sujeita a

alterações é a cortical pois apresenta maior concentração de unidades filtrantes.

Muitos trabalhos ressaltam a substituição da sacarose pelo edulcorante aspartame, porém tem crescido a preocupação de que ocorram testes toxicológicos freqüentes devido ao seu grande consumo.<sup>(61,62)</sup> Estes testes preditivos. permitem a avaliação do potencial carcinogênico de substâncias a que o homem ainda não foi exposto ou está sendo continuamente, isto é, produtos tais como medicamentos, pesticidas, aditivos alimentares, cosméticos e outros. Estas investigações de segurança destina-se a evitar que produtos criados pelo homem venham a constituir novos fatores de risco para o câncer.<sup>(63,64)</sup>

Estudos ressaltam que os mecanismos de excreção renal que incluem a filtração glomerular, a difusão tubular simples e a filtração tubular ativa são frequentemente limitados pela ligação protéica plasmática, pois os grandes complexos formados não conseguem atravessar a membrana.<sup>(65)</sup>

Assim, após a filtração, o tóxico na luz tubular é excretado ou então pode ser reabsorvido passivamente. A passagem através da parede tubular é mais fácil quando a molécula for lipossolúvel, não polar e de baixo peso molecular.

Também pode ocorrer secreção tubular passiva, no sentido da corrente sanguínea para a luz tubular, processo de pouca importância, mais eficaz em algumas bases orgânicas, que são ionizadas na urina, geralmente de natureza ácida.<sup>(65,66)</sup>

Diante do exposto verifica-se que a excreção renal é o principal processo de remoção de um tóxico do organismo humano, embora existam outros como

excreção biliar e pulmonar e, se reconheça que as excreções orgânicas, lágrimas, suor, leite, também possam realizar estas funções.<sup>(65)</sup>

Desta forma desconhece-se na literatura sobre a participação renal na assimilação de muitas substâncias, inclusive do aspartame.

O conhecimento de como certos peptídeos são metabolizados pelos rins poderá fornecer resultados que preencham lacunas sobre a remoção desta substância do organismo, visto que seu uso indiscriminado e dados sobre a morfometria deste órgão são inexistentes.

### **1.5. Objetivos**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do aspartame em rins de fetos de ratas, considerando-se as alterações morfométricas, por meio da cariometria e estereologia, das estruturas do glomérulo, túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e ducto coletor.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

---



## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1. Animais e Dieta**

Para realização deste trabalho, foram utilizados 15 ratas albinas, variedade Wistar, com peso médio de 220 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp). Estas receberam cuidados conforme recomendações do *Committee on Care and Use of Laboratory Animals- Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR)*, Estados Unidos.<sup>(67)</sup>

Cinco ratas foram utilizadas para grupo tratado com solução de aspartame à temperatura ambiente, cinco para grupo controle (tratado com água *ad libitum* à temperatura ambiente) e, cinco ratas para o grupo tratado com solução de aspartame aquecida a 40° C.

#### **2.1.1. Período de Adaptação**

Após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), os animais foram retirados do Biotério e permaneceram no Laboratório de Pesquisa. Por sete dias, estes animais foram mantidos em gaiolas individuais com temperatura e luz ambiente como também recebendo água e ração comercial *ad libitum* exceto no período de acasalamento. A distribuição das ratas nos grupos citados realizou-se aleatoriamente.

### **2.1.2. Período de Acasalamento**

Após a adaptação, as ratas foram acasaladas com machos da mesma linhagem, obedecendo-se a proporção de 4 fêmeas para 1 macho.

### **2.1.3. Determinação do Primeiro dia de Prenhez da Rata**

Pela manhã, após o acasalamento, as fêmeas foram examinadas por meio de esfregaços vaginais, observados através do microscópio óptico visando verificar a presença de espermatozóides, sendo então considerado como o primeiro dia de gestação.

A partir deste momento, as fêmeas foram separadas e mantidas em gaiolas individuais.

### **2.1.4. Tratamento**

Os animais foram expostos ao Aspartame nos 9º, 10º e 11º dias de prenhez, isto é durante a organogênese<sup>(68)</sup> com a dosagem foi de 14 mg/kg diário de peso.

Antes da administração da droga, as ratas foram colocadas em uma cuba esférica com algodão embebido em éter, com o objetivo de promover leve sedação. Em seguida, a rata foi colocada em decúbito dorsal com inclinação da cabeça a 30º, passando sonda em trajeto nasogástrico, através da qual foi injetada a solução com Aspartame, seguido de 1 ml de água destilada para

impedir a presença de quantidade residual da medicação. Utilizamos sonda gástrica nº 4 e seringa de 1 ml, ambas descartáveis. Logo após, a sonda foi retirada e o animal retornou a sua caixa individual. As ratas passaram pelo processo de sedação individualmente e uma nova diluição da droga foi feita a cada aplicação.

Nas ratas do grupo controle foi administrado água destilada em volume equivalente, utilizando-se os mesmos procedimentos.

#### **2.1.5. Técnica de Dissecção e Pesagem**

No 20º dia de prenhez, os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico. Por meio de uma ampla incisão mediana no abdômen e útero, os fetos foram coletados e imediatamente imersos em solução Alfac (álcool 80% = 450ml, formol 10% = 50 ml e ácido acético puro = 25 ml) durante 5 dias, sendo então transferidos ao álcool 80%. Todos os fetos, após fixação, foram limpos, secados em papel de filtro e pesados em balança de precisão Labof (Laboratorium Felszerelés, Budapeste, Hungria).

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Técnica Histológica**

Para obtenção dos preparados histológicos permanentes, foram escolhidos aleatoriamente 30% da prole de cada rata tratada e do grupo controle. Os rins

dos fetos foram dissecados e cortados longitudinalmente. Posteriormente, estes foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. O material foi seccionado de forma semi-seriada com 6  $\mu\text{m}$ . Após este procedimento foram estabilizados com hematoxilina-eosina no Laboratório de Histologia da Famerp, para capacitar o exame morfométrico.

### **2.2.2. Técnica Morfométrica**

Para a realização morfométrica foram utilizadas a cariometria e a estereologia. A primeira forneceu como base de dados, as imagens dos núcleos das células do glomérulo, túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e ducto coletor dos rins de fetos. A segunda, a estereologia, foi estudada os procedimentos geométrico-estatísticos das mesmas estruturas citadas.

#### **2.2.2.1. Volume Glomerular**

Para o cálculo do volume glomerular foi utilizado o microscópio óptico Hund H500 Wetzlar (Helmut Hund GmbH, Alemanha), com objetiva de 40 vezes de aumento, munido de câmara clara Leitz Wetzlar (Alemanha) com aumento final de 496 vezes. Os glomérulos foram projetados sobre papel sulfite branco, sendo contornados com lápis preto n° 2.

Foram obtidas 20 estruturas por animal, totalizando 150 estruturas para cada grupo (controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e, tratado aquecido com aspartame diluído à temperatura de 40°C no final da prenhez).

Para obtenção dos diâmetros foram medidos os eixos maior e menor de cada uma dessas imagens.

Após a determinação dos eixos maior e menor (mm) calcularam-se o diâmetro geométrico médio (M) e o volume glomerular (V).

- a)  $M = \sqrt{D \cdot d}$
- b) Volume (V):  $V = \pi \cdot M^3$

#### **2.2.2.2. Cariometria**

Para estimar os parâmetros nucleares das células do epitélio dos túbulos contorcidos proximal e distal e ductos coletores renais nos grupos estudados, foi utilizado microscópio óptico Hund H500 Wetzlar (Helmut Hund GmbH, Alemanha) com objetiva de imersão (100 vezes) munido de câmara clara Leitz Wetzlar (Alemanha) (Figura 3).

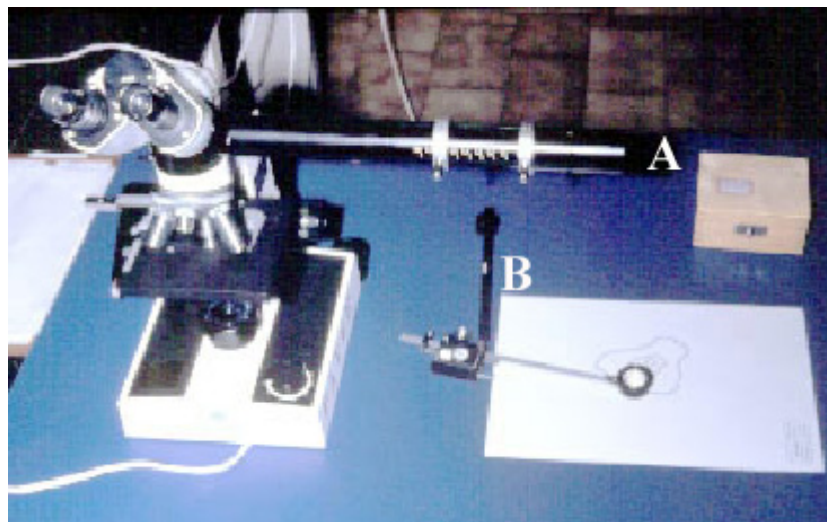


Figura 3. Conjunto constituído por uma Câmara-clara acoplada ao Microscópio de luz (A) e um Planímetro (B).

