



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ADEMIR BARIANNI RODERO

**Efeito da Sucralose no Rim Fetal de Ratos:
Estudo Morfométrico**

São José do Rio Preto

2010

Ademir Barianni Rodero

**Efeito da Sucralose no Rim Fetal de Ratos:
Estudo Morfométrico**

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 Interna.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

São José do Rio Preto

2010

Rodero, Ademir Barianni

Efeitos da Sucralose no Rim Fetal de Ratos: Estudo Morfométrico / Ademir Barianni Rodero;
São José do Rio Preto, 2010
100 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

1. Educorantes; 2. Sucralose; 3. Placenta; 4. Cariometria;
5. Rim.

Ademir Barianni Rodero

Efeito da Sucralose no Rim Fetal de Ratos:
Estudo Morfométrico

BANCA EXAMINADORA
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR

Presidente e Orientador: Reinaldo Azoubel

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

4º Examinador: _____

5º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, ____/____/____

SUMÁRIO

<i>Dedicatória</i>	i
<i>Agradecimentos Especiais</i>	iii
<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Epígrafe</i>	vii
<i>Lista de Figuras</i>	viii
<i>Lista de Quadros e Tabelas</i>	ix
<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	xii
<i>Resumo</i>	xiii
<i>Abstract</i>	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos.....	22
2. MATERIAL E MÉTODO	24
2.1. Características e condições dos animais.....	24
2.2. Determinação do 1º dia de prenhez da rata.....	25
2.3. Tratamento	25
2.4. Técnica de dissecação e pesagem.....	26
2.5. Técnica histológica	27
2.6. Técnica morfométrica.....	28
2.7. Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS	32
3.1. Resultados morfológicos	32
3.1.1. Peso fetal.....	32
3.2.1. Peso das placentas.....	33
3.1.3. Comprimento do cordão umbilical.....	34
3.2. Resultados cariométricos	36
3.2.1. Glomérulo	36
3.2.2. Túbulo contorcido proximal.....	37
3.2.3. Túbulo contorcido distal	41
3.2.4. Ducto coletor.....	46
4. DISCUSSÃO	51
4.1. O animal de experimentação.....	51

4.2. Método (morfometria e estatística).....	52
4.3. Placenta, peso fetal e cordão umbilical.....	56
4.3.1 Placenta e peso fetal.....	56
4.3.2. Cordão umbilical.....	60
4.5. Rim fetal.....	63
4.5.1. Glomérulo	66
4.5.2. Túbulo renais.....	67
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
7. APÊNDICE	100

Dedicatória

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Gandhi

A toda minha família, base de todo meu equilíbrio, zelosa de meu bem-estar físico e espiritual, obrigado por seu apoio, sua proximidade e sua preocupação. Todos esses elementos juntos determinaram um final feliz em nossas vidas. Agradeço o apoio, o afeto, o reconhecimento e a compreensão por tantos momentos de ausência.

À Maria Aparecida “MIMI”, esposa, amiga e maior incentivadora dessa jornada, que soube adiar seus anseios em favor dos meus nesse novo desafio em minha vida acadêmica. Eterna companheira de todos os momentos, doando-se com imensa ternura e carinho, que lhe é peculiar. Que Deus a compense dessa sua bondade.

A meus filhos, David e Lucas, apoiadores de meus ideais, hoje médicos, e que tanto estimularam e ajudaram essa nova meta de seu pai, em cujo caminho surgiram enormes dificuldades por meus muitos afazeres. Agradeço a vocês, que, muitas vezes, deixaram de lado seus estudos, trabalhos e até seus lazeres para me ajudarem nas pesquisas, correção de textos, tradução, entre outras... e, muitas vezes, dando apoio naquelas horas de desespero pelas minhas muitas atividades profissionais. Sei que entenderam esse meu momento.

A minha mãe e meu pai (*“in memoriam”*), a quem devo a vida, além de minha formação moral. Com suas humildades e simplicidades que lhes são peculiares, souberam entender minha ausência. Meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão, sempre compensadas por palavras de apoio, carinho e incentivo. A amizade, apoio e o amor de todos vocês foram fundamentais. Obrigado.

Agradecimentos Especiais

“As melhores e as mais lindas coisas do mundo não
se podem ver nem tocar
elas devem ser sentidas com o coração
“a persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

Ao Prof. Dr. Reinaldo Azoubel e Prof^a. Lina, obrigado por suas amizades e convivência próxima e harmoniosa, por seu jeito sereno e simples de ser, que cativa a todos. Sinto um enorme orgulho de tê-lo como amigo e orientador. Obrigado por sua disponibilidade sempre para orientações, apoio e incentivo em todos os momentos da realização deste trabalho; agradeço a confiança em mim depositada, para que esta tese pudesse acontecer. Sou grato aos ensinamentos de vida e científicos transmitidos. Agradeço a oportunidade que me foi dada. Espero corresponder aos seus anseios de colega, amigo e orientado para sempre. Obrigado por despertar em minha pessoa o pesquisador que estava adormecido.

Ao Prof. Dr. Fernando Batigália, amigo e incentivador de meu ingresso na Pós-graduação da FAMERP, que acreditou no meu potencial, me apadrinhou, facilitando sobremaneira minha aceitação. Obrigado por sua disponibilidade a todo o momento, além de suas palavras de incentivo e de estímulo à perfeição. Agradeço sua generosidade, preocupação e tolerância em compartilhar seus ensinamentos e suas capacidades comigo. Honrarei seu nome e sua confiança.

Ao Prof. Dr. Alex Tadeu Martins meus agradecimentos por ampliar o meu campo de visão, abrindo as portas, oferecendo sua amizade desinteressada para que eu desse mais este passo na vida acadêmica. Sempre acreditou que iria dar certo, me incentivando a correr atrás dos meus ideais, disposto a ajudar a qualquer momento.

À Pós-graduação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, agradeço a todos de sua diretoria, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Domingo Marcolino Braille, a oportunidade de frequentar este curso, organizado com tamanha competência, habilidade e seriedade. Ele, certamente, propiciará a busca do conhecimento necessário, possibilitando a estruturação de minha tese e, desse modo, contribuir com as ciências.

À Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), em particular ao Magnífico Reitor Prof. Dr. Gilberto de Moraes Selber, à Pró-Reitora e Prof^a. MSc. Ana Maria de Matos Rettl, ao Pró-Reitor de Pós-graduação e Pesquisa Prof. Dr. Adalberto Vasquez e ao Coordenador Geral do Campus Fernandópolis, Prof. Amauri Piratininga, agradeço a todos com minha eterna amizade. Além dos dirigentes da Universidade, meus respeitos aos docentes, pois, em muitos momentos, alguém trabalhou dobrado para que eu pudesse frequentar a Pós-graduação, realizar o experimento e preparar a tese. A todos vocês, minha profunda gratidão.

Agradecimentos

Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolvermos em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos.

Sócrates

Ao Prof. Dr. Marcelo Alexandre de Matos, pela sua amizade a mim dispensada durante toda a Pós-graduação e que se perpetuou para sempre. Você é uma pessoa especial. Sua colaboração, assim como seu estímulo, foram de grande valia. Deus o proteja.

Ao Sr. Onivaldo Bizzutti, técnico do laboratório de Fisiologia e Farmacologia da FAMERP, pessoa incansável na estruturação da parte prática do experimento, além de valoroso amigo. Sempre disposto a ajudar, independentemente do dia, hora e momento.

Ao Prof. Dr. João Armando Padovani, por sua amizade, incentivo, conselhos e apoio constantes.

À Prof^a. Patrícia Maluf Cury, pela sua liderança, seu carinho e apoio, nas nossas quartas-feiras, com o invejável grupo de estudo. Sempre presente na elucidação das dificuldades.

Ao Prof. MSc. Roberto Racanhicci, incansável amigo de todas as horas, responsável pela ajuda na realização da estatística do experimento, assim como na tabulação dos resultados. Seu apoio foi fundamental no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram à execução e conclusão desta tese

Aos Auditores da DRS XII, Silvio Antonio Coelho, Vera Helena de Almeida Gama, José Luiz Bassan Faria, Valter Negrelli Júnior, Lourival Tomé de Faria e Simone Rosa de Souza, que souberam, com paciência, tolerar muitas vezes, minha ausência nas minhas auditorias, ficando, desse modo, sobrecarregados, porém, nunca deixando de incentivar e dar apoio constante.

Aos funcionários e amigos da Pós-graduação, Luis Antonio Oliveira Ferreira, Bruno Augusto de Oliveira Barretto, José Antonio Silistino, Fabiana Cristina Godoy, Rosemeire Cleide Souza Desidério e Guilherme Martins Dias, que, além da amizade sincera, também estiveram sempre dispostos a apoiar nas dificuldades encontradas.

Às Prof^ª. Dra. Alba Regina de Abreu Lima Catelani, Prof^ª. Dra. Ilda Stefani Ribeiro Marta e Prof^ª. Dr. Patrícia de Fátima Lopes de Andrade, que, além de suas amizades, me encorajaram e auxiliaram nas minhas dificuldades e incertezas.

Epígrafe

"Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.

A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância."

Hipócrates (460 - 377 a.C.)

Lista de Figuras

- Figura 1** Estruturas químicas: A - sucralose ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$) e B – sucrose (sacarose - $C_{12}H_{22}O_{11}$).....6
- Figura 2** Estrutura química dos produtos da hidrólise da sucralose: A - 4-CG e B - 1,6- DCF.....7
- Figura 3** Representação esquemática do corpúsculo renal.....15
- Figura 4** Representação esquemática do epitélio (cúbico simples) do túbulo proximal – parte convoluta e reta.16
- Figura 5** Representação esquemática do epitélio (cúbico) do túbulo distal: parte convoluta.....18
- Figura 6** Representação esquemática das células do epitélio cúbico: ducto coletor.19

Lista de Quadros e Tabelas

- Quadro 1.** Porcentagem de pessoas do sexo masculino e feminino com sobrepeso (IMC > 25 kg/m²) e obesidade (IMC > 30 Kg/m²) em 2005 e estimativas da população para 2010 3
- Tabela 1** Valores médios de peso corporal (gramas) de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose (30 mg/kg peso dia). Teste estatístico de Mann-Whitney.....33
- Tabela 2** Valores médios do peso das placentas (gramas) fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste estatístico de Mann-Whitney.....34
- Tabela 3** Valores médios dos comprimentos dos cordões umbilicais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney35
- Tabela 4** Valores médios do parâmetro: volume dos glomérulos de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney36
- Tabela 5** Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.....38
- Tabela 6** Valores médios da relação D/d e perímetro médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controles e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.....39
- Tabela 7** Valores médios dos parâmetros: área, volume e relação volume/área dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas (T) com sucralose. Teste de Mann-Whitney40

- Tabela 8** Valores médios dos parâmetros: excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste: Mann-Whitney41
- Tabela 9** Valores médios dos diâmetros maior, diâmetro menor (μm) e diâmetro médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos distais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney42
- Tabela 10** Valores médios da relação D/d e perímetro médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos distal de fetos de ratas controles e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney43
- Tabela 11** Valores médios dos parâmetros: área, volume e relação volume/área dos núcleos dos túbulos contorcidos distais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.....44
- Tabela 12** Valores médios dos parâmetros: excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney45
- Tabela 13** Valores médios do diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro médio dos núcleos do epitélio dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.....46
- Tabela 14** Valores médios da relação D/d e perímetro médio dos núcleos do epitélio dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.....47
- Tabela 15** Valores médios dos parâmetros: área, volume e relação volume/área dos núcleos dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.48

Tabela 16 Valores médios dos parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.....	49
---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABIAD	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos
WHO	World Health Organization
IMC	Índice de Massa Corpórea
OMS	Organização Mundial de Saúde
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FDA	Food and Drugs Administration
IDA	Índice Diário Aceitável
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
4-CG	4-chloro-4-deoxy-D-galactose
1,6-DCG	1,6-dichloro-1-6-dideoxy-D-fructose
$C_{12}H_{22}O$	Sucrose
$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$	Sucralose

Resumo

Introdução: O aumento da população com sobrepeso tem elevado os riscos para doenças como *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica e câncer de endométrio, mama ou intestino. Na procura por alternativas para emagrecer, o consumo de edulcorantes tem-se mostrado preocupante, em virtude de seu uso indiscriminado, em diabéticos e principalmente por mulheres em idade reprodutiva. A sucralose é um edulcorante descoberto recentemente, derivado da sacarose com cloração de 3 radicais hidroxílicos. **Justificativa:** Estudos experimentais com sucralose e seus produtos de hidrólise, por meio de diversas vias de administração e doses, demonstraram alterações clínicas e histopatológicas nos sistemas digestório, imune e nervoso, bem como em baço e glândulas suprarrenais, e comprovada toxicidade materno-fetal. **Objetivo:** Determinar as alterações morfométricas induzidas pela sucralose no rim de fetos durante o período gestacional, bem como repercussões morfológicas nos pesos placentário e fetal e no comprimento do cordão umbilical. **Material e Métodos:** Sucralose foi administrada via gavagem (30 mg/kg de peso/dia), do 10^o ao 14^o dia de prenhez em 5 ratas (grupo tratado), e mesmo volume de solução salina em 5 ratas pela mesma via (grupo controle). No vigésimo dia de prenhez, todos os animais foram sacrificados para pesagem, com retirada dos rins fetais e análise do peso da placenta e do comprimento do cordão umbilical. Avaliaram-se o volume dos glomérulos e a morfometria dos núcleos das células dos túbulos contorcido proximal e distal e túbulo coletor, com determinação dos diâmetros maior, menor e médio; relação diâmetro maior/menor, perímetro, volume, área, relação área/volume; excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno. **Resultados:** O peso fetal e o comprimento do cordão umbilical do grupo

tratado foram significativamente menores em relação ao grupo controle (valor: $p < 0,01$), embora sem significância estatística em relação ao peso da placenta. A média aritmética dos volumes dos glomérulos não apresentou diferença estatística significativa. Nos túbulos proximais, todos os parâmetros cariométricos do grupo tratado foram significativamente maiores em relação ao grupo controle (valor: $p < 0,01$). Nos túbulos distais, houve aumento na maioria dos parâmetros cariométricos, com significância estatística, no grupo tratado em relação ao grupo controle, exceto para relação diâmetro maior/menor, excentricidade e índice de contorno. Não houve significância estatística na comparação entre ambos os grupos para os parâmetros cariométricos das células dos túbulos coletores. **Conclusões:** Sucralose causa redução do peso fetal e no comprimento do cordão umbilical. Nos rins fetais, ocasiona alterações significativas em diversos parâmetros nucleares das células do túbulo contorcido proximal e distal, o que sugere passagem de sucralose pela membrana placentária e riscos de nefrotoxicidade.

Palavras-chave: 1. Edulcorantes; 2. Sucralose; 3. Placenta; 4. Cariometria; 5. Rim.

Abstract

Introduction: The increase of overweight people has amplified the risks for diseases like *diabetes mellitus*, systemic hypertension and endometrial cancer, breast or intestine. In searching for alternatives to lose weight, consumption of sweeteners has proved worrisome because of their indiscriminate use, especially in diabetics and women of reproductive age. Sucralose is a sweetener discovered recently, derived from the chlorination of sucrose to 3 hydroxyl radicals. **Justificative:** Experimental studies with sucralose and its hydrolysis products, through various routes of administration and doses, showed clinical and histopathological changes in the digestive, immune and nervous systems, as well as in spleen and adrenal glands, and proven maternal and fetal toxicity. **Objective:** To determine the histological changes induced by sucralose in the kidney of fetuses during pregnancy, as well as morphological effects on fetal and placental weights and the length of the umbilical cord. **Material and Methods:** Sucralose was administered by gavage (30 mg/kg to weight / day), from the 10th up to the 14th day of pregnancy in five rats (treated group), and the same volume of saline solution in five rats by the same route (control group). On the twentieth day of pregnancy, all animals were sacrificed and weighed, with removal of the fetal kidneys and analysis of the fetal weight, placenta weight and umbilical cord length. They were evaluated the volume of glomeruli and morphometry of the nuclei of cells of proximal and distal convoluted tubules and collecting duct, determining the major, minor and mean diameter; ratio between major diameter and minor diameter, perimeter, volume, area, relation volume/area; eccentricity, coefficient of form and index of contour. **Results:** The fetal weight and length of the umbilical cord of the treated group were significantly lower in the control

group (value: $p < 0.01$), although not statistically significant compared to the weight of the placenta. The arithmetic mean of the volumes of glomeruli showed no statistically significant difference. In proximal tubules, all karyometric parameters of the treated group were significantly higher in relation to the control group (value – $p < 0.01$). Distal tubules showed an increase in the most karyometric parameters, with statistical significance in the treated group when compared to the control group, except for major/minor diameter ratio, eccentricity and contour index. There was no statistical significance when comparing both groups for the karyometric parameters of the cells of collecting tubules. **Conclusions:** Sucralose causes reduction of fetal weight and length of the umbilical cord. In fetal kidney, it causes significant changes in various nuclear parameters of cells of the proximal and distal convoluted tubule, suggesting transit of sucralose through the placental membrane and risks of nephrotoxicity.

