

Efeitos do Aspartame no Rim Fetal de Ratos – Estudo Cariométrico

Effects of Aspartame in Kidneys of Rat Fetuses – Karyometric Study

Marielza R. Ismael Martins; Reinaldo Azoubel

*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Grupo de Pesquisa Reprodução Humana e Toxicologia da
Reprodução / FAMERP*

RESUMO

Introdução: O aspartame é um edulcorante artificial amplamente usado em muitos produtos como alimentos e bebidas, sendo 200 vezes mais doce que o açúcar. O objetivo deste estudo foi 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. **Método:** 15 ratas grávidas (Wistar) pesando em média 180g foram divididas em 3 grupos: grupo controle (n=5), grupo tratado com aspartame à temperatura ambiente (n=5) e, grupo tratado com aspartame aquecido a 40°C (n=5). No vigésimo dia de prenhez, os animais foram mortos e os fetos fixados em solução Alfac, incluídos em parafina, cortados e estabilizados com hematoxilina-eosina. O método utilizado foi a morfometria pela técnica cariométrica. **Resultados:** Houve diminuição significativa no peso dos fetos do grupo tratado com aspartame à temperatura ambiente ($p=0,004$) comparado com o grupo controle. O volume glomerular e o tamanho nuclear das células dos túbulos proximais, distais e ducto coletor dos rins fetais das ratas tratadas com aspartame a 40°C aumentaram significativamente em relação aos controles. **Conclusão.** Estes resultados mostraram que o uso do aspartame produz efeitos em todas as estruturas renais sugerindo nefrotoxicidade. (**J Bras Nefrol 2006; 28(3):151-157**)

Descritores: Rim. Aspartame. Morfometria. Estudo experimental.

ABSTRACT

Introduction: Aspartame is a widely used artificial sweetener added to many products of foods and beverages, being 200 times as sweet as sugar. The purpose of this study was to assess the effect of aspartame in kidneys of rat fetuses considering morphometric changes of glomerulus, proximal and distal convoluted tubules and, collecting duct. **Methods:** Fifteen pregnant Wistar rats weighting around 180g were 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). On the 20th day of pregnancy, animals were sacrificed and the fetuses were fixed in Alfac solution, included in paraffin, sectioned and stained with haemotoxyline and eosine. Morphometry by the karyometric technique was the method used. The principal evaluated measurements were glomerular volume and cell nuclei size of proximal and distal convoluted tubules, and collecting duct. 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 glomerular volume and nuclei size of proximal and distal convoluted tubules and collecting dust of kidneys of rat fetuses treated with aspartame at 40°C were statistically higher than the control ones. Conclusions: The results showed that use of aspartame affected every structure suggesting nephrotoxicity. (**J Bras Nefrol 2006; 28(3):151-157**)

Keywords: kidney. Aspartame. Morphometry. Experimental study.

INTRODUÇÃO

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 mercado¹.

O aspartame ou éster metílico de N-alfa-aspartil-L-fenilalanina foi descoberto acidentalmente 1965, quando o químico norte-americano James Schlatter estava testando uma droga contra a úlcera, mas seu consumo só foi liberado pelo Food and Drug Administration (FDA)-órgão norte americano responsável em testar drogas,

Recebido em 19/04/06 / Aprovado em 26/06/06

Endereço para correspondência: 

Dra. Marielza Regina Ismael Martins
Rua dos Bombeiros, 255 – Vila Maria
15025-420, São José do Rio Preto, SP
E-mail: marielzamartins@bol.com.br; joaldm@terra.com.br

alimentos e cosméticos- em 1981 após a realização de diversos estudos toxicológicos²⁻⁴. No Brasil o livre comércio de dietéticos foi autorizado em 1988 e, na União Européia seu uso foi liberado em 1994^{5,6}.

Sua composição é 50% de fenilalanina (Phe), 40% de ácido aspártico (Asp) e 10% de metanol (sob a forma de éster)⁷.

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 sacarina⁸.

O período entre sua descoberta (1965) e sua aprovação (1981) foi de 17 anos. 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^{2,7}. Este período foi marcado por controvérsias a respeito de sua inocuidade, o que levou a pedidos de pesquisas toxicológicas, as quais ocorrem até hoje⁶.