Os núcleos foram projetados sobre papel sulfite branco com aumento final de 1240 vezes. As imagens nucleares obtidas, 50 por animal em cada um dos grupos, foram então contornadas com lápis preto nº 2, tomando-se o cuidado de se anotar somente as imagens elípticas. Para obtenção dos diâmetros, com régua milimetrada, foram medidos os eixos maior (D) e menor (d) das referidas imagens.

Após a determinação dos eixos citados e mediante a utilização de um Software desenvolvido no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (FORP-USP), foram obtidos os seguintes parâmetros nucleares com suas respectivas fórmulas: Diâmetro médio:  $M=(D.d)^{1/2}$ ; Perímetro:  $P=(\pi/2).[3/2.(D+d)-M]$ ; Relação Diâmetro maior e menor:  $D/d$ ; Volume:  $\pi.1/6.M^3$ ; Área:  $A=\pi.1/4.M^2$ ; Relação volume/área:  $V/A=3/2.M$ ; Coeficiente de forma:  $F=4.\pi.A/1/\pi^2$ ; Índice de contorno:  $I=\pi/A^{1/2}$ ; Excentricidade:  $E=(D+d)^{1/2}.(d)^{1/2}/D$ .

A unidade de medida dos diâmetros utilizada é o micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), enquanto que para a área e o volume utiliza-se o micrômetro quadrado ( $\mu\text{m}^2$ ) e o micrômetro cúbico ( $\mu\text{m}^3$ ), respectivamente.

### **2.2.2.3. Estereologia**

Neste estudo, utilizou-se uma grade idealizada por Merz,<sup>(69)</sup> impressa sobre o papel no qual foram realizados os desenhos. Essa grade consiste em um quadrado de  $1440 \mu\text{m}^2$ , que limita uma área teste contendo um sistema de

100 pontos, com uma distância real entre os pontos de 12,48  $\mu\text{m}$  marcados sobre 10 linhas sinuosas, formadas por uma sucessão de 10 semicírculos encadeados por linha, conforme figura 4. Os cortes foram focalizados ao microscópio de luz, com objetiva de 100x, munido de câmara clara. As imagens obtidas do rim foram desenhadas sobre a grade.

A grade de Merz pode ser usada tanto para contar pontos sobre determinada estrutura histológica, como para contar intersecções entre duas estruturas contíguas, bastando para isso considerar o numero de pontos que caem sobre a estrutura em estudo, no primeiro caso, ou o numero de vezes em que as superfícies vizinha cortam a linha curva, no segundo caso.

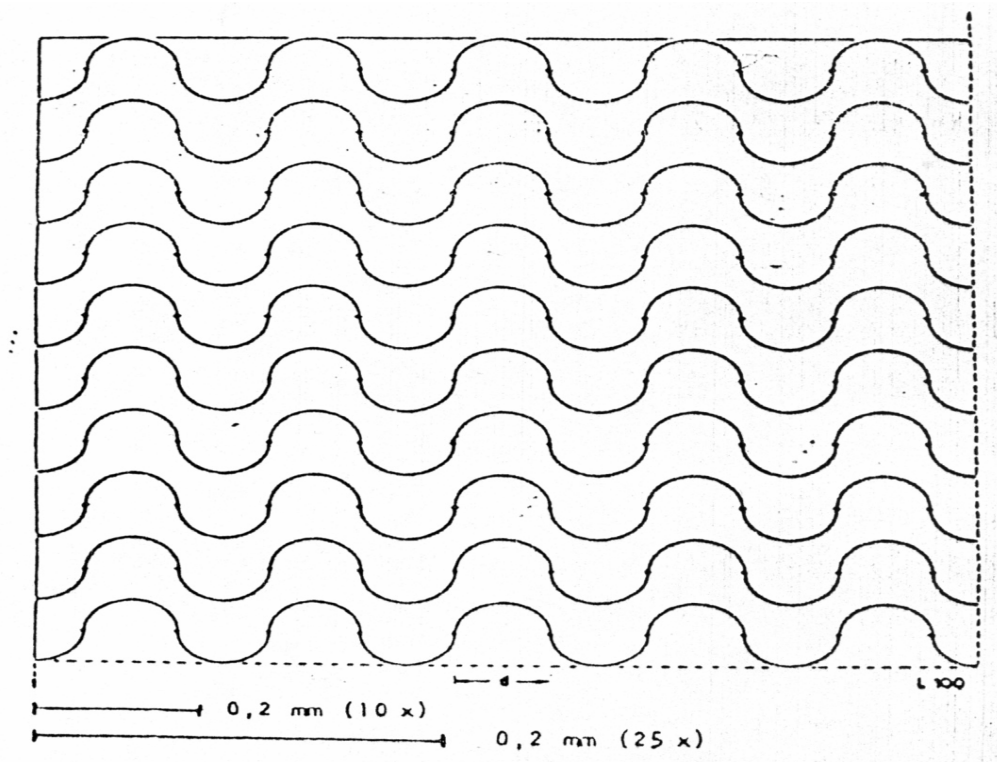


Figura 4. Representação gráfica da grade idealizada por Merz (1968).

A finalidade é obter o Volume citoplasmático, Volume celular, Relação Núcleo/Citoplasma e Densidade numérica celular através da contagem dos pontos que ficaram superpostos aos núcleos e citoplasmas das referidas células e sobre sinusóides da região dos fetos de ratas dos grupos tratado, tratado aquecido e controle. Para cada feto avaliado, foram marcados 2000 pontos sobre as estruturas renais estudadas na grade de Merz, o que perfaz a utilização de 20 campos diferentes.

**a) Volume Citoplasmático**

O volume citoplasmático (Vct) foi estimado a partir do volume nuclear e da relação núcleo/citoplasma corrigida. O Vct é dado pela relação:

$$V_{ct} = \frac{V_n}{N/C \text{ corrigida}}$$

**b) Volume celular médio**

A soma dos volumes nuclear e citoplasmático médios forneceram o valor estimado para as células epiteliais renais.

$$V_{cel} = V_n + V_{ct}$$

**c) Relação Núcleo/citoplasma (N/C)**

Esta relação é dada pela relação entre os volumes relativos do núcleo e do citoplasma pela equação:

$$N/C = \frac{V_{vn}}{V_{vcit}}$$

Os volumes relativos dos núcleos e citoplasmas nas células epiteliais da estruturas renais estudadas foram determinados pelo número de pontos que incidem sobre a estrutura considerada em relação ao número total de pontos da área teste.



O valor obtido deste modo é uma sobrestimação do valor real, devido ao chamado “efeito Holmes” que resulta do uso de cortes histológicos de espessura finita. Hennig<sup>(70)</sup> propôs a seguinte expressão matemática corretiva para o efeito Holmes, na qual os núcleos são encarados como se fossem esferas de diâmetro médio D, sendo t a espessura do corte:

$$V_{vc} = \frac{V_{vn}}{1 + 3t/2D}$$

Nessa expressão,  $V_{vc}$  é a fração volumétrica corrigida dos núcleos e  $V_{vn}$  a fração volumétrica observada, calculada pela divisão do número de pontos que incidem sobre os núcleos pelo número total de pontos que recaem sobre o núcleo e sobre o citoplasma. O valor do diâmetro médio (D) é o mesmo já determinado anteriormente pela cariometria.

A relação núcleo/citoplasma (N/C) corrigida será então:

$$N/C \text{ corrigida} = \frac{V_{vc}}{1 - V_{vc}}$$

Onde  $1 - V_{vc}$  é a fração volumétrica citoplasmática corrigida ( $V_{vcit}$ ).

#### **d) Densidade Numérica Celular**

Corresponde ao número de células por milímetro cúbico de tecido. Este dado é calculado dividindo-se a densidade volumétrica das células pelo volume celular médio.

$$N_{vh} = (V_{vh}/V_c)$$

### **2.2.3. Análise Estatística**

Para os cálculos matemáticos dos estudos morfométricos, foi utilizado um programa de computador em linguagem Basic Avançado, desenvolvido pelos Professores Doutores Geraldo Maia Campos e Miguel Angel Sala, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. A análise estatística entre os grupos foi realizada pelo Teste de Mood para medianas, Teste de Kruskal Wallis, seguida do Teste de Mann-Whitney quando se encontrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

---

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Resultados Morfológicos

Os resultados apresentados referem-se aos grupos controle, tratado com aspartame 14 mg/kg de peso diário à temperatura ambiente e tratado com aspartame aquecido a 40°C, administrados por sonda orogástrica no 9°, 10° e 11° dia de prenhez da rata.

Na Tabela 1 estão expressas as médias dos pesos corporais iniciais e finais (em gramas) das ratas do grupo controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C. A análise estatística mostrou significância na diferença de peso entre os animais do grupo controle e do tratado com aspartame à temperatura ambiente.

Tabela 1. Valores médios dos pesos corporais iniciais(I) e finais(F) das ratas(g) dos grupos: controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C no final da prenhez.

Parâmetro	Controle		Aspartame (temperatura ambiente)		Aspartame (aquecido)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Peso corporal(g)	240,7	346,5	245,1	320,1*	242,8	331,9*
	± 10	± 13	± 8	± 6	± 10	± 11

\* p = 0,004 vs. controle

Em relação ao peso corporal final dos fetos das ratas evidenciaram-se diferença estatística entre os fetos do grupo controle (média=3,84g, p=0,004) e grupo tratado à temperatura ambiente (média =1,76g) e quanto ao grupo tratado com aspartame aquecido (média = 2,05g, p= 0,006).