Keywords: 1. Edulcorantes; 2. Sucralose, 3. Placenta; 4. Kariometry; 5. Kidney.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Com o ritmo agitado do dia a dia e o aumento do consumo de alimentos, cresce rapidamente o número de pessoas obesas, diabéticas, hipertensas e com problemas cardiovasculares. ⁽¹⁾

Bebidas e alimentos industrializados cresceram ao gosto da população, refrigerantes e cervejas tiveram seu consumo triplicado, em detrimento de consumo de frutas frescas e sucos naturais. ⁽²⁾

A obesidade é uma doença complexa e multifatorial de regulação do apetite e do metabolismo energético, envolvendo genética, fisiologia e bioquímica. A sua etiologia é complexa e relacionada ao estilo de vida, hereditariedade, hábitos, desordens fisiológicas e fatores ambientais, culturais, sociais e econômicos. Constitui um risco associado a um grande número de doenças, dentre elas, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, diabetes, disfunções respiratórias, algumas formas de câncer de endométrio, ovário, mama e intestino. ⁽³⁾

Em razão desses riscos, é consenso mundial que o excesso de peso precisa de tratamento, pois tal excesso não deve ser visto apenas como uma questão estética, mas como uma doença e/ou um agravante. ⁽⁴⁾

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2005, a população mundial com sobrepeso era de 1.6 bilhões e a de obesos de 400 milhões; estimativas predizem que, em 2015, será de 2.3 bilhões de sobrepeso e 700 milhões de obesos. ⁽⁴⁾

Quadro 1. Porcentagem de pessoas do sexo masculino e feminino com sobrepeso (IMC > 25 kg/m²) e obesidade (IMC > 30 Kg/m²) em 2005 e estimativas da população para 2010

IMC	Sexo	Brasil		EUA	
		2005	2010	2005	2010
Sobrepeso >25 Kg/m ²	M	38,7%	41,6%	39,1%	36,3%
	F	35,2%	35,8%	30,8%	28,4%
Obeso >30 Kg/m ²	M	8,7%	12,4%	36,5%	44,2%
	F	18,3%	24,5%	41,8%	48,3%

Fonte: WHO.⁽⁴⁾

A WHO estima que, em 2015, a população de obesos do sexo masculino no Brasil estará entre 15 a 29,9 % e do sexo feminino entre 30 a 44,9%, portanto não é só a população brasileira que está engordando; o planeta todo passa por esse problema. Nos Estados Unidos a previsão é que a população de obesos do sexo masculino e feminino seja maior que 45%.⁽⁴⁾

Como vimos, dados recentes e estimativas da World Health Organization mostram um crescimento importante, e classificam o problema do excesso de peso como epidemia mundial.⁽⁴⁾

Nesse cenário, existe uma preocupação crescente de as pessoas praticarem dietas saudáveis, ricas nutricionalmente, porém, com baixo teor calórico e redução de açúcares.⁽¹⁾

A indústria de alimentos, atenta a esse novo do mercado consumidor, vem desenvolvendo produtos e tecnologias para produção de alimentos de baixas

calorias, mediante substituição do açúcar por edulcorantes e/ou redução no seu teor de gorduras.⁽⁵⁾

Segundo a legislação brasileira, o termo *diet*, estampado em alimentos ou bebida, possui sentido amplo, não se aplicando apenas a alimentos isentos de açúcar ou de baixas calorias. São considerados dietéticos alimentos para dietas de restrição de açúcares, gorduras, colesterol, sódio e aminoácidos ou proteínas, alimentos para dietas de controle de peso e para dietas enterais.⁽⁵⁾

Os produtos *light*, segundo portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, são caracterizados por redução de pelo menos 25% do valor calórico de determinado nutriente e/ou calorias em relação ao alimento tradicional, por substituição ou redução de alguns componentes.⁽⁶⁾ Sabe-se que a energia total dos alimentos é obtida através da determinação dos valores do teor de proteínas, lipídios, carboidratos e etanol, e esse somatório fornece o valor calórico do total do alimento. Desse modo, a redução ou substituição de um dos nutrientes fornece diminuição do valor calórico total dos alimentos.⁽⁵⁾

Segundo dados da Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (2003), o mercado *diet/light* vem crescendo cada vez mais. A divulgação desses produtos traz embutida a presença de corpo bonito e, sobretudo saudável, indo de encontro aos apelos da sociedade, guiada por parâmetros de beleza. A presença da inscrição *diet* ou *light* no rótulo lembra o conceito de saúde.⁽²⁾

A venda desses produtos avança sem restrição, conquistando cada vez maior número de pessoas interessadas em usar o mais doce do açúcar, sem o ônus de engordar. Esse mercado registrou, em 1998, um faturamento de 1 bilhão de dólares; em 2003, 2,3 bilhões de dólares e em 2005, 7 bilhões de dólares. No Brasil, esses produtos representam 3 a 5% dos alimentos industrializados vendidos.⁽²⁾

Em consequência de um início de conscientização da população sobre os riscos das doenças ocasionadas pelo sobrepeso e obesidade, além dos frequentes apelos a favor da qualidade de vida através da alimentação adequada e não calórica e da ideal obtenção de um corpo com formas perfeitas, os consumidores buscam mudanças nos hábitos de vida, alimentação balanceada e produtos que possam auxiliar nesses objetivos. Como consequência, houve aceleração do uso das dietas *light/diet* e, junto com estas, dos adoçantes. Inúmeros edulcorantes já existem no mercado, quer puros ou associados, para se adequarem aos gostos e sabores da população.⁽²⁾

Os primeiros adoçantes desenvolvidos apresentavam alguma limitação técnica, como sabor amargo ou residual, pouca resistência a altas temperaturas, baixa estabilidade em solução e pH ácido, baixa solubilidade, perfil de sabor e duração do estímulo e dulçor diferentes do açúcar, e alguma resistência das pessoas por dúvidas quanto à segurança e toxicidade.⁽¹⁾

Vários novos edulcorantes estão surgindo, sendo a sucralose um dos mais recentes. A descoberta da sucralose permitiu solucionar a maioria dos problemas anteriormente existentes.⁽¹⁾

A sucralose foi descoberta acidentalmente em 1976 por Shashikant Phadnis, estudante com graduação internacional no King's College. Phadnis fazia parte de uma equipe com pesquisadores do Queen Elizabeth College, da Universidade de Londres, que buscavam sintetizar açúcares halogenados. Durante parte do experimento, por dificuldade de interpretação de inglês, executou mal uma tarefa, clorando o açúcar e experimentando-o.⁽⁷⁾

Os cientistas Leslie Hough e Khan, continuaram avaliando os diferentes efeitos adoçantes dos derivados da sacarose, quando esta se encontrava ligada a determinados halogênios.⁽⁸⁾

No entanto, o edulcorante sucralose obtido a partir da sacarose, e composta de 1 molécula de glicose associada a outra molécula de frutose, onde se substituem três grupos hidroxílicos, da posição 4, 1 e 6 da sua molécula, por 3 átomos de cloro, formando o composto de 4,1',6' triclorigalactosacarose, também conhecido como 1,6 - dichloro - 1,6 - dideoxy - β - D - fructofuranosyl - 4 - chloro - 4 - deoxy - α - D - galactopyranosídeo, resultando uma molécula de massa molecular 397,61 g/mol. Muitas vezes, é utilizada a nomenclatura química abreviada de 4,1', 6'-triclorigalactosacarose ou 4,1', 6' - triclouro - 4,1', 6'-trideoxi-galacto-sacarose.^(9,10) O termo galactosucrose foi proposto em 1989 para identificar esse derivado de sacarose. Desde essa data, o uso desse composto se mostra promissor e ficou conhecido com o nome de sucralose.⁽⁹⁾

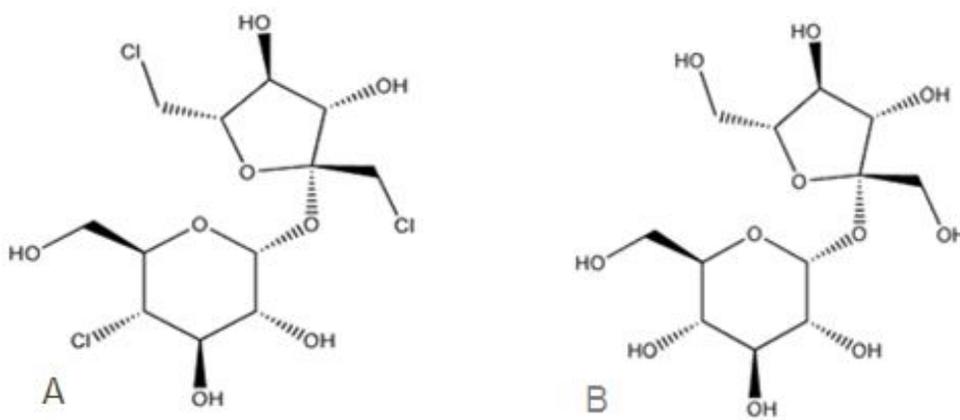


Figura 1. Estruturas químicas: A - sucralose ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$) e B - sucrose (sacarose - $C_{12}H_{22}O_{11}$).⁽¹⁰⁾

Estudos indicam a existência de dois produtos de hidrólise da sucralose: o 4-CG (4-chloro 4-deoxy D-galactose) e 1,6-DCF (1,6-dichloro-1-6-dideoxy-D-fructose).⁽¹⁰⁾ Tais produtos são mais rapidamente absorvidos na administração oral que o composto sucralose de origem. O produto de hidrólise 4 -CG é excretado de forma intacta, essencialmente na urina, enquanto 1,6-DCF segue dois caminhos metabólicos principais: redução para 1,6 dichloromannitol, excretado rapidamente e de forma inalterada na urina, ou conjugado com glutathione.⁽¹¹⁾

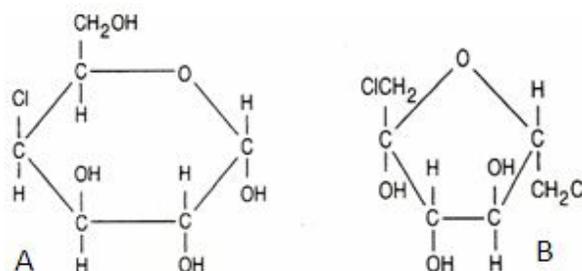


Figura 2. Estrutura química dos produtos da hidrólise da sucralose: A - 4- CG e B - 1,6 - DCF.¹⁰⁾

O consumo da sucralose vem aumentando em razão das características desse adoçante: não calórico, insípido, estável em altas temperaturas e em meio ácido, não é hidrolisado mesmo durante a digestão ou em seu metabolismo, pela extrema estabilidade de suas ligações carbono-cloro^(12,13) ser hidrófilo, com percentual de solubilidade de 25%.⁽¹¹⁾ Segundo Binns⁽¹²⁾, apresenta importante característica, ao não interagir quimicamente com outros alimentos, sendo estável na presença de etanol, podendo ser armazenada, por mais de um ano, mantendo 99% do sabor original. Ainda preserva suas características, mesmo durante pasteurização, esterilização e cozimento a altas temperaturas.⁽⁹⁾

Outra característica da sucralose é a não interferência na utilização e absorção de glicose, metabolismo de carboidratos e secreção de insulina. Portanto, é uma substância segura, podendo ser ingerida por pacientes com diabetes⁽¹⁾, não estimulando secreção de insulina, nem reduzindo a concentração de glicose no plasma⁽⁵⁾. Além disso, estudos clínicos concluíram que a sucralose não é acidogênica nem não cariogênica.⁽¹⁴⁾

No início de 1998, o Food and Drug Administration (FDA), após avaliar 110 estudos em animais e humanos, aprovou a sucralose como aditivo alimentar em 15 variedades de alimentos e bebidas.⁽¹⁵⁾ Em 1999, essa aprovação foi estendida podendo ser utilizada como edulcorante de uso geral em todos os alimentos, bebidas convencionais, suplementos vitamínicos dietéticos, dietas médicas, assim como alimentos cozidos e assados.^(16,17)

Baseada em suas propriedades térmicas, estabilidade em amplas variações de pH, não interação química com os ingredientes e solubilidade, a sucralose pode ser usada como adoçante de mesa em formulações secas (para refrescos e sobremesas instantâneas), em aromatizantes, conservantes, temperos, molhos prontos, compotas, xaropes, panificados, sobremesas lácteas, vegetais enlatados, produtos pasteurizados e outros alimentos.^(1, 18) Atualmente, segundo MacNeil, seu uso é permitido em mais de 80 países estando presente em mais de três mil produtos.⁽¹⁷⁾ No Brasil, está presente na formulação de mais de 500 produtos. No mundo, é consumida por milhares de pessoas diariamente.⁽²⁾

Em relação à sua farmacodinâmica, no ser humano, a administração oral de sucralose, na razão 1 mg/kg peso/dia, mostra que o tubo digestivo é a maior rota de eliminação, com a média de 78,3% (69,4% a 89,6%), enquanto a urina elimina a média de 14,5% (8,9 a 21,8%) dessa dose. Estudos indicam que a meia-vida da

sucralose. No ser humano é de 13 horas.⁽¹¹⁾, sendo as variações dependentes das diferenças individuais de absorção e excreção. Mesmo com administração em altas doses, não houve aumento correspondente na média da eliminação urinária, sugerindo possibilidade de redução na absorção de sucralose.⁽¹⁹⁾

Quando a sucralose é administrada em ratos, via endovenosa, na dose de 2 a 20 mg/kg de peso, sua excreção faz-se aproximadamente 80% pela urina e 9% a 16% pelas fezes; no entanto, quando administrada por via oral na dose de 10-1000 mg/kg, a excreção urinária é menor que 5%, mostrando que a sucralose é pouco absorvida no trato intestinal, sendo quase inteiramente excretada de modo inalterado pelas fezes, de maneira rápida, nas primeiras 24 horas, independentemente da dose e sexo dos animais.⁽²⁰⁾

John et al.⁽²¹⁾, detectaram, em coelhas não prenhas, com administração oral, excreção de sucralose em 22% na urina e 55% nas fezes. Nas coelhas prenhas a excreção foi de 22% na urina e 65% através do trato gastrointestinal.

Em outros estudos, os mesmos autores⁽²²⁾ investigaram a excreção e metabolismo da sucralose em camundongos, utilizando a administração oral e endovenosa: com a via endovenosa de 20 mg/kg peso/dia, a excreção preferencial foi a via urinária, com 70% nas primeiras 24 horas e 12% através das fezes, indicando alguma excreção através da bile ou outra área intestinal, talvez por outro mecanismo. Com administração oral, na dose de 1000, 1500 e 3000 mg/kg peso/dia, a eliminação ocorreu através da urina, respectivamente na média de 23%, 15% e 16%, indicando que 20% a 30% da dose oral foi absorvida. Esse estudo mostrou que, mesmo com o aumento da administração de sucralose, não existe aumento correspondente da absorção e conseqüente eliminação renal. A sucralose foi excretada de maneira inalterada e representou mais que 80% a 90% na urina e fezes.

Na administração oral em cães, a sucralose foi rapidamente absorvida, com excreção urinária na forma inativa, estando presente o ácido glicurônico conjugado com sucralose, em doses pequenas, na proporção de 2% a 8% da dose administrada. Na administração endovenosa, ocorreu predomínio de excreção urinária inalterada da sucralose, sendo detectado o ácido glicurônico, conjugado com sucralose, em 15% a 20% da dose administrada.⁽²³⁾

Segundo alguns estudos^(19,24), o perfil de eliminação em humanos é semelhante ao encontrado em ratos, cães e camundongos; porém a excreção urinária no rato é metade da encontrada no homem, enquanto a eliminação pelas fezes é mais alta nestes animais. Concluiu-se, por estudos farmacocinéticos, que 85% da sucralose não é absorvida, sendo excretada intacta nas fezes, e os limites de absorção por difusão passiva de aproximadamente 15% da dose consumida.⁽¹⁷⁾

A revisão de Grice e Goldsmith⁽¹¹⁾ demonstrou que, em animais tratados com mistura equimolar de produtos hidrolisados da sucralose, por 6 meses, embora ocorresse um aumento focal na incidência de células claras no fígado, não foram verificadas evidências significativas da progressão dessa lesão para neoplasia, quando comparado com o grupo controle. Estudos com sucralose e seus produtos de hidrólise, mostraram diminuição do número de linfócitos, em cães tratados, sem significância estatística. Em ratos, as alterações com 2,5% e 5% de sucralose não são de toxicidade e seriam secundárias à diminuição do consumo alimentar por decréscimo da palatabilidade. Estudos em ratas indicaram um efeito adverso da sucralose no sistema imune, com diminuição do número de linfócitos e leucócitos..

Fin e Lord⁽²⁵⁾ abordaram a possível neurotoxicidade induzida pela utilização da sucralose, seus produtos de hidrólise e 6-cloro 6-deoxiglucose (6-CG). Tendo em vista que estes três produtos possuem semelhanças em suas estruturas, justifica-se

a verificação da neurotoxicidade em espécies susceptíveis ao 6-CG – comprovadamente neurotóxico. Administraram-se sucralose e seus produtos de hidrólise em ratos e macacos na dose de 1000 mg/kg peso/dia, por 21 e 28 dias, respectivamente, e analisando-se, por microscopia eletrônica ou de luz, a estrutura histopatológica e possíveis efeitos na ultraestrutura do SNC de ratos machos, ratas e macacos machos. Neste estudo, não foram evidenciadas alterações no sistema nervoso central induzidas pela sucralose e seu produto de hidrólise, o 4-CG. Esses estudos, também não detectou a possibilidade da sucralose e seus produtos de hidrólise serem metabolizados a 6-CG^(19,20,21,23); portanto neurotoxicidade semelhante à encontrada em estudos com 6-CG não devem ser esperadas.⁽²⁶⁾

Neste mesmo estudo⁽²⁵⁾, foi utilizado, como controle positivo, o 6-cloro 6-deoxiglucose, administrado por gavagem, na dose de 500 mg/kg peso/dia, prevendo que alterações neurotóxicas induzidas seriam encontradas, tais como lesões simétricas em núcleos profundos do cerebelo, cérebro e medula espinal e lesões neurológicas profundas envolvendo o SNC.

A possibilidade de formação de 6-cloro-6-deoxifrutose (6CF) a partir do metabólito de hidrólise da sucralose 1,6 DCF existe teoricamente. Entretanto, caso seja produzido, sua quantidade seria pequena e desprezível. O maior metabólito do 1,6 DCF não envolve a formação de 6-CF ou qualquer outro componente neurotóxico conhecido: trata-se da formação do Glutation conjugado ao 1,6 DCF, formando o glutatión conjugado, sendo que nenhum 6-CF é produzido.⁽²⁷⁾

Estudos^(28,29) sugerem ocorrência de linfoma em camundongos, com aparente significância positiva, na dose de 7,5 mg/ml, cujas análises revelaram um aumento das células com aberrações, o qual, todavia, não alcançou significância estatística.

Goldsmith⁽³⁰⁾, ao avaliar a toxicidade aguda, utilizou camundongos machos e fêmeas (16 g/kg/dia) e ratos machos (10 g/kg/dia), sendo administrado por 4-8 semanas, na concentração de 1, 2 e 5%. Não se observaram efeitos teratológicos significantes nas dietas com doses de 1 e 2%. A 5%, entretanto, houve diminuição do consumo de alimentos, ganho de peso, conversão alimentar deficiente e alterações nos pesos absolutos e relativos de vários órgãos, incluindo baço e timo, bem como alterações histopatológicas do ceco. Ocorreram, também, com dieta a 5% durante 4 semanas, diminuição do número de linfócitos, aumento da excreção de cálcio e magnésio, todas as alterações sem significância estatística. Houve, porém, significativa diminuição do volume urinário, com dose de 5%, tanto com 4 quanto com 8 semanas. Acredita-se que muitos dos efeitos foram, provavelmente, secundários à diminuição do consumo de alimento ou ao consumo em larga escala de dieta não nutritiva, de baixa absorção e com substância osmoticamente ativa.

No mesmo estudo, avaliando a toxicidade subcrônica, administraram-se, por gavagem, doses de 750, 1500 e 3000 mg/kg peso/dia, em ratos machos e fêmeas por 26 semanas, investigando-se as dietas e as suas respectivas toxicidades. Na dieta de 3000 mg/kg peso/dia por 26 semanas houve aumento relativo do peso do rim, assim como da distensibilidade e aumento do peso do ceco, com significância estatística. Neste estudo, não se evidenciou toxicidade, apenas ocorreu diminuição da palatabilidade e da digestibilidade nas dietas contendo altas doses de sucralose, tendo como causa a diminuição do consumo de alimentos. Na administração aguda, por 4 a 8 semanas, em concentrações de 1, 2,5 e 5%, não ocorreram efeitos significativos toxicológicos na concentração de 1 e 2,5%. Entretanto ocorreu diminuição do consumo alimentar, redução do ganho de massa corporal e do peso

de alguns órgãos (baço) e alterações histopatológicas do timo, em ratas na concentração de 5%, por 4 a 8 semanas.