A dose diária aceitável (ADI) é 50mg/Kg diário de peso nos Estados Unidos e, 40mg/Kg diário de peso na Europa e Brasil⁹.

Estudos em humanos e animais demonstram que o aspartame é metabolizado no trato gastrointestinal em três componentes: aminoácidos; ácido aspártico e fenilalanina; e metanol que são absorvidos pela circulação sistêmica^{10,11}. Para cada molécula de aspartame uma molécula de cada constituinte é produzida. Após a absorção elas são então metabolizadas e/ou excretadas pelo organismo seguindo os seguintes caminhos: o ácido aspártico é transformado em alanina, a fenilalanina é transformada principalmente em tirosina e, o metanol é transformado em formaldeído e então em ácido fórmico.

Vários estudos têm sido feito com animais de laboratório para verificar a toxicidade do aspartame¹¹⁻¹³. Recentemente um mega experimento utilizando 25.000 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 aceitável¹⁴.

Contrapondo estes resultados outros trabalhos¹⁵⁻¹⁷ 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 foi publicado nos últimos anos. Lennon e colaboradores¹⁸ 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.

Holder¹⁹ 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). Neste estudo Boenh relata que a quantidade de ácido aspártico produzida pelo aspartame aquecido em altas temperaturas (100°C) e pH neutro é elevada²⁰.

Diante do exposto urge uma reflexão crítica e coerente, considerando o conhecimento existente na literatura nacional e internacional cujo objetivo é o auxílio da toxicologia que é a ciência que define os limites de segurança de uma determinada substância cujos efeitos são ainda controversos. Além disso, não se conhece literatura sobre a participação renal na assimilação do aspartame, nem tampouco possíveis alterações morfológicas.

O nosso objetivo foi o de determinar morfológica e morfometricamente as alterações induzidas nos túbulos contorcidos proximais e distais, ductos coletores e glomérulos dos rins fetais dependentes da administração do aspartame diluído em água destilada à temperatura ambiente e diluído em água destilada aquecida a temperatura de 40 °C, em ratas grávidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e dieta

Foram utilizadas 15 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) pesando de 160 a 220g, provenientes de uma colônia mantida no Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), SP, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Para o grupo tratado com solução de aspartame à temperatura ambiente foram utilizadas 5 ratas, sendo o mesmo número (n=5) para o grupo controle (tratado com água *ad libitum* à temperatura ambiente) e 5 para o grupo tratado com solução de aspartame aquecida a 40°C. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Famerp.

Protocolo Básico

As fêmeas foram acasaladas com os machos da mesma linhagem na proporção de 1:4 durante a noite, e pela manhã, foram examinadas por esfregaço vaginal, o qual ao microscópio evidencia a presença de espermatozoides, determinando-se o 1º dia de prenhez.

Tratamento

Os animais foram expostos ao Aspartame nos 9º, 10º e 11º dias de prenhez, isto é durante a organogênese²¹ 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 por aproximadamente 10 minutos, 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 injetadas 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. No 20º dia de prenhez, os animais foram mortos 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 pesados em balança de precisão.

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 µm. Após este procedimento foram estabilizados com hematoxilina-eosina para capacitar o exame morfométrico.

Método Morfométrico

Para o estudo morfométrico a cariometria foi utilizada para avaliar os parâmetros nucleares que são: diâmetro maior, diâmetro menor, diâmetro médio, relação diâmetro maior/menor, volume, área, perímetro, relação de volume/área, os quais referem-se ao tamanho da estrutura analisada e, a excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células epiteliais das estruturas, no caso deste estudo, as renais, referem-se à forma. Esta técnica fornece como base de dados as imagens destes núcleos e, consiste em analisar os cortes das estruturas através de um microscópio óptico H500 Wetzlar Hund com objetiva de imersão (100x), com a câmera lúcida Leitz Wetzlar. Os núcleos são projetados sobre papel sulfite branco com aumento final de 1.240 vezes, e então contornados com lápis preto número dois sendo desenhadas 50 imagens elípticas nucleares obtidas de cada estrutura estudada (túbulos contorcidos proximal, distal e ducto coletor) perfazendo um total de 250 imagens por grupo. Para obtenção dos