Quanto às médias de fetos por rata, os achados foram: grupo controle, n=11, grupo tratado à temperatura ambiente, n=10,2 e grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C, n=10, 4, não apresentando diferença estatística.

Expressando através da Tabela 2 os pesos das placentas (g) e as medidas dos cordões umbilicais dos animais dos grupos estudados observa-se que as médias mostraram diferença significativa no grupo tratado com aspartame á temperatura ambiente, mas não na medida do cordão umbilical.

Tabela 2. Valores médios do peso da placenta (g) e, a medida do cordão umbilical (cm) das ratas do dos grupos: controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C no final da prenhez.

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Aspartame (temperatura ambiente)</b>	<b>Aspartame (aquecido)</b>	<b>P</b>
Peso da placenta(g)	0,46 ± 7	0,25* ± 10	0,26 ± 5	0,004*
Cordão umbilical	1,86 ± 6	1,81 ± 8	1,82 ± 10	0,075

\* p < 0,05 vs. controle

## 3.2. Técnica Morfométrica

### 3.2.1. Volume Glomerular

Os resultados relativos ao volume glomerular dos rins dos fetos das ratas pertencentes aos grupos controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C estão expressos na tabela 3. Nota-se que o volume do grupo com aspartame à temperatura ambiente e o tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C estavam significativamente maior que no grupo controle.

Tabela 3. Valores das medianas dos volumes nucleares dos glomérulos ( $\mu\text{m}^3$ ) de fetos de ratas do grupo controle, grupo tratado à temperatura ambiente e, grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

Fetos	Controle	Aspartame (temperatura ambiente)	Aspartame (aquecido)
1	1599	2102	1784
2	648	2652	1831
3	1347	1637	2254
4	1396	1793	1994
5	1422	2109	2171

---

Mediana	1396	2102*	1994*
dIQ	513	665	405

---

- $p < 0,05$  vs. Controle; dIQ – diferença interquartílica.

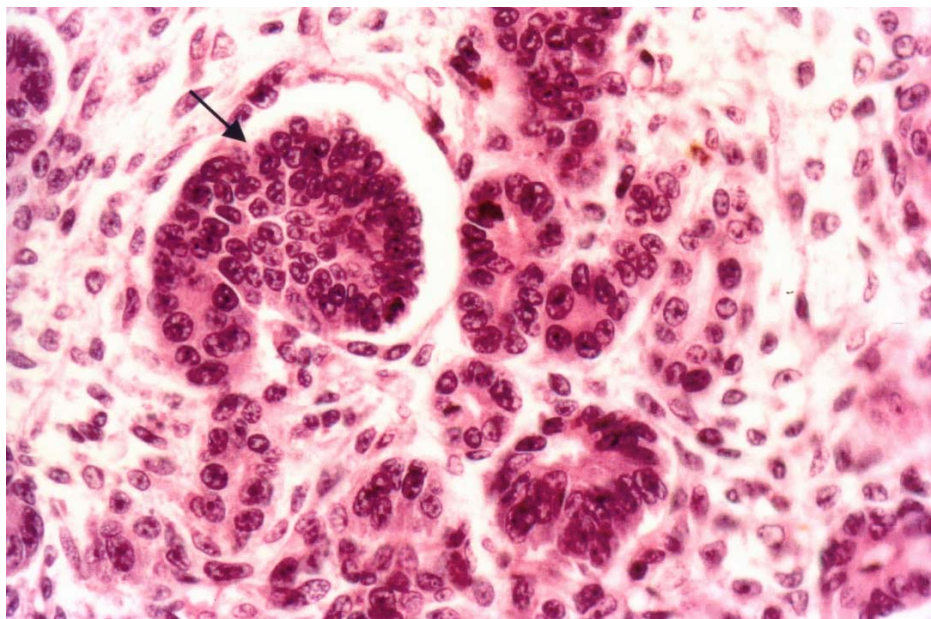


Figura 5. Corte de rim fetal do grupo controle – Glomérulo.  
Coloração hematoxilina-eosina.

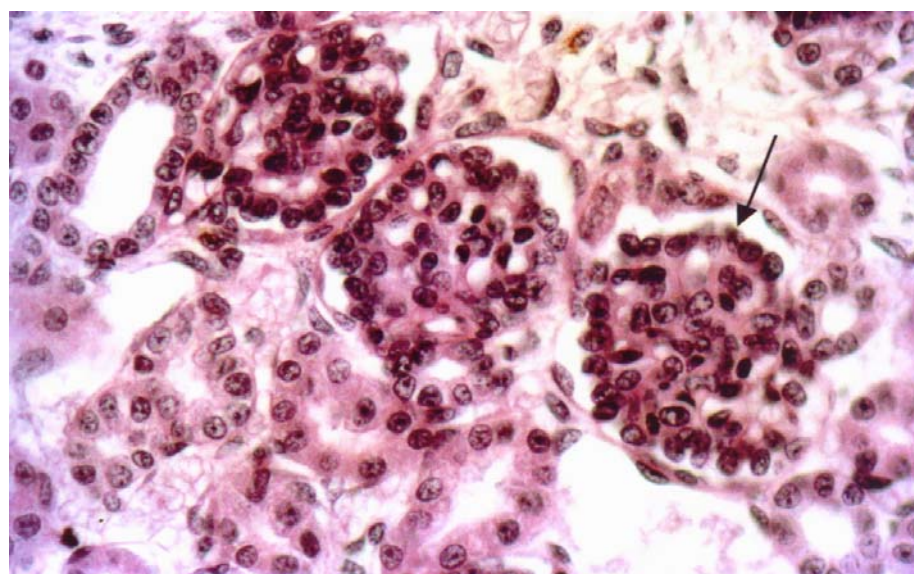


Figura 6. Corte de rim fetal do grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C - Glomérulo edemaciado. Coloração hematoxilina-eosina.



### **3.2.2. Cariometria**

De cada feto resultou uma avaliação de 50 núcleos. Os diâmetros nucleares foram medidos, estimou-se uma média a partir desses dados apresentados nas tabelas que se seguem (Tabelas 4,5 e 6).

Estes dados mostram os resultados da cariometria das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximal, distal e ductos coletores dos fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

#### **3.2.2.1. Túbulo Contorcido Proximal**

Nos túbulos contorcidos proximais os resultados correspondem aos parâmetros nucleares observados verificando que não houve diferença estatística no tamanho do diâmetro menor e relação diâmetro maior/menor e também não houve modificação na forma da células as quais correspondem aos parâmetros de excentricidade, índice de contorno e coeficiente de forma(Tabela 4).

Tabela 4. Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Aspartame (temperatura ambiente)</b>	<b>Aspartame (aquecido)</b>	<b>P</b>
Diâmetro Maior	9,11±1,55	9,65±1,30	12,54±1,56*	0,014*
Diâmetro Menor	7,66±1,94	8,22±0,14	8,44±1,71	0,082
Diâmetro Médio	8,36±1,82	9,06±0,42	10,75±1,42*	0,006*
Relação D/d	1,22±0,37	1,15±0,14	1,22±0,37	0,343
Volume	341±182	428±212	685±122*	0,006*
Área	56,9±22,3	66,6±10,9*	68,0±16,8*	0,031*
Perímetro	26,5±5,3	28,6±2,6*	30,5±14,3*	0,006*
Relação V/A	5,58±1,21	6,04±0,28*	6,54±1,55*	0,031*
Excentricidade	0,52±0,16	0,45±0,07	0,54±0,14	0,435
Coeficiente de forma	0,98±0,01	0,99±0,01	0,86±0,20	0,153
Índice de contorno	3,58±0,06	3,56±0,04	3,45±1,05	0,153

Mediana ± diferença interquartílica; \* p < 0,05 vs. controle

### 3.2.2.2. Túbulo Contorcido Distal

Os túbulos contorcidos distais (Tabela 5) revelaram que os núcleos apresentaram diâmetros aumentados o que implica em aumento do perímetro, área e volume destes núcleos nos fetos de ambos os grupos tratados. A forma destes núcleos (excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) apresentou alteração significativa apenas no grupo tratado com aspartame a temperatura ambiente.

Tabela 5. Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos túbulos contorcidos distais de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

Parâmetro	Controle	Aspartame (temperatura ambiente)	Aspartame (aquecido)	P
Diâmetro Maior	7,15±0,88	10,80±1,55*	12,98±1,33*	0,006*
Diâmetro Menor	5,34±0,65	8,42±1,29*	8,92±4,12*	0,031*
Diâmetro Médio	6,15±0,70	9,82±1,74*	10,85±1,50*	0,006*
Relação D/d	1,40±0,11	1,67±0,20*	1,58±0,17*	0,031*
Volume	128±22	413±106*	633±189*	0,006*
Área	30,2±6,3	70,6±3,8*	64,2±6,1*	0,006*
Perímetro	19,8±2,3	30,5±3,3*	30,7±7,0*	0,031*
Relação V/A	4,10±0,47	6,14±0,57*	6,94±2,08*	0,031*
Excentricidade	0,64±0,05	0,74±0,15*	0,55±0,15	0,003*
Coeficiente de forma	0,95±0,02	0,82±0,13*	0,86±0,11	0,003*
Índice de contorno	3,63±0,04	3,72±0,07*	3,68±0,56	0,031*

Mediana ± diferença interquartilica; \* p < 0,05 vs. controle.