Semelhante estudo foi realizado por Man et al.⁽³¹⁾ para avaliação da toxicidade crônica e do potencial carcinogênico em ratos “Sprague–Dawley”. Nestes, foi administrada sucralose nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0 % durante a prenhez e nas 104 semanas seguintes. Para avaliação da toxicidade crônica, os ratos foram sacrificados com 52 semanas e 78 semanas, e para avaliação da carcinogênese com 104 semanas. Concluiu-se que, entre os efeitos, nas doses de 1,0 % e 3,0 %, ocorreu diminuição do peso corpóreo por menor consumo de alimentos devido à redução da palatabilidade na dieta e a uma resposta fisiológica devido à alta concentração de sucralose não digerida na dieta. Em relação aos achados não neoplásicos, observou-se hiperplasia epitelial da pelve renal em todas as fêmeas do grupo tratado, mineralização da pélvis renal nas fêmeas do grupo tratado com as doses intermediária e alta da sucralose (1% e 3%) e degeneração hemorrágica na cortical adrenal, em machos e fêmeas tratados com altas doses do edulcorante.

Segundo revisão de estudos, intitulados “Opinion of the Scientific Committee on Food on Sucralose”⁽³²⁾, com a administração crônica de uma dieta de 4500 mg/kg peso/dia (2 anos), observou-se efeito Loel de diminuição de peso, aumento do fígado e diminuição do tamanho dos eritrócitos e nefropatia. Outro estudo com dieta crônica de 150 mg/kg/peso/dia (2 anos), obteve-se efeito Loel com redução de ganho ponderal e menor ingestão de alimentos. Na avaliação da biovariação mineral em ratos, com dose de 2000 mg/kg peso/dia, houve diminuição de ganho ponderal, redução da alimentação e aumento do tamanho do ceco. A administração por gavagem em ratos com dose de 2000 mg/kg peso/dia, por 2 a 13 semanas apresentou

como efeitos: aumento do ganho de peso, aumento da intensidade da alimentação, aumento do rim e diminuição do baço.

Em estudos de carcinogênese com camundongos, durante 2 anos, detectou-se, ainda, um aumento da incidência de nefropatia crônica, quando comparado ao grupo controle, havendo significância estatística apenas nas ratas do grupo tratado com alta dose de sucralose; no entanto, não se observou aumento de outras patologias renais em ratos, cães e primatas, que vinham alimentando-se com a mesma dieta.⁽¹¹⁾

Em trabalhos com oncogênese, observou-se um aumento da incidência de mineralização renal, acompanhado de hiperplasia epitelial da pelve renal em fêmeas de ratos submetidas a tratamento com doses de 1 a 3% de sucralose.⁽³³⁾

Sabe-se que a susceptibilidade do animal à ação de agentes teratogênicos é dada de acordo com a época de diferenciação de cada órgão, determinando, assim, um maior ou menor período crítico. Em ratos, a organogênese acontece em um período que vai desde a implantação até o 8º e 9º dias, sendo que o rim inicia sua diferenciação do 8º ao 9º dias da prenhez, estando completamente formado por volta do 18º ao 19º dia.⁽³⁴⁾

O rim fetal de ratos, pela semelhança ao humano, é muito utilizado para estudos que envolvam organogênese. É formado pelo néfron, que se compõe de um corpúsculo renal e 4 estruturas tubulares: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor.

A composição do filtrado glomerular depende do endotélio capilar, que segundo Aires ⁽³⁵⁾, é descontínuo, com inúmeras fenestrações com aspecto de rede, permeável a substâncias de alto peso molecular, e não permitindo trânsito de elementos figurados do sangue. Nessa barreira, existem fendas de filtração

(podócitos) e a membrana basal, sendo esta determinante das propriedades de permeabilidade do glomérulo.^(35,36)

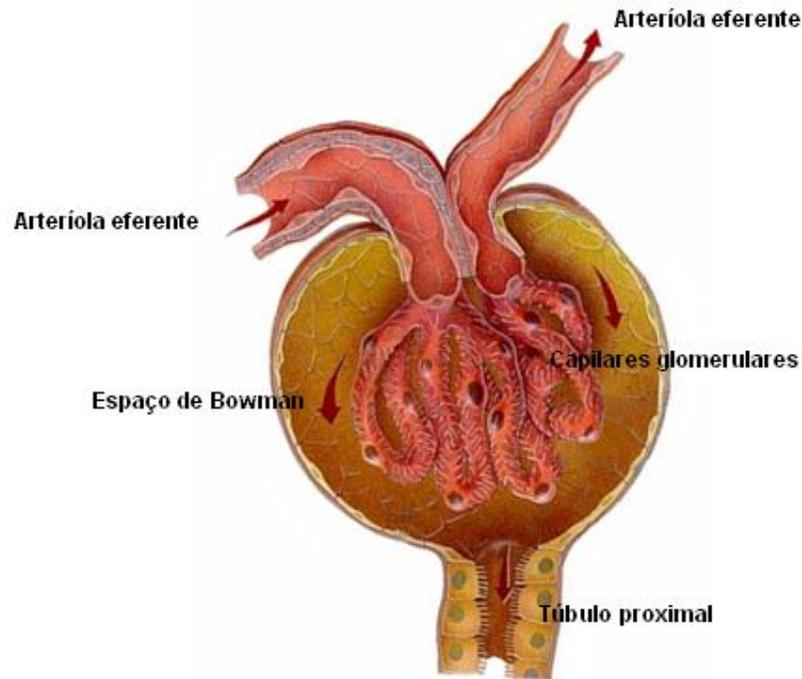


Figura 3 Representação esquemática do corpúsculo renal.
Fonte: Adaptado de Aires.⁽³⁶⁾

Após o filtrado sair da Cápsula de Bowman, será modificado pelo processo de reabsorção nos túbulos proximais, localizados no córtex profundo e medular externa, sofrendo novas reabsorções nas demais estruturas, até se transformar em urina. Determinadas substâncias, como aminoácidos e glicose, são totalmente reabsorvidas nos túbulos proximais, mesmo que grande quantidade sejam filtradas nos capilares glomerulares.

Todo o túbulo contorcido proximal é revestido por epitélio cúbico simples, sendo que suas células têm núcleo redondo com citoplasma rico em mitocôndrias, apresentando-se com duas membranas com permeabilidades e características diferentes de transporte, a membrana luminal ou apical a separa da luz do lúmen

tubular, e a membrana peritubular ou basolateral a separa dos capilares peritubulares.

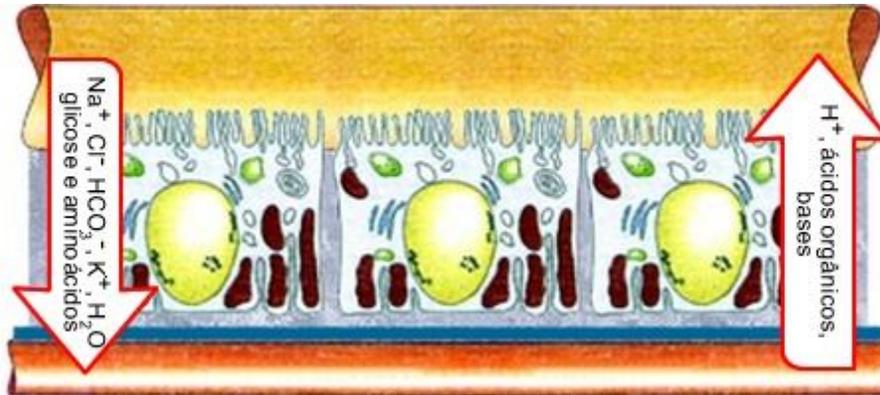


Figura 4 Representação esquemática do epitélio (cúbico simples) do túbulo proximal – parte convoluta e reta.
Fonte: Adaptado de Aires.⁽³⁶⁾

A superfície da membrana basolateral ou peritubular é aumentada por inúmeras dobras e prolongamento laterais. As células tubulares proximais têm espaços intercelulares, com pontos de junções

No segmento S1 e S2, dos túbulos contorcidos proximais, as áreas da membrana apical e basolateral são iguais, porém a altura da borda em escova é menor em S2, além de a membrana basolateral não apresentar um número tão elevado de dobras. Em relação ao segmento S3, a borda em escova é extensa, porém, as dobras basolaterais são pouco desenvolvidas. Portanto a diminuição das digitações entre as células (segmento S3) faz com que os espaços intercelulares sejam menores e, associada à diminuição no número e tamanho das mitocôndrias, determina que a reabsorção de sódio e água seja menor nessa região em relação às outras porções.^(35,36,27,38)

Desse modo, embora os 2 segmentos possuam mecanismos de transporte e reabsorção semelhantes, as diferenças se resumem apenas quantitativamente.

Na segunda metade do túbulo proximal, o Na^+ é reabsorvido com o Cl^- através da via transcelular e paracelular. O fluido que entra no segmento final do túbulo tem pouca glicose e aminoácido, porém tem alta concentração de Cl^- quando comparada com o início do túbulo. A água é reabsorvida através de gradiente osmótico transtubular formado pela reabsorção de NaCl^+ , Glicose e aminoácido.

Portanto, baseado na estrutura histológica das células epiteliais do túbulo contorcido proximal que apresentam citoplasma rico em mitocôndrias, aparelho de Golgi ao redor do núcleo e ribossomos livres, bordadura em escova, membrana basal aumentada e alargada, além de inúmeras dobras, esse segmento é sede importante de reabsorção tubular que, em sua maioria, ocorre por transporte ativo primário e secundário.

Possivelmente, baseada nas características do segmento S1 em reabsorver glicose e aminoácido e de a sucralose apresentar alta solubilidade em água, conclui-se que parte destas moléculas seja absorvida nesse segmento.^(35,36,39,40,41,42)

Os túbulos contorcidos distais, em razão de suas características com células cúbicas, apresenta poucas microvilosidades, na sua parte apical, e citoplasma com inúmeras e largas mitocôndrias, enquanto na sua parte final tem mitocôndrias menores e menos numerosas. Na sua parte basolateral, existem pregas que se encaixam em células vizinhas. Está dividido em 2 partes: o túbulo distal inicial tem as mesmas características da alça de Henle espessa, ou seja, reabsorve sódio, cloreto, cálcio e magnésio, porém é impermeável à água e uréia. Já a parte final dos túbulos contorcidos distais é composta de células principais e intercaladas; as principais secretam sódio e secretam potássio para o lúmen, enquanto as intercaladas reabsorvem potássio e bicarbonato do lúmen e secretam hidrogênio para o lúmen. Em razão de sua baixa condutância, desfavorecendo o transporte

passivo de íons, é classificado como segmento de baixa capacidade de transporte e alto gradiente de concentração, reabsorvendo menores frações do filtrado.^(35,36)

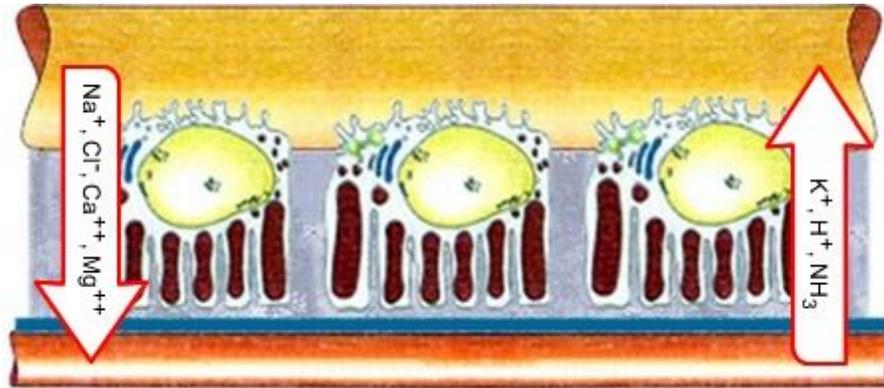


Figura 5 Representação esquemática do epitélio (cúbico) do túbulo distal: parte convoluta.

Fonte: Adaptado de Aires.⁽³⁶⁾

Os ductos coletores apresentam-se, no córtex, com células cubóides e colunares à medida que caminha para a região medular. Cerca de 70% das células são do tipo principais ou claras, responsáveis pela reabsorção de sódio e secreção de potássio, cerca de 30% são células intercalares ou escuras, que diminuem à medida que alcançam a medula e apresenta muitas mitocôndrias.

De um modo geral, os ductos coletores reabsorvem sódio e cloreto e secretam amônia, podendo tanto secretar como reabsorver K, H+ e bicarbonato de sódio. A permeabilidade do ducto coletor à água é controlada pelo ADH e, se presente em níveis elevados, a água é rapidamente absorvida para dentro do interstício medular, reduzindo o volume urinário e concentrando os solutos urinários. Diferentemente do ducto coletor cortical, o medular é permeável à uréia, portanto um pouco é reabsorvido para dentro do interstício medular, ajudando a elevar a osmolaridade nesta região do rim, contribuindo com a capacidade do rim formar urina concentrada.^(35,36,37)

Os túbulos contorcidos distais, assim como o ductos coletores, reabsorvem 7% do cloreto de sódio filtrado, secretam quantidades variáveis de potássio e hidrogênio e reabsorvem uma quantidade variável de água (8 a 17%); dependendo esta do hormônio antidiurético, ambos são classificados como segmento de baixa capacidade de transporte e alto gradiente de concentração, reabsorvendo menor fração do filtrado glomerular em relação ao túbulo proximal.^(35,36,37)

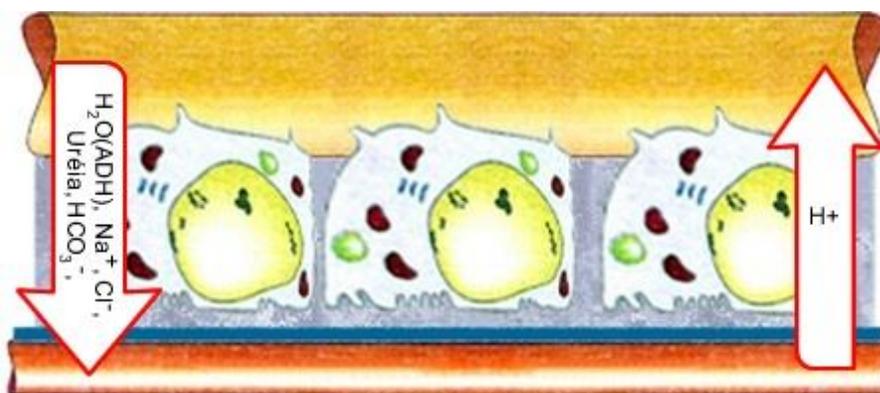


Figura 6 Representação esquemática das células do epitélio cúbico: ducto coletor.

Fonte: Adaptado de Aires.⁽³⁶⁾

Estudos recentes têm comprovado a associação da ingestão de adoçantes com a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade ou retardo no desenvolvimento placentário e fetal.^(43;47)

Baseado-se na solubilidade da sucralose na água⁽¹⁹⁾, e nos estudos de MacNeil⁽²⁶⁾ de que haveria passagem através da barreira placentária, realizaram-se estudos para avaliar os efeitos teratogênicos da sucralose e seus metabólicos, em diferentes doses e vias de administração.

Estudos teratológicos na organogênese de roedores (ratas prenhas), do 6º ao 15º dia de gestação, na dose de 500, 1000 e 2000 mg/kg peso/dia, e em não roedores (coelhas prenhas), do 6º ao 19º dias de gestação, com doses de 175, 350

e 700 mg/kg peso/dia), não detectaram alterações no desenvolvimento dos fetos, confirmados após necropsia. Houve apenas um leve aumento do consumo de água e distúrbios intestinais nas coelhas.⁽⁴⁸⁾

Em relação à reprodução, estudos em coelhas e ratas com sucralose e ratas com produtos da hidrólise da sucralose não evidenciaram efeito teratogênico nem alteração da capacidade reprodutiva. No entanto, nos estudos em ratas, usando produtos de hidrólise da sucralose em altas doses (270 mg/kg peso), existem evidências de toxicidade materna. Na progênie, evidenciou-se pequena mudança no desenvolvimento, porém, essa dose é 40.000 vezes o valor máximo permitido nos EUA (6,6 µg/kg peso/dia). Entretanto, estudos toxicológicos gerais, conduzidos com a sucralose e seus produtos de hidrólise, não evidenciaram efeitos adversos a ponto de comprometer a saúde humana.⁽¹¹⁾

Segundo estimativas^(3,4), associado às características de que a sucralose é um dos mais recentes edulcorantes e com alto poder dulçor, seu uso vem aumentando gradativamente; desse modo, novos estudos são necessários para atestar a sua segurança de consumo.

Considerando os dados estatísticos mostrando que o consumo mundial de adoçantes vem aumentando assustadoramente, inclusive por mulheres na idade reprodutiva, aliados ao fato de existirem poucas informações sobre a segurança de seu uso, em especial da sucralose, constata-se a necessidade de mais estudos sobre sua utilização na gestação.

Esta pesquisa experimental propõe estudo inédito, avaliando os possíveis efeitos adversos da administração da sucralose no período da organogênese em ratos, utilizando a técnica morfométrica. Apesar de existirem diversos trabalhos

isentando a sucralose de efeitos adversos, este estudo procura focar sua utilização na prenhez, uma vez que não existem estudos específicos nessa situação.

1.1. Objetivos

1.1.1. Geral

Verificar as alterações morfométricas nos rins, assim com as repercussões nos pesos placentário e peso fetal e comprimento do cordão umbilical, induzidas pela administração de sucralose, do 10^o ao 14^o dia de prenhez, na dose de 30 mg/Kg de peso/dia, em fetos de ratas

1.1.2. Específico

Avaliar o desenvolvimento placentário, fetal e comprimento do cordão umbilical em fetos de ratas, submetidas a administração de sucralose;

Avaliar os parâmetros cariométricos dos núcleos das células dos túbulos contorcidos proximais, túbulos contorcidos distais e ductos coletores, assim como, os volumes glomerulares, nos fetos de ratas submetidos a ingestão de sucralose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Características e condições dos animais

Após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais (CEEA) da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), nº 414.707, seguindo as orientações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para armazenamento, manipulação e experimentação e sacrifício dos animais. De acordo com protocolo, os ratos foram removidos do Biotério e alojados no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da FAMERP. Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas e machos, em número de 14, sendo 10 fêmeas e 4 machos. As ratas virgens com 50 a 53 dias de idade atingiram o peso entre 213 a 258 g (média 240 de kg) na época do acasalamento. O animais foram alojados em gaiolas retangulares de fundo plástico, com cama de maravalha, no Biotério do Departamento de Fisiologia, Bioquímica e Farmacologia FAMERP, que possui condições constantes de umidade, com temperatura de 20 a 25 graus e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais são alimentados com ração Labina (Purina) e água “ad libitum” durante todo o período do experimento.