diâmetros, é utilizada régua milimetrada medindo-se os eixos maior (D) e menor (d) dos núcleos. Após a determinação destes eixos (D e d) é utilizado um software desenvolvido no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (FORP-USP), obtendo-se os parâmetros nucleares de cada estrutura. Para estimar os parâmetros nucleares são aplicadas as seguintes fórmulas: Diâmetro médio: $M=(D+d)/2$; Perímetro: $P=(1/2) \cdot [3/2 \cdot (D+d) - M]$; Relação Diâmetro maior e menor: D/d ; Volume: $V=1/6 \cdot M^3$; Área: $A=1/4 \cdot M^2$; Relação volume/área: $V/A=3/2 \cdot M$; Coeficiente de forma: $F=4 \cdot A/1^2$; Índice de contorno: $I=1/A^{1/2}$; Excentricidade: $E=(D+d)^{1/2} \cdot (-d)^{1/2}/D$. A unidade de medida dos diâmetros utilizada é o micrômetro (µm), enquanto que para a área e o volume utiliza-se o micrômetro quadrado (µm²) e o micrômetro cúbico (µm³), respectivamente. Quanto ao glomérulo é analisado somente o volume, através do mesmo microscópio, mas com objetiva de 40 x, câmera lúcida Leitz Wetzlar e aumento final de 496 vezes. Os glomérulos são projetados em um papel sulfite branco e, com lápis número dois são desenhados. São obtidas 20 estruturas por animal, perfazendo um total de 100 estruturas de cada grupo.

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, seguida do Teste de Mann-Whitney quando se encontrou diferença significante ($p < 0,05$).

RESULTADOS

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 9º, 10º e 11º dia de prenhez da rata.

Na tabela 1 estão expressas as médias dos pesos corporais iniciais e finais (em gramas) das ratas do grupo

Tabela 1. Valores médios do peso corporal das ratas ao início e fim do estudo nos 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)	
	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

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.

Em relação ao peso corporal final dos fetos das ratas evidenciou-se diferença estatística entre os fetos do grupo controle (média=3,84g, p=0,004) e grupo tratado à temperatura ambiente (média =1,76g). Não houve diferença quanto ao grupo tratado com aspartame aquecido (média = 2,05g , p= 0,155).

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.

Na tabela 2 são expressos os valores dos volumes glomerulares dos rins dos fetos das ratas dos grupos controle, tratado com aspartame à temperatura ambiente e tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40 °C. Nota-se que o volume do grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40 °C estava significativamente maior que no grupo controle.

Nos túbulos contorcidos proximais os resultados correspondem aos parâmetros nucleares observados verificando que só não houve diferença estatística na relação diâmetro maior e menor e índice de contorno (Tabela 3).

Nos túbulos contorcidos distais houve diferença estatística nos parâmetros nucleares entre todos os grupos apresentando significativo aumento nos diâmetros, tamanhos e formas dos núcleos. Os ductos coletores mostraram alterações em alguns parâmetros como mostra (Tabela 5).

DISCUSSÃO

O presente trabalho enfoca um estudo de toxicidade do aspartame sobre os rins de fetos expostos na cavidade uterina pela sua administração às ratas durante a gestação.

A nefrotoxicidade foi avaliada por alterações nos parâmetros cariométricos dos epitélios tubulares renais dos coletores, proximais e distais²²⁻²³.

O estudo avaliou 4 estruturas renais após a administração de doses de aspartame diluído em água destilada com dosagem de 14mg/Kg diário de peso à temperatura ambiente e, à temperatura aquecida à 40°C, pela via orogástrica nos 9º, 10º e 11º dias de gestação das ratas.

O uso do aspartame durante o período gestacional, tal como utilizado neste estudo, tem sido pouco experimentado apesar do crescente uso. Comprovou-se que o mesmo atravessa a barreira placentária podendo causar

efeito nefrotóxico no feto^{14,16}. Administrado na rata, acumula-se no concepto aumentado com o desenvolvimento gestacional^{7,24}.