### 3.2.2.3. Ducto Coletor

O estudo morfométrico dos ductos coletores (Tabela 6) revelou variações significantes em parâmetros como o diâmetro maior, médio, área, perímetro e relação volume/área no grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C. Em ambos os grupos tratados o volume também aumentou significativamente, porém não houve variação nas formas dos núcleos destes grupos quando comparados ao controle.

Tabela 6. Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

Parâmetro	Controle	Aspartame (temperatura ambiente)	Aspartame (aquecido)	P
Diâmetro Maior	7,84±1,57	8,45±0,51	10,89±2,14*	0,006*
Diâmetro Menor	5,94±1,26	7,42±0,51	7,97±0,36	0,060
Diâmetro Médio	6,44±1,44	7,59±0,67	9,53±1,37*	0,006*
Relação D/d	1,45±0,29	1,30±0,13	1,55±0,29	0,343
Volume	151±115	332±63*	489±168*	0,006*
Área	33,5±15,8	43,5±10,3	73,0±13,5*	0,006*
Perímetro	21±4,3	25,7±5,3	34,1±5,2*	0,006*
Relação V/A	4,29±0,96	5,39±0,70	7,15±0,60*	0,006*
Excentricidade	0,62±0,21	0,55±0,07	0,47±0,44	0,153
Coeficiente de forma	0,94±0,05	0,97±0,04	0,93±0,06	0,453
Índice de contorno	3,66±0,11	3,61±0,14	3,68±0,34	0,765

Mediana ± diferença interquartilica; \* p < 0,05 vs. controle.

### 3.2.3. Estereologia

A análise estereológica das células epiteliais do glomérulo, túbulos contorcidos proximal e distal e, ducto coletor de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C serão demonstrados na tabela 8.

Esta análise permitiu verificar o volume das células e do citoplasma ( $\mu\text{m}^3$ ) bem como a relação núcleo/citoplasma e a densidade numérica celular ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^3$ ) através da determinação das áreas estudadas, recorte e contagem dos pontos na grade de Merz.<sup>(69)</sup>( Figura 7).

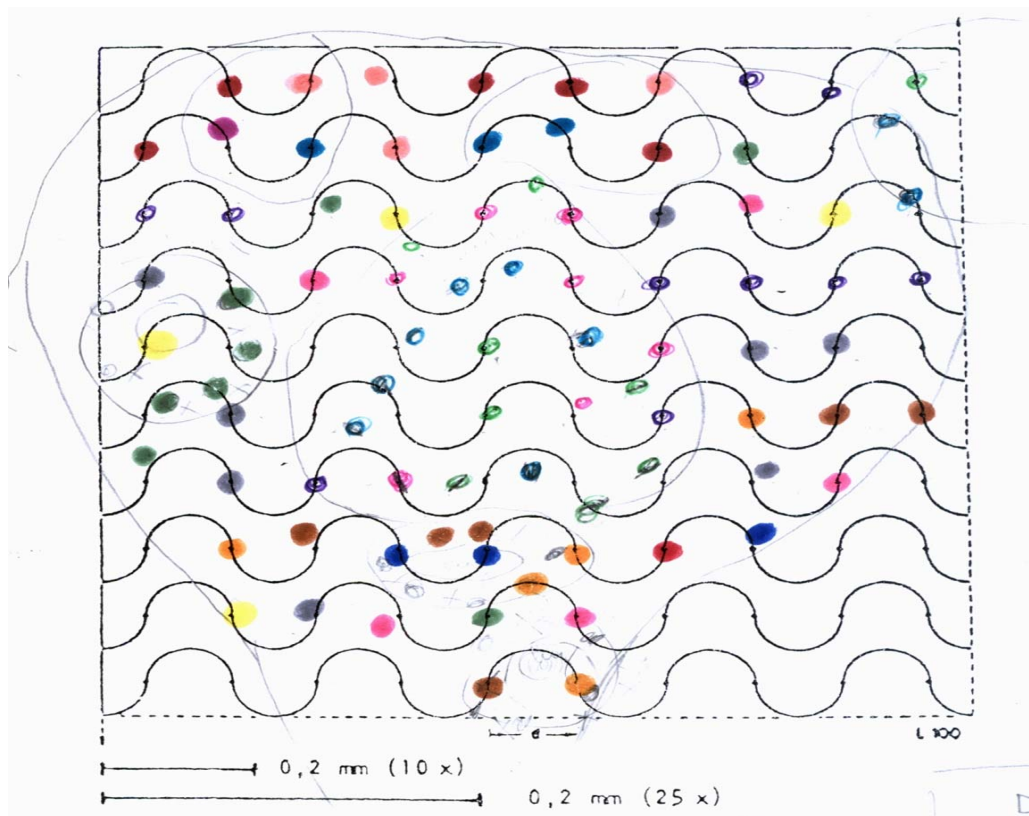


Figura 7. Modelo da marcação dos pontos considerando o núcleo, citoplasma, luz e outros elementos das estruturas renais estudadas.

Neste estudo houve a contagem de 10.000 pontos do grupo controle (100 fichas, sendo 20 de cada feto), 10.000 pontos do grupo tratado com aspartame à temperatura ambiente e, 10.000 pontos do tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C, perfazendo um total de 30.000 pontos os quais foram aplicados às equações estereológicas apropriadas.

Tabela 7. Quadro geral dos resultados das medianas dos parâmetros estereológicos das células do glomérulo, túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e ducto coletor de fetos de ratas dos grupos controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

Parâmetro		Controle	Aspartame (temperatura ambiente)	Aspartame (aquecido)	p
<b>V. celular</b>	Glomérulo	5369,3	5924,3*	6156,7*	0,007*
	T. C .Proximal	2118,7	2564,3	2956,4*	0,006*
	T. C.Distal	1965,3	2489,2 *	2372,0*	0,026*
	Ducto coletor	1756,3	1935,5*	2235,4*	0,006*
<b>V. citoplasmático</b>	Glomérulo	6505,7	6607,8*	6955,0*	0,007*
	T. C .Proximal	3897,3	4122,0	4625,3*	0,006*
	T. C.Distal	2565,3	2935,6 *	3024,2*	0,030*
	Ducto coletor	1854,3	2165,4*	2563,2*	0,007*
<b>Relação N/ citop.</b>	Glomérulo	0,5437	0,5568*	0,7533*	0,007*
	T. C .Proximal	0,1574	0,1823	0,1960	0,69
	T. C.Distal	0,1355	0,1412*	0,1563*	0,006*
	Ducto coletor	0,1023	0,1255*	0,1333*	0,007*
<b>Dens. Num. Cel</b>	Glomérulo	245425	150588 *	148967*	0,007*
	T. C .Proximal	150588	165598	130566*	0,007*
	T. C.Distal	132564	125658*	112500 *	0,026*
	Ducto coletor	112367	125438	1095433	0,082

V.celular – volume celular; V. Citoplasmático-volume citoplasmático; Relação N/citop.- relação núcleo/citoplasma; Dens. Num. Cel. – densidade numérica celular; Mediana ± diferença interquartilica;

\* p < 0,05 vs. controle.

Os dados apresentados na Tabela 7 apresentaram aumento dos volumes celular e citoplasmático nos grupos tratados com aspartame. Na quantificação das células houve redução significativa no túbulo contorcido proximal bem como o desaparecimento em muitas delas da bordadura em escova no tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C. No túbulo contorcido distal os núcleos celulares também encontram-se em menor número.

O glomérulo nos grupos tratados também se apresenta com todas os parâmetros estereológicos alterados com as células epiteliais maiores, porém em número reduzido. Contudo o ducto coletor não apresentou diferença estatística com relação á densidade numérica.

## 4. DISCUSSÃO

---



#### 4. DISCUSSÃO

Com o objetivo de estudar em animais o efeito do aspartame no rim fetal, delineamos a indução desta substância em ratas na prenhez.

Com o uso da dose de 14mg/Kg de peso diário e sua administração por via orogástrica nos 9º, 10º e 11º dia de prenhez verificamos o desenvolvimento das estruturas renais.

O adoçante artificial estudado neste trabalho é um agente químico e como qualquer outro pode ser incluído em uma das divisões que classificam os agentes teratogênicos, isto é, aqueles que quando os embriões são expostos a eles apresentam crescimento intra-uterino retardado e outras alterações (ex. a talidomida, álcool), os supostamente teratogênicos (ex. anticonvulsivantes) e os possivelmente teratogênicos que no caso de exposição do embrião a um deste agente indicam um comprometimento fetal.<sup>(71)</sup>

Pesquisas têm sido realizadas desde o 7º até o 14º dia de prenhez, porque este é um período importante na organogênese na rata.<sup>(72)</sup>

No caso da administração do aspartame um número limitado de estudos foi publicado administrando a substância nesta fase.<sup>(73)</sup>

Lennon *et al.*<sup>(37)</sup> administraram via intragástrica aproximadamente 300mg/kg de peso/diário de aspartame em ratas fêmeas por sete dias e hamsters fêmeas por cinco dias após o acasalamento não afetando a fertilidade pós coito, medida pelo número de implantações. Níveis de aspartame acima de 4% na dieta (7g/kg/peso diário) não afetaram o consumo alimentar, peso corporal, prolactina, gonadotrofina e histologia das glândulas

mamárias nas fêmeas ou o crescimento ou sobrevivência de seus fetos. Contudo, altos níveis de 7.5 e 14% de aspartame (9g/Kg/peso diário) causou redução no consumo alimentar e resultou em baixo peso corporal nas fêmeas e retardo de crescimento nos ratos jovens.