2.2. Determinação do 1º dia de prenhez da rata

Os animais atingiram as condições ideais após aclimatação, o que foi avaliado pelo comportamento tranquilo. Os animais foram pesados e separados previamente e separados aleatoriamente em 2 grupos de 5 fêmeas cada, em gaiolas previamente identificadas. Cada macho foi introduzido em uma caixa onde estavam de 2 a 3 fêmeas. O período de acasalamento ocorreu até que todas as fêmeas dos dois grupos estivessem prenhas. No período da manhã de cada dia, os animais machos foram separados, e as fêmeas avaliadas através de verificação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal obtido através de hastes flexíveis de algodão embebidas em solução fisiológica 0,9%, que foi repassada para uma lâmina e, posteriormente, observada através de microscópio óptico com 10 aumentos. Após a confirmação do acasalamento através da presença de espermatozóides, foram separadas dos machos, sendo este dia considerado o primeiro dia de prenhez. Desse dia em diante, as ratas do grupo controle e do grupo tratado foram alojadas em gaiolas individuais.

2.3. Tratamento

Todas as cinco fêmeas prenhas do grupo tratado receberam, do 10º ao 14º dias de gestação, a dose de 30 mg/kg peso/dia, do edulcorante sucralose (Línea Sucralose®), sendo a dose diária total administrada diretamente no estômago do animal por meio de cânula de gavagem (método gavagem); posteriormente, foi injetado mais 0,5 ml para lavagem da sonda. Esta dose do edulcorante sucralose foi 100 % a

mais do que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para um adulto humano, que é de 15 mg/kg peso/dia ⁽¹⁰⁾; foi realizada a equivalência ao peso dos ratos Wistar.

As fêmeas do grupo controle receberam soro fisiológico a 0,9%, por gavagem, com sonda gástrica, com as mesmas características do grupo experimento, seguido de 0,5 ml de Soro Fisiológico a 0,9% para lavagem da sonda; desse modo foram submetidas às mesmas condições de manipulação e volume gástrico, à exceção da sucralose.

2.4. Técnica de dissecação e pesagem

No 20° dia de prenhez, todas as fêmeas (do grupo tratado e do grupo controle), foram anestesiadas com éter (inalatório), e realizada uma ampla incisão no abdome para visualização do útero. Durante o ato cirúrgico, e após a exposição do útero de cada fêmea, incisaram-se os cornos uterinos (direito e esquerda), com a retirada dos fetos. Esses fetos foram contados, por corno uterino, sendo observado: número de fetos vivos, mortos, malformações e sítios de reabsorção. Foram obedecidos os critérios para essa avaliação: fetos vivos: presença de movimentos voluntários ou quando estimulados; mortos: ausência de movimentos, ausência de sinais respiratórios ou cianose de face e extremidades; e para as reabsorções, os pontos característicos.

As ratas mães foram sacrificadas com dose excessiva de Thiopental, na dose de 40 mg/kg de peso.

Em sequência, todos os fetos do grupo estudo e grupo controle foram colocados em recipientes separados, baseados na rata mãe (R), e seus respectivos fetos (f), previamente identificados: grupo de estudo: (R1f1, R1f2, R1f3, R1f4, R2f1,

R2f2, R2f3...) e grupo controle (R1f1, R1f2, R1f3, R1f4... , R2f1, R2f2, R2f3...); foram então fixados com Alfac (85 ml de álcool a 80%), 5 ml de ácido acético glacial puro e 10 ml de formol a 10%), onde permaneceram por cinco dias para fixação. Após essa fixação, foram secados em papel filtro e pesados em balança de precisão "Mettler H64". Após pesagem, os fetos, placentas e medição dos cordões umbilicais foram lavados e imersos em álcool a 70% para conservação, em recipientes individuais previamente identificados, conforme o número da fêmea e número do feto (R1-f1, R2-f2,...).

Após cinco dias imersos no álcool, foram selecionados um feto de cada rata e retirado um dos rins (D ou E) através de uma incisão transversal na região dorsal, mais próximo à coluna cervical; assim, foram retirados cinco rins do grupo tratado e cinco rins do grupo controle e foram armazenados em álcool a 70%. Os fetos foram novamente colocados na mesma solução de fixação.

2.5. Técnica histológica

Os rins fixados foram desidratados, diafanizados e fixados em parafina, sendo nos dois blocos (controle e tratado) realizados cortes de 5 µm de espessura cada e corados, posteriormente, com Hematoxilina-Eosina.⁽⁴⁹⁾ Em uma sequência de 81 cortes, foram separados 9 cortes por bloco de 5 fetos (tratados) e 9 cortes por bloco de 5 fetos (controle) e confeccionadas 3 lâminas de cada grupo (controle e tratado), Lamina 1: cortes 9-18-27; lâmina 2: 36- 45- 54; e lâmina 3: 63 - 72 - 81, totalizando 6 lâminas.

2.6. Técnica morfométrica

Cariometria

O estudo morfométrico foi realizado através da técnica de cariometria⁽⁴⁹⁾, permitindo obter dois parâmetros nucleares importantes, a saber: diâmetro maior (D) e diâmetro menor (d).

Os cortes foram analisados sob microscopia óptica (microscópio binocular modelo Zeiss, Jena[®] (West Germany), com utilização da objetiva de imersão (100 aumentos) acoplada à microcâmera, que permite a captura das imagens dos diversos cortes, com aumento final de 1000 vezes. Esta imagem visualizada foi selecionada e armazenada, e importada como figura para o programa Image Pró-Plus[®], que, através do aplicativo Ipin 4, permite a obtenção das medidas dos diâmetro D e d, na unidade μm . Estas medidas permitiram avaliar a forma e volume dos núcleos, assim como suas relações, podendo também determinar seu aumento, diminuição e irregularidades através de parâmetros como: índice de contorno, coeficiente de forma e excentricidade^(50,51), entre outros; dos núcleos das células do epitélio dos túbulos contorcidos proximal, distal e tubos coletores, assim como volume do glomérulos.

O número de imagens nucleares obtidas foi de 50 imagens de cada estrutura estudada, para cada um dos fetos, nos grupos controle e tratado, totalizando 1500 imagens, e 20 imagens de glomérulos, para cada feto, totalizando 200 glomérulos entre controle e tratado.

Através dessas análises, puderam-se obter os dados de interesse para o estudo, tanto patológicos, fisiológicos, assim como estabelecer correlações entre estruturas e funções, sejam elas normais ou alteradas.⁽⁵²⁾

Parâmetros nucleares avaliados⁽⁵³⁾

Diâmetro maior (D), Diâmetro menor (d), Diâmetro médio (DM), Relação D/d, Perímetro (P), Área nuclear (A), Volume (V), Relação V/A, Excentricidade (E), Coeficiente de forma (CF) e Índice de contorno (IC).

1 - Diâmetro Médio: $M = (D \cdot d)^{1/2}$

2 - Relação entre diâmetros maior e menor: D / d

3 - Perímetro (μm): $P = (\pi/2) \{ [1,5 (D + d)] - M \}$

4 - Área (μm^2): $A = \pi M^2 / 4$

5 - Volume (μm^3): $V = \pi M^3 / 6$

6 - Relação V/A: $2 M / 3$

7 - Excentricidade: $E = [(D + d)^{1/2} \cdot (D - d)^{1/2}] / D$

8 - Coeficiente de forma: $F = 4 \cdot \pi \cdot (A/P)^{1/2}$

9 - Índice de contorno: $I = P / (A)^{1/2}$

Para os cálculos das equações matemáticas desenvolvidas em função dos diâmetros medidos, os resultados dos diâmetros foram exportados para uma planilha eletrônica no programa Microsoft Excel previamente programada para o cálculo dos diversos parâmetros nucleares a serem estudados, que automatiza os referidos cálculos.

Os dados obtidos para cada um dos grupos estudados foram avaliados por métodos estatísticos descritos a seguir.

2.7. Análise estatística

A fim de se obter as comparações estatísticas dos resultados entre os grupos controle e tratado, utilizou-se o teste estatísticos Mann-Whitney “U”⁽⁵⁴⁾, não paramétrico, com amostras independentes, adequados para comparar grupos com pequeno número de amostras.

Na análise estatística, foi utilizado o programa de computador GraphPad InStat, Windows–demo, versão 3/2009 (San Diego, CA, E.U.A.)⁽⁵⁵⁾. Através desse programa, calcularam-se as médias (\bar{X}), desvio padrão (S), os intervalos de confiança de 95%, valor de U (Mann-Whitney), e o valor da significância p[U] em análise bicaudal, para cada um dos grupos, controle e tratado.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Resultados morfológicos

Os resultados a seguir se referem às avaliações quantitativas dos pesos fetal e placentário (g) e comprimento do cordão umbilical (cm), sendo obtidos após a administração, em ratas prenhas, do edulcorante sucralose, na dose 30 mg/kg peso dia, por gavagem, do 10^o ao 14^o dias, a partir do diagnóstico da prenhez.

Avaliou-se o peso dos fetos, das placentas e comprimento dos cordões umbilicais, calculando-se as médias, desvio padrão e o valor de [U] Mann-Whitney e a significância p[U] entre os grupos controle e tratados.⁽⁵⁵⁾

Não houve malformações macroscópicas evidenciáveis.

3.1.1. Peso fetal

Verificou-se que as médias dos pesos corporais dos fetos dos animais tratados com sucralose (1,108 g), apresentam-se diminuídas em relação às médias do grupo controle (1,702 g). Notou-se diferença estaticamente significativa entre os grupos controle e tratado.

Tabela 1. Valores médios dos pesos corporais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste estatístico de Mann-Whitney

Feto	Peso corporal de fetos de ratas (g)	
	Controle	Tratado
1	1,386	1,089
2	1,440	1,270
3	1,948	1,259
4	1,581	1,216
5	2,153	0,707
\bar{X}	1,702	1,108
S	0,334	0,236
p[U]:		0,0079*

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

3.2.1. Peso das placentas

O peso das placentas do grupo controle e tratado com sucralose, assim como os resultados da análise estatística, encontram-se representados na tabela 2. Notou-se que a média dos pesos das placentas (gramas) dos animais tratados com sucralose (0,225 g) apresenta-se diminuído em relação ao grupo controle (0,323g), porém sem significância estatística entre os grupos.

Tabela 2. Valores médios dos pesos das placentas de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste estatístico de Mann-Whitney

Feto	Peso das placentas de fetos de ratas (g)	
	Controle	Tratado
1	0,264	0,213
2	0,226	0,298
3	0,382	0,258
4	0,297	0,184
5	0,448	0,170
\bar{X}	0,323	0,225
S	0,09	0,053
p[U]:	0,0952**	

** Sem significância estatística.

3.1.3. Comprimento do cordão umbilical

Os comprimentos dos cordões umbilicais dos grupos controle e tratados com sucralose e seus resultados da análise estatística são mostrados na tabela 3. A média dos comprimentos dos cordões umbilicais das ratas tratadas com sucralose (1,55 cm) apresentou-se diminuída em relação ao grupo controle (1,83 cm), mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3. Valores médios dos comprimentos dos cordões umbilicais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Comprimentos dos cordões umbilicais de fetos de ratas (cm)	
	Controle	Tratado
1	1,64	1,56
2	1,99	1,50
3	1,84	1,58
4	1,81	1,61
5	1,87	1,48
\bar{X}	1,83	1,55
S	0,13	0,06
p[U]:	0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p [U] < 0,01$.

3.2. Resultados cariométricos

3.2.1. Glomérulo

Foram observadas 20 estruturas glomerulares de cada lâmina, do grupo controle e tratado, totalizando 100 estruturas glomerulares do grupo controle e 100 estruturas glomerulares do grupo tratado, respectivamente. Mediram-se sete diâmetros perpendiculares entre si, e em função de suas médias, calcularam-se seus respectivos volumes em micrômetros cúbicos (μm^3).

A tabela 4, apresenta a média dos volumes glomerulares, dos grupos controle e tratados com sucralose, obtido através das medidas de 7 diâmetros de cada glomérulo, para obtenção de seu volume.

Tabela 4. Valores médios do parâmetro: volume dos glomérulos de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Volume (μm^3)	
	Controle	Tratado
1	43093942.38	32410355.45
2	41244743.89	42919137.77
3	38398448.09	41491392.73
4	37495852.08	51928027.91
5	38770027.72	39137936.30
\bar{X}	39800602.83	41577370.03
S	2306058.74	7052106.85
p[U]:	0,5476**	

** Sem significância estatística.

Notou-se um aumento no volume glomerular do grupo tratado em relação ao grupo controle, conforme tabela 4, da ordem de quatro 4,3%, mas sem diferença estatisticamente significativa.

Após a obtenção dos parâmetros nucleares, a partir das medidas dos diâmetros maiores e menores dos 50 núcleos de cada estrutura estudada (TCP, TCD e DC) de cada animal do grupo controle e tratado, calcularam-se as médias dos parâmetros obtidos de cada feto, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, que serão discutidos a seguir.

3.2.2. Túbulo contorcido proximal

A análise cariométrica dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas dos grupos controle e tratado com sucralose são mostrados nas tabelas 5 a 8.

Os parâmetros encontrados, em relação aos diâmetros: D, d e DM, são mostrados na tabela 5. A média e desvio padrão dos diâmetros maiores se apresentam no grupo controle: $8,88 \pm 1,04$; e no grupo tratado: $10,34 \pm 0,21$, mostrando uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No grupo controle, o valor do diâmetro menor apresentou: $6,19 \pm 1,07$; e no grupo tratado: $8,32 \pm 0,40$, mostrando uma significância estatisticamente significativa. Em relação ao diâmetro médio, o grupo controle apresentou média e desvio padrão: $7,81 \pm 0,23$; já o grupo tratado: $9,25 \pm 0,25$, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e tratado.

Tabela 5. Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Diâmetro maior (μm)		Diâmetro menor (μm)		Diâmetro médio (μm)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	7,03	10,11	4,36	7,89	7,66	8,90
2	9,23	10,64	6,14	8,42	7,50	9,44
3	9,40	10,16	6,67	8,86	7,89	9,48
4	9,30	10,42	6,85	7,96	7,95	9,08
5	9,45	10,35	6,96	8,48	8,08	9,35
\bar{X}	8,88	10,34	6,19	8,32	7,82	9,25
S	1,04	0,21	1,07	0,40	0,23	0,25
p[U]:	0,0079*		0,0079*		0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

Os parâmetros, relação entre o diâmetro D/d, e perímetro médio, dos núcleos das células do túbulo contorcido proximal estão demonstrados na tabela 6.

Constatou-se que a média e desvio padrão da relação D/d nos controles, é de $1,48 \pm 0,11$; quanto aos animais tratados com sucralose, essa relação é de $1,26 \pm 0,06$. Com relação ao perímetro médio, nos controles o valor encontrado foi de: $25,33 \pm 0,57$; nos animais tratados foi de $29,43 \pm 0,69$. Em se comparando os controles e tratados, em ambos os parâmetros, essa mostrou diferenças estatisticamente significativa.

Tabela 6. Valores médios da relação D/d e perímetro médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controles e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Relação D/d		Perímetro Médio (μm)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	1,64	1,30	25,24	28,42
2	1,54	1,28	24,43	30,08
3	1,43	1,16	25,47	29,93
4	1,39	1,32	25,55	29,04
5	1,38	1,23	25,97	29,69
\bar{X}	1,48	1,26	25,33	29,43
S	0,11	0,06	0,57	0,69
p[U]:	0,0079*		0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

Os parâmetros Área, volume e relação V/A dos túbulos contorcidos proximais em relação aos grupos controle e tratados serão mostrados na tabela 7. Verifica-se que a área nuclear do grupo controle, apresentou a média e desvio padrão de, $48,48 \pm 2,83$, enquanto essa relação nos animais tratados com sucralose foi de $67,75 \pm 3,54$; essa relação se mostra estatisticamente significativa. Em relação à média e desvio padrão do parâmetro volume, no grupo controle foi de $257,62 \pm 22,14$; nos animais do grupo tratado com sucralose, foi de $424,30 \pm 32,49$. Entre os grupos foi verificada diferença estatisticamente significativa. Na avaliação do túbulo contorcido proximal, na relação do volume/área, a média e desvio padrão no grupo controle foi de $5,19 \pm 0,15$; no grupo tratado com sucralose, essa relação foi de $6,17 \pm 0,17$. Evidenciou-se uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 7. Valores médios dos parâmetros: área, volume e relação volume/área dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Área (μm^2)		Volume (μm^3)		Relação V/A	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	46,56	62,95	242,17	381,35	5,11	5,94
2	44,69	70,52	228,57	450,20	5,00	6,30
3	49,23	71,02	262,33	454,96	5,26	6,32
4	50,18	65,14	271,86	399,12	5,20	6,05
5	51,73	69,11	283,18	435,85	5,39	6,24
\bar{X}	48,48	67,75	257,62	424,30	5,19	6,17
S	2,83	3,54	22,14	32,49	0,15	0,17
p[U]:	0,0079*		0,0079*		0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

Observou-se, na tabela 8, a análise dos parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células dos túbulos contorcidos proximais. Verificou-se que no parâmetro excentricidade no grupo controle, a média e desvio padrão de $0,69 \pm 0,06$; no grupo tratado com sucralose foi de $0,55 \pm 0,06$. Em relação ao parâmetro coeficiente de forma, no grupo controle a média e desvio padrão apresentou-se com $0,94 \pm 0,02$; enquanto no o grupo tratado com $0,98 \pm 0,01$. No parâmetro índice de contorno apresentou, no grupo controle, $3,66 \pm 0,04$ e no grupo tratado com sucralose $3,59 \pm 0,02$. Desse modo, pode-se afirmar que, em relação aos parâmetros, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, existe diferença estatisticamente significativa, entre os grupo controle e tratado.

Tabela 8. Valores médios dos parâmetros: excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas (T) com sucralose. Teste: Mann-Whitney

Feto	Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de contorno	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	0,77	0,59	0,91	0,97	3,72	3,60
2	0,73	0,57	0,93	0,97	3,68	3,60
3	0,68	0,45	0,95	0,99	3,64	3,56
4	0,63	0,59	0,96	0,97	3,63	3,61
5	0,64	0,54	0,96	0,98	3,63	3,58
\bar{X}	0,69	0,55	0,94	0,98	3,66	3,59
S	0,06	0,06	0,02	0,01	0,04	0,02
p[U]:	0,0079*		0,0079*		0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

3.2.3. Túbulo contorcido distal

As análises cariométricas dos túbulos contorcidos distais dos fetos de ratas dos grupos controle e tratado com sucralose são mostrados nas tabelas 9 a 12.

Todos os parâmetros, foram avaliados em relação às médias e seus desvios padrões. Analisando os parâmetros do diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro médio estão demonstrados na tabela 9. A média e o desvio padrão do parâmetro diâmetro maior, apresentam-se, no grupo controle com $10,07 \pm 0,62$; no grupo tratado, $12,650,43$, demonstrando diferença estatisticamente significativa de entre os grupos. Em relação ao diâmetro menor, o grupo controle apresentou-se

5,04±0,51, enquanto no grupo tratado com 6,71±0,19, mostrando uma diferença estatisticamente significativa. No parâmetro diâmetro médio, as médias e desvio padrão foi de 7,29±0,22; enquanto no grupo tratado de 9,17±0,23, apresentando uma diferença estatisticamente significativa entre o dois grupos.