Sabe-se que qualquer substância, agente físico ou condições de deficiência presentes durante a vida embrionária ou fetal que possam produzir perturbações na sua estrutura e ou função são denominados teratogênicos e, são assim considerados por promoverem morte, reabsorção, malformações e redução do peso fetal^{8,13,24}.

Na pesquisa efetuada, a média do peso corporal final dos fetos das ratas foi de 3,84 gramas, enquanto encontrou-se média de 1,76 gramas no grupo tratado com aspartame à temperatura ambiente. Os dados sobre a diferença de pesos corporais nestes grupos foram considerados estatisticamente significantes.

Neste experimento as alterações morfológicas observadas sugerem que o aspartame atravessou a placenta causando dano fetal conforme os resultados apresentados.

Em relação à investigação de alterações morfológicas a cariometria vem sendo utilizada em pesquisas de diversas áreas. Esta técnica permite obter dados de interesse fisiológico e patológico e, possibilita efetuar correlações quantitativas entre estruturas e funções, quer normais ou alteradas²⁴. Pode-se ainda, por meio dela, coadjuvar o diagnóstico de alterações celulares^{22,23,25}.

Dados quantitativos foram obtidos por cariometria dos núcleos celulares e suas alterações durante o crescimento gestacional em exposição a agentes físicos e químicos e também nas doenças²⁶.

No rim, a morfometria tem sido utilizada para estudar lesões tubulares e intersticiais na diabete mellitus insulino-dependente²⁷ e nos carcinomas renais²⁸.

Valeu-se na presente pesquisa os dados obtidos com a medida dos diâmetros maiores e menores para realizar a morfometria. Aplicando-se a cariometria para estimar os volumes, áreas e perímetro dos mesmos, pode-se compor imagens exibindo os núcleos em formato de figura geométrica. Possibilitou ainda o cálculo da relação entre os diâmetros maiores e menores e entre o volume e a área.

Determinou-se também o formato estimado da figura nuclear dos túbulos renais mediante a utilização dos dados obtidos, demonstrando-se modificações ocorridas nestas estruturas pela administração do aspartame em ratas durante a gestação e avaliando-se o efeito nos fetos.

No que diz respeito aos rins avaliados neste trabalho, os dados evidenciaram que o maior dano ocorreu nos túbulos contorcidos proximais e distais e nos glomérulos apresentando modificações nos diâmetros maior e menor, excentricidade, coeficiente de forma nuclear e índices de

Tabela 2. Valores das medianas dos volumes nucleares dos glomérulos (μm^3) de fetos de ratos 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 interquartilica

Tabela 3. Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratos dos grupos controle, tratado à temperatura ambiente e tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C .

Parâmetro	Controle	Aspartame (temperatura ambiente)	Aspartame (Aquecido)	P
Diâmetro Maior	9,11 ± 1,55	9,65 ± 1,30	12,54 ± 1,56*	0,014*
Diâmetro Menor	7,66 ± 1,94	8,52 ± 0,14	8,44 ± 1,71	0,031*
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	20,5 ± 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*	0,031*
Coefficiente de forma	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,01	0,86 ± 0,20*	0,020*
Índice de Contorno	3,58 ± 0,06	3,56 ± 0,04	3,45 ± 1,05	0,153

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

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

Parâmetro	Controle	Aspartame (temperatura ambiente)	Aspartame (Aquecido)	P
Diâmetro Maior	7,15 ± 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
Coefficiente 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

Tabela 5. Valores das medianas dos parâmetros nucleares (n=50) das células dos ductos coletores de fetos de ratos dos grupos controle, tratado 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	9,15 ± 0,51*	12,89 ± 2,14*	0,006*
Diâmetro Menor	5,44 ± 1,26	7,42 ± 0,51*	8,97 ± 0,36*	0,006*
Diâmetro Médio	6,44 ± 1,44	8,39 ± 0,67*	10,53 ± 1,37*	0,006*
Relação D/d	1,45 ± 0,29	1,20 ± 0,13	1,55 ± 0,29	0,060
Volume	151 ± 115	332 ± 63*	589 ± 168*	0,006*
Área	33,5 ± 15,8	53,5 ± 10,3	93,0 ± 13,5*	0,006*
Perímetro	21,0 ± 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	0,37 ± 0,44	0,153
Coefficiente 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

contornos considerados todos, estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Estes achados mostraram evidências de mudanças na forma, com tendência ao arredondamento dos núcleos. A excentricidade de uma figura geométrica é considerada nula quando ela é uma circunferência²².