Sturtevant<sup>(74)</sup> relata que usando o aspartame em grávidas o ácido aspártico não cruza a placenta e que os níveis de metanol encontrados no sangue são baixos. Conclui que o uso do aspartame em doses aceitáveis não tem risco na gravidez.

Holder<sup>(75)</sup> corrobora o estudo acima e afirma que a exposição perinatal ao aspartame consumida moderadamente não afeta o desenvolvimento morfológico dos fetos de ratos.

Contrapondo estes resultados alguns trabalhos demonstram que a exposição fetal a esta substância aumenta o risco a hipersensibilidade alérgica e outras alterações e, além de atravessar a barreira placentária seus componentes também podem ser transmitidos pelo leite materno.<sup>(76-78)</sup>

Neste experimento as alterações morfológicas observadas revelaram que o aspartame atravessou a placenta causando redução no peso dos fetos tratados com a substância á T° ambiente e aquecida diluída à temperatura de 40°C (p < 0,005). Este resultado está em concordância com outros trabalhos,<sup>(79,80)</sup> que administraram doses de 20mg/kg/ peso diário no 10° até o 14° dia de prenhez e detectaram retardo no desenvolvimento fetal.

A origem do retardo de crescimento intra-uterino pode ter como etiologia causas fetais, fatores maternos e/ou ambientais e, perturbações da linha de suprimento.<sup>(79)</sup> Quando o surgimento de efeitos sobre o feto decorre de

exposições a agentes físicos ou químicos e esta exposição se deu durante a organogênese, pode levar especificamente a malformações dos diversos órgãos que se encontram em desenvolvimento durante a fase em que o agente teratogênico esteve agindo sobre o embrião.<sup>(79-81)</sup>

No período fetal a sensibilidade aos agentes exógenos cai drasticamente, porém estes agentes podem ainda causar crescimento retardado ou uma alteração na função.<sup>(81)</sup>

Ao expor o organismo a estas substâncias podem ocorrer efeitos diretos ou indiretos, ou seja, através de seus metabólitos. Como a metabolização das diversas substâncias são diferentes e, inúmeros fatores podem influenciá-la, o efeito teratogênico pode apresentar-se individualmente distinto.<sup>(82)</sup>

Diante do exposto o peso corporal do feto é um indicador de alteração fetal ou embriotoxicidade<sup>(83)</sup> ressaltando-se que o crescimento maior deste organismo ocorre durante o período do 15° ao 21° dia de gestação.<sup>(84)</sup>

Este estudo sugere que a administração do aspartame nos 9°, 10° e 11° dias de prenhez retarda o crescimento fetal e isto se dá pela expressão de danos celulares induzidos neste período e manifestados durante a fase de crescimento do feto.

O efeito do aspartame sobre o peso ao nascer tem sido discutido em alguns trabalhos<sup>(79,80)</sup> mas, as conseqüências da sua cronicidade pelas mães e, o efeito desta carga corporal sobre a próxima geração, durante a gestação e a lactação tem sido pouco investigado.

Recentes estudos<sup>(85,86)</sup> têm se preocupado nas conseqüências ao organismo das interações sinérgicas de diferentes adoçantes artificiais

comuns, demonstrando indução de neurotoxicidade e a possibilidade de atravessar a barreira placentária.

Sendo a placenta um órgão que controla as trocas materno-fetais e também a produção de hormônios, portanto, responsável pelo crescimento e proteção do feto á indução de teratogenicidade, é essencial estudá-la para que se verifique se a passagem de microrganismos, anticorpos e substâncias estão acontecendo.

As substâncias químicas que atravessam a placenta por diferentes tipos de transporte podem afetar o feto. Assim deve-se considerar a permeabilidade, a espessura e sua capacidade metabolizadora. Além disto, outros fatores determinantes como a lipossolubilidade e o tamanho da molécula (relacionados ao perfil farmacológico da substancia) e, os aspectos biológicos como o fluxo sanguíneo materno – fetal devem ser considerados.<sup>(86-88)</sup>

Em relação ao comprimento do cordão umbilical, este dado tem sido considerado um indicador confiável no movimento fetal. É influenciado pelo menos por dois fatores que são: a incidência do movimento fetal e o espaço da cavidade uterina disponível.<sup>(88-90)</sup>

O espaço ou o bloqueio do movimento fetal diminuído refletirá na diminuição do estiramento do cordão umbilical e no comprimento do mesmo.<sup>(91,92)</sup>

Moessinger<sup>(89)</sup> observou cordões umbilicais mais curtos quando injetou curare em roedores durante a prenhez, com a finalidade de aumentar a pressão do saco amniótico e suprimir os movimentos fetais.

Em seres humanos com defeitos estruturais dos membros Miller *et al.*<sup>(90)</sup> observaram cordões umbilicais encurtados que limitaram os movimentos fetais.

Neste estudo embora os grupos tratados com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C tivessem diminuído em relação ao controle, a diferença nos tamanhos dos cordões umbilicais não apresentou significância.

Um grande número de substâncias pode interferir no desenvolvimento tanto estrutural quanto funcional embrionário, com atuação positiva ou negativa, estabelecendo mecanismos/cascatas de regulação e/ou vias de condução de sinal desencadeado nos eventos da morfogênese renal.

Há cerca de 102 anos iniciaram-se os estudos de anatomia/embriologia que originaram a maioria dos conhecimentos atuais sobre desenvolvimento renal ou nefrogênese.<sup>(93)</sup>

O rim fetal provê um modelo experimental clássico presente na literatura atual e poderoso para o estudo dos princípios da organogênese. Desde as décadas de 50 e 60, os rins embrionários de camundongo e rato têm sido utilizados como modelos para o estudo da organogênese, por serem relativamente fáceis de manter em cultura *in vitro*.<sup>(93,94)</sup>

O desenvolvimento dos rins de camundongo/rato recapitula as condições vistas no humano com a formação em série dos pronefros no dia embrionário, dos mesonefros que são estruturas vestigiais do cordão nefrogênico e de caráter transitórios e dos metanefros, formando o rim funcional após o nascimento.<sup>(93)</sup> Nos humanos a nefrogênese inicia-se durante a quinta semana

de gestação culminando entre a trigésima segunda e a trigésima sexta semana.<sup>(63)</sup>

Com o intuito de quantificar o efeito do aspartame no rim fetal de ratos, utilizou-se a morfometria em suas duas vertentes: a cariometria e a estereologia.

A morfometria tem demonstrado ser uma importante metodologia para avaliar objetivamente as alterações morfológicas que ocorrem tanto nas condições fisiopatológicas como em estudos experimentais.<sup>(95)</sup> Esta técnica corresponde a um método coadjuvante para o diagnóstico de alterações celulares.<sup>(95,96)</sup> que auxilia a fisiologia e a patologia no estabelecimento de correlações quantitativas entre estrutura e função dos órgãos,<sup>(97)</sup> inclusive o rim.<sup>(98)</sup>

Muitos estudos utilizaram-se de medidas cariométricas e estereológicas com o objetivo de interpretar a toxicidade de diferentes substâncias químicas como o níquel,<sup>(99)</sup> albendazol,<sup>(100)</sup> vitamina A,<sup>(101)</sup> etanol,<sup>(102)</sup> metilmercurio,<sup>(103)</sup> ciclofosfamida,<sup>(104)</sup> chumbo,<sup>(105)</sup> amicacina,<sup>(106)</sup> , ciclamato<sup>(107)</sup> , cadmio<sup>(108)</sup> ,este ultimo sendo investigado na estrutura renal .

Também para a avaliação de agentes físicos como o efeito da temperatura em variados órgãos, estas técnicas tem sido aplicadas.<sup>(109,110)</sup>

Iniciando pelos glomérulos evidenciou-se no estudo cariométrico diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos volumes dos grupos tratado com aspartame á temperatura ambiente e, tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C, modificando o tamanho das células quando comparados

ao grupo controle. Verificou-se que os núcleos celulares da referida região nos fetos pertencentes a estes grupos apresentaram-se maiores.

Em relação às medidas estereológicas deste trabalho, observa-se que os parâmetros de volume celular, volume citoplasmático e relação núcleo/citoplasma aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo tratados com a substância quando confrontados com o grupo controle.

O parâmetro de densidade numérica celular apresentou redução significativa do número de células nos grupos tratado com aspartame à temperatura ambiente e tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C.

Um estudo longitudinal sobre a carcinogenicidade do ácido aspártico administrado na bebida para grupos de 50 ratos machos e 50 fêmeas, raça Fischer ( iniciando a administração com 6 semanas de idade até 100 semanas e então sacrificadas), onde verificou hiperplasia da pélvis renal em machos e fêmeas.<sup>(111)</sup>

O mesmo efeito foi observado pelo mesmo grupo de investigadores em outro estudo com ácido aspártico administrado na bebida de ratos isogênicos Fischer para avaliar se a atividade que promovia a carcinogênese era na camada epitelial da pélvis renal.<sup>(112)</sup> Em ambos os estudos houve clara evidencia da relação entre tratamento com acido aspartico e hiperplasia celular renal.