Tabela 9. Valores médios dos diâmetros maior, menor (μm) e diâmetro médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos distais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Diâmetro maior (μm)		Diâmetro menor (μm)		Diâmetro médio (μm)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	10,64	12,52	5,41	6,55	7,56	9,00
2	10,18	12,99	4,92	6,54	7,03	9,19
3	9,00	13,01	4,21	6,87	7,12	9,41
4	10,24	12,76	5,45	6,95	7,44	9,37
5	10,28	11,98	5,22	6,62	7,28	8,88
\bar{X}	10,07	12,65	5,04	6,71	7,29	9,17
S	0,62	0,43	0,51	0,19	0,22	0,23
p[U]:	0,0079*		0,0079*		0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

Em relação aos parâmetros perímetro médio e média da relação entre o diâmetro maior/diâmetro menor, estão relacionados na tabela 10.

Verificou-se que a média e desvio padrão do perímetro médio, no grupo controle, foi de 25,17±0,52, sendo que, nos fetos tratados, essa média foi de 31,22±0,87, mostrando uma diferença estatisticamente significativa. Quanto à relação D/d, nos grupos controle foi de 2,05±0,11; nos animais tratados com sucralose, essa média foi de 1,93±0,06. Embora existam diferenças entre os grupos tratado e controle, estas não se mostrou diferença estatisticamente significativa.

Tabela 10. Valores médios da relação D/d e perímetro médio dos núcleos do epitélio dos túbulos contorcidos distal de fetos de ratas controles e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Perímetro médio (μm)		Relação D/d	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	25,94	30,81	1,99	1,96
2	24,52	31,61	2,13	2,01
3	25,00	32,07	2,19	1,94
4	25,3	31,72	1,91	1,88
5	25,08	29,89	2,03	1,84
\bar{X}	25,17	31,22	2,05	1,93
S	0,52	0,87	0,11	0,07
p[U]:	0,0079*		0.0952**	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

** Sem significância estatística.

Em relação aos parâmetros área, volume e relação volume/área, após análise dos núcleos das células dos túbulos contorcidos distais do grupo controle e tratado com sucralose, estão representados na tabela 11.

Detectou-se no parâmetro área nuclear, que a média e desvio padrão no grupo controle mostrou $42,23 \pm 2,63$; no grupo tratado, essa média foi de $66,57 \pm 3,24$, sendo que essa relação demonstrou diferença estatisticamente significativa. Em relação ao parâmetro volume, no grupo controle de $210,31 \pm 20,21$; nos fetos tratados: $413,76$, com desvio padrão de $29,44$, apresentando diferença estatisticamente significativa de $0,0079$. Na relação volume/área, no grupo controle,

esta relação foi $4,86 \pm 0,15$; enquanto no grupo tratado, a relação é de $6,11 \pm 0,15$, mostrando diferença estatisticamente significativa.

Tabela 11. Valores médios dos parâmetros: área, volume e relação volume/área dos núcleos dos túbulos contorcidos distais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Área (μm^2)		Volume (μm^3)		Relação V/A	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	45,64	64,38	237,2	395,55	5,04	6,00
2	39,33	66,63	189,47	412,49	4,68	6,12
3	40,14	69,91	193,36	443,5	4,75	6,27
4	44,00	69,51	223,83	441,76	4,96	6,25
5	42,03	62,4	207,67	375,49	4,86	5,92
\bar{X}	42,23	66,57	210,31	413,76	4,86	6,11
S	2,63	3,24	20,21	29,44	0,15	0,15
p[U]:	0,0079*		0,0079*		0,0079*	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

Na tabela 12, demonstra-se a análise dos parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células dos túbulos contorcidos distais.

No grupo tratado, o parâmetro excentricidade, apresentou média e desvio padrão de $0,85 \pm 0,02$, sendo no grupo tratado com sucralose, mostrou $0,83 \pm 0,01$. Comparando-se os grupos controle e tratado, esse parâmetro apresentou-se sem significância estatística. No parâmetro coeficiente de forma, o grupo controle mostrou média e desvio padrão de $0,83 \pm 0,02$; no grupo tratado de $0,86 \pm 0,01$. Esse

parâmetro apresentou diferença estatisticamente significativa. O índice de contorno mostrou, no grupo controle, relação de $3,90 \pm 0,05$, enquanto o grupo tratado apresenta $3,84 \pm 0,03$. Embora haja variação entre os grupos controle e tratado, não existe significância estatística.

Tabela 12. Valores médios dos parâmetros: excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos dos túbulos contorcidos proximais de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de contorno	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	0,85	0,83	0,84	0,85	3,87	3,86
2	0,86	0,85	0,82	0,84	3,94	3,88
3	0,87	0,83	0,81	0,85	3,96	3,85
4	0,83	0,82	0,86	0,87	3,84	3,82
5	0,84	0,82	0,84	0,87	3,89	3,80
\bar{X}	0,85	0,83	0,83	0,86	3,90	3,84
S	0,02	0,01	0,02	0,01	0,05	0,03
p[U]:	0,0552**		0,0079*		0,0952**	

* Diferença estatisticamente significativa para $p < 0,01$.

** Sem significância estatística.

3.2.4. Ducto coletor

As análises cariométricas das células do ducto coletor dos fetos das ratas dos grupos controle e tratado com sucralose são mostrados nas tabelas 13 a 16.

Tabela 13. Valores médios do diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro médio dos núcleos do epitélio dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Diâmetro maior		Diâmetro menor		Diâmetro médio	
	Controle (µm)	Tratado (µm)	Controle (µm)	Tratado (µm)	Controle (µm)	Tratado (µm)
1	10,95	9,44	7,23	7,26	8,88	8,26
2	10,09	10,07	7,81	7,44	8,87	8,64
3	9,63	9,50	7,70	7,69	8,59	8,52
4	9,97	9,68	7,55	7,87	8,66	8,71
5	9,86	10,11	7,80	8,02	8,75	8,99
\bar{X}	10,10	9,76	7,62	7,66	8,75	8,62
S	0,50	0,31	0,24	0,31	0,13	0,27
p[U]	0,4206**		0,8413**		0,4206**	

** Sem significância estatística.

Os resultados dos parâmetros diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro médio, com suas respectivas médias e desvios padrão e p[U], tanto no grupo controle quanto no tratado, estão demonstrados na tabela 13. No parâmetro diâmetro maior, a relação no controle de $10,10 \pm 0,50$ e no grupo tratado $9,76 \pm 0,31$. . O diâmetro menor apresentou no grupo controle média e desvio padrão de $7,62 \pm 0,24$, enquanto no grupo tratado $7,66 \pm 0,31$. No parâmetro diâmetro médio, no

grupo controle essa relação foi de $8,75 \pm 0,13$, e no grupo tratado de $8,62 \pm 0,27$. Nestes três parâmetros, demonstrou-se não haver significância estatística entre o grupo controle e o tratado.

Tabela 14. Valores médios da relação D/d e perímetro médio dos núcleos do epitélio dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Relação D/d		Perímetro médio (μm)	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	1,53	1,31	28,91	26,39
2	1,30	1,36	28,26	27,69
3	1,27	1,25	27,34	27,13
4	1,33	1,24	27,68	27,67
5	1,29	1,27	27,87	28,61
\bar{X}	1,34	1,29	28,01	27,50
S	0,11	0,05	0,60	0,82
p[U]:	0,3095**		0,3095**	

** Sem significância estatística.

Na tabela 14, estão demonstradas as respectivas médias e desvio padrão entre os grupos controle e tratado, assim como o p[U]. No parâmetro relação entre os diâmetros D/d, essa relação foi de $1,34 \pm 0,11$, enquanto no grupo tratado de $1,29 \pm 0,05$. No parâmetro perímetro médio, no grupo controle apresentou média e desvio padrão de $28,01 \pm 0,60$, no grupo tratado $27,50 \pm 0,82$. Esses dados mostraram não havendo significância estatística entre o grupo controle e tratado.

Tabela 15. Valores médios dos parâmetros: área, volume e relação volume/área dos núcleos dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney.

Feto	Área (μm^2)		Volume (μm^3)		Relação V/A	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	62,4	54,16	374,77	304,09	5,92	5,51
2	61,96	59,56	368,84	353,6	5,91	5,76
3	58,45	57,59	340,49	333,21	5,73	5,68
4	59,25	60,16	346,14	355,93	5,77	5,81
5	60,67	63,79	360,43	386,39	5,83	5,99
\bar{X}	60,55	59,05	358,13	346,64	5,83	5,75
S	1,70	3,54	14,59	30,44	0,08	0,18
p[U]:	0,5476**		0,5476**		0,4206**	

** Sem significância estatística.

A tabela 15 apresenta os parâmetros área, volume e relação volume/área dos núcleos dos ductos coletores. Comparando-se os grupos controle e tratado, respectivamente, em relação às médias e desvio padrão, no parâmetro área, essa relação em relação ao grupo controle foi de $60,55 \pm 1,70$, no grupo tratado $59,05 \pm 3,54$. O parâmetro volume, apresentou média e desvio padrão, no grupo controle de $358,13 \pm 154,59$, no grupo tratado $346,64 \pm 30,44$. Em relação ao parâmetro relação V/A, mostrou no grupo controle $5,83 \pm 0,08$, no grupo tratado $5,75 \pm 0,18$. Portanto não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado dos três parâmetros estudados.

Tabela 16 Valores médios dos parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos dos ductos coletores de fetos de ratas controle e tratadas com sucralose. Teste de Mann-Whitney

Feto	Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de contorno	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1	0,74	0,60	0,93	0,97	3,67	3,60
2	0,61	0,65	0,97	0,96	3,60	3,62
3	0,56	0,53	0,97	0,98	3,59	3,59
4	0,63	0,54	0,97	0,98	3,61	3,58
5	0,58	0,57	0,97	0,97	3,60	3,59
\bar{X}	0,62	0,58	0,96	0,97	3,61	3,60
S	0,07	0,05	0,43	0,01	0,03	0,02
p[U]:	0,3095**		0,4206**		0,3095**	

** Sem significância estatística.

Os parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno foram analisados na tabela 16. Nesses parâmetros, foram avaliados as médias e desvios padrão dos grupos controle e tratado. Em relação à excentricidade, a média e desvio padrão no grupo controle foi de $0,62 \pm 0,07$, enquanto no grupo tratado $0,58 \pm 0,05$. O coeficiente de forma apresentou média e desvio padrão, no grupo controle de $0,96 \pm 0,43$, no grupo tratado $0,97 \pm 0,01$. Em relação ao índice de contorno, essa relação no grupo controle foi de $3,61 \pm 0,03$, no grupo tratado $3,60 \pm 0,02$. Concluiu-se não haver significância estatística entre os grupos controle e tratado dos parâmetros apresentados acima.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. O animal de experimentação

Nos trabalhos de pesquisa, a utilização de animais para experimentos mostra-se indispensável em diversas situações. Na área da saúde, verifica-se a importância do uso desse recurso em determinadas ocasiões, lançamentos de produtos advindos da indústria farmacêutica, como forma de avaliar seus benefícios, contra-indicações e efeitos colaterais, para que possam ser comercializados. Dessa forma, procedimentos em animais se mostram necessários para a análise de novas técnicas no tratamento e/ou prevenção de inúmeras doenças. A utilização desse recurso, que demanda sacrifício do animal, mostra-se perfeitamente aceitável, visto que a finalidade é obtenção de benefícios a toda a humanidade.

Dessa maneira, é lógico concluir que os meios científicos, em muitas ocasiões, dependem da utilização dos animais de experimentação e, somente desse modo, podem-se reproduzir determinadas e complexas reações necessárias ao aprendizado e análise do funcionamento de novos medicamentos ou novos procedimentos a serem adotados sem, todavia, expor um ser humano a riscos desnecessários. Obviamente, tal atividade é regulamentada por normas do Conselho Internacional de Ciências Médicas⁽⁵⁶⁾, a fim de que abusos sejam evitados e, principalmente, a fim de que uma série de princípios básicos, como a utilização de determinadas espécies em quantidades adequadas, venham a ser respeitados, quando da realização de pesquisas científicas.⁽⁵⁷⁾

Dada a preocupação ética, o número de animais utilizados nos estudos experimentais deve ser reduzido ao mínimo necessário e, ao mesmo tempo, suficiente, de maneira a permitir uma análise estatística e fornecer resultados cientificamente confiáveis e válidos.⁽⁵⁸⁾

4.2. Método (morfometria e estatística)

A morfometria, tem a finalidade de “medir estruturas anatômicas” e/ou “estabelecer dimensões”. Apresenta-se como ferramenta indispensável na coleta, apresentação e análise dos resultados, contribuindo com objetividade e precisão, além de permitir estabelecer relações entre as mais diversas estruturas anatômicas e suas respectivas funções, possibilitando o aperfeiçoamento da capacidade de se estabelecer diagnóstico e, e até mesmo, o prognóstico de determinados processos patológicos.⁽⁵⁹⁾

A análise morfométrica foi utilizada de maneira a promover uma mensuração rápida e, ao mesmo tempo, isenta de maiores intervenções por parte do pesquisador. Essa análise automatizada permite a obtenção de dados importantes a respeito da estrutura das células e tecidos através das medidas e da contagem das mesmas, possibilitando, dessa maneira, o diagnóstico e prognóstico de quaisquer alterações, dentre as quais, tumores.⁽⁶⁰⁾

A morfometria busca analisar alguns aspectos e parâmetros do núcleo das células, tais como forma, tamanho e padrão cromatínico. Esses aspectos são fundamentais, quando se comparam células normais e células malignas. Por conta disso, alguns autores consideram que a morfometria nuclear poderia ser utilizada como parâmetro diagnóstico e também fornecer fatores prognósticos confiáveis.⁽⁶¹⁻⁶⁶⁾

Em relação às alterações morfométricas, a cariometria possibilita a comparação de parâmetros nucleares distintos em órgãos e tecidos obtidos através da microscopia óptica, tendo sido considerada uma técnica de fundamental importância, ou seja, é uma ferramenta consagrada à obtenção de dados fisiológicos e patológicos, viabilizando, dessa maneira, a análise conjunta e correlação quantitativa entre estruturas/funções normais ou alteradas.

Além disso, a utilização da morfometria como instrumento de análise e estudo em alguns tumores (prostáticos e renais), permitindo muitas vezes seu diagnóstico precoce e até mesmo o prognóstico, contribuindo dessa maneira, para as pesquisas nas mais variadas áreas de abrangência da anatomia patológica, comparando estruturas anatômicas e funções e auxiliando na visualização de alterações celulares.^(52;60; 67-68) No rim, a morfometria é utilizada para estudar lesões dos túbulos, alterações no diabetes insulínico⁽⁶⁹⁾, além de carcinomas renais.⁽⁷⁰⁾

Esta pesquisa procurou manter em foco e sob análise o efeito toxicológico da sucralose sobre os rins fetais, administrando a sucralose às ratas em período de gestação. Avaliou-se também, o peso fetal, peso placentário e comprimento do cordão umbilical. Em relação ao rim fetal, priorizou-se a toxicidade renal, através das alterações nos parâmetros cariométricos dos epitélios dos túbulos proximais, distais e ductos coletores de fetos de ratos. Foram estimados, ainda, os diâmetros maiores e menores dos glomérulos renais.⁽⁵²⁾

Inúmeros trabalhos são desenvolvidos no Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, utilizando esta técnica, basicamente avaliando efeitos dos vários edulcorantes, antibióticos e citostáticos existentes em diversos tecidos e órgãos de animais de experimentação.^(44-47;71-73)

Em relação à estatística, é uma ciência que tem por objetivo explicar a frequência da ocorrência de determinados eventos, tanto em estudos observacionais quanto em experimentos através de planejamento, coleta, análise e interpretação de dados, objetivando, ao final, o estabelecimento de conclusões. ^(54;59;74)

Nos diversos métodos estatísticos, é de fundamental importância determinar duas vertentes, o cálculo do tamanho da amostra e a análise estatística, visando testar hipóteses entre duas ou mais variáveis, que são utilizados para responder as perguntas clínicas ou de pesquisa; também se mostram diretamente envolvidos nas técnicas de amostragem, pois, com alguma frequência, faz-se necessária a utilização da matemática para determinar se uma amostra é ou não representativa.

Nesta pesquisa, utilizou-se a Estatística Inferencial, conjunto de técnicas analíticas utilizadas para se identificarem e caracterizarem relações entre variáveis. ^(54;74-75)

O método estatístico utilizado foi o Teste Não-Paramétrico, já que as amostras representam um pequeno universo e não obedecem a uma distribuição normal (simétrica) em torno da média. Como os grupos avaliados no presente estudo são de distribuição “assimétrica” e sem homogeneidade na sua variação (trata-se, pois, de grupos independentes), o teste indicado para a análise estatística foi o Mann-Whitney, utilizado para comparação de pequenos grupos⁽⁵⁴⁾. Para as análises estatísticas, foi utilizado o auxílio do programa de computador GraphPad InStat, for Windows: versão 3/2009 – demo: San Diego, CA, E.U.A.).⁽⁵⁵⁾

Há necessidade de se conhecerem quantos campos microscópicos precisam ser analisados para que a amostra tenha representatividade. Esta metodologia foi desenvolvida por Williams, em 1977, e relatada por Reis et al., em 2002.^(59;76)

A média acumulada, proposta por Williams, calcula a média dos eventos que se querem avaliar e estabelece o número de variação aceitável. Calcula-se o número de eventos do fenômeno estudado em cem campos aleatórios, representativos de todo a peça histológica. No cálculo da média acumulada, soma-se o número de eventos que se estão estudando e divide-se a quantidade de campos (fator de divisão). A centésima média acumulada será equivalente a "100%". Aplica-se a regra de três e calculam-se as porcentagens das demais médias de cada campo.

Observa-se que, a partir da 50ª medida, os valores ficaram entre 95 e 105%. Pode-se afirmar que, pelo cálculo da média acumulada de Williams, a partir da avaliação de 50 campos a amostra tem significância de $p < 0,05$. Assim, pode-se concluir que contar 50 campos aleatórios tem a mesma significância de contar 100 ou mais campos.⁽⁷⁶⁾ Em decorrência dessa comprovação, neste trabalho, foram capturadas imagens de 50 núcleos de cada estrutura histológica do rim (TCP, TCD e TC) e 20 glomérulos de cada feto selecionado, sendo 5 tratados e 5 controle, totalizando 1700 imagens. Desse modo, e de acordo com o raciocínio da média acumulada de Williams, os 5 rins obtidos de fetos tratados com sucralose e 5 fetos do grupo controle terão satisfeito o tamanho da amostra necessária, para que esta pesquisa tenha validade. Assim, esta pesquisa satisfaz o preceito de que se deve utilizar o mínimo de animais necessários para que os resultados sejam válidos.⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾

4.3. Placenta, peso fetal e cordão umbilical

4.3.1 Placenta e peso fetal

Na análise estatística, constatou-se que a média do peso das placentas dos animais tratados com sucralose foi de 0,225g, enquanto do grupo controle de 0,323 g, desse modo apresentou-se diminuída em relação ao grupo controle, No entanto, embora a média dos pesos das placentas do grupo tratado com sucralose se encontre diminuída em cerca de 30%, porém sem significância estatística entre o grupo.