Tem-se estudado o grau de prejuízo induzido sobre os glomérulos para avaliar-se a relação dose - resposta entre a dose de aspartame e a prevalência de efeitos carcinogênicos¹⁴.

Na presente investigação, os glomérulos dos rins fetais de animais tratados com a substância à temperatura ambiente e aquecida a 40°C mostraram-se edemaciados quando comparados com essas mesmas estruturas do grupo controle. Os valores das medianas do grupo tratado com aspartame aquecido diluído à temperatura de 40°C foi estatisticamente significativa ($p=0,031$) comparados ao grupo controle. Estes dados evidenciam que os glomérulos dos fetos na cavidade uterina com aspartame foram danificados.

Em estudos com bebidas carbonatadas, como refrigerantes, mostram que o aspartame degrada-se em 3-carboximetil-6-benzil-2,5-dicetopiperazina (ciclo Asp-Phe) e em seus componentes aminoácídicos-Phe, -aspartil-fenilalanina, -aspartame, aspartil-l-fenilalanina, além de metanol. Quando estas bebidas são estocadas por 8 semanas a 20°C, persiste 84% a 89% do aspartame original adicionado, sendo que 3% a 4% são degradados em ciclo Asp-Phe. Se mantidas à 30°C pelo mesmo período, permanecem apenas 62% do adoçante original, sendo 12% convertidos em ciclo Asp-Phe. Apesar desta falta de estabilidade a agência norte-americana FDA garante sua segurança^{29,30}.

Boehm & Bada descreveram alterações na quebra da composição do aspartame em altas temperaturas que resultam em elevadas produções de ácido aspártico e fenilalanina²⁰.

Pesquisadores da Fundação Europeia Rammazinni de Ciências Experimentais em Câncer observaram em estudos experimentais os efeitos carcinogênicos do aspartame na pélvis renal e ureter e mostraram que o metanol é metabolizado em formaldeído em várias situações. Estes autores relatam que o uso diário de aspartame pode indicar calcificação e esta pode ter um importante papel na indução de hiperplasia papilar nas células epiteliais transitórias da pélvis renal e, conseqüentemente na indução de tumores celulares transitórios¹⁴.

Estes resultados são opostos aos encontrados por Ishi e colaboradores que não verificaram presença de carcinogenicidade nos seus estudos experimentais^{31,32}.

Não foram encontrados estudos com alterações morfométricas renais com a administração desta substância.

Os parâmetros cariométricos relacionados ao tamanho nuclear apresentaram significativo aumento nos grupos que receberam a substância, quando comparados ao grupo controle que receberam apenas o excipiente, sem princípio ativo: volume nuclear, área nuclear, perímetro nuclear, diâmetro maior, diâmetro médio e ainda a relação diâmetro maior / diâmetro menor e a relação volume / área nuclear. Os parâmetros nucleares que estão relacionados à forma do núcleo também apresentaram diferenças entre os grupos tratados e controle: coeficiente de forma, índice de contorno, excentricidade. É possível que os parâmetros cariométricos aumentados, nas células epiteliais das estruturas renais de fetos de ratas, possam representar alterações estruturais induzidas pelo aspartame e sinalizar a sua ação teratogênica nessas estruturas.

Tendo em vista o contexto apresentado, as alterações morfológicas e morfométricas causadas pela administração do aspartame são preocupantes, pois ainda são escassos os estudos quanto ao metabolismo pelos rins e os efeitos orgânicos desta substância à longo prazo.