Nos túbulos contorcidos proximais este estudo demonstrou que o grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C evidenciou mudanças significativas no tamanho dos núcleos celulares.

Arruda *et al.*<sup>(113)</sup> detectaram modificações nos núcleos destes túbulos pela técnica cariométrica em fetos de ratos tratados com o edulcorante ciclamato. Concluíram que as alterações que também atingiram glomérulos e túbulos contorcidos distais sugerem nefrotoxicidade.

Vários segmentos do néfron determinam a quantidade de substâncias que aparecem na urina. Ocorre através de ações coordenadas a filtração glomerular, seguida pela reabsorção da substância do líquido tubular de volta para o sangue e pode ocorrer a secreção da substância do sangue para o líquido tubular.<sup>(93)</sup>

Nos túbulos proximais, a realização do trabalho no organismo deve-se às microvilosidades da membrana luminal, que aumentam a área disponível para a reabsorção. A borda em escova, contendo proteínas facilita o transporte de vários solutos, enzima e junções rígidas. Caso o túbulo contorcido proximal deixar de reabsorver os 2/3 do sódio filtrado, o segmento grosso ascendente compensa, parcialmente, aumentando sua reabsorção. Nesta pesquisa as bordas em escova apresentam evidências de destruição.

No grupo tratado com aspartame a temperatura ambiente as modificações ocorreram nos parâmetros relacionados à área, perímetro e relação volume/área. Embora os diâmetros maior, menor e médio estivessem maiores que o controle, não houve diferença significativa.

Nos túbulos contorcidos distais a cariometria evidenciou aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos tratados com aspartame de todos os parâmetros relacionados ao tamanho das células (DM, Dm, Diâmetro médio, volume, área, relação V/A). As variações de forma que são a



excentricidade, o coeficiente de forma e o índice de contorno, contudo, ocorreram apenas no grupo tratado com aspartame a temperatura ambiente, observando-se a tendência ao arredondamento dos núcleos.

Em relação às medidas estereológicas apresentaram diferença em todos os parâmetros em ambos os grupos tratados.

A morfometria efetuada na presente pesquisa evidenciou que, ao se comparar as médias dos diâmetros maiores nucleares dos ductos coletores, a diferença foi estatisticamente significativa com valor  $p < 0,05$  no grupo tratado com aspartame á aquecido diluído à temperatura de 40°C. O volume alterou também no grupo tratado com aspartame á temperatura ambiente. Não houve alterações significantes quanto a forma destas células quando comparadas ao grupo controle.

Verificou-se também nesta estrutura que os parâmetros do volume celular, volume citoplasmático e a relação núcleo/citoplasma estavam aumentadas porém, o número de células dos ductos coletores dos grupos tratados não reduziram de maneira significativa quando confrontados com o grupo controle.

Soffritti *et al.*<sup>(31)</sup> utilizaram a administração crônica do aspartame em ratos Sprague-Dawley concluindo que houve a indução de tumores com dose diária de 20mg/Kg de peso porém, no estudo de Ishi<sup>(114)</sup> não foi observado estes efeitos carcinogênicos nos experimentos com ratos Wistar. De acordo com Soffritti várias razões podem explicar esta diferença. A primeira é que em seu experimento o número de animais por sexo e por grupo era maior e submetido a análise estatística confiável.. Segundo é que os roedores não foram mortos

na 110 semanas de idade, mas foram observados até a morte natural, onde o aspartame expressou plenamente seu potencial carcinogênico. Finalmente relatam que no experimento de Ishi<sup>(114)</sup> com ratos Wistar, estes são mais resistentes do que a variedade Sprague - Dawley para desenvolver câncer, característica apresentada no experimento com benzeno.<sup>(115)</sup> Portanto os resultados com os ratos Wistar não podem ser comparados aos ratos Sprague – Dawley.<sup>(31)</sup>

Contudo os achados deste estudo demonstram a utilidade de um modelo animal para estudar os efeitos desta substância no rim em desenvolvimento e através do uso de métodos cariométricos e quantificação estereológica, pode-se especular que exista uma alteração nas estruturas deste órgão durante a gestação, especialmente nas análise morfológica destas células.

Neste estudo a toxicidade do aspartame foi mais visível no grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C tanto na análise morfométrica quanto estereológica onde os achados de alterações estruturais foram concordantes ao trabalho de Tsang<sup>(116)</sup> e colaboradores utilizando também o modelo experimental. Este estudo relata que qualquer aquecimento, mesmo no final do cozimento, causará rapidamente a formação de dicetopiperazina (DKP) e fenilalanina livre. Formam-se quantidades significativas de DKP quando o aspartame é armazenado em solução à temperatura ambiente e o aquecimento apressa consideravelmente este processo.

Diante do exposto nota-se a necessidade de novos trabalhos com o intuito de elucidarem os mecanismos pelos quais o edulcorante artificial em

---

questão determina alterações nucleares e celulares neste estudo, no rim, cabendo ainda destacar que a indiscutível utilidade dos estudos experimentais, duas limitações ainda comprometem em maior ou menor grau o valor preditivo dos testes de mutagenicidade/carcinogenicidade de substâncias químicas. No caso dos testes *in vitro*, há a necessidade de extrapolação do resultado obtido para a situação *in vivo*. Como os sistemas *in vitro* têm capacidade metabólica limitada e os sistemas extrínsecos de ativação metabólica não reproduzem necessariamente a biotransformação da substância que ocorre no animal íntegro, resta sempre a possibilidade de um metabólito carcinogênico ser produzido *in vivo*, mas não nas condições experimentais *in vitro*.<sup>(117)</sup>

Por enquanto, ainda é fundamental complementar os testes *in vitro* com pelo menos um ensaio *in vivo* na investigação do potencial genotóxico de qualquer xenobiótico<sup>(31)</sup>.

A outra limitação, mais complexa, é a incerteza subjacente à extrapolação de resultados entre espécies. Sabe-se que há consideráveis diferenças de resposta entre espécies e o que é observado em uma espécie pode não ser extrapolável para outra, tanto em termos quantitativos, quanto qualitativos.<sup>(31,117)</sup>

Frente a estas considerações, neste trabalho os grupos tratados com aspartame, á temperatura ambiente e aspartame diluído aquecido á temperatura de 40°C demonstram a utilidade de um modelo animal para estudar os efeitos nefrotóxicos em um sistema em desenvolvimento, pois evidenciaram alterações morfológicas e morfométricas.

## 5. CONCLUSÕES

---

## **5. CONCLUSÕES**

A análise e a discussão dos resultados obtidos possibilitaram as seguintes conclusões sobre o aspartame administrado, via gavagem durante a prenhez:

1. causou redução dos parâmetros morfológicos: peso da placenta e peso corporal dos fetos;
2. causou alterações significativas das medidas cariométricas e estereológicas nos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais e, em menor grau nos ductos coletores dos grupos que foram tratados com esta substância á temperatura ambiente e aquecido diluído à temperatura de 40°C.
3. sugere nefrotoxicidade .

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pelaez V. A dinâmica econômica da inovação no campo dos edulcorantes sintéticos. *Cad Cie & Tecn* 1993; 10(1/3):93-117.
2. Salles RK, Dornelles CAS, Dal Piva MM, Silva RA. Aspartame: uma revisão. *Hig Aliment* 2000;14(77):34-6.
3. Associação Brasileira da Industria de Alimentos Dietéticos - ABIAD. Hábitos se atitude do consumidor de produtos dietéticos e de baixo teor de gordura. São Paulo:ABIAD;1994.
4. Woodrow C. Aspartame, Methanol and the Public Health. *Journal of Applied Nutrition* 1984; 42-54.
5. Cândido LM, Campos AM. Alimentos para fins especiais: Dietéticos. São Paulo: Livraria Varela;1995.
6. Hull JS. Sweet Poison-How the world's most popular artificial sweetener is harming us. New Horizon Press, London; 1999.
7. Tephly TR. Comments on the purported generation of formaldeyde and adduct formation from the sweetener aspartame. *Life Sci* 1999; 65(13):157-60.

8. Butchko HH, Stargel WW. Aspartame: scientific evaluation in the postmarketing period. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001; 34(3):221-33.
9. Gougeon R, Spidel MS, Kristy Lee BS, Field CJ. Canadian diabetes association national nutrition committee technical review: non-nutritive sweeteners in diabetes management. *Can J Diab* 2004; 28(4):385-99.
10. Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Análise quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. *Cienc Tecnol Aliment* 2000; 20:318-28.
11. Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Avaliação tempo-intensidade de doçura e amargor do aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência a sacarose em altas concentrações. *Bol Centro Pesqui Process Aliment* 2001;19:391-410.
12. Assunção MCF, Anderson GB, Cavalcanti ZCH. Uso de adoçantes alternativos pelo diabético. *JBM* 1994; 67:62-9.
13. Andrade JP, Volschan BCG. A praticidade do uso de adoçantes alternativos. *Rev Bras Odontol* 1998; 55:40-4.
14. Tollefson L. Monitoring adverse reactions to food additives in the U.S. Food and Drug Administration. *Regul Toxicol Pharmacol* 1988; 8:438-446.