Sabe-se que a placenta é um órgão multifuncional, responsável pelo crescimento e bem-estar fetal, além de ser responsável pelo controle de vários mecanismos que contribuem para a passagem de substâncias de um para outro compartimento, dependendo da fase da prenhez. Sua principal função é proporcionar a troca de produtos metabólicos entre o sangue materno e o fetal, além da produção de hormônios. Ademais, a placenta se destaca por ser responsável pela difusão de nutrientes e oxigênio do sangue materno para o feto e difusão de produtos de excreção de volta para a mãe.^(35;78)

As vilosidades coriônicas representam quase que a totalidade da placenta fetal, sendo suas células responsáveis pelo transporte materno-fetal de nutrientes e resíduos de excreções fetais. Dessa forma, essa é a região de contato mais íntimo entre mãe e feto, conhecido no ser humano como placentônio.

A membrana placentária não pode ser comparada a uma membrana semipermeável inanimada, existente entre duas circulações a equilibrar, obedecendo a leis físico-químicas, a concentrações dos fluídos que a circundam. É

uma membrana, que interfere, ativa e seletivamente, nas composições plasmáticas. Sua característica dinâmica condiciona a intervenção no trânsito de substâncias nos dois sentidos. Tem propriedades diferenciadas, porém, obedecendo a princípios gerais de equilíbrios osmóticos e oncóticos.⁽⁷⁹⁾

Além das citadas, existem outras funções placentárias de controle entre os tecidos fetais e materno, responsáveis pelo bem-estar fetal através do controle do trânsito materno-fetal. Juntamente com a bolsa amniótica, a placenta desenvolve importante proteção mecânica, além de servir como barreira à passagem de produtos que possam induzir a malformação, como hormônios, vírus, anticorpos e produtos medicamentosos. A passagem de substâncias químicas através de diferentes meios de transporte pode expor o feto aos efeitos dessas substâncias. Por conta disso, mostra-se de fundamental importância a análise da permeabilidade e espessura placentária.⁽⁸⁰⁻⁸³⁾

A espessura da membrana placentária depende da fase da prenhez: quanto mais inicial, maior é a sua espessura, e menor é sua permeabilidade a determinadas substâncias. Com o evoluir da gestação, existe uma redução de sua espessura ocorrendo maior permeabilidade com maior difusão placentária. Portanto, a designação de barreira à placenta mostra-se inadequada, pois quase todas as moléculas, em velocidades variadas, transitam em um ou outro sentido.^(35;79;84;85)

A passagem transplacentária de glicose e açúcares ocorre por difusão facilitada, sendo seu transportador o Glut_1 (sinciotrofoblasto), principalmente na membrana microvilosa e, em menor grau, na membrana basal. Essas substâncias transitam após conjugar-se com molécula carreadora, Glut_1 , cuja afinidade para a substância é a mesma em ambos os lados (fetal e materna) da membrana, formando o complexo: substância+molécula carreadora Glut_1 ; desse modo; difunde-

se mais rapidamente de um lado da membrana para outro, do que a difusão simples. Os aminoácidos são transportados contra gradiente de concentração, portanto com dispêndio de energia (transporte ativo), também atuando proteínas carreadoras presentes nas microvilosidades da membrana placentária.⁽⁸⁶⁾

Água e eletrólitos são transportados livremente entre mãe e feto, quer por difusão simples, quer por ultracentrifugação.

Portanto, embora a sucralose seja um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose associada à frutose, com cloração seletiva de 3 grupos hidroxila, além de envolver a substituição no carbono 4 e 6 - ($C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow C_{12}H_{19}Cl_3O_8$), outros fatores se mostram importantes na permeabilidade da membrana placentária à sucralose; e estão relacionados com a farmacologia da sucralose, tais como sua alta solubilidade na água.⁽¹⁹⁾ Um importante estudo, de MacNeil⁽²⁶⁾ sugere que existe passagem de sucralose através da membrana placentária, sendo esses dados de fundamental importância na demonstração da existência, nesta pesquisa, de fluxo materno-fetal da sucralose.

Pesquisas sobre o uso de adoçantes durante o período gestacional têm sido realizadas em diversos países, em razão de seu uso cada vez mais habitual e frequente. Sabe-se que a maioria dos adoçantes passa através da barreira placentária, podendo ocasionar efeitos tóxicos no feto. Várias pesquisas atestam o efeito tóxico do ciclamato de sódio no rim⁽⁴³⁾ e fígado fetal⁽⁴⁵⁾, assim como a toxicidade do ciclamato de sódio na placenta fetal⁽⁴⁶⁾ e do aspartame na placenta fetal, cordão umbilical e fígado fetal.⁽⁴⁷⁾

Neste trabalho, conforme mostra a tabela 1, verifica-se que a média do peso corporal dos fetos dos animais tratados com sucralose foi de 1,108 g. Este peso, obtido no grupo submetido à influência da sucralose, mostrou-se inferior à média do

peso dos fetos dos animais do grupo controle, que foi de 1,702 g. A diferença da média de peso dos fetos entre os dois grupos resultou em uma diferença estatisticamente significativa.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, onde se demonstrou que a administração de sucralose, ocasiona diminuição do peso fetal e redução do comprimento do cordão umbilical, pode-se inferir que provavelmente houve efetiva passagem do edulcorante sucralose através da membrana placentária, resultado também observado no trabalho de MacNeil.⁽²⁶⁾

Várias pesquisas com outros edulcorantes apontaram resultados semelhantes, mostrando que a placenta é permeável à maioria dos adoçantes, ocasionando diminuição do peso placentário, do tamanho do cordão umbilical, assim como do peso fetal, além de efeitos toxicológicos em tecidos e órgãos.^(43;45-47;71)

Trabalhos recentes, que levaram em consideração os efeitos morfométricos com administração de ciclamato de sódio e do aspartame em ratas prenhas, evidenciaram a ocorrência de alterações nucleares na camada esponjosa da placenta, com papel endócrino importante durante a gravidez, desse modo podendo levar à diminuição do estrógeno, responsável pelo crescimento e multiplicação celular fetal, concorrendo, dessa maneira, para alterações no crescimento do feto.

De um modo geral, a ingestão de adoçantes parece ter efeito tóxico sobre a placenta, provocando alterações não só nas funções placentárias, como também no peso fetal.⁽⁷¹⁾

Sabe-se, também, que administração e/ou ingestão de substâncias, assim como a ocorrência de algumas doenças, podem provocar a liberação de inúmeras substâncias solúveis e radicais livres de oxigênio na circulação materna. Essas substâncias, uma vez liberadas, causariam uma disfunção endotelial sistêmica,

podendo ocasionar um menor desenvolvimento placentário com conseqüente diminuição do seu fluxo sanguíneo, resultando, ao final, em hipóxia fetal e restrição de crescimento fetal (crescimento intra-uterino retardado). O resultado da liberação dessas substâncias ocasionariam um menor desenvolvimento fetal, além de seu baixo peso.

Resultados semelhantes são encontrados em humanos, mais especificamente nas toxemias grávidas (Doença Hipertensiva Específica da Gravidez), que possivelmente decorrem de infartos placentários com menor crescimento da placenta com sinais de sofrimento, por constrição das arteríolas do sistema viloso terciário, ocasionando, também, diminuição placentária e fetal.^(87;88)

Portanto, a administração de sucralose do 10º ao 14º dia de prenhez, associada à provável permeabilidade da placenta, ocasionou uma diminuição do peso da placenta (tabela 2), possivelmente por alterações circulatórias e endócrinas da mesma, com diminuição do fluxo sanguíneo e menor desenvolvimento placentário, com conseqüente diminuição do peso do feto (tabela 1).

4.3.2. Cordão umbilical

Nesta pesquisa, a média do comprimento do cordão umbilical (tabela 3), das ratas tratadas com sucralose foi de 1,55 cm, tamanho inferior à média do comprimento do cordão umbilical apresentada no grupo controle, de 1,83 cm. Essa diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado.

Portanto, nesta pesquisa, demonstrou-se que a administração de sucralose acarretou menor desenvolvimento fetal intra-uterino, com provável diminuição dos movimentos fetais e conseqüente redução do comprimento do cordão umbilical.⁽⁸⁹⁾

Semelhantes resultados foram encontrados, em recentes trabalhos, com edulcorantes, demonstrando que o comprimento do cordão umbilical é usado como indicador de movimentação fetal, ou seja, seu cumprimento é influenciado pela boa movimentação fetal e pelo espaço adequado de cavidade uterina. A diminuição do espaço ou a diminuição dos movimentos acarretarão a diminuição da elasticidade e conseqüente redução do tamanho do mesmo. Todos esses trabalhos concluíram pela diminuição do peso do feto, além da redução do comprimento do cordão umbilical. ^(43;45-47;71;90)

Na literatura, diversas outras pesquisas, com diversas outras substâncias, mostraram esses mesmos efeitos, dentre as quais se pode destacar: Brandini⁽⁹¹⁾, que avaliou o efeito de exposição da gestante ao álcool e seus efeitos no cordão umbilical; Oliveira⁽⁹²⁾, que, em sua tese, estudou o mesmo efeito do álcool e suas alterações no palato, língua e glândula submandibular de fetos de ratos, demonstrando a diminuição do tamanho do cordão umbilical; Calvano⁽⁹³⁾, que estudou o tamanho do cordão umbilical e sua correlação com a utilização de álcool; Barron⁽⁹⁴⁾, que avaliou o efeito do álcool, na gestação, sobre o tamanho do cordão umbilical. Além desses, outros trabalhos foram realizados, cujos resultados obtidos indicaram a ocorrência de efeitos sobre o tamanho do cordão umbilical, tais como o de Cunha⁽⁹⁵⁾, com administração de altas doses de Vitamina A; Leão⁽⁹⁶⁾, que utilizou restrição protéica durante a gravidez; Lopes⁽⁹⁷⁾, com administração de metilmercúrio; Oliveira⁽⁹⁸⁾, que utilizou a hiperterminia e observou seus efeitos na placenta e cordão umbilical; e Liedtke⁽⁹⁹⁾, que, em 1995, utilizou a administração de ciclofosfamida em ratas prenhe e realizou avaliação morfométrica. Em todas essas pesquisas, verificou-se a redução do tamanho do cordão umbilical.

Portanto, a ocorrência do cordão umbilical de tamanho reduzido se mostra associada a diversas condições e exposições intra-uterinas que podem diminuir o desenvolvimento do útero, assim como a atividade do feto, incluindo oligoâmnio, ruptura de membrana e anomalias estruturais do útero. ^(100 -102)

Existem diversas substâncias, dentre elas os β bloqueadores, que também estão associadas à diminuição do comprimento do cordão umbilical. ⁽¹⁰³⁾

Embora a patogênese do cordão umbilical curto permaneça obscura, é conhecido que a sua extensão é fator importante para a compressão intra-uterina. ^(100;102)

Outros estudos têm descrito complicações associadas ao cordão umbilical curto, incluindo descolamento de placenta, trabalho de parto prolongado e estresse fetal. ⁽¹⁰⁴⁾

Conclui-se que a diminuição do peso da placenta e fetal possivelmente ocorreram por retardo no desenvolvimento da placenta, com conseqüente menor crescimento fetal intra-uterino por conta da diminuição da cavidade uterina, reafirmado pela diminuição do comprimento do cordão umbilical no grupo tratado. É descrito que o cordão umbilical cresce na medida da atuação de forças tensoras, que dependem do movimento fetal e do espaço disponível durante o desenvolvimento. Essa diminuição ocorreu por restrição dos movimentos fetais, com conseqüente menor desenvolvimento fetal. ⁽⁸⁹⁾ Desse modo, pode-se inferir que a diminuição do cordão umbilical constatada neste estudo ocorreu por diminuição de movimentação fetal durante a gestação.

4.5. Rim fetal

Para estudos que envolvam a organogênese, o rim de ratos e camundongos é muito utilizado, pois é um excelente modelo experimental clássico, baseado em suas características anatômicas e seu fácil manuseio, ele vêm sendo utilizados para experimentos a partir da década de 50 e 60, pois seu desenvolvimento é muito próximo às condições presenciadas no ser humano, com a formação em série dos pró-néfrons e meso-néfrons, que são estruturas vestigiais do tubo nefrogênico de caráter transitório, e dos meta-néfrons, formando o rim funcional após o nascimento.

Inúmeras substâncias podem alterar tanto seu crescimento quanto seu desenvolvimento funcional anatômico/embrionário, e por intermédio de moléculas reguladoras, podem desencadear interferências na morfogênese renal.^(105; 106)

O termo toxicologia é utilizado para estudar efeitos adversos de substâncias químicas sobre os organismos. Conforme a época da administração, poderão causar efeitos adversos e até malformações congênitas. A ação teratogênica de uma substância depende: 1. da fase do desenvolvimento embrionário, que determina a susceptibilidade a fatores teratogênicos: se age nas primeiras fases do desenvolvimento, conseqüentemente lesa a maior parte das células do embrião, levando à morte ou as potencialidades reguladoras do embrião compensam a perda, sem anomalias aparentes; 2. do efeito teratogênico, que por sua vez depende do genótipo – instabilidade genética; 3. do agente teratogênico, que age de modo específico em um aspecto particular do metabolismo: muitos agentes agem de modo característico quando aplicados a diferentes espécies. Nesta pesquisa, foi administração de sucralose na dose de 30 mg/kg de peso, via gavagem, do 10^o ao 14^o

dia de prenhez, teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos toxicológicos no desenvolvimento das estruturas do rim fetal.

Qualquer substância ou agente físico, quer em excesso, quer em falta durante toda a vida fetal, pode induzir perturbações na estrutura e/ou função estudada; são conhecidos como agentes teratogênicos, podendo, desse modo, induzir morte, reabsorções, malformações e até redução do peso fetal.⁽¹⁰⁷⁾

O edulcorante sucralose é uma substância química e, como tal, pode ser classificado como agente potencialmente teratogênico, ou seja, quando o embrião é exposto a ele e, eventualmente, dependendo da dose, poderá apresentar algumas alterações, tal como ocorreu com a talidomida: amelia, focomelia, atresia intestinal e malformações cardíacas; quinino: surdez congênita e aminopterina, anencefalia, meningomielocela, hidrocefalia e fenda labial; e/ou agentes supostamente teratogênicos, como: progestágenos sintéticos, cortisona, anticonvulsivante.^(80,108)

O período embriogênico da rata Wistar inicia-se no 5º dia após a prenhez (linha primitiva) e termina 8 a 9 dias após (14º a 15º dias após – *sperm day*), sendo este o período de maior susceptibilidade a agentes potencialmente teratogênicos. Em ratos, a nefrogênese inicia-se do 8º ao 9º dias de vida, e os rins começam a ascender por volta do 15º ao 16º dia.^(34,109;110)

Em humanos, a nefrogênese inicia-se durante a quinta semana de gestação culminando entre a 32ª e a 36ª semana.⁽¹¹¹⁾

O presente estudo avaliou os potenciais efeitos nefrotóxicos, utilizando a técnica morfométrica, determinados pela sucralose nas estruturas renais: glomérulo, túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e túbulo e ducto coletor.

Justifica-se este estudo, pois, além de inédito, trata-se de um adoçante com características de alta solubilidade da sucralose na água⁽¹⁹⁾, o que facilitaria sua

passagem pela membrana, corroborada pelo estudos de MacNeil⁽²⁵⁾. Trata-se de um edulcorante recente, pouco estudado, mas cujo consumo vem aumentando, basicamente em alimentos e refrigerantes *diet/light*.

Conhecendo-se que a IDA da sucralose em humanos é de 15 mg/kg peso/dia⁽¹⁰⁾ e baseando-se nos estudos de MacNeil⁽²⁶⁾ de que haveria difusão da sucralose ou de seus metabólicos pela membrana placentária, vários autores realizaram investigações para avaliar seus possíveis efeitos teratológicos deste, com diferentes dosagens e vias de administração. Neste trabalho, utilizou-se sucralose na dose de 100%, acima do preconizado pela IDA, 30 mg/kg dia, via gavage.

Segundo estudos em animais, assim como no homem, concluiu-se que o perfil de eliminação da sucralose em humanos é semelhante ao encontrado em ratos, cães e camundongos, porém a excreção urinária no rato é metade da encontrada no homem, enquanto a eliminação pelas fezes é mais alta nesses animais.^(19,24) Desse modo, os estudos farmacocinéticos mostraram que, se administrada via endovenosa, 80% são excretados pela urina e 15% a 20%, eliminados pelas fezes; ao contrário, se administrado por via oral, 85% da sucralose não é absorvidos, sendo excretados intactos nas fezes, e os limites de absorção por difusão passiva se aproximam de 15% da dose consumida.⁽³²⁾

Em relação aos seus metabólitos, 4-CG e o 1,6-DCF, resultados da hidrólise da sucralose, estudos indicam que são mais rapidamente absorvidos. O 4-CG é excretado de forma intacta na urina, enquanto o 1,6-DCF segue dois caminhos metabólicos principais: redução para 1,6 dichloromannitol, excretado rapidamente e de forma inalterada na urina, ou conjugado com glutathione.⁽¹¹⁾

4.5.1. Glomérulo

A estrutura do rim é formada, em média, por 1 milhão de néfrons, que diminuem com a idade e não podem ser regenerados. Cada néfron é formado por um corpúsculo renal, composto por um glomérulo capilar envolto pela cápsula de Bowman, além de uma estrutura em forma tubular. O glomérulo renal (figura 3) é formado por grupo de capilares enovelados a partir da arteríola aferente, que se subdivide em 20 a 40 capilares, sustentados por células mesangiais, cuja função é fagocitar; possui, também, receptores hormonais; no final, as alças capilares se unem e formam a arteríola eferente do glomérulo.

O filtrado glomerular ultrapassa a barreira de filtração endotelial, formado por fendas de filtração (podócitos) e membrana basal, a qual determina tanto as propriedades de permeabilidade do glomérulo, quanto a composição do filtrado.⁽³⁶⁾

Uma vez o filtrado glomerular presente na Cápsula de Bowman, o fluido é desprovido de elementos celulares e quase livre de proteínas⁽³⁷⁾, tendo composição de sal e moléculas orgânicas, como glicose e aminoácidos, muito semelhantes ao plasma. Portanto, a taxa de filtração glomerular é que permite ao rim remover produtos indesejáveis, cuja maioria é pouco reabsorvida nos túbulos renais.⁽³⁵⁾

O presente estudo avaliou o volume dos glomérulos (tabela 4) e demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratado.

Estudos realizados com outros edulcorantes, como os de Arruda⁽¹¹²⁾, em cujo experimento foi administrado ciclamato de sódio na dose 60 mg/kg peso em ratas prenhas por via intraperitoneal do décimo ao décimo quarto dia de prenhez, com sacrifício das ratas e obtenção dos fetos, e cujos rins, após obtidos e

analisados pelo estudo morfométrico, mostraram, em relação ao volume dos núcleos das células dos glomérulos, haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado, sugerindo nefrotoxicidade, ocasionada pelo edulcorante ciclamato.