REFERÊNCIAS

1. Pelaez V. A dinâmica econômica da inovação no campo dos edulcorantes sintéticos. *Cad. Cien Tecn* 1993; 10:93-117.
2. Roberts HJ. Aspartame as a cause of allergic reactions, including anaphylaxis. *Arch Intern Med* 1996; 13:156-67.
3. Opinion of the Scientific Committee on Food Update on the Safety of Aspartame, 2002 http://europa.eu.int/comm/food/fs/sci/out155_en.pdf.
4. 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; 28:385-99.
5. Garnier-Sagne I, Leblanc JC, Verger PH. Calculation of the intake of three Intense sweeteners in young insulin-dependent diabetics. *Toxicology* 2001; 39:745-9.
6. Toledo MC, Ioshi SH. Potential intake of intense sweeteners in Brazil. *Food Addit Cont* 1995; 12:799-808.
7. Gaull GE. Aspartame and seizures. *Lancet* 1985; 2:1431.
8. Burgert SL, Andersen DW, Stengik LD, Takeuchi H, Schedl HP. Metabolism of aspartame and its L-phenylalanine methyl ester decomposition product by the porcine gut. *Metabolism*. 1991; 40:612-8.
9. Butchkho HH, Stargel WW, Corner CP, Mayhew DA, Benninger C, Blackburn GN, et al. Intake of aspartame vs. acceptable daily intake. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002a; 35:S7-S12.
10. Hull JS. Sweet Poison - How the world's most popular artificial sweetener is harming us. *New Horizon Press*, London, 1999.
11. Trocho C, Pardo R, Rafecas I, Virgili J, Remesar X, Fernandez-Lopez JA and Alemany M. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci* 1998; 63:337-49.

12. Gurney JG, Pogoda JM, Holly EA, Hecht SS, Preston-Martin S. Aspartame consumption in relation to childhood brain tumour risk: results from a Oyama Y, case control St casecontrol Study. **J Nat Cancer Inst** 2002; 89:1072.
13. 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; 18:43-50.
14. 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; N.3, Vol.14.
15. LaBuda CJ, Hale RL. Anxiety in mice following acute aspartame and methanol exposure. **Alcohol** 2000; 20: 69-74.
16. Goerss AL, Wagner GC, Hill WL. Acute effects of aspartame on aggression and neurochemistry of rats. **Life Sciences** 2000; 67:1325-9.
17. Trefz F, de Sonneville L, Matthis P, Benninger C, Lanz-Englert B and Bickel H. Neuropsychological and biochemical investigations in heterozygotes for phenylketonuria during ingestion of high dose aspartame (a sweetener containing phenylalanine). **Hum Genet** 1994. 93:369-74.
18. Lennon HD, Metcalf LE, Mares SE, Smith JH, Nutting EF., Saunders FJ. Biological properties of aspartame. Effects on reproduction and lactation. **J Environ Pathol Toxicology** 1980; 3:375-86.
19. Holder MD. Effects of perinatal exposure to aspartame on rats pups. **Neurotoxicol Teratol** 1989; 11:1-6.
20. Boehm MF & Bada JL. Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100°C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1984; 81: 5263-6.
21. 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
22. Sala MA, Matheus M, Valeri V. Estimation of the average diameter of human placental villi by a stereological method. **Microsc. Acta** 1980; 82:339-42.
23. Chalkley HW, Corneld J, Park H. A method for estimating volume surface ratios. **Science** 1949; 110:295-7.
24. Garcia A, Azoubel R. A placenta humana. **Livraria Ateneu**, 1986.
25. Tassinari MS, Long SY. Normal and abnormal midfacial developmenmt in the cadmium-treated hamster. **Teratology** 1982; 25:110-3.
26. Paschoal VD. Efeitos da ofloxacina no desenvolvimento dos testículos de ratos:estudo cariométrico[Tese]. **FAMERP** 2003.
27. Ueno M, Kawashima S, Shimada H, Karasawa R, Suzuki Y et al. Túbulo intersticial lesions in non-insulin dependent diabets mellitus. **Kid Int** 1997; 63(Supl):S191-S194.
28. Barth PJ, Sibel A, Gerhez E. Nuclear morphometry of renal carcinomas. **Gen Diagn Pathol** 1995;141:29-33.
29. _____. Aspartame: uma doçura amarga? **Rev Ciência Hoje** 2001; 30:175-7.
30. Pierlgorsh WW, Bailer AJ. Chapman and Hall, London, **Statistics for Environmental Biology and toxicology** 1997; Section 6.3.2
31. Ishi H. Incidency of brain tummsors in rats fed aspartame. **Toxicol Lett** 1981; 7:423-37.
32. 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; 21:91-4.