15. Stengik LD. The aspartame history: a model for the clinical testing of a food additive. *Am J Clin Nutr* 1987; 46(1Suppl):204-15.
16. Butchko HH, Stargel WW, Conner CP, Mayhow DA, Benninger C, Blackburn GL, *et al.* Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol* .2002; 35:91-3.
17. Toledo MC, Ioshi SH. Potencial intake of intense sweeteners in Brazil. *Food Addit Cont* 1995;12:799-808.
18. Aspartame Information Center, 2005. Aspartame Information Center Homepage. Avaliado: <http://www.aspartame.org>
19. AFSSA. Assessment Report: Opinion on a possible link between exposition to aspartame and the incidence of brain tumours in humans 2002. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort. Report in French, available at. <http://www.afssa.fr>.
20. Soffritti M, Belpoggi F, Padovani M, Lauricia M, Dagli Spositi D, Minardi F. Life-time carcinogenicity bioassay of toluene given by stomach tube to Sprague-Dawley rats. *Eur J Oncol* 2004; 9:91:102.
21. Hazardous Substances Data Bank. TOXNET. Toxicological Data Network. Avaliado: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/tamp/-mobZul>.2005.

22. Gaull GE . Aspartame and seizures. *Lancet* 1985; 2 (8469-70): 1431.
23. Stengik LD, Brummel MC, Filer LJ Jr, Baker GL. Blood methanol concentrations in one - year-old infants administered graded doses of aspartame. *J Nutr* 1983; 113(8):1600-6.
24. Opinion of the Scientific Committee on Food Update on the Safety of spartame.2002 [http://europa.eu.int/comm./food/fs/scf/out155\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm./food/fs/scf/out155_en.pdf).
25. Davoli E. Serum methanol Concentrations in rats and in men after a single dose of aspartame. *Food and Chemical Toxicology* 1986; 24:187-9.
26. Liesovouri J, Heikki S. Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms. *Pharmacology & Toxicology* 1991; 69: 157-163.
27. Diomede L, Romano M, Guiso G, Caccia S, Nava S, Salmona M. Interspecies and interstrain studies on the increased susceptibility to metrazol-induced convulsions in animals given aspartame. *Food Chem Toxicol.*1991; 29(2):101-6.
28. Goerss AL, Wagner GC, Hill WL. Acute effects of aspartame on aggression and neurochemistry of rats. *Life Sciences* 2000; 67:1325-1329.

29. Dailey JW, Lasley SM, Mishra PK, Bettendorf AF, Burger RL, Jobe PC. Aspartame fails to facilitate pentylenetetrazol-induced convulsions in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 98(3):475-86.
30. Porikos KP, Koopmans HS. The effect of non-nutritive sweeteners on body weight in rats. *Appetite*. 1988; 11 Suppl 1:12-5.
31. Soffritti M, Belpoggi F, Espositi DD, Lambertini L, Tibaldi E, Rigano A. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the fed to Sprague-Dawley Rats. *Environmental Health Perspectives* 2006; 14.(3): 379-385.
32. Vermunt SH, Pasman WJ, Schaafsma G, Kardinaal AF. Effects of sugar intake on body weight: a review. *Obes Rev* 2003; 4(2):91-9.
33. Rowan AJ, Shaywitz BA, Tuchman L, French JA, Luciano D, Sullivan CM. Aspartame and seizure susceptibility: results of a clinical study in reportedly sensitive individuals. *Epilepsia* 1995; 36(3):270-5.
34. Butchko HH, Kotsonis FN. Acceptable daily intake vs actual intake: the aspartame example. *Am Coll Nutr* 1991; 10(3):258-66.
35. Pierlgorsh WW, Bayler AJ. *Statistics for environmental biology and toxicology*. London 1997; Chapman.

36. McAnulty PA, Collier MJ, Enticott J, Tesh JM, Mayhew DA, Comer CP, *et al.* Absence of developmental effects in CF-1 mice exposed to aspartame in utero. *Fundam Appl Toxicol* 1989; 13(2):296-302.
37. Lennon HD, Metcalf LE, Mares SE, Smith JH, Nutting EF, Saunders FJ. The biological properties of aspartame. IV. Effects on reproduction and lactation. *Environ Pathol Toxicol* 1980; 3(5-6):375-86.
38. Holder MD. Effects of perinatal exposure to aspartame on rat pups. *Neurotoxicol Teratol* 1989;11(1):1-6.
39. Boehm MF & Bada JL. Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100°C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81:5263-66.
40. Ishi H, Koshimizu T, Usami S, Fugimoto T. Toxicity of aspartame and this diketopiperazine for Wistar rats by dietary administration for 104 weeks. *Toxicology* 1991; 21:91-94.
41. Burgert SL, Andersen DW, Stengik LD, Takeuchi H, Schedl HP. Metabolism of aspartame and its L-phenylalanine methyl éster decomposition product by the porcine gut. *Metabolism*. 1991; 40: 612-8.

42. Dailey JW, Lasley SM, Burger RL, Bettendorf AF, Mishra PK, Jobe PC. Amino acids, monoamines and audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats: effects of aspartame. *Epilepsy Res* 1991; 8(2):122-33.
43. Frey GH. Use of aspartame by apparently healthy children and adolescents. *Toxicol Environ Health* 1976; 2(2):401-15.
44. Garriga MM, Metcalfe DD. Aspartame intolerance. *Ann Allergy*. 1988; 61(6Pt2):63-9.
45. Filer Jr LJ, Stengik LD. Aspartame metabolism in normal adults, phenylketonuric, heterozygotes and diabetic subjects. *Diabetes Care* 1989; 12(suppl.1) : 67-74.
46. Mackey SA, Berlin CM Jr. Effect of dietary aspartame on plasma concentrations of phenylalanine and tyrosine in normal and hozygous phenylketonuric patients. *Clin Pediatr* 1992; 31(7):394-9.
47. Yalaz K, Vanli L, Yilmaz E, Tokatli A, Anlar B. Phenylketonuria in pediatric neurology practice: a series of 146 cases. *J Child Neurol* 2006; 21(11): 987-90.
48. Brandalize SR, Czeresnia D. Evaluation of the program for prevention and health promotion in phenylketonuria patients in Brazil. *Rev Saude Publica* 2004; 38(2):300-6.

49. LaBuda CJ, Hale RL. Anxiety in mice following acute aspartame and ethanol exposure. *Alcohol* 2000; 20: 69-74.
50. Ranney RE, Oppermann JA, Muldoon E, McMahan FG. Comparative metabolism of aspartame in experimental animals and humans. *J Toxicol Environ Health* 1976; 2(2):441-51.
51. David S Ludwig, Karen E Peterson, Steven L Gortmak..Relationship between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis . *Lancet* 2001; 357; 505-08
52. Roberts HJ. Aspartame and brain cancer. *Lancet* 1997; 349(9048):362.
53. Roberts HJ. Aspartame as a cause of allergic reactions, including anaphylaxis. *Arch Intern Med* 1996; 13:156-67.
54. Oyama Y, Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaike N, Sakai K, *et al.* Cytotoxic effects of methanol, formaldeído, and formate indissociate rat thimocytes: a possibility of aspartame toxicity. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18(1):43-50.
55. Stengik LD, Brummel MC, McMartins K, Martin-Amat G, Filer LJ, Baker GL, *et al.* Blood methanol concentrations in normal adult subjects administered abuse doses of aspartame. *J Toxicol Environ Health* 1981; 7(2):281-90.

56. Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaike N, Sakai K, Noda K. Cytotoxic effects of methanol, formaldeído, and formate indissociate rat thimocytes: a possibility of aspartame toxicity. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18(1): 43-50.
57. McAnulty PA, Collier MJ, Enticott J, Tesh JM, Myhew DA, Córner CP, *et al.* Absence of development effects in CF-1 mice exposed to aspartame in útero. *Fundam Appl Toxicol* 1989; 13(2): 296-302.
58. Romão Jr JE, Araújo MR. Hemodiálise. In: Shor N, Srougi M, editores. *Nefrologia e Urologia*. São Paulo: Sarvier; 1998. p.37-41.
59. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Oshita M, Kabasawa K, Iwama K, *et al.* The comet assy with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 2002; 519:103-119.
60. Silva FR, Wachter PH, Ito Y, Jeckel-Neto EM. Efeito da idade e da restrição de dieta na quantidade de colágeno no rim de ratos. Laboratório de Biofísica da Faculdade de Biociências, PUCRS; Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University, Japão. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Geriatria e Gerontologia. Brasília, 21 a 24 de Junho de 2000. p. 99
61. Mello AL. Percepção e práticas alimentares de indivíduos adultos com Diabetes mellitus. [Dissertação] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina; 1999.

62. Ioshii SH. Avaliação da ingestão diária potencial de edulcorantes no Brasil. [Dissertação] Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1992.
63. Garcia A, Azoubel R. A placenta humana. São Paulo: Ateneu; 1986.
64. Raben A, Vasilaras T, Moller AC, Astrup A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 721-9.
65. Schwartzman S. Intoxicações agudas. 4<sup>o</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 1991.
66. Ortiz A. Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int* 2000; 58:467-485.
67. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press Washington, D.C. 1996.
68. Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. Principles and methods of toxicology. 3rd ed. New York: Raven Press; 1994. p.989-1034.