Em dois estudos, Martins^(113,114) administrou por sonda orogástrica, aspartame na dose de 14 mg/kg de peso, do 9º ao 11º dias de prenhez, com aspartame à temperatura ambiente e aspartame aquecido a 40º. Em relação ao parâmetro volume dos núcleos das células dos glomérulos, entre o grupo controle e o tratado, à temperatura ambiente, o grupo tratado com aspartame diluído à temperatura de 40º apresentou diferença estatisticamente significativa, o que levou a concluir haver nefrotoxicidade.

4.5.2. Túbulo renais

O filtrado, a partir da cápsula de Bowman, flui para o túbulo contorcido proximal, e deste para a alça de Henle, localizada na medular renal, sendo esta formada por uma segmento descendente e ascendente, cuja que a maioria é conhecida como segmento fino da alça de Henle. Parte desta alça retorna à cortical, suas paredes se tornam espessas, e ele passa a ser conhecido como segmento espesso do ramo ascendente.

O epitélio cúbico simples, que reveste os túbulos proximais, contém células com núcleo redondo, sendo seu citoplasma rico em mitocôndrias e contém aparelho de Golgi ao redor do núcleo; essas células, mostradas na figura 4, separam a luz do lúmen tubular dos capilares peritubulares, cujo citoplasma contém ribossomas livres, presença de microtúbulos e inúmeros canalículos no polo apical da célula. A

membrana apical possui extensas áreas de microvilosidades, cuja função é multiplicar a superfície de traças das membranas em até 20 vezes. A membrana basolateral ou peritubular é aumentada por inúmeras dobras e prolongamentos laterais.^(36,115)

A sucralose, uma vez filtrada nos glomérulos e tendo passado para a primeira porção do TCP (S1), tendo sido em parte reabsorvida principalmente nesta porção (S1) onde as microvilosidades da membrana luminal são mais desenvolvidas, disponibiliza maior área para reabsorção de substâncias. Provavelmente por mecanismos semelhantes ao de glicose e aminoácidos, basicamente o transporte ativo secundário, onde a energia liberada pela proteína transportadora de membrana presente em grande quantidade na borda em escova, que ao transportar outra substância (difusão passiva) cria um gradiente eletroquímico para o interior das células, e desse modo fornece energia para o transporte ativo simultâneo de glicose, aminoácidos e outros solutos através da membrana luminal.

Esse mecanismo possibilita, desse modo, o transporte de solutos, enzimas, íons e substâncias que passam para o líquido intersticial, fazendo com que estes sejam quase totalmente removidas desse segmento.⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾

É muito provável que parte da sucralose seja removida por esse mecanismo e/ou outros mecanismos ativos, a pinocitose. Caso a primeira porção do TCP deixe de reabsorver, os outros segmentos (S2 e S3), que também realizam essa atividade, porém com menor intensidade, até por suas limitações histológicas (tais como altura da bordadura menor, menor número de dobras da membrana basolateral, associado à diminuição do número e tamanho das mitocôndrias), compensam essa função.^(36,115)

Na literatura científica atual, não há referências a artigos que analisaram alterações cariométricas em estruturas renais (Glomérulo, TCP, TCD e DC) com a administração de sucralose.

Uma vez reabsorvida para o interior das células, a sucralose, altera o metabolismo celular destas, modificando sua estrutura nuclear, demonstrada nesta pesquisa, através de mudanças nos parâmetros núcleos das células dos túbulos contorcidos proximais, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Tais alterações ocorreram tanto nos parâmetros cariométricos relacionados ao tamanho do núcleo (diâmetro maior, diâmetro menor, diâmetro médio), como na relação D/d, volume, área e relação V/A. Em relação aos parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, relacionados à forma do núcleo, também se encontram alterados, quando se comparam o grupo controle e o tratado.

O tamanho do núcleo reflete o estado funcional das células. Ao se comparar células em repouso com células em plena atividade fisiológica, estas se apresentam com aumento do seu volume nuclear. Este aumento deve-se, provavelmente, à descondensação gênica para transcrição (DNA/RNA) e aumento das atividades nucleares para síntese de ribossomos, visando à síntese protéica, indispensável para as atividades metabólicas. Portanto as alterações detectadas nesta pesquisa, confirmadas pelos aumentos de todos os parâmetros nucleares, refletem, muito provavelmente, um metabolismo celular aumentado, ocasionando modificações na síntese de DNA, RNA e/ou proteínas relacionadas à manutenção do ciclo celular.

(120-122)

Há trabalhos semelhantes com morfometria, onde Arruda ⁽¹¹²⁾ administrou, por via intraperitoneal, ciclamato de sódio na dose 60 mg/kg peso, do décimo ao

décimo quarto dia de prenhez, com sacrifício das ratas e obtenção dos fetos, dos quais foram tomados os rins e, após realizado o estudo morfométrico em relação ao túbulo contorcido proximal em rim fetal, encontrou diferença estatisticamente significativa no diâmetro maior, diâmetro menor, diâmetro médio, volume, área, perímetro e relação volume/área.

Estudos de Martins, ^(113, 114) trabalhando com rim fetal, também utilizou a morfometria, trabalhando com o edulcorante aspartame à temperatura ambiente e aquecido e diluído a temperatura de 40°, que foi administrado em ratas prenhas na dose de 14 mg/kg peso, do 9º ao 11º dias da prenhez. Em relação ao grupo controle e tratado com aspartame à temperatura ambiente, houve diferença estatisticamente significativa em relação à mediana, área, relação volume/área e perímetro. Quando comparado o grupo controle com o grupo tratado com aspartame aquecido e diluído a 40°, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros média dos diâmetros, volume, área, perímetro e média volume sobre área. Este trabalho sugere haver nefrotoxicidade entre os grupos controle e tratado em alguns parâmetros, quando avaliados por cariometria.

Portanto, nesta pesquisa, foi possível, através da técnica morfométrica, demonstrar, de forma inédita, haver alterações de todos os parâmetros morfométricos dos núcleos de células do túbulo contorcido proximal nos fetos de ratas submetidas à ingestão de sucralose. Esta pesquisa sugere que tais alterações foram induzidas pela sucralose, com fortes indícios de nefrotoxicidade.

Após o filtrado alcançar a alça de Henle, localizada na medular renal e constituída por um segmento descendente e ascendente, cuja maior parte é conhecida como segmento fino da alça de Henle, parte dessa alça retorna à cortical, e suas paredes se tornam espessas; é o segmento espesso do ramo ascendente.

No final da alça de Henle ascendente espessa existe um segmento curto, a mácula densa, sendo uma dependência do túbulo contorcido proximal, cuja função é controlar a filtração do néfron, a partir da qual o líquido do filtrado entra no túbulo contorcido distal convoluto, cujas paredes estão próximas ao glomérulo, arteríola aferente e eferente do qual faz parte. A junção dessas três estruturas forma o aparelho justa glomerular, principal local de controle filtração glomerular, pela secreção de renina, controlando, desse modo, o ritmo de filtração glomerular e regulação da pressão arterial sanguínea. Em continuidade ao aparelho justaglomerular, segue o túbulo distal final, segmento de conexão e coletores medulares.^(35, 36)

Na sua parte convoluta, as células do túbulo contorcido distal são cúbicas; na sua parte apical, apresenta-se com poucos microvilos e citoplasma com inúmeras e largas mitocôndrias; a sua parte final tem mitocôndrias menores e menos numerosas. Na sua parte basolateral, existem pregas que se encaixam em células vizinhas.

A estrutura celular desse segmento está representada na figura 5, e sua avaliação morfométrica mostrou alterações nucleares com diferença estatisticamente significativa nos seguintes parâmetros: diâmetro maior, diâmetro menor, diâmetro médio, volume, área, perímetro, relação V/A e coeficiente de forma. Em relação aos parâmetros relação D/d, excentricidade e índice de contorno, não houve diferença estatisticamente significativa, sugerindo haver ação da sucralose, com alterações tóxicas dos núcleos das células desse segmento, provavelmente por um aumento do metabolismo celular induzido pela ação da sucralose.^(35, 36)

Trabalho com metodologia semelhante, com o edulcorante ciclamato de sódio em rim fetal evidenciou alterações nos núcleos dos túbulos distais, com

diferença estatisticamente significativa, nos parâmetros diâmetro maior, menor, volume, área, perímetro, relação volume/área⁽¹¹²⁾.

Semelhante pesquisa com aspartame em rim fetal^(113,114), com avaliação por morfometria e estereologia, detectou alterações nos parâmetros nucleares, quando se compararam os grupos controle e tratado com aspartame à temperatura ambiente; houve significância estatística no diâmetro maior, diâmetro menor, diâmetro médio, relação entre os diâmetros, volume, área, perímetro, relação volume/área, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno. Se comparado o grupo controle com o grupo tratado com aspartame aquecido, mostrou diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros, a exceção da excentricidade, índice de contorno e coeficiente de forma.

Ao túbulo distal, localizado na cortical, seguem-se o ducto coletor cortical, que, ao se juntarem em grupo de 8 a 10 dutos, formam um ducto maior. Este, ao se dirigir para a medular, recebe o nome de ducto coletor medular, que vai aumentando em número e calibre e termina na pélvis renal. Em cada rim existem 250 grandes ductos coletores, e cada um é responsável pela coleta de 4 mil néfrons.^(35, 36)

Os ductos coletores apresentam-se com células cubóides (tabela 6) no córtex; à medida que caminham para a região medular, passam a apresentar células colunares, aumentando seu diâmetro. Apresentam dois tipos de células, as principais ou claras (70%), responsáveis pela reabsorção de sódio e secreção de potássio, e as células intercalares ou escuras, que significam 30%.

Nesta pesquisa, com a administração da sucralose por gavagem, não houve alterações nos parâmetros nucleares avaliadas por morfometria (tabela 13 a 16) comprovando que, no ducto coletor, não existem efeitos tóxicos da sucralose, confirmando a literatura que mostra que este segmento do néfron é, basicamente,

responsável pela reabsorção de água, permitindo que o fluído tubular entre em homeostase com o interstício.⁽³⁶⁾

Pesquisa com edulcorante ciclamato de sódio no rim fetal mostrou alterações nos parâmetros nucleares, das células do ducto coletor: diâmetro maior, menor, diâmetro médio, volume, área, perímetro, relação volume/área, com diferença estatisticamente significativa⁽¹¹²⁾

Semelhante pesquisa, com administração de aspartame no período organogênico, e comparados os grupos controle e o grupo tratado com aspartame à temperatura ambiente, houve alteração, com diferença estatisticamente significativa somente do parâmetro volume; no entanto, ao se compararem os grupos controle e tratado com aspartame aquecido, alteraram-se os parâmetros diâmetro maior, diâmetro médio, volume, área, perímetro, relação volume/área e índice de contorno, com diferença estatisticamente significativa.⁽¹¹³⁻¹¹⁴⁾

Tais alterações nos parâmetros nucleares não seriam esperadas, pois os ductos coletores reabsorvem apenas sódio e cloro e secretam amônia. No entanto eles podem tanto reabsorver como secretar potássio, hidrogênio e bicarbonato. Sua função mais importante é reabsorver água sob ação do hormônio antidiurético, determinando que o fluído tubular entre em equilíbrio osmótico com o interstício.⁽³⁶⁾

O ineditismo desta tese, embora desejável, traz dificuldades para a argumentação comparativa na sua discussão, por não haver trabalhos, em morfometria, com o edulcorante sucralose; portanto, como se percebe nesta discussão, esta pesquisa procura comparar morfometria na sucralose com morfometria em outros edulcorantes, além do efeito da sucralose em diversas estruturas renais, avaliadas clinicamente e/ou histopatologicamente.

A seguir, serão mostrados diversos estudos com sucralose. Na utilização de produtos de hidrólise da sucralose em ratas, na dose de 270 mg/kg de peso, existem evidências de possível toxicidade materna, com menor desenvolvimento fetal, somente em doses muito acima das recomendadas. No entanto, nenhum desses experimentos evidenciou significância estatística, a ponto de comprometer a saúde humana.⁽¹¹⁾

Fin e Lord⁽²⁵⁾ avaliaram a possível neurotoxicidade com sucralose, produtos de hidrólise e 6 CG, utilizado por ter estrutura semelhante ao 4CG (metabólico da sucralose), com doses de 1000 mg/kg peso diário por 21 a 28 dias. Não evidenciaram nenhuma alteração no SNC, mostrando, também, não existir possibilidade da sucralose e do metabólico 1-6 DCF serem metabolizados a 6CG. Portanto, nos trabalhos que apresentam resultados sugerindo nefrotoxicidade e neurotoxicidade, nenhum deles apresentou diferença estatisticamente significativa.

Outros estudos com camundongo, durante um período de 2 anos, mostraram um aumento de nefropatia crônica, com diferença estatisticamente significativa somente nos camundongos do grupo tratado com altas doses de sucralose, porém sem alterações em ratos, cães e macacos, alimentados com a mesma dose.⁽¹¹⁾ Avaliando a oncogênese em ratos submetidos a tratamento com dose de 1% a 3% de sucralose, detectou-se um aumento da incidência de mineralização renal, com hiperplasia epitelial da pelvis renal.²⁷ Avaliando-se a toxicidade aguda em camundongos machos e fêmeas com dieta de 5% de sucralose, administrada por via oral durante 4 semanas, houve diminuição de linfócitos, aumento da excreção de cálcio e magnésio sem diferença estatisticamente significativa, porém com diminuição significativa do volume urinário, possivelmente secundário à diminuição do consumo de alimento ou

consumo em larga escala de dieta não nutritiva, de baixa absorção e osmoticamente ativa.⁽³⁰⁾

No mesmo estudo, avaliando a toxicidade subcrônica, administraram-se, por gavagem, doses de 750, 1500 e 3000 mg/kg peso/dia em ratos machos e fêmeas por 26 semanas, investigando-se as dietas e suas respectivas toxicidades. Na dieta de 3000 mg/kg peso/dia por 26 semanas, parece haver aumento relativo do peso do rim, assim como da distensibilidade e peso do ceco³⁰

Mann⁽³¹⁾, administrando, doses de 0,3%, 1% e 3% de sucralose, por 52 a 78 semanas, em ratos “Sprague Dawley” para avaliação da toxicidade crônica e potencial carcinogênico, respectivamente, encontrou, nas fêmeas do grupo tratado com dose intermediária, mineralização e hiperplasia epitelial da pélvis renal, além de degeneração hemorrágica na cortical adrenal, em machos e fêmeas tratadas com altas doses.

Um dos trabalhos da “Opinion of the Scientific Committee on Food Sucralose”, com dieta crônica de sucralose, por 2 a 13 semanas, detectou ganho de peso, aumento do rim e diminuição do baço. Portanto, carece-se de trabalhos que avaliem a estrutura glomerular de filtração, mais especificamente o glomérulo, com a administração de sucralose.⁽³²⁾

Em estudos de carcinogênese realizados com camundongos durante 2 anos, Lord e Newberne⁽³³⁾ detectaram, ainda, um aumento da incidência de nefropatia crônica, quando comparado o grupo tratado com o grupo controle, mostrou diferença estatisticamente significativa apenas nas ratas do grupo tratado com alta dose de sucralose.

Mann⁽³¹⁾, trabalhando com toxicidade crônica e potencial carcinogênico em relação aos achados não neoplásicos, observou um aumento da incidência de

mineralização e hiperplasia epitelial da pelve renal em fêmeas de ratos submetidas a tratamento com doses de 1 a 3% de sucralose.

Nesta pesquisa, a técnica da morfométrica foi de grande utilidade para demonstrar alterações nos parâmetros nucleares das estruturas renais, induzidas pela sucralose no rim fetal em desenvolvimento. Pelos resultados, pode-se sugerir que houve alterações nas diversas estruturas desse órgão, além de permitir a conclusão de que existe passagem de sucralose através da membrana placentária, semelhante ao detectado por MacNeil.⁽²⁶⁾

Pôde-se, também, demonstrar que a sucralose altera o peso fetal, peso placentário e comprimento do cordão umbilical, além de alterar o metabolismo celular das células do túbulo contorcido proximal e distal, sugerido através da alteração dos parâmetros nucleares, principalmente do volume. Este estudo demonstra, também, que a utilização do edulcorante sucralose em doses acima da recomendada, no período embriogênico, poderá causar efeitos toxicológicos em diversas estruturas do corpo humano, especialmente o rim. Portanto seu uso deve ser restringido durante a gestação, principalmente no período embriogênico.

Deve-se ainda, demonstrar, através de novas pesquisas, o mecanismo pelo qual o edulcorante sucralose determina alterações nucleares nas estruturas renais, além de redução do peso fetal, placentário e diminuição do cordão umbilical, detectadas neste estudo, além de avaliação mais acurada das alterações histopatológicas desses núcleos. Trabalhos futuros poderão demonstrar se os efeitos causados pela sucralose nos fetos são definitivos ou temporários. Devemos também, no futuro avaliar se o edulcorante sucralose pode agravar a nefropatia diabética.

Cabe salientar que pesquisas em humanos se fazem necessárias, uma vez que a excreção urinária de sucralose, no humano, é o dobro que a observada nos ratos^(19,24), sugerindo que os efeitos tóxicos no homem possivelmente poderão ser menores.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O edulcorante sucralose administrado “via gavagem” em ratas do 10^o ao 14^o dias de prenhez, na dose de 30 mg/kg de peso, causa:

- ✓ Redução no peso fetal e comprimento do cordão umbilical, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$);
- ✓ Aumento de todos os parâmetros cariométricos dos núcleos das células dos túbulos contorcidos proximais (diâmetro maior, menor, relação D/d, perímetro, volume, área, relação V/A, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) assim como a maioria dos parâmetros dos túbulos contorcidos distais (diâmetro maior, menor, médio, perímetro, volume, área, relação V/A e coeficiente de forma), nos fetos submetidos a ingestão de sucralose, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Essas alterações sugerem:

1. Passagem da sucralose pela membrana placentária, com efeitos sobre o sistema reprodutivo;
2. Indícios de efeitos nefrotóxicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campos MB. Sucralose: a revolução em adoçantes. *Food Ingredients* 2000;17:18-21.
2. Pachione R. Indústria do diet engorda as vendas. *Rev Quím Derivados*. 2003;419(1):38-50.
3. Lopes HF, Drager LF. Doenças cardiovasculares: obesidade e síndrome metabólica. In: Lopes AC, editor. *Tratado de clínica médica*. São Paulo: Roca; 2006. p. 712-27.
4. Ono T, Guthold R, Strong K. *WHO Global Comparable Estimates*. Genebra: WHO; 2005.
5. Candido LMB, Campos AM. *Alimentos para fins especiais: dietéticos*. São Paulo: Livraria Varela; 1995.
6. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. *Informação Nutricional Complementar*. Portaria n° 27, de 13 de janeiro de 1998. Brasília (DF): Publicado no Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Jan 15, Sec. 1, p. 29514.
7. Ophardt CE. Sections: sweet receptor site, aspartame, saccharine, and sucralose. *Virtual Chembook*. 2003.

8. Frank, G. Sucralose: an overview. URJHS [periódico na Internet]. 2002 [acesso em 2010 Apr 25]:[aproximadamente 13 p.]. Disponível em: <<http://www.kon.org/urc/frank.html>>.
9. Knight I. The development and applications of sucralose, a new high-intensity sweetener. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72(4):435-9.
10. Godsmith LA, Meckel CM. Sucralose. In: Nabors, L O'Brien, editor. *Alternative sweeteners*. 3ª ed. New York: Marcel Dekker; 2001. p.185-207.
11. Grice HC, Goldsmith LA. Sucralose: an overview of the toxicity data. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(Suppl 2):1-6.
12. Binns NM. Sucralose:alt sweeteners and light. *Nutr Bull BNF*. 2003;29(1):53-8.
13. Berndt RL, Jackson G. Stability of sucralose in backed goods. *Foods Technol*. 1990;44(1):62-6.
14. Grotz VL, Mandel LD. Dental considerations in sucralose use. *J Clin Dent*. 2002;13(3):116-8.
15. Whitmore A. FDA approves new high-intensity sweeteners sucralose. *FDA Talk Paper*. 1998;T98-16:202-5.

16. Department of Health and Human Services. Food and drug administration. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: sucralose. Federal Register. 1999;64(155):43908-9.
17. Splenda Brand. Sucralose a scientific and safety review. Washington: McNeil Nutritional; 2007.
18. Campos MB. Aplicação de sucralose em iogurtes e preparados de frutas para iogurtes. Food Ingredients. 2002;19:68-71.
19. Roberts A, Renwick AG, Sims J, Snodin DJ. Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. Food Chem Toxicol. 2000;38(Suppl 2):S31-41.
20. Sims J, Roberts A, Daniel JW, Renwick AG. The metabolic fate of sucralose in rats. Food Chem Toxicol. 2000;38 (Suppl 2):S115-21.
21. John BA, Wood SG, Hawkins DR. The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the rabbit. Food Chem Toxicol. 2000;38(Suppl 2):S111-3.
22. John BA, Wood SG, Hawkins DR. The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the mouse. Food Chem Toxicol. 2000;38(Suppl 2):S107-10.
23. Wood SG, John BA, Hawkins DR. The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the dog. Food Chem Toxicol. 2000;38(Suppl 2):S99-106

24. Sham WS. A safe and sweet alternative to sugar: splenda. Nutrition Bites. 2005;10(2):1-5.
25. Finn JP, Lord GH. Neurotoxicity studies on sucralose and its hydrolysis products with special reference to histopathologic and ultrastructural changes. Food Chem Toxicol. 2000;38(Suppl 2):7-17.
26. McNeil Specialty Products Company. Food Additive Petition 7A3987. Sucralose food additive. Federal Register [periódico na Internet]. 1998 Abr Abr [acesso em 2010 Abril 25];63(64):[aproximadamente 17 p.]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/040398a.pdf>>.
27. Houghes HM, Powell GM, Snodin DJ, Daniel JW, Crawford A, Sanders JKM, et al. Glutathion-dependant dechlorination of 1,6-dichloro-1,6-dideoxyfructose. Biochem J. 1989;259(2):537-48.
28. Brusick D. Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. Environ Mutagen. 1986;8(6):879-86.
29. Cifone MA. Relationship between increases in the mutant frequency in L5178Y TK+ /y mouse lymphoma cells at low pH and metabolic activation. Environ Mutagen. 1985;7(Supl 3):27.

30. Goldsmith LA. Acute and subchronic toxicity of sucralose. *Food Chem Toxicol.* 2000;38(Suppl 2):53-69.
31. Mann SW, Yuschak MM, Amyes SJG, Aughton P, Finn JP. A combined chronic toxicity / carcinogenicity study of sucralose in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2000;38(Suppl 2):71-89.
32. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General [homepage na Internet]. Brussels; 2000 [acesso em 2010 Abri; 25]. Opinion of the Scientific Committee on food on sucralose; [aproximadamente 25 telas]. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf>.
33. Lord GH, Newberne PN. Renal mineralization- a ubiquitous lesion in chronic rat studies. *Food Chemical Toxicol.* 1990;28(6):449-55.
34. Beaudoin AR. Embryology and teratology. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editores. *The laboratory rat: biology and diseases*. New York: Academic Press; 1980. p. 75-101.
35. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 327-338
36. Aires MM. Visão morfofuncional do rim. In: Aires MM. *Fisiologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 679-92.

37. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Transporte de solutos e água ao longo do nefro: função tubular. In: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA Fisiologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 683-99.
38. Larsen EH, Willumsen NJ, Møbjerg N, Sørensen JN. The lateral intercellular space as osmotic coupling compartment in isotonic transport. Oxford: *Acta Physiol. (Oxf)*. 2009;195(1):171- 86.
39. Loo DD, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(23):13367-70.
40. Meinild A, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. The human Na⁺.glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol*. 1998;508(Pt 1):15-21.
41. Larsen EH, Møbjerg N, Sørensen JN. Fluid transport and ion fluxes in mammalian kidney proximal tubule: a model analysis of isotonic transport. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006;187(1-2):177-89.
42. Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, Klaerke DA. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol*. 2001;531(Pt 3):631-44.
43. Arruda JGF, Martins AT, Azoubel R. Ciclamato de sódio e rim fetal. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2003;3(2):147-50.

44. Portela GS, Azoubel R. Nefrotoxicidade fetal com o uso da amicacina. Estudo cariométrico. *J Bras Nefrol.* 2004;26(1):12-8.
45. Martins AT, Azoubel R, Lopes RA, Di Matteo MAS, Arruda JGF. Efectos del ciclamato de sódio en el hígado fetal de ratas: estudios cariométrico y estereológico. *Int J Morphol.* 2005;23(3):221-6.
46. De Matos MA, Martins AT, Azoubel R. Efectos del ciclamato de sodio en la placenta de rata: estudio morfométrico. *Int J Morphol.* 2006;24(2):137-42.
47. Portela GS, Azoubel R, Batigália F. Effects of aspartame on maternal-fetal and placental weights, length of umbilical cord and fetal liver: a kariometric experimental study. *Int J Morphol.* 2007;25(3):549-54.
48. Kille JW, Tesh JM, Mcanulty PA, Ross FW, Willoughby CR, Bailey GP, et al. Sucralose: assessment of teratogenic potential in the rat and rabbit. *Food Chem Toxicol.* 2000;38(Suppl 2):42-52.
49. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para Histologia normal e patológica. São Paulo: Manole; 2005.
50. Harkema JR. Morphometric methods for studying airway cell density/Proliferation. São Francisco: American Thoracic Society. American Lung Association. Postgraduate Course 3; 1997.

51. Mandarim-de-Lacerda CA. Estereologia e urologia: volume nuclear médio ponderado na classificação e prognóstico de tumores. *J Bras Urol.* 1999;25(2):286-90.
52. Sala MA, Matheus M, Valeri V. Estimation of average diameter of human placental villi by a stereologic method. *Microsc Acta*, 1980;82(4):339-42.
53. Sala MA, Komesu MC, Lopes PA, Maia Campos G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz Dent J.* 1994;5(1):11-4.
54. Vieira S, Testes não-paramétricos. In: _____. *Bioestatística: tópicos avançados*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. p.12-50.
55. GraphPad InStat, for Windows—demo, versão 3/2009 (San Diego, Califórnia. 2009; <<http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>>
56. Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas. Normas internacionales para la investigación biomédica con animales. *Bol Sanit Panam.* 1990;108(5-6):637-41.
57. Ferm VH, Carpenter SJ. Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Exp Mol Pathol.* 1967;7(2):208-13.

58. Menezes HS. Éthics and researchs in animals. Revista AMRIGS. 2002;46 (3,4):104-8.
59. Reis MA, Terra SA, Oliveira FA, Teixeira VPA. Métodos de estudo dos processos patológicos gerais: ênfase à aplicação da estatística em estudos morfológicos. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 2002.
60. Andréa CE, Bleggi-Torres LF, Alves MTS. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. J.Bras Pato Med Lab. 2008;44(1):51-7.
61. Baak JP. The principles and advances of quantitative pathology. Anal Quant Cytol Histol. 1987;9(2):89-95.
62. Collan Y, Torkkeli T, Pesonen E, Jantunen E, Kosma VM. Application of morphometry in tumor pathology. Anal Quant Cytol Histol. 1987;9(2):79-88.
63. Carr I, Pettigrew N. How malignant is malignant? A brief review of the microscopic assessment of human neoplasms, and the prediction of whether they will metastasize and kill. Clin Exp Metastasis. 1991;9(2):127-37.
64. Millot C, Dufer J. Clinical applications of image cytometry to human tumor analysis. Histol Histopathol. 2000;15(4):1185-200.

65. Veltri RW, Partin AW, Miller CC. Quantitative nuclear grade (QNG): a new image analysis-based biomarker of clinically relevant nuclear structure alterations. *J Cell Biochem Suppl.* 2000;35(Suppl):151-7.
66. Gil J, Wu H, Wang BY. Image analysis and morphometry in the diagnosis of breast cancer. *Microsc Res Tech.* 2002;59(2):109-18.
67. Paschoal VD. Efeitos da ofloxacina no desenvolvimento dos testículos de ratos: Estudo cariométrico [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2002.
68. Emmanouilides GC, Hobel CJ, Yashiro K, Klyman G. Fetal responses to maternal exercise in the sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(1):130-7.
69. Ueno M, Kawashima S, Nishi S, Shimada H, Karasawa R, Suzuki Y, et al. Túbulo-intersticial lesions in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int Suppl.* 1997;63(Suppl): S191-4.
70. Barth PJ, Siebel A, Gerharz E, Köhler HH. Nuclear morphometry of renal cell carcinomas. *Gen Diagn Pathol.* 1995;141(1):29-33.
71. Matos NA. Efeitos do ciclamato de sódio e do aspartame na placenta: estudo morfométrico [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2008.

72. Paschoal VD, Rossit AB, Bizutti R, Monteiro R, Padovani JR, Azoubel R. Study of the nuclear volume of testicular cells of rats receiving Ofloxin through lactation. *Int J Morphol.* 2007;25(3):603-8.
73. Gonçalves PCB, Azoubel R. Bases da reparação tecidual fetal. *Arq Cienc Saúde.* 1997;4(2):156-62.
74. Callegari-Jacques SM. Testes não paramétricos. In: Callegari-Jacques SM. *Bioestatística: Princípios e aplicações.* Porto Alegre: Artmed, 2004. p.166-84.
75. Bussab WO, Morettin PA. Introdução a estatística inferencial. In: Bussab WO, Morettin PA. *Estatística básica.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Saraiva; 2006. p. 255-64.
76. Reis MA, Oliveira FA, Teixeira VPA. Método demonstrativo para o cálculo da média acumulada (Williams, 1977). Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 2001.
77. Sala MA, Lopes RA, Matheus M. Método morfométrico para analisis cuantitativo de los tejidos. Determinación de los parâmetros normales par el hepatócito de rato. *Arch Fac Med Zaragoza.* 1992;32(1):29-31.
78. Sadler TW. O feto e a placenta. In: Sadler TW. *Langman: embriologia médica.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam; 2007. p. 79-97.
79. Rezende J. *Obstetrícia.* 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

80. Schuler-Faccini L, Sanseverino MT, Peres RM. Teratologia na prática pediátrica. In: Carakushansky F. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 407-14.
81. Brito Filho D. Fundamentos de Toxicologia. In Brito Filho D. Toxicologia humana e geral. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1988. p. 1-35
82. Moraes EA. Agentes teratogênicos In: Zugaib M. Medicina fetal. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 537-40.
83. Altemani AM. Patologia da placenta, cordão umbilical e membranas. In: Neme B. Obstetrícia básica. 2ª ed. São Paulo: Sarvier; 2000. p. 587-92.
84. Davies J, Glasser SR. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat.* 1968;69(4):542-608.
85. Roby KF, Soares MJ. Trophoblast cell differentiation and organization: role of fetal and ovarian signals. *Placenta.* 1993;14(5):529-45.
86. Lodig H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. O transporte através das membranas. In: _____. *Biologia celular e molecular.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p. 578-85.

87. Fuentes M, Torregrosa A, Mora R, Götzens V, Corbella J, Domingo JL. Placental effects of lead in mice. *Placenta*. 1996;17(5-6):371-6.
88. Montenegro CAB, Rezende J. *Obstetrícia fundamental*. 10° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
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(2):109-12.
90. Martins AT, Azoubel R. Efeitos do ciclamato de sódio sobre pâncreas exócrino fetal de ratos: estudo cariométrico e estereológico [tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2006.
91. Brandini DA. Efeitos tóxicos dos metais comumente utilizados em reabilitação oral: estudo histométrico das alterações provocadas pelo chumbo no assoalho da cavidade bucal e cartilagem de Meckel de fetos de rato [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2000.
92. Oliveira C. Estudo morfológico, morfométrico e estereológico das alterações do epitélio de revestimento glandular de palato, língua e glândula submandibular de fetos de ratos submetidos ao alcoolismo [tese]. Jaboticabal: UNESP; 1989.

93. Calvano CJ, Hoar RM, Mankes RF, Lefevre R, Reddy AP, Moran ME, et al. Experimental study of umbilical cord length as a marker of fetal alcohol syndrome. *Teratology*. 2000;61(3):184-8.
94. Barron S, Riley EP, Smotherman WP. The effect of prenatal alcohol exposure on umbilical cord length in fetal rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10(5):493-5.
95. Cunha SA, Contrera MGD, Lopes RA, Azoubel R, Contrera JD. Experimental hipervitaminosis A in the rat XXV: the effect of a high single dosis of vitamin A on umbilical cord length. In: *Anais da 44ª Reunião da SBPC; 1992; São Paulo*. São Paulo: SBPC; 1992.
96. Leão LLS, Lopes RA, Novaes Jr AB, Sala MA, Komesu MC, Maia Campos G. The effect of maternal protein deprivation during pregnancy in rat umbilical cord length. In: *Resumos do 14º Encontro de Pesquisas Veterinárias de Jaboticabal; 1992; Jaboticabal*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal; 1992.
97. Lopes RA, Sala MA, Maia Campos G, Petenusci SO, Komesu MC. The effect of methylmercury on umbilical cord length. *An Farm Quím São Paulo*. 1991/1992;31-32(Supl):66.
98. Oliveira PT, Lopes RA, Toneto ADR, Sala MA, Maia Campos G, Watanabe IS. The effect of hyperthermia on umbilical cord and placenta. In: *14º Jornada*

- Farmacêutica de Ribeirão Preto; 1994; Ribeirão Preto. An Farm Quím São Paulo. 1994;33-34(1):91.
99. Liedtke Jr H, Azoubel R, Tubino PJG, Lopes RA. Estudo morfológico de fetos de ratas tratadas com ciclofosfamida durante a gestação. Rev Reg Ciênc. 1995;4(1):95-104.
100. Miller ME, Jones MC, Smith DW. Tension: the basis of umbilical cord growth. J Pediatr 1982;101(5):844.
101. Miller ME, Higginbottom M, Smith DW. Short umbilical cord: its origin and relevance. Pediatrics. 1981;67(5):618-21.
102. Fujinaga M, Chinn A, Shepard TH. Umbilical cord growth in human and rat fetuses: evidence against the "stretch hypothesis". Teratology. 1990;41(3):333-9.
103. Katz V, Blanchard G, Dingman C, Bowes WA Jr, Cefalo RC. Atenolol and short umbilical cords. Am J Obstet Gynecol. 1987;156(5):1271-2.
104. Sornes T. Short umbilical cord as a cause of fetal distress. Acta Obstet Gynecol Scand. 1989;68(7):609-11.
105. Pfaller W, Rittinger M. Quantitative morphology of the rat kidney. Int J Biochem. 1980;12(1-2):17-22.

106. Cabrera A, Santos ORP. Expressão de genes no desenvolvimento renal. Med On Line [periódico na Internet]. 2001 [acesso em 2010 Abril 25]:[aproximadamente 9 p.]. Disponível em: <<http://www.medonline.com.br/genes.htm>>
107. Garcia A, Azoubel R. A placenta humana. São Paulo: Livraria Atheneu; 1986.
108. Leveno KJ, Cunningham G, Alexander JM, Bloom SL, Hauth J, Rouse D, et al. Williams obstetrics: Drugs and Medications. 20rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 943-65.
109. Sakurai H, Barros EJ, Tsukamoto T, Barasch J, Nigam SK. An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(12):6279-84.
110. Muller U, Brandli AW. Cell adhesion molecules and extracellular-matrix constituents in kidney development and disease. J Cell Sci. 1999;112(Pt 22):3855-67.
111. Gomez RA. Role of angiotensin in renal vascular development. Kidney Int. 1998;54(67):S12-S6.

112. Arruda JGF, Martins AT, Godoy JMP, Fácio Jr FN, Azoubel R. Effects of sodium cyclamate in kidneys of rats fetuses: a morphometry study. *Int J Morphol.* 2004;22(2):127-32.
113. Martins MRI, Azoubel R. Efeitos do aspartame no rim fetal de ratos: estudo cariométrico. *J Bras Nefrol.* 2006;3(28):153-7.
114. Martins MRI, Azoubel R. Effects of aspartame on fetal kidney: a morphometry and stereological study. *Int J Morphol.* 2006;25(4):689-94.
115. Larsen EH, Willumsen NJ, Mobjerg N, Sorensen JN. The lateral intercellular space as osmotic coupling compartment in isotonic transport. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;195(1):171-86.
116. Larsen EH, Møbjerg N, Sørensen JN. Fluid transport and ion fluxes in mammalian kidney proximal tubule: a model analysis of isotonic transport. *Acta Physiol (Oxf).* 2006;187(1-2):177-89.
117. Loo DDF, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(23):13367-70.
118. Meinild AK, Klaerke DA, Loo DDF, Wright EM, Zeuthen T. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol.* 1998;508(Pt 1):15-21.

119. Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, Klaerke DA. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol.* 2001;531(Pt 3):631-44.
120. Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*, 5^a ed. São Paulo: Artmed; 2009.
121. De Roberts E, Hib J. *De Robertis: bases da biologia celular e molecular*. Rio de janeiro: Guanabara Koogam; 2006.
122. Ferreira RR, Assis GF, Taga R. Estudo morfométrico do volume nuclear e citoplasmático e da relação citoplasma/núcleo de células acinosas de glândulas parótidas de rato durante a vida pós-natal. *Rev Bras Cienc Morfol.* 1994;11(2):142-8.

7. APÊNDICE

7. APÊNDICE

Apêndice 1. Aprovação na Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – FAMERP)



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto de pesquisa intitulado "Efeitos da Sucralose no rim fetal de ratos: Estudo morfológico.." (Protocolo FAMERP nº 414707) sob responsabilidade do Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovada pela CEEA-FAMERP.

São José do Rio Preto, 02 de Agosto de 2007.

Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury
Presidente CEEA - FAMERP