

Vera Lúcia Fugita dos Santos

Efeitos do Ciclamato de Sódio Sobre o
Testículo Fetal de Ratos: Estudo Morfométrico

São José do Rio Preto
2006

Vera Lúcia Fugita dos Santos

Efeitos do Ciclamato de Sódio Sobre o
Testículo 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
2006

Dos Santos, Vera Lúcia Fugita

Efeitos do Ciclamato de Sódio Sobre o Testículo Fetal de Ratos: Estudo Morfométrico / Vera Lúcia Fugita dos Santos
São José do Rio Preto, 2006

___ p.;

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

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

1. Ciclamato; 2. Gestação; 3. Testículos; 4. Cariometria.

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos Especiais	ii
Agradecimentos	iii
Epígrafe	iv
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolosx
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	02
1.1. A Gestação	03
1.2. Adoçantes e o Ciclamato	05
1.3. Objetivo	11
2. Material e Método	14
2.1. Material	15
2.2. Método	15
2.2.1. O Acasalamento e Definição dos Grupos	15
2.2.2. O Tratamento	16
2.2.3. Dissecção e Pesagem dos Fetos	16
2.2.4. Técnica Histológica	17
2.2.5. Técnica Morfométrica	18
2.2.6. Técnica Estatística	20
3. Resultados	22

3.1. Resultados Morfológicos	23
3.2. Resultados Morfométricos – Cariometria.....	25
a. Gonócitos.....	25
b. Células de Sertoli.....	30
c. Células de Leydig	35
4. Discussão.....	42
4.1. Agentes Teratogênicos: Os Edulcorantes	43
4.2. O Material – Animal de Experimentação	45
4.3. O Estudo Morfométrico.....	48
4.4. A Amostra e a Estatística	50
4.5. Os Pesos Fetal e Placentário e o Comprimento do Cordão Umbilical	52
4.6. Efeitos do Ciclamato de Sódio sobre os Testículos.....	55
4. Conclusões	63
5. Referências Bibliográficas.....	66
6. Apêndices	80

- ✓ Aos meus familiares, que são meus amigos de todas as horas; neles sempre encontro o “chão” nos momentos mais complicados da minha existência.

- ✓ Aos meus pais que sempre serão modelos de luta e fonte de inspiração para continuar a minha caminhada.

- ✓ Ao Pedro, esposo e amigo, grande motivador nos momentos de desânimo, de incertezas. Companheiro de todas as horas, auxiliar indispensável nas minhas tarefas, meu “porto seguro”.

- ✓ À todos os meus amigos, que sempre torceram por mim!

Agradecimentos Especiais

- ✓ À Deus, que quanto mais penso, mais acredito que sou privilegiada por Ele, porque Ele coloca em meu caminho pessoas especiais que fazem as coisas acontecerem na minha vida!

- ✓ Aos Professores Doutores Reinaldo Azoubel e Lina, que sempre comigo partilharam os vossos conhecimentos, desde a Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto; quando espelhando-me neles, pude sonhar e acreditar que um dia seria uma pesquisadora. E hoje, agradeço ainda pela competência e paciência na condução deste trabalho. Pelos laços de amizade e convivência que se fortaleceram ao longo dessa jornada. Sinto que todo “muito obrigado” seria pouco!

- ✓ À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, que por intermédio do Programa de Pós-graduação, forneceu estrutura para que eu pudesse trabalhar em prol da vida. Minha eterna gratidão!

- ✓ E finalmente, ao meu esposo Pedro, por ter renunciado ao descanso dos finais de semana, para me acompanhar nas vindas a São José do Rio Preto no desenvolvimento das fases práticas do experimento. E simplesmente por existir...

Agradecimentos

- ✓ Aos colegas do Grupo de Pesquisa: Reprodução Humana e Toxicologia da Reprodução, pelo incentivo na realização deste trabalho.
- ✓ À colega, Professora Marielza Martins, pelo companheirismo, pela grande amizade surgida e pela colaboração.
- ✓ Ao Prof. Dr. Alex Tadeu Martins pela amizade, estímulo e pela paciência de estar sempre pronto a partilhar seus conhecimentos conosco.
- ✓ Ao Prof. Dr. José Germano Ferraz de Arruda pela colaboração e sugestões apresentadas.
- ✓ À Profa Dra. Vânia Del'Arco Paschoal pela amizade, participação e pela disponibilidade em nos atender.
- ✓ Ao Prof. Dr. Mário José Góes pela colaboração e sugestões.
- ✓ À Profa. Dra. Teresa Lúcia Lamano - Carvalho pelas orientações e sugestões apresentadas.
- ✓ Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela colaboração e atenção dispensadas.

- ✓ À Profa. Dra. Zaida Aurora Sperli Geraldes Soler pelos ensinamentos dispensados no início desta caminhada. Sempre lhe serei grata!
- ✓ Ao Prof. Dr. Fernando Batigalia pela amizade, estímulo e sugestões.
- ✓ À Professora Adília Maria Pires Sciarra pela amizade e colaboração.
- ✓ Aos amigos e funcionários da Pós-graduação José Antônio Silistino, Rosimeire Cleide Souza Desidério, Fabiana Cristina Godoy, Guilherme Martins Dias e Carlos Rodrigo da Silva Viana sempre prontos a nos atender com carinho e atenção.
- ✓ Ao Sr. Onivaldo Bizzuti, técnico responsável pelo Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da FAMERP, pela dedicação, respeito e seriedade dispensados aos meus experimentos.
- ✓ Ao destacar o nome do Sr. Domingos Zanchetta Neto, agradeço a colaboração de todos os colegas do Laboratório de Histotecnologia e Histoquímica da FAMERP.
- ✓ À amiga, Profa. Dra. Denise Aparecida Mencaroni, coordenadora do curso de Enfermagem do Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV, pela amizade, apoio e compreensão.

- ✓ Aos colegas e professores do curso de Enfermagem da UNIFEV pelo companheirismo, carinho e incentivo.

- ✓ À Fundação Educacional de Votuporanga por viabilizar mais esta conquista!

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã;
portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar,
fazer e principalmente VIVER.”

(Dalai Lama)

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Valores e média dos pesos corporais (em gramas) dos fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	23
Tabela 2.	Valores e média do peso placentário (em gramas) dos fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	24
Tabela 3.	Valores e média do comprimento do cordão umbilical (em centímetros) dos fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student...	25
Tabela 4.	Distribuição dos valores médios do Diâmetro Maior e do Diâmetro Menor (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	26
Tabela 5.	Distribuição dos valores médios do Diâmetro Médio e a Relação D.maior/d.menor (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	27
Tabela 6.	Distribuição dos valores médios do Volume Nuclear (μm^3) e da Área Nuclear (μm^2) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	28
Tabela 7.	Distribuição dos valores médios da Relação Volume/Área e do Perímetro (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	29

Tabela 8.	Distribuição dos valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student..	30
Tabela 9.	Distribuição dos valores médios do Diâmetro Maior e do Diâmetro Menor (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	31
Tabela 10.	Distribuição dos valores médios do Diâmetro Médio e a Relação D.maior/d.menor (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	32
Tabela 11.	Distribuição dos valores médios do Volume Nuclear e da Área Nuclear (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	33
Tabela 12.	Distribuição dos valores médios da Relação Volume/Área e do Perímetro e (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	34
Tabela 13.	Distribuição dos valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	35

Tabela 14. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Maior e do Diâmetro Menor (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	36
Tabela 15. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Médio e a Relação D.maior/d.menor (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	37
Tabela 16. Distribuição dos valores médios do Volume Nuclear e da Área Nuclear (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	38
Tabela 17. Distribuição dos valores médios da Relação Volume/Área e do Perímetro (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t de Student.....	39
Tabela 18. Distribuição dos valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T). Teste t Student.....	40

Objetivo: Avaliar os efeitos do ciclamato de sódio sobre o crescimento fetal e nas células testiculares de fetos de ratas tratadas durante a embriogênese. **Método:** Do décimo ao décimo terceiro dia de prenhez, foi administrado por via intraperitoneal, 50 mg/Kg de ciclamato de sódio nas ratas participantes do grupo tratado e, pela mesma via, igual volume de água destilada nas ratas do grupo controle. A laparotomia para a retirada dos fetos foi realizada no vigésimo dia da gestação, onde foram selecionados aleatoriamente cinco fetos das ratas tratadas e cinco das ratas controle. Por meio da cariometria, foi realizada a avaliação dos parâmetros nucleares de células testiculares dos fetos: gonócitos, células de Sertoli e células de Leydig. **Resultados:** As médias dos pesos fetal e placentário dos animais componentes do grupo tratado foram menores que os do grupo controle; sendo o mesmo resultado observado para o comprimento do cordão umbilical. Nos núcleos dos gonócitos não foram verificadas alterações. Nas células de Sertoli as modificações foram notadas nos seguintes parâmetros nucleares: diâmetro menor, diâmetro médio, volume, área, relação volume/área e no perímetro. Nas células de Leydig não foram registradas alterações nucleares. **Conclusões:** O desenvolvimento desta pesquisa possibilitou a observação de alterações no crescimento fetal e células testiculares de fetos de ratas, causadas pelo uso de ciclamato de sódio durante o período gestacional.

Palavras-chave: 1. Ciclamato; 2. Gestação; 3. Testículos; 4. Cariometria.

Objective: To evaluate the effects of sodium cyclamate on fetal growth and on testicular cells of rat fetuses treated during embryogenesis. **Method:** From the tenth to the thirteenth day of pregnancy, 50 mg/Kg sodium cyclamate was administered via intraperitoneally in rats participating in the Treated Group. An equal volume of distilled water was similarly administered to rats of a Control Group. The fetuses were removed on the twentieth day by laparotomy, when 5 fetuses were randomly selected from the both Treated and Control Groups. Using karyometry, the nuclear parameters of the testicular cells were evaluated in respect to gonocytes, Sertoli cells and Leydig cells. **Results:** The mean fetal and placental weights of the animals from the Treated Group were lower than those of the Control Group, with a similar result seen in respect to the length of the umbilical cord. No changes were seen in the nuclei of the gonocytes. In relation to the Sertoli cells, differences were observed in the lowest diameter, mean diameter, volume, area, volume:area ratio and perimeter. No nuclear alterations were identified in the Leydig cells. **Conclusions:** This study identified alterations in fetal growth and in the testicular cells of rat fetuses caused by the administration of sodium cyclamate during the gestational period.

Key-words: 1. Cyclamate; 2. Gestation; 3. Testicles; 4. Karyometry

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte”.

(Mahatma Gandhi)

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Gestaçã

Embora considerada um processo fisiológico, a gestaçã induz ao surgimento de modificaçõs no organismo materno, com a finalidade de garantir o crescimento e o desenvolvimento do conceito.⁽¹⁾

Em relaçaõ à nutriçaõ, as gestantes requerem 15% de calorias (kcal) a mais que as mulheres nãogestantes, normalmente em torno de 300 a 500 kcal por dia, dependendo do peso da cliente e de sua atividade.⁽²⁾

No geral, a gestante ou a nutriz deve optar por uma dieta com alta densidade de nutrientes, mas nã de calorias. Deve evitar alimentos com calorias vazias, ou seja, ricos em açucares, gorduras e sal; e devem observar se algum alimento em particular produz no bebê alguma reaçaõ indesejável, e excluir o alimento de sua dieta.^(3,4)

Os casos de nutriçaõ materna inadequada nã ocorrem somente em populaçõs desfavorecidas, mas também, como consequênci de uma prática onde se faz restriçaõ e substituiçaõ de alimentos com o objetivo de perder ou evitar o ganho de peso durante a gestaçã. Para tanto, usualmente sã incorporados à dieta os produtos dietéticos e adoçantes como forma de diminuir as calorias ingeridas.

O sistema de transporte de substâncias entre a mã e o feto é formado pela placenta e pelo cordã umbilical, onde os nutrientes e o oxigênio passam do sangue materno para o fetal; assim como as excretas e o dióxido de carbono passam do sangue fetal para o materno.⁽⁵⁾

O útero, o saco coriônico e a placenta aumentam de tamanho de acordo com o crescimento do feto e; até este completar 18 semanas, a placenta continua a crescer em tamanho e espessura. Uma placenta totalmente desenvolvida cobre de 15 a 30% da decídua e pesa aproximadamente 1/6 (um sexto) do peso fetal.⁽⁵⁾

Os níveis aumentados de progesterona observados durante o período gestacional podem, causando a proliferação do retículo endoplasmático de superfície lisa dos hepatócitos, estimular enzimas celulares e, em consequência, aumentar a metabolização de substâncias químicas que, por conseguinte, altera sua toxicidade, aumentando-a ou diminuindo-a, dependendo do metabólito formado.⁽⁵⁾

Na gestação, a exposição materna a um agente químico tóxico pode conduzir a respostas diversas e seu efeito final variar desde a morte até o nascimento de um indivíduo normal.⁽⁵⁾

Os efeitos teratogênicos causados por alguns produtos é uma preocupação de longa data. Em 1953 Cohlman⁽⁶⁾ relatou as anormalidades congênitas em ratos produzidas pela ingestão excessiva de vitamina A durante o período gestacional, entre outros, registrou-se o índice de 52% de malformações na prole do grupo tratado (35,000 u.i de vit. A do 2º, 3º ou 4º ao 16º dia de gestação), principalmente anormalidades de crânio e cérebro.

Mais recente, Góes⁽⁷⁾ estudou a exposição pré-natal à fenitoína e seus efeitos sobre os plexos corioides dos ventrículos laterais do cérebro de fetos de ratas, e entre outros achados, observou alterações histopatológicas nos núcleos dessas células, sugerindo a ação teratogênica do fármaco.

Muitos são os agentes que apresentam grande periculosidade para o conceito, devido à facilidade de serem introduzidos no organismo materno e à forma diversa e múltipla com que podem entrar em contato com a gestante, são destacados agentes químicos como: fármacos, agroquímicos, contaminantes ambientais e os aditivos alimentares.⁽⁸⁾

1.2. Adoçantes e o Ciclamato

Com a finalidade de proporcionar o sabor doce aos alimentos, o adoçante é uma mistura de um ou mais edulcorantes com algum nutriente. Atualmente, encontra-se disponível no mercado, uma gama de compostos capazes de produzir o sabor doce, porém dependendo do país, somente alguns (naturais ou sintéticos) são permitidos pela legislação para serem adicionados aos alimentos.⁽⁹⁾

Os edulcorantes são substâncias capazes de adoçar os alimentos, que podem ser usados substituindo total ou parcialmente o açúcar; tendo a capacidade adoçante muito superior ao da sacarose.

São classificados como **naturais** quando são obtidos a partir de plantas ou de alimentos de origem animal, por meio de reações químicas; e como **artificiais** ou **sintéticos** quando originam-se de produtos naturais ou não por intermédio de reações químicas apropriadas.

Os alimentos dietéticos e os adoçantes fazem parte de um grupo denominado “alimentos para fins especiais”, que somados aos alimentos modificados, os especialmente formulados e os sucedâneos do sal foram

regulamentados pela Secretaria da Vigilância Sanitária, por meio da portaria nº 41 de 12 de maio de 1995.⁽¹⁰⁾

Os adoçantes tornaram-se amplamente populares na década de 60 nos Estados Unidos. Porém, no Brasil, até meados da década de 80, os produtos dietéticos eram utilizados apenas por portadores de diabetes ou de outras doenças com limitação na ingestão da sacarose, por serem considerados fármacos pela legislação em vigor.

Dentre os substitutos do açúcar (sacarose), os mais conhecidos são a sacarina, ciclamato e aspartame; sendo o ciclamato um produto sintético obtido pela sulfonação da ciclohexilamina (CHA).

A descoberta do ciclamato, em 1937, por Michel Sveda da Universidade de Illiones – EUA, foi atribuída a uma contaminação acidental de um cigarro com derivado da ciclohexilamina.⁽¹⁰⁾

É denominado ácido ciclohexilsulfâmico, podendo existir sob quatro formas químicas: ácido ciclâmico, ciclamato de cálcio, de sódio e de potássio; sendo que o sal sódico é o mais utilizado, embora o sal de cálcio possa também ser empregado em dietas hipossódicas.⁽¹¹⁻¹³⁾

O ciclamato é classificado como adoçante ou edulcorante não calórico sintético, tem como propriedades principais a capacidade de ser não cariogênico e 30 à 50 vezes mais doce que a sacarose. A mistura mais satisfatória é na proporção de dez partes de ciclamato para uma de sacarina (10:1), pois além de acentuar o doce, elimina o sabor residual de ambos; ressaltando-se que cada um contribui com metade da doçura.⁽¹⁴⁾

Foi considerado, sob vários aspectos, um aditivo ideal por muitos anos. Era de consenso sua absorção lenta e parcial, e que era eliminado de forma rápida e inalterado sem qualquer ação tóxica. Porém em 1966, foi detectada a presença de ciclohexilamina na urina de cães, coelhos, porcos e humanos após a ingestão oral de ciclamato, e a partir desta observação foram desenvolvidos vários estudos visando esclarecer o metabolismo deste produto; concluindo-se que 40% do ciclamato é absorvido no intestino e excretado inalterado na urina, o restante é parcialmente convertido a ciclohexilamina (CHA).⁽¹⁵⁻¹⁹⁾

Em 1970 o uso do ciclamato foi banido dos Estados Unidos e em outros países como Canadá e Reino Unido, inclusive, temporariamente no Brasil; como resultado de experimentos que demonstraram que doses massivas de ciclamato e outras substâncias administradas em ratos estavam associadas a mudanças inexplicáveis de estrutura de tecido, registrando-se câncer de bexiga ⁽¹⁵⁾. Outro fator, foi a constatação que alguns indivíduos e animais experimentais podiam metabolizar ciclamato à ciclohexilamina, a qual mostrou produzir atrofia testicular em animais experimentais.^(10,21,22)

A composição química da ciclohexilamina é $C_6H_{11}NH_2$ e estando na forma líquida apresenta as seguintes propriedades físico-químicas: cor amarela, odor de peixe, ponto de fusão $-17,5\text{ }^\circ\text{C}$, ponto de ebulição $134,5\text{ }^\circ\text{C}$, pH 10,5, miscível em água e peso molar 99,18. São considerados sinônimos: ciclohexanamine, aminociclohexane, CHA, hexahidrobenzenamine entre outros.

É interessante ressaltar que na indústria a CHA é usada como um intermediário para a síntese de herbicidas, antioxidantes e acelerador de vulcanização, inibidor da corrosão nos encanamentos e nas caldeiras de vapor mucolíticos, broncodilatadores, agentes analgésicos e em adoçantes artificiais como nos ciclamatos.⁽²³⁾

Oser *et al.*⁽²⁴⁾ comprovaram a conversão “in-vivo” do ciclamato de sódio em ciclohexilamina em ratos e a excreção desse metabólito na urina, após tratamento de três grupos: dois animais receberam 500 mg/kg, seis receberam 1,120 mg/kg e doze receberam 2,500 mg/kg e um grupo controle. Os autores concluíram que geralmente a capacidade de conversão foi a mesma entre os participantes tratados, e que a dose recebida parece ter relação com o número de animais capazes de excretar CHA na urina após a ingestão de ciclamato.

Kroes *et al.*⁽²⁵⁾ examinaram os efeitos toxicológicos (carcinogênicos) a curto prazo e, a reprodução e a teratogenicidade a longo prazo da CHA através de seis gerações de ratos. O tratamento com a CHA resultou em uma ligeira diminuição no tamanho, peso e na sobrevivência de filhotes em todas as gerações; o consumo maternal de dieta contendo 0,5% de CHA reduziu o ganho de peso das ratas, sendo que este pode ter sido um dos fatores que contribuíram para os efeitos embrio-tóxicos da substância.

Em outra pesquisa, Bopp *et al.*⁽²⁶⁾ publicaram uma revisão inédita na literatura em ciclamato, tentando avaliar a questão carcinogênica e outros aspectos importantes da toxicidade do ciclamato e da ciclohexilamina, incluindo os seus efeitos em vários órgãos dos sistemas, o potencial genotóxico, e os efeitos na reprodução. Além disso, a disposição fisiológica de ciclamato foi

revisada, com atenção particular dirigida para o local e extensão de sua conversão em CHA e, em relação a isso, constatou-se que na espécie humana, 25% são conversores.

Também, Collings⁽²⁷⁾ estudou em porcos a absorção, excreção e a conversão do ciclamato em ciclohexilamina. Entre outros achados, observou que os níveis excretados de ciclamato e CHA na urina e nas fezes variaram de dia para dia e; que quando os animais receberam doses de antibiótico oral, a excreção diminuiu rapidamente a quase zero, e a capacidade de conversão retornou ao cessar o tratamento.

Renwick *et al.*⁽²⁸⁾ pesquisaram o metabolismo do ciclamato para ciclohexilamina em seres humanos, envolvendo 14 sujeitos que foram identificados de um grupo de 261 voluntários que usaram tabletes de ciclamato de cálcio e excretaram na urina. A dose utilizada foi equivalente a 250 mg de ácido ciclâmico 3 vezes ao dia. Os valores encontrados nas amostras de urina coletada dos 14 participantes que excretaram a CHA foi de 21 à 38% mantidos por um período de longo metabolismo; entre outros, autores apontam que os resultados deste estudo oferece suporte para a aceitação da ingestão diária (ADI) de 0 à 11 mg/kg.

No Brasil, a produção do ciclamato data de 1977, onde alguns autores o enquadram no grupo dos “coadjuvantes domésticos” que são substâncias com funções similares às dos aditivos e coadjuvantes empregados na indústria, utilizados para alimentos e preparações culinárias destinados ao regime alimentar normal ou dietoterápico.^(10, 29)

Em 1985, após avaliação toxicológica, o JECFA (Comitês de Peritos em Aditivos Alimentares da Junta “Food and Agriculture Organization/Organização Mundial da Saúde”) considerou que o uso de ciclamato em alimentos e bebidas é seguro, desde que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) máxima seja de 11 mg/Kg de peso corpóreo.⁽¹⁰⁾

Contudo, entre os poucos trabalhos brasileiros envolvendo essa temática, destaca-se a pesquisa de Martins⁽³⁰⁾ que, por meio de estudo cariométrico e estereológico no fígado fetal de ratos, observou que o efeito do ciclamato de sódio causou hipertrofia celular hepática no citoplasma e núcleo, com sinusóides de menor calibre entre os elementos tratados com o edulcorante, sendo esses achados conclusivos para hepatotoxicidade fetal.

Corroborando, Matos⁽³¹⁾ realizou um estudo morfométrico para verificar os efeitos do ciclamato de sódio em placentas de ratas, e entre outros achados, constatou a diminuição do peso placentário; alterações nos núcleos da camada esponjosa e das vilosidades coriônicas entre as componentes tratadas com o produto.

Arruda *et al.*,⁽³²⁾ também utilizaram a morfometria para observar os efeitos do ciclamato de sódio no rim fetal de ratos, e obtiveram como principais resultados o aumento do volume glomerular e aumento dos núcleos das células dos túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor entre os participantes do grupo tratado; sugerindo nefrotoxicidade da substância.

Torres de Mercau *et al.*⁽³³⁾ informam que, no intestino, a sacarina e os ciclamatos dificultam o processo de absorção, por ser um composto iônico em

solução aquosa, impede a entrada de substâncias por osmose nas células, provocando diarreias.

Em recente estudo de revisão sobre o risco carcinogênico, os autores concluíram que o uso “pesado” de adoçantes artificiais (maior que 1680 mg/dia) conduz a um aumento relativo do risco de 1.3 para o câncer de bexiga em humanos; mas uma determinação precisa do agente exato não é possível, porque muitos adoçantes artificiais são combinados com outros tipos de produtos alimentícios⁽³⁴⁾. Atualmente, o uso do ciclamato é permitido em alimentos de baixa caloria em 50 países na Europa, Ásia, América do Sul e do Norte e África.⁽¹⁰⁾

Nesse contexto, nos propusemos a estudar o ciclamato de sódio pelo fato de estar presente na composição de aditivos alimentares do tipo adoçantes artificiais e em muitos alimentos; e os efeitos indesejados que esta substância possa causar no concepto quando a mãe faz uso desse produto; e também a observação da escassez de estudos científicos esclarecedores e atuais sobre esta temática.

1.3. Objetivo

Avaliar possíveis alterações morfométricas em fetos de ratas submetidas a administração intraperitoneal de ciclamato de sódio do décimo ao décimo terceiro dia de prenhez, proposta da seguinte forma:

- ✓ Avaliação do crescimento fetal, por meio da observação dos pesos do feto e da placenta e do comprimento do cordão umbilical;
- ✓ Quantificação das alterações nucleares em células testiculares dos fetos, utilizando-se a cariometria.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam”.

(George Bernard Shaw)

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Material

Para a realização do trabalho, inicialmente foi encaminhado o projeto de pesquisa à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e, após a aprovação foram utilizados ratos (*Rattus Norvergicus albinus*, variedade Wistar), provenientes do biotério da FAMERP, somando-se dez animais que foram sorteados aleatoriamente para constituir os seguintes grupos:

- 2 animais machos para o acasalamento
- 3 ratas para o grupo controle
- 5 ratas para o grupo tratado

2.2. Método

Com a finalidade de ajustamento às novas condições, os animais provindos do biotério permaneceram por sete dias no laboratório de pesquisa, em gaiolas coletivas, em temperatura e luz ambiente, sendo alimentados com ração comercial (PURINA®) e água *ad libitum*.

2.2.1. O Acasalamento e Definição dos Grupos

Ao findar-se o período de adaptação dos animais, durante a noite os ratos foram colocadas em gaiolas comunitárias para o acasalamento, na proporção

de um macho para quatro fêmeas. Pela manhã, procedeu-se a coleta de secreção vaginal para a confecção de esfregaços, que foram observados em microscópio de luz; onde a presença de espermatozóides no esfregaço confirmou o coito. À partir daí, considerou-se com precisão, o 1º dia de prenhez.

As ratas prenhas foram então pesadas e colocadas em gaiolas individuais, assinalando-se aleatoriamente as participantes dos grupos tratado e controle, mantidas em observação diária.

2.2.2. O Tratamento

Recorda-se que a substância utilizada neste estudo é o ciclamato de sódio, administrado por via intra-peritoneal nos 10º, 11º, 12º e 13º dia de gestação. Sabendo-se que o consumo diário permitido é de 11mg/Kg de peso e que a possibilidade de os usuários desse produto ingerirem acima do recomendado, optou-se por uma dosagem mais elevada, ou seja, de 50 mg/Kg de peso.

Nas ratas do grupo controle foi utilizado o mesmo procedimento, injetando-se água destilada em volume equivalente.

2.2.3. Dissecção e Pesagem dos Fetos

Ao final do período de prenhez, ou seja, no 20º dia, as fêmeas de ambos os grupos (tratado e controle) foram pesadas e, em seguida sacrificadas por

inalação de éter sulfúrico. Assim, procedeu-se a abertura do abdome e útero para a retirada dos fetos, por meio de ampla incisão cirúrgica mediana. Imediatamente os fetos ligados às placentas e membranas foram totalmente imersos em solução de Alfac (85 ml de álcool à 80% + 10 ml de formalina + 5ml de ácido acético) para fixação, permanecendo por 24 horas.

Após a fixação, todos os elementos (fetos e as placentas) foram limpos, enxutos em papel absorvente para serem pesados em balança de precisão e, em seguida, conservados em álcool a 70%.

2.2.4. Técnica Histológica

Nessa fase do estudo, os fetos foram separados por sexo, contados e separados aleatoriamente para compor os grupos tratado e controle, num total de cinco machos para cada grupo. À partir daí, foram retirados os testículos de cada animal, tomando-se por base a região sub-umbilical e a virilha. Os órgãos extirpados, foram fixados em formol neutro, encaminhados para o laboratório para inclusão (desidratação, diafanização e impregnação com parafina) e emblocamento.⁽³⁵⁾

Ao micrótomo de parafina, os blocos foram seccionados em cortes de 6 μm de espessura, seriados de 9 em 9 fragmentos (com um espaço de 45 μm entre um corte e outro), colocados em lâminas e, em seguida, foi utilizado o método de coloração hematoxilina-eosina (HE), a fim de possibilitar a avaliação histológica.

2.2.5. Técnica Morfométrica

A cariometria foi a técnica utilizada para o estudo morfométrico das células testiculares, por permitir a avaliação dos parâmetros nucleares de tamanho, volume e forma; bem como suas relações por meio da observação dos diâmetros maior e menor dos núcleos dessas células.⁽³⁶⁾

Para cada um dos animais participantes dos grupos tratado e controle foram considerados 50 imagens nucleares de cada tipo celular estudado: gonócitos, células de Sertoli e células de Leydig, somando-se a análise de 150 núcleos. Ao empregar-se 10 animais para o estudo, foram obtidos parâmetros nucleares de 1.500 núcleos.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram analisadas em microscópio de luz H 500 Hund Wetzlar® com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes), provido de câmara clara (Leitzwetzlar - Germany®). Com aumento final de 1.240 vezes, as imagens dos núcleos das células testiculares foram projetadas sobre folha de papel branca e contornadas com lápis preto número dois, obtendo-se assim, os desenhos para os cálculos dos diâmetros maiores (D) e diâmetros menores (d); utilizou-se papel milimetrado para a medição exata (Anexo 1).

Para a análise dos parâmetros revelados pela cariometria, nos dois grupos tratado e controle, foi utilizado um “*software*” desenvolvido por Maia Campos e Sala, ambos do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto – USP.

A obtenção dos valores dos diâmetros maior e menor nos possibilitou a avaliação de outros parâmetros nucleares como: diâmetro médio, a relação D/d, perímetro, área, volume, relação volume/área, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno.⁽³⁷⁾

As fórmulas utilizadas para o cálculo desses parâmetros foram:

Diâmetro médio:

$$M = (D \cdot d)^{1/2}$$

Relação diâmetros maior/menor:

$$R = D/d$$

Perímetro:

$$P = (\pi^{1/2}) \cdot [3/2 \cdot (D + d) - M]$$

Volume:

$$V = \pi \cdot 1/6 \cdot M^3$$

Área:

$$A = \pi \cdot 1/4 \cdot M^2$$

Relação volume/área:

$$V/A = 2/3 \cdot M$$

Excentricidade:

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

Coeficiente de forma:

$$F = 4 \cdot \pi \cdot A \cdot 1/P^2$$

Índice de contorno:

$$I = P/A^{1/2}$$

Para os diâmetros e perímetro, a unidade de medida foi o micrômetro (μm), e para a área e o volume foram utilizados o micrômetro quadrado (μm^2) e o micrômetro cúbico (μm^3), respectivamente.

2.2.6. Técnica Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada empregando-se o *Teste de Student* ou *Teste t* não pareado, pois a curva de distribuição dos dados no teste era gaussiana e os desvios padrões eram iguais, determinando-se o intervalo de confiança de 95%.

“Desde que o bom pensamento entra em nosso espírito, ele nos traz uma luz que nos faz ver uma quantidade de outras coisas, cuja existência nem sequer imaginávamos antes”.

(Chateaubriand)

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Resultados Morfológicos

Os parâmetros quantitativos de peso dos fetos das ratas dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, assim como sua análise estatística, estão expressos (em gramas) na tabela 1. Verifica-se que a média do peso corporal dos fetos do grupo tratado é 1,86 gramas e, 2,08 gramas para os fetos do grupo controle, não apresentando diferença estatisticamente significativa para essa variável, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 1. Valores e média dos pesos corporais (em gramas) dos fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Fetos	Peso corporal dos fetos (g)	
	C	T
1	2,10	1,47
2	2,24	2,02
3	1,97	2,15
4	1,84	1,59
5	2,27	2,07
Média	2,08	1,86
Dp	0,31	0,18
Mediana	1,97	2,15
p•	> 0,05	

• Teste t de Student

O peso da placenta dos fetos das ratas dos grupos controle e tratadas com ciclamato de sódio, assim como sua análise estatística, está expresso (em gramas) na tabela 2. Nota-se que a média do peso da placenta dos fetos do

grupo controle é 0,42 gramas e, 0,29 gramas para o grupo tratado; há evidência da média do grupo tratado ser menor que a do controle, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 2. Valores e média do peso placentário (em gramas) dos fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Fetos	Peso da placenta (g)	
	C	T
1	0,46	0,30
2	0,41	0,32
3	0,38	0,32
4	0,42	0,27
5	0,45	0,24
Média	0,42	0,29
Dp	0,32	0,34
Mediana	0,38	0,32
p•	< 0,05*	

• Teste t de Student; * Significante ao nível de 5%

O comprimento do cordão umbilical dos fetos das ratas do grupos controle e tratadas com ciclamato de sódio, assim como sua análise estatística, está expresso (em centímetros) na tabela 3. Observa-se que a média do comprimento do cordão umbilical dos fetos do grupo controle é 1,96 centímetros e, 1,76 centímetros no tratado; há evidência da média do comprimento do cordão umbilical ser menor no grupo tratado, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

tabela 3. Valores e média do comprimento do cordão umbilical (em centímetros) dos fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Fetos	Cordão umbilical (cm)	
	C	T
1	2,0	1,7
2	2,2	1,7
3	1,8	1,8
4	1,8	1,7
5	2,0	1,9
Média	1,96	1,76
Dp	0,17	0,09
Mediana	1,8	1,8
p•	< 0,05*	

• Teste t de Student; * Significante ao nível de 5%

3.2. Resultados Morfométricos – Cariometria

a. Gonócitos

A análise cariométrica testicular dos fetos de ratas dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, é verificada na avaliação dos parâmetros dos gonócitos em relação aos diâmetros maior e menor (μm) destes núcleos, e estão expressos na tabela 4. Observa-se que os valores médios do diâmetro maior é de 11,90 μm para o grupo controle e 11,49 μm para o grupo tratado; assim como os valores médios do diâmetro menor é de 7,92 μm para o grupo

controle e $8,01\mu\text{m}$ para o grupo tratado, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 4. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Maior e do Diâmetro Menor (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Diâmetro Maior		Diâmetro Menor	
	C	T	C	T
1	12,24	12,02	7,98	8,76
2	11,47	10,73	8,10	7,65
3	11,40	11,08	7,87	8,00
4	12,50	11,29	8,08	7,50
5	11,92	12,34	7,61	8,15
Média	11,90	11,49	7,92	8,01
Dp	0,47	0,66	0,20	0,49
Mediana	11,40	11,08	7,87	8,00
P•	> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

Na Tabela 5 são apresentadas as variáveis evidenciadas a partir dos diâmetros maiores e diâmetros menores. Observam-se os resultados obtidos das médias dos valores dos diâmetros médios e as diferenças entre os diâmetros maiores e menores dos núcleos dos gonócitos.

Os valores médios do diâmetro médio nuclear é de $9,65\mu\text{m}$ para o grupo controle e $9,54\mu\text{m}$ para o grupo tratado e; e os valores médios da relação D/d dos núcleos dos gonócitos é de $1,54\mu\text{m}$ para o grupo controle e $1,46\mu\text{m}$ para o

grupo tratado, não mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 5. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Médio e a Relação D.maior/d.menor (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Diâmetro Médio		Relação D/d	
	C	T	C	T
1	9,82	10,22	1,57	1,40
2	9,58	9,02	1,44	1,43
3	9,42	9,38	1,49	1,41
4	9,99	9,16	1,59	1,53
5	9,46	9,95	1,63	1,57
Média	9,65	9,54	1,54	1,46
Dp	0,24	0,51	0,77	0,76
Mediana	9,42	9,38	1,49	1,41
p•	> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

A avaliação dos volumes nucleares medidos em micrômetro cúbico (μm^3) e das áreas nucleares medidas em micrômetro quadrado (μm^2) dos gonócitos, encontra-se na tabela 6.

Os valores médios do volume nuclear dos gonócitos é de $494,06\mu\text{m}^3$ para o grupo controle e $484,33\mu\text{m}^3$ para o grupo tratado; assim como os valores médios da área nuclear é de $74,37\mu\text{m}^2$ para o grupo controle e $73,04\mu\text{m}^2$ para o grupo tratado. A análise estatística não apresenta significância para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 6. Distribuição dos valores médios do Volume Nuclear (μm^3) e da Área Nuclear (μm^2) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Volume Nuclear		Área Nuclear	
	C	T	C	T
1	517,67	608,01	76,85	84,38
2	479,61	408,76	73,12	65,23
3	457,97	449,15	70,72	70,00
4	547,49	419,17	79,69	66,78
5	467,56	536,58	71,50	78,83
Média	494,06	484,33	74,37	73,04
Dp	37,5	85,5	3,79	8,24
Mediana	457,97	449,15	70,72	70,00
p•	> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

Observam-se as estimativas da relação volume/área e do perímetro dos núcleos dos gonócitos na tabela 7. Os valores médios da relação volume/área nuclear é de 6,44 para o grupo controle e 6,36 para o grupo tratado e, e os valores das médias dos perímetros desses núcleos é de $31,57\mu\text{m}$ para o grupo controle e $30,95\mu\text{m}$ para o grupo tratado. Essas diferenças verificadas entre os grupos não são estatisticamente significantes para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 7. Distribuição dos valores médios da Relação Volume/Área e do Perímetro (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Relação Vol/Área		Perímetro	
	C	T	C	T
1	6,55	6,81	32,23	32,89
2	6,39	6,01	31,04	29,12
3	6,28	6,25	30,62	30,22
4	6,66	6,11	32,80	29,89
5	6,31	6,64	31,16	32,63
Média	6,44	6,36	31,57	30,95
Dp	0,16	0,34	0,90	1,70
Mediana	6,28	6,25	30,62	30,22
p•	> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

A análise nuclear dos gonócitos em relação à excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, estão expressos na tabela 8.

É verificado que a média da excentricidade é de 0,70 para o grupo controle e 0,68 para o grupo tratado. Para o coeficiente de forma desses núcleos os valores médios no grupo controle é de 0,93 e 0,94 no tratado. E no índice de contorno a média estimada é de 3,69 para o grupo controle e 3,66 no tratado. Essas diferenças observadas entre os grupos não são estatisticamente significantes para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 8. Distribuição dos valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno (μm) dos núcleos dos gonócitos de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Excentricidade		Coef. de Forma		Ind.de Contorno	
Média de 50 núcleos	C	T	C	T	C	T
1	0,72	0,66	0,92	0,95	3,70	3,63
2	0,66	0,66	0,94	0,95	3,65	3,64
3	0,68	0,66	0,94	0,95	3,67	3,64
4	0,73	0,71	0,92	0,93	3,71	3,68
5	0,73	0,70	0,91	0,92	3,72	3,70
Média	0,70	0,68	0,93	0,94	3,69	3,66
Dp	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,03
Mediana	0,68	0,66	0,94	0,95	3,67	3,64
p•	> 0,05		> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

b. Células de Sertoli

As especificações cariométricas das células de Sertoli observadas nos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, e sua análise estatística, estão expostas nas tabelas 9 a 13. Tendo como unidade de medida o micrômetro (μm), na tabela 9 verificam-se que os valores médios do diâmetro maior desses núcleos é $16,34\mu\text{m}$ para o grupo controle e $15,10\mu\text{m}$ para o tratado, não constatando-se diferença estatística significativa. E os valores

médios do diâmetro menor é 14,25 μ m para o grupo controle e 13,08 μ m para o tratado, resultado estatisticamente significativo ao nível de $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 9. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Maior e do Diâmetro Menor (μ m) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Diâmetro Maior		Diâmetro Menor	
	C	T	C	T
1	15,76	13,77	13,98	11,90
2	15,82	16,87	13,61	14,15
3	17,29	14,24	15,45	12,52
4	15,84	15,47	13,68	13,73
5	17,03	15,18	14,52	13,13
Média	16,34	15,10	14,25	13,08
Dp	0,74	1,20	0,76	0,90
Mediana	17,29	14,24	15,45	12,52
p•	> 0,05		< 0,05*	

• Teste t de Student; * Significante ao nível de 5%

Na Tabela 10 são apresentadas as variáveis observadas a partir dos diâmetros maiores e diâmetros menores. Notam-se os resultados obtidos das médias dos valores dos diâmetros médios e as diferenças entre os diâmetros maiores e menores dos núcleos das células de Sertoli.

Os valores médios do diâmetro médio nuclear é 15,25 μ m para o grupo controle e 14,04 μ m para o tratado, sendo que esta diminuição é estatisticamente significativa ao nível de 5%. Os dados da diferença entre os diâmetros maiores e menores (D/d) desses núcleos é 1,15 μ m para o grupo

controle e $1,16\mu\text{m}$ para o tratado, não evidenciando significância estatística entre os grupos.

Tabela 10. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Médio e a Relação D.maior/d.menor (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Diâmetro Médio		Relação D/d	
	C	T	C	T
Média de 50 núcleos				
1	14,84	12,79	1,13	1,17
2	14,66	15,43	1,17	1,20
3	16,34	13,34	1,12	1,14
4	14,70	14,56	1,17	1,13
5	15,71	14,10	1,18	1,16
Média	15,25	14,04	1,15	1,16
Dp	0,74	1,03	0,02	0,02
Mediana	16,34	13,34	1,12	1,14
p•	< 0,05*		> 0,05	

• Teste t de Student; * Significante ao nível de 5%

A avaliação dos volumes nucleares medidos em micrômetro cúbico (μm^3) e das áreas nucleares medidas em micrômetro quadrado (μm^2) das células de Sertoli, encontra-se na tabela 11.

Os valores médios do volume nuclear das células de Sertoli é de $1.902,75\mu\text{m}^3$ para o grupo controle e $1.510,11\mu\text{m}^3$ para o grupo tratado; assim como os valores médios da área nuclear é de $184,12\mu\text{m}^2$ para o grupo controle

e $157,03\mu\text{m}^2$ para o grupo tratado. Para os parâmetros avaliados, as diferenças observadas entre os grupos são estatisticamente significante ao nível do 5%.

Tabela 11. Distribuição dos valores médios do Volume Nuclear e da Área Nuclear (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Volume Nuclear		Área Nuclear	
Média de 50 núcleos	C	T	C	T
1	1.728,70	1.142,52	173,51	130,29
2	1.686,32	2.003,94	170,02	189,63
3	2.326,33	1.263,02	210,94	140,57
4	1.696,12	1.647,68	170,84	167,56
5	2.076,28	1.493,38	195,31	157,09
Média	1.902,75	1.510,11	184,12	157,03
Dp	287	339	18,3	23,2
Mediana	2.326,33	1.263,02	210,94	140,57
p•	< 0,05		< 0,05	

• Teste t de Student; * Significante ao nível de 5%

As estimativas da relação volume/área e do perímetro dos núcleos das células de Sertoli estão expostas na tabela 12. Os valores médios da relação volume/área nuclear é de 10,16 para o grupo controle e 9,37 para o grupo tratado e, e os valores das médias dos perímetros desses núcleos é de $48,14\mu\text{m}$ para o grupo controle e $44,36\mu\text{m}$ para o grupo tratado. Na análise estatística, o teste t de Student revela que essas diferenças são

estatisticamente significantes para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 12. Distribuição dos valores médios da Relação Volume/Área e do Perímetro e (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Relação Vol/Área		Perímetro	
	C	T	C	T
1	9,89	8,53	46,77	40,41
2	9,77	10,29	46,33	48,84
3	10,89	8,90	51,48	42,09
4	9,80	9,71	46,46	45,92
5	10,47	9,40	49,66	44,54
Média	10,16	9,37	48,14	44,36
Dp	0,49	0,68	2,32	3,25
Mediana	10,89	8,90	51,48	42,09
P•	< 0,05*		< 0,05*	

• Teste t de Student; * Significante ao nível de 5%

A análise nuclear das células de Sertoli em relação à excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, estão expressos na tabela 13.

É verificado que os valores médios da excentricidade é de 0,46 para o grupo controle e 0,47 para o grupo tratado. Para o coeficiente de forma desses núcleos a média nos grupos controle e tratado é de 0,99. E para o índice de contorno a média estimada é de 3,56 nos dois grupos. A análise estatística não mostrou significância para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 13. Distribuição dos valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno (μm) dos núcleos das células de Sertoli de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Excentricidade		Coef. de Forma		Ind.de Contorno	
	C	T	C	T	C	T
1	0,44	0,47	0,99	0,99	3,56	3,57
2	0,48	0,52	0,99	0,98	3,57	3,57
3	0,43	0,46	0,99	0,99	3,56	3,56
4	0,47	0,43	0,99	0,99	3,57	3,56
5	0,50	0,48	0,99	0,99	3,57	3,56
Média	0,46	0,47	0,99	0,99	3,56	3,56
Dp	0,02	0,03	-	-	0,005	0,005
Mediana	0,43	0,46	0,99	0,99	3,56	3,56
p•	> 0,05		> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

c. Células de Leydig

As especificações cariométricas das células de Leydig observadas nos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, e sua análise estatística, estão expostas nas tabelas 14 a 18. Tendo como unidade de medida o micrômetro (μm), na tabela 14 verificam-se que os valores médios do diâmetro maior desses núcleos é $11,52\mu\text{m}$ para o grupo controle e $11,30\mu\text{m}$ para o tratado; assim como os valores médios do diâmetro menor é $9,12\mu\text{m}$ para o

grupo controle e 8,94 μ m para o tratado. A análise estatística não mostrou significância para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 14. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Maior e do Diâmetro Menor (μ m) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Diâmetro Maior		Diâmetro Menor	
	C	T	C	T
Média de 50 núcleos				
1	11,65	11,98	9,50	8,94
2	11,11	11,63	8,79	9,31
3	11,79	10,52	9,26	8,60
4	11,94	10,87	9,06	8,71
5	11,10	11,52	9,00	9,16
Média	11,52	11,30	9,12	8,94
Dp	0,39	0,59	0,27	0,29
Mediana	11,79	10,52	9,26	8,60
p•	> 0,05		> 0,05	

•Teste t de Student

Na Tabela 15 são apresentadas as variáveis observadas a partir dos diâmetros maiores e diâmetros menores. Notam-se os resultados obtidos das médias dos valores dos diâmetros médios e as diferenças entre os diâmetros maiores e menores dos núcleos das células de Leydig.

Os valores médios do diâmetro médio nuclear é 10,22 μ m para o grupo controle e 10,03 μ m para o tratado. Os dados da diferença entre os diâmetros maiores e menores (D/d) desses núcleos é 1,27 μ m para o grupo controle e

1,28 μm para o tratado; sendo que a análise estatística não apresenta significância para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 15. Distribuição dos valores médios do Diâmetro Médio e a Relação D.maior/d.menor (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Diâmetro Médio		Relação D/d	
	C	T	C	T
Média de 50 núcleos				
1	10,50	10,31	1,23	1,37
2	9,86	10,38	1,28	1,26
3	10,42	9,50	1,29	1,23
4	10,37	9,71	1,34	1,26
5	9,98	10,25	1,24	1,27
Média	10,22	10,03	1,27	1,28
Dp	0,28	0,39	0,04	0,05
Mediana	10,42	9,50	1,29	1,23
p•	> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

A avaliação dos volumes nucleares medidos em micrômetro cúbico (μm^3) e das áreas nucleares medidas em micrômetro quadrado (μm^2) das células de Leydig, encontra-se na tabela 15.

Os valores médios do volume nuclear das células de Leydig é de 579,79 μm^3 para o grupo controle e 558,34 μm^3 para o grupo tratado; assim como os valores médios da área nuclear é de 83,10 μm^2 para o grupo controle e

80,51 μm^2 para o grupo tratado. As diferenças observadas entre os grupos não é estatisticamente significativa ao nível de $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 16. Distribuição dos valores médios do Volume Nuclear e da Área Nuclear (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

Média de 50 núcleos	Volume Nuclear		Área Nuclear	
	C	T	C	T
1	625,34	615,68	87,50	85,45
2	529,09	621,53	77,73	86,39
3	605,92	467,20	85,90	71,83
4	601,40	499,74	85,30	75,16
5	537,21	587,55	79,08	83,73
Média	579,79	558,34	83,10	80,51
Dp	43,6	70,5	4,39	6,58
Mediana	605,92	467,20	85,90	71,83
p•	> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

Expressa-se na tabela 17 a avaliação da relação volume/área e do perímetro dos núcleos das células de Leydig. Os valores médios da relação volume/área nuclear é de 6,81 para o grupo controle e 6,68 para o grupo tratado e, e os valores das médias dos perímetros desses núcleos é de 32,56 μm para o grupo controle e 31,94 μm para o grupo tratado. A análise estatística não mostra significância para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 17. Distribuição dos valores médios da Relação Volume/Área e do Perímetro (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Relação Vol/Área		Perímetro	
	C	T	C	T
Média de 50 núcleos				
1	7,00	6,87	33,32	33,10
2	6,58	6,92	31,40	33,02
3	6,94	6,33	33,23	30,12
4	6,91	6,48	33,19	30,88
5	6,66	6,84	31,67	32,61
Média	6,81	6,68	32,56	31,94
Dp	0,18	0,26	0,94	1,36
Mediana	6,94	6,33	33,23	30,12
P•	> 0,05		> 0,05	

•Teste t de Student

A análise nuclear das células de Leydig em relação a excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, estão expressos na tabela 18.

É verificado que os valores médios da excentricidade é de 0,58 para os grupos controle e tratado. Para o coeficiente de forma desses núcleos a média observada é de 0,97 em ambos os grupos e, para o índice de contorno a média estimada é de 3,59 também nos dois grupos. Assim, análise estatística não mostra significância para os parâmetros estudados, considerando-se $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 18. Distribuição dos valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno (μm) dos núcleos das células de Leydig de fetos de ratas do grupo controle (C) e do grupo tratado com ciclamato de sódio (T).

	Excentricidade		Coef. de Forma		Ind.de Contorno	
Média de 50 núcleos	C	T	C	T	C	T
1	0,55	0,63	0,98	0,96	3,58	3,62
2	0,58	0,57	0,97	0,98	3,59	3,59
3	0,58	0,55	0,97	0,98	3,60	3,58
4	0,62	0,57	0,96	0,98	3,61	3,59
5	0,57	0,58	0,98	0,98	3,58	3,59
Média	0,58	0,58	0,97	0,97	3,59	3,59
Dp	0,02	0,03	0,008	0,008	0,01	0,01
Mediana	0,58	0,55	0,97	0,98	3,60	3,58
p•	> 0,05		> 0,05		> 0,05	

• Teste t de Student

“Há duas maneiras de viver a vida: Uma é como se nada fosse milagre. A
outra, como se tudo fosse milagre”.

(Albert Einstein)

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. Agentes Teratogênicos: Os Edulcorantes

A identificação de agentes que possam ser teratogênicos durante o desenvolvimento humano é o objetivo geral de pesquisas que testam a teratogenicidade de drogas, compostos químicos, aditivos de alimentos e pesticidas; também para alertar a equipe de saúde e mulheres grávidas do possível risco para os embriões/fetos.⁽⁵⁾

Segundo Lemonica (2003), a terceira lei da Teratologia diz que os efeitos finais de um agente nocivo podem aparecer na forma de malformações, déficit funcional, retardo de desenvolvimento geral ou específico ou letalidade dependendo do estágio de desenvolvimento no qual se encontra o conceito no momento da exposição ao agente.⁽⁸⁾

Por outro lado, sabe-se que uma das inquietações de grande parte das mulheres quando engravidam é o risco para a obesidade, e se antes da gestação já tinham o hábito de consumir adoçantes e outros “alimentos dietéticos” normalmente o uso não é interrompido e, na maioria dos casos elas não recebem orientações dos profissionais da saúde.

Com o passar dos anos, a crescente preocupação com a estética corporal e com a saúde, fizeram com que os adoçantes e aos produtos “light” e “diet” ganhassem cada vez mais adeptos ao seu uso. Nos dias de hoje, é comum observarmos o constante aparecimento de produtos novos no mercado, com grande apelo da mídia para o consumo sem restrições. E por exigência da

legislação, a composição do produto vem no rótulo, mas quase sempre não encontra-se realçada.^(9,38,39)

Por meio de uma dieta equilibrada e adequada, e respeitando a individualidade de cada gestante, são atingidas todas as necessidades diárias para o crescimento e desenvolvimento do conceito, evitando-se distúrbios nutricionais e sem que haja a necessidade de utilizar produtos como edulcorantes.

Durante a gestação, a mulher torna-se altamente vulnerável aos problemas nutricionais devido ao aumento dos requerimentos de nutrientes e energia, que podem estar sendo ignorados pela substituição de alimentos integrais por produtos dietéticos.⁽³⁾

O uso de adoçantes durante a gravidez foi um dos assuntos pesquisado em estudo realizado na região sul do Brasil, onde o uso de produtos que contenham edulcorantes em sua composição, foi observado em 36% das participantes que utilizaram pelo menos uma vez durante o período gestacional, sendo que somente 10% foram orientadas por profissionais da saúde.

Outro dado interessante verificado na mesma pesquisa, foi em relação ao grau de escolaridade das gestantes que eram consumidoras de produtos dietéticos, sendo o índice de 85,7% entre as universitárias e esta relação diminuiu entre as que apresentaram menor nível de instrução escolar.

Ainda, as autoras observaram que entre as gestantes consumidoras de produtos dietéticos à base de edulcorantes, independente do Índice de Massa Corpórea (IMC) prévio, a maioria obteve um ganho de peso gestacional

excessivo, especialmente aquelas com IMC acima de 24 kg/m², evidenciando-se que a substituição da sacarose por adoçantes e produtos que contenham edulcorantes não é aspecto determinante no ganho de peso.⁽⁴⁰⁾

Ziegel e Cranley⁽⁴¹⁾ relatam que durante o período gestacional existem gastos adicionais com o crescimento da unidade fetoplacentária e com o aumento dos tecidos maternos (como útero e mamas), também com a manutenção do maior metabolismo materno. Assim, a dieta da gestante deve conter calorias suficientes para apoiar um aumento de peso de aproximadamente 11 kg.

A gordura subcutânea que aumenta gradualmente no abdômen, costas e coxas serve como uma reserva de energia para a gravidez e lactação.⁽³⁾

No desenvolvimento de uma das etapas do presente trabalho, após a laparotomia para a retirada dos fetos, observou-se nas ratas do grupo tratado um acúmulo excessivo de tecido gorduroso na região abdominal e dorsal, ainda que essas tivessem adquirido menos peso que as ratas do grupo controle, despertando-nos para novos estudos.

4.2. O Material – Animal de Experimentação

Por volta de 1865, em seus estudos de fisiologia, Claude Bernard lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana. Em seu trabalho “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” procurou estabelecer os princípios e as regras para o estudo experimental da medicina, por meio de situações físicas e químicas que

resultavam em alterações nos animais semelhantes à de doenças em seres humanos.⁽⁴²⁾

Um modelo animal deverá atender aos pressupostos de: que permita o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal; que um processo patológico espontâneo ou induzido possa ser investigado e; que o fenômeno, em um ou mais aspectos, seja semelhante ao fenômeno em seres humanos.

Nesse contexto, Fagundes e Taha⁽⁴³⁾ realizaram um levantamento nas bases de dados da Biblioteca Regional de Medicina incluindo a Medline (National Library of Medicine-USA), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Eletronic Library Online) e Biblioteca Cochrane (The Cochrane Database of Systematic Reviews) sobre as seis espécies animais mais utilizadas em experimentos, num período de quatro anos, observaram que o rato nas quatro bases de dados, foi o animal mais usado em pesquisa, seguido pelo camundongo, coelho, cão, suíno e primatas. Cerca de 85% dos artigos da Medline e 70,5% dos artigos da Lilacs são referentes a ratos e camundongos.

Evidenciar possível risco de substâncias químicas para o homem, é um dos principais objetivos da Teratologia Experimental, assim quase sempre nos testes de teratogenicidade são envolvidos embriões de mamíferos. Então, é muito importante a escolha dos animais de experimentação, pois os resultados podem variar dependendo da espécie. Para tanto, são sugeridos os animais que possuem período de gestação curto e prole numerosa.

O rato, o camundongo e o coelho têm em comum características embriológicas e anatômicas, como: útero bicórnio (onde os sítios de implantação distribuem-se regularmente), número de filhotes elevados (para o rato e camundongo cerca de 11 por gestação e 7 a 8 para o coelho), como no homem, a placenta é do tipo hemocorial e, o controle adequado da população pode ser desenvolvido em laboratórios.

As agências normativas internacionais estabelecem, de acordo com o produto a ser testado, protocolos a serem elaborados que resumem testes denominados de 3 segmentos e que abrangem todos os períodos do ciclo evolutivo.⁽⁸⁾

Assim, para o desenvolvimento deste estudo foram envolvidos os testes de segmento 2 que são os testes de teratogenicidade propriamente ditos. São efetivados da seguinte forma: após o acasalamento, as fêmeas são tratadas durante o período organogênico, que compreende do 6º ao 15º dias pós-coito, no caso dos ratos.

Ao final da gestação os animais são sacrificados e, após laparotomia, os fetos são retirados para estudo de presença de malformações e anomalias externas, viscerais e esqueléticas, utilizando-se metodologias apropriadas para a realização desses procedimentos.⁽⁸⁾

Nesses testes, são observados ainda, os sítios de implantação, a presença de reabsorções e de fetos mortos para se determinar a taxa de perda pós-implantação; também são anotados o peso fetal e da placenta, o grau de desenvolvimento fetal e muitas outras observações que, após analisadas, oferecem parâmetros sobre a embriofetotoxicidade da substância em estudo.⁽⁸⁾

Contudo, é interessante lembrar que quando são envolvidos modelos animais em experimentos, a responsabilidade e o respeito são palavras que devem estar sempre presentes no íntimo de todo pesquisador e, que a escolha do animal deve ser bem estudada e pesquisada na literatura, antes da prática com o animal vivo. É aconselhável que seja utilizado o número mínimo necessário de animais para a obtenção de resultados válidos cientificamente.⁽⁴⁴⁾

Ante ao exposto, acreditamos que foram realizadas as adequações necessárias para o desenvolvimento do presente trabalho.

4.3. O Estudo Morfométrico

As medidas morfométricas mais comuns são superfícies, pesos, volumes, comprimentos, ângulos, diâmetros, perímetros; sendo que a cariometria é uma das técnicas desenvolvidas para a obtenção destes parâmetros.⁽⁴⁵⁾

A palavra morfometria é de origem grega, onde *morphé* significa a forma e *metrikós* é o ato de medir ou processo de estabelecer dimensões e, a finalidade dessas técnicas é tornar mais objetiva e rápida a apresentação e a compilação de resultados obtidos em pesquisas (na ciência) e na rotina diagnóstica (em biomedicina).⁽⁴⁶⁾

Essas medidas podem ser determinadas em estrutura macroscópicas utilizando-se balanças e antropômetros; mesoscópicas utilizando-se lupas e, microscópicas utilizando-se microscópio ótico para análise de células, sendo para estas o uso mais freqüente do termo morfometria.⁽⁴⁵⁾

Assim, Mello⁽⁴⁷⁾ nos lembra que apesar dos fragmentos celulares poderem desenvolver algumas atividades importantes, somente a célula tem a capacidade de manter a vida e de transmiti-la. As células podem apresentar estrutura e forma variadas, em geral, depende de suas especializações funcionais.

E na medida em que as técnicas de estudo foram se aprimorando, foi sendo reconhecida a importância vital do núcleo para a vida celular, culminando-se com a comprovação de que suas principais funções seriam a de transmissão de caracteres hereditários e a de supervisão da atividade metabólica da célula.⁽⁴⁷⁾

Na literatura especializada encontramos vários estudos que utilizaram a cariometria para observar células testiculares; como o trabalho de Miraglia e Hayashi⁽⁴⁸⁾ para monitorar os efeitos da elevação da temperatura testicular em ratos; Lamano Carvalho *et al.*⁽⁴⁹⁾ para verificar alterações do testículo humano na moléstia de Chagas II; também Lamano Carvalho *et al.*⁽⁵⁰⁾ para observar a simpatectomia química com guanetidina em ratos; Paschoal⁽⁵¹⁾ para estudar os efeitos da ofloxacina no desenvolvimento dos testículos de ratos.

Ainda, em outros tecidos orgânicos, a cariometria mostrou-se apropriada para estudos teratogênicos como na análise de células do cérebro,^(7,52) dos rins,⁽⁵³⁾ do fígado,^(30,38) da placenta,⁽³¹⁾ do pâncreas exócrino⁽⁵⁴⁾ entre outros.

Portanto, para quantificar o efeito do ciclamato de sódio nos testículos de ratos durante o período fetal, no atual experimento foi adequada a utilização da cariometria.

4.4. A Amostra e a Estatística

Para Vieira⁽⁵⁵⁾ população é um conjunto de elementos que têm em comum determinada característica. Na pesquisa experimental, após a definição da população a ser estudada, estabelece-se a técnica de amostragem, que é o procedimento utilizado para escolher os elementos que irão compor a amostra. Sabendo-se disso, no presente trabalho, optou-se pela amostra casual simples sem reposição.

A determinação do tamanho de uma amostra é um fator muito importante, pois amostras desnecessariamente grandes acarretam desperdício de tempo e de dinheiro; e amostras demasiadamente pequenas podem levar a resultados não-confiáveis.⁽⁵⁶⁾

Assim, para a definição de uma quantidade representativa de núcleos celulares a serem analisados, na presente pesquisa utilizou-se o método apresentado em 1977 por Williams,⁽⁵⁷⁾ que basicamente consiste no cálculo das médias do evento que se tem a intenção de estudar.

Por este método, inicialmente conta-se em 100 (cem) campos aleatórios o número de células que se pretende avaliar, de forma que representem todo o corte histológico; na seqüência, calcula-se a média acumulada somando-se o número de células por campo e dividi-se pelo número de campos – fator divisão. Então, a centésima média acumulada corresponderá “ao 100%”, sendo que este valor será a base para calcular os valores das porcentagens dos demais, por meio da aplicação de uma regra de três simples.

Efetuada o cálculo da porcentagem da média acumulada, a partir da 50^a medida observa-se que os valores permanecem entre 95 e 105%; assim sendo, aceita-se como estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$ e, o número representativo de campos para contar os eventos é 50 (cinquenta).

Portanto, na probabilidade estatística, contar 50 campos aleatórios não seria diferente de se contar valores acima, ou seja, 100, 200, 1000 ou mais campos aleatórios.⁽⁵⁷⁾

A partir disso, em nosso trabalho, foram avaliados 50 núcleos de cada tipo celular determinado – gonócitos, células de Sertoli e células de Leydig; sendo 5 (cinco) animais participantes de cada grupo, somou-se 750 núcleos no grupo controle e 750 no tratado; então, o número total de núcleos avaliados foi de 1500.

Para a confirmação de diferenças significantes estatisticamente, o teste aplicado foi o de *Student* ou *Teste t*, visto que os dados obtidos eram contínuos e de distribuição gaussiana.⁽⁵⁸⁾

O teste t é método mais utilizado quando se deseja avaliar as diferenças entre as médias de dois grupos; podendo ser usado mesmo que as amostras sejam pequenas, desde que seja admitido que as populações que originaram as amostras tenham distribuição normal e variabilidades não diferentes significativamente. Este teste usa a diferença entre as médias dos dois grupos e o erro padrão das diferenças das médias obtidas.^(58,59)

4.5. Os Pesos Fetal e Placentário e o Comprimento do Cordão Umbilical

O estado nutricional materno está relacionado com o peso do recém-nascido. Dietas hipocalóricas causam retardo do crescimento intra-uterino em animais de experimentação, assim como em humanos.⁽¹⁾

Desde o início do século passado, acreditava-se que um estado de nutrição materna pobre tinha uma profunda influência no peso ao nascimento e no resultado da gravidez. Entretanto, a filosofia de restringir o ganho de peso materno prevaleceu nos anos 60 e ainda é defendida por uma minoria dos clínicos.

Posteriores a este período, os estudos têm confirmado a observação de que um ganho de peso maior durante a gravidez está associado com aumento do peso de nascimento e uma diminuição progressiva no número de bebês com baixo peso ao nascimento.⁽³⁾

Zanagnolo e Pressman⁽⁶⁰⁾ informam que a incidência de peso baixo ao nascimento varia de acordo com a população investigada; é estimada em aproximadamente 4 a 8% nos países desenvolvidos e 6 a 30% em países em desenvolvimento. Os fatores causais são classificados em maternos, placentários e fetais, sendo que nestes últimos, os teratógenos são destacados e definidos como “qualquer agente que cause lesão teratogênica é capaz de produzir retardo no crescimento fetal”; são citados fármacos, tabaco e álcool.

Dessa forma, no neste trabalho, observa-se que em valores numéricos, a média do peso corporal foi menor nos fetos das ratas tratadas com ciclamato

de sódio durante a gestação (1,863g) em relação aos do grupo controle (2,084g). Este resultado está em concordância com os achados de Arruda⁽⁵³⁾ que ao realizar estudo morfométrico utilizando o mesmo produto, registrou a média de 2,29g para o grupo tratado e 2,93g para o controle, sugerindo a ação do produto durante o desenvolvimento fetal.

Situação semelhante observou Martins,⁽³⁰⁾ pesquisando os efeitos do ciclamato de sódio no fígado fetal de rato, quando a média de peso corporal do grupo tratado foi de 2,31g e 2,94g no controle, indicando-se como uma das ações tóxicas do uso da substância no período gestacional.

Corroborando, Matos⁽³¹⁾ em seu trabalho sobre os efeitos do ciclamato de sódio na placenta de ratas encontrou o mesmo resultado na avaliação do peso corporal dos fetos, onde as médias dos grupos foram de 2,31g no tratado e 2,94g no controle, sugerindo a ação do produto sobre o desenvolvimento fetal.

Em relação ao peso da placenta há diferença significativa ($p=0,001$) entre as médias encontradas 0,42g no grupo controle e 0,29g no tratado, sugerindo-se o efeito tóxico do ciclamato de sódio sobre esse órgão. Os estudos de Arruda,⁽⁵³⁾ Portela,⁽³⁸⁾ Martins⁽³⁰⁾ e Matos⁽³¹⁾ também corroboram com nossos resultados ao identificarem pesos placentários diminuídos entre ratas prenhas tratadas com edulcorantes.

As substâncias químicas que apresentam características necessárias para transpor os vários tipos de membranas, também atravessam a barreira placentária. Então, os elementos com peso molecular até 600 transpõem facilmente a placenta; porém aqueles com peso molecular entre 600 e 1.000 ultrapassam com maiores dificuldades.⁽⁸⁾

Assim, sabendo-se que o peso molecular da ciclohexilamina é 99,18,⁽²³⁾ é compreensível que esse metabólito atravessa a barreira placentária com “certa facilidade”, expondo o conceito aos efeitos tóxicos do produto.

Além do peso molecular, dentre outras propriedades, a lipossolubilidade, o grau de ionização e a ligação com proteínas plasmáticas também interferem na transposição placentária; onde a passagem das substâncias acontece principalmente por difusão lipídica, mas também por difusão facilitada, transporte ativo ou pinocitose.^(5,8)

À medida que o embrião se desenvolve, o âmnio envolve o pedículo embrionário, e surge o cordão umbilical; este estende-se da área umbilical do feto para o centro da superfície da placenta. Contém três vasos sangüíneos: duas artérias e uma veia, sendo que uma substância gelatinosa, denominada *geléia de Wharton*, formada de tecido conjuntivo mucóide, envolve os vasos e forma o restante do interior do cordão.⁽⁶¹⁾

O comprimento do cordão umbilical foi outro dado morfométrico observado nesta pesquisa. Há evidência ($p= 0,028$) que a média do comprimento do cordão umbilical é menor no grupo tratado (1,76cm) que a média do controle (1,96 cm), sugerindo-se a ação do edulcorante em estudo. Este resultado está em consonância com estudos anteriormente descritos.^(53,30,31)

No cordão umbilical, o sangue do feto flui através das duas artérias umbilicais para a placenta, onde deixa seus produtos degradados, e a veia conduz sangue oxigenado e sustento alimentar da placenta para o feto. Assim,

é evidente que a vida do feto depende de um fluxo bidirecional ininterrupto de sangue através do cordão.⁽⁶¹⁾

Para Moore e Persaud,⁽⁵⁾ na espécie humana, normalmente o cordão umbilical tem 1 a 2 centímetros de diâmetros e 30 a 90 centímetros de comprimento, em média de 55 centímetros. Acredita-se que a definição do comprimento seja influenciada por fatores genéticos e outros; porém um cordão muito curto, durante o parto, pode causar a separação prematura da placenta da parede do útero.

4.6. Efeitos do Ciclamato de Sódio Sobre os Testículos

O testículo é composto por até 900 (novecentos) túbulos seminíferos envelados, com mais de meio metro de comprimento cada um deles, no interior dos quais ocorre a espermatogênese.⁽⁶²⁾

A capacidade de formação dos gametas masculinos haplóides (espermatozóides) pelos túbulos seminíferos é atribuída ao fato de que estes são revestidos por grande número de células epiteliais germinativas – as espermatogônias, que encontram-se distribuídas em duas ou três camadas ao longo da superfície tubular interna.^(5,63)

A espermatogênese ocorre ao longo de uma série de passos chamada, em seqüência, espermacitogênese, meiose e espermiogênese. A espermacitogênese inicia com o desenvolvimento das espermatogônias, das quais são reconhecidos três tipos: a célula tipo A escura, a célula tipo A clara e

a célula tipo B⁽⁶³⁾. Assim, no atual estudo, as espermatogônias foram denominadas genericamente como gonócitos.

Entretanto, nos túbulos seminíferos, o principal tipo celular até a puberdade são as células de Sertoli, que possuem funções de sustentação, de fagocitose e de secreção (são polifuncionais).

O formato da célula de Sertoli é irregular, com muitas extensões citoplasmáticas ramificadas que se comunicam com as células de Sertoli vizinhas, formando uma rede citoplasmática. O núcleo também é irregular, com pregas profundas, mas com tendência a assumir um formato oval, com o eixo maior em ângulo reto em relação à membrana basal, possui ainda, um padrão de cromatina vesicular e um nucléolo grande.⁽⁶³⁾

As células de Sertoli não sofrem influências de fatores que lesam o sensível epitélio germinativo, por exemplo, elas não se degeneram quando são expostas a uma temperatura corporal normal, podendo sobreviver no testículo que não migrou para a bolsa escrotal.⁽⁶³⁾ Porém, no presente trabalho, os núcleos desse tipo celular foram os únicos que apresentaram alterações significativas na análise cariométrica, que serão discutidas no decorrer deste capítulo.

Nos interstícios entre os túbulos seminíferos, são encontrados vasos sangüíneos e os aglomerados de células intersticiais produtoras de hormônios – as células de Leydig.

As células de Leydig produzem testosterona e, podem ser ocasionalmente encontradas no mediastino do testículo, no epidídimo ou até no

cordão espermático. Algumas dessas células são pequenas e fusiformes e consideradas como formas imaturas, mas a maioria é redonda ou poligonal.

Possuem, ainda, um citoplasma granular eosinofílico, contendo lipases, enzimas oxidativas, esterases e inúmeros esteróides desidrogenases; os núcleos são vesiculares arredondados, com membranas nucleares proeminentes e podem conter um ou dois nucléolos.⁽⁶³⁾

No embrião, por volta da oitava semana, a testosterona e outros andrógenos sintetizados pelos testículos em formação, são responsáveis pelo desenvolvimento do pênis e das glândulas sexuais acessórias, como a próstata e o epidídimo.^(5,63)

Recorda-se que, na maioria dos organismos, a flora bacteriana do trato gastrointestinal converte o ciclamato em um metabólito tóxico denominado ciclohexalamina (CHA).⁽⁶⁴⁾

Testes realizados nos órgãos de ratos mostraram-se sensíveis aos efeitos tóxicos da CHA, sendo citada atrofia dos testículos caracterizada pela redução do peso testicular e marcada diminuição da espermatogênese.^(20,65-67)

Oser *et al.*⁽²¹⁾ verificaram atrofia testicular em ratos tratados com 2500 mg/kg da mistura 10:1 ciclamato/sacarina, além disso esses animais tiveram o peso corporal significativamente mais baixos do que os controles.

Também, Miyaji