69. Merz WA. Die streckenmessung an gerichteten strukturen im mikroskop und ihre zur bestimmung von oberflächen volumen:relationen im knochengewebe. *Mikroskopie* 1968; 22:132-42.
70. Henning A. Fehler der oberflächen bestimmung von kernen bei edlicher schnittdick. *Mikroskopie* 1957; 1-2:7-11.
71. Zugaib M, Pedreira DAL, Brizot ML, Bunduki V. *Medicina Fetal*. 2º ed. São Paulo: Atheneu 1999; p. 537-540.
72. Rugh R. *The mouse, its reproduction and development*. Minneapolis: Burgess Publishin Company; 1968.
73. Ferreira AL, Sampaio HA. Aspartame: uma doçura amarga? *Rev Ciência Hoje*; 2001; 30: 175-77.
74. Sturtevant E. Use of aspartame in pregnancy. *Int J Fertil* 1985; 30(1):85-7.
75. Holder MD. Effects of perinatal exposure to aspartame on rat pups. *Neurotoxicol Teratol* 1989 ;11(1):1-6.
76. Geha R, Bucckley CE, Patterson R, Polmar S, Saxon A, Rohr A, *et al.* Aspartame is no more likely than placebo to cause urticaria/angioedema: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(2): 639-40.

77. Hill AM, Belsito DV. Systemic contact dermatitis of the eyelids caused by formaldehyde derived from aspartame? *Contact Dermatitis* 2003; 49(5):258-9.
78. Schiffman SS, Buckey CE, Sampson HA, Massey EW, Baraniuk JN, Follet JV, *et al.* Aspartame and susceptibility to headache. *N Engl J Med* 1987;317(19):1181-5.
79. Mukhopadhyay M, Mukherjee A, Chackrabarti J. In vivo cytogenetic studies on blends of aspartame and acesulfame-K. *Food Chem Toxicol* 2000 ; 38(1):75-7.
80. Vences-Meija A, Labra-Ruiz N, Hernandez-Martinez N, Dorado-Gonzales V, Gomes-Garduno J, Perez-Lopes I, *et al.* The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes. *Hum Exp Toxicol.* 2006; 25(8):453-9.
81. Dow-Edwards DL, Scribani LA, Riley EP. Impaired performance on odor-aversion testing following prenatal aspartame exposure in the guinea pig. *Neurotoxicol Teratol* 1989;11(4):413-6.
82. Sturtevant F. Does aspartame cause methanol toxicity? *Food Chem Toxicol* 1985; 23(10):961.

83. Schardein JL. Chemically induced birth defects. 2° ed. New York: MarcelDeckker;1985.
84. Witschi E. Development: Rat. In: Altman PL, Dittner DS, Editors. Growth including reproduction and morphological development. Washigton, DC: Biological Handbooks of the Federation of American Societes for Experimental Biology; 1962. p.304-14.
85. Belpogui F, Soffritti M, Padovani M, Degli-Espositi D, Lauriola M, Minardi F. Results of long-term carcinogenicity bioassay on Sprague-Dawley rats exposed to aspartame administered in feed. Ann N Y Acad Sci. 2006;1076:559-77.
86. Gallus S, Scotti L, Negri E, Talamini R, Franceschi S, Montella M, *et al.* Artificial sweeteners and cancer risk in a network of case-control studies. Ann Oncol. 2006; 16 (2):302-8.
87. Marieb EM. Essentials of anatomy and physiology. 6° ed. San Francisco, Califórnia: Cummings Science Publishing;2000.
88. Alcântara P, Marcondes E. Pediatria Básica. 6°ed. São Paulo: Sarvier,1978.
89. Moessinger AC, Blanc WA, Marone PA, Polsen DC. Umbilical cord length as an index of fetal activity: experimental study and clinical implications. Pediatr Res 1982;16:109-12.

90. Miller ME, Higginbottom M, Smith DW. Short umbilical cord: its origin and relevance. *Pediatrics* 1981; 67(5):618-621.
91. Cunha AS, Contrera MGD, Lopes RA, Azoubel R, Contrera JD. Experimental hipervitaminosis A in the rat XXV. The effect of a single dosis of vitamin A on umbilical cord length. *Anais da 44ª Reunião da SBPC* 1992;712.
92. Leão LLs, Lopes RA, Novaes Jr AB, SALA ma, Komesu MC, Maia Campos. The effect of maternal protein deprivation during pregnancy in rat umbilical cord length. *Resumos do 14º Encontro de Pesquisa Veterinária, Jaboticabal* 1992;14:259.
93. Cabrera A, Santos OFP. Expressão de genes no desenvolvimento renal. [http://www.medonline.com.br/med\\_ed/med8/feedback.htm](http://www.medonline.com.br/med_ed/med8/feedback.htm).
94. Pfaller W, Rittinger M. Quantitative morphology of the rat kidney. *Int J Biochem* 1980;12:17-22.
95. Sala MA, Lopes RA, Matheus M. Método morfométrico para análisis cuantitativo de los tejidos. Dterminación de los parâmetros normales para el hepatócito de rato. *Arch Fac Méd Zaragoza* 1992; 32:29-31.
96. Chalkley HW, Cornfield J, Park H. A method for estimating volume surface ratios. *Science* 1949; 23(110):295-7.

97. Sala MA. Estudo estereológico da placenta humana no decorrer da gestação. [Tese de livre docência]. Ribeirão Preto(SP):FORP-USP;1987.
98. Schimidt NB, Reinking LN. Morphometry and fluid reabsorption during peristaltic flow in hamster renal papillary collecting ducts. *Kidney Int* 1981; 20(6):789-98.
99. Martins MP. Efeitos da exposição pré-natal ao cloreto de níquel em fetos de ratos. [Dissertação] Ribeirão Preto (SP); Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;1996.
100. Mizusaki CI, Watanabe LS, Semprini M, Lopes RA, Sala MA, Vale SAL, *et al.* Estudio cariométrico del epitélio de fetos de ratas tratadas con albendazol durante la preñez. *Ver Chil Anat* 1996;14:79-85.
101. Andrade DHL. Efeitos do etanol e vitamina A nas áreas de suporte de prótese dental. [Dissertação] Ribeirão Preto(SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2001.
102. Caputo LRG, Iunes DH, Hernandez JW, Lopes RA, Sala MA, Semprini M *et al.* Efectos del etanol sobre la epidermis de fetos de rata: estudio morfológico y morfométrico. *Ver Chil Anat* 1997; 15(2):165-74.
103. Mendes GEF, Azoubel R, Lopes RA, Sala MA, Lacerda AS, Silva Jr AR. Effects of low-dose exposure of rat fetuses pâncreas to

- methylmercury:morphometric and stereologic studies. *Rev Chil Anat* 1998;16(2):177-183.
104. Liedtke Jr H. Estudo do efeito teratogênico da ciclofosfamida em ratos:morfologia, morfometria e estereologia do palato fetal. [Tese] São José do Rio Preto(SP):Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;1997.
105. Brandini DA. Efeitos tóxicos dos metais comumente utilizados em reabilitação oral: estudo hitométrico das alterações provocadas pelo chumbo no assoalho da cavidade bucal e cartilagem de Meckel de fetos de rato. [Tese] Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2000.
106. Portela GS. Nefrotoxicidade fetal no uso da amicacina:estudo cariométrico. [Dissertação] São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2003.
107. Martins AT. Efeito do Ciclamato de Sódio sobre o Pâncreas Exócrino Fetal de Ratos: Estudo Cariométrico e Estereológico.[Tese] São José do Rio Preto (SP):Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;2006.
108. Roman TRN. Efeito comparativo do cádmio e mercúrio sobre rim fetal de rato: estudo morfométrico. [Tese] São José do Rio Preto (SP):Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;2006.

109. Pedrazzi V, Cruz Filho AM, Tambasco P, Lopes RA, Sala MA, Mattos MGC, *et al.* Efeitos da hipertermia nos epitélios de revestimento e glandular das fossas nasais de feto de rata: estudo cariométrico. Rev Esc Farn Odontol Alfenas 1996;(18):27-9.
110. Miraglia SM. Hayashi H. Histomorphometry of immature rats testis after heating. Journal of Morphology 1993; 217:65-74.
111. Kirahori Y, Kitamura T, Matsuda H, Tão M, Matsuda E , Konishi N, *et al.* Carcinogenit study of monosodium aspartate,in Fisher 344 rats: 100 weeks treatment. J Toxicol Pathol 1996; 9:161-8.
112. Kitamura M, Konishi N, Kitahori Y, Fukushima Y, Yoshioka N, Hissa Y. Promoting effect of monosodium aspartate,but not glicyne, on renal pelvis and urinary bladder carcinogenesis in rat induced by N- butyl-N. Toxicol Patho 1996; 24:579-679.
113. Arruda G, Martins A, Godoy JMP, Facio Jr F, Azoubel R. Effects of sodium cyclamate in kidneys of rats fetuses: a morphometric study. Int J Morphol 2004; 22(2);127-132.
114. Ishi H. Incidence of brain tumors in rats fed aspartame. Toxicol Lett 1981; 7:433-7.

115. Maltoni C, Lefemine G, Belpoggi FA. Benzene, an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology 1989; 82:109-124.
116. Tsang W. Determination of Aspartame and Its Breakdown Products in Soft Drinks by Reverse-Phase Chromatography with UV Detection. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 1985; 33(4):734-738.
117. Dietrich DR, SwenbergJA. Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutation Research* 1991; 248: 239-260.



## 7. APÊNDICES

---

## **7. APÊNDICES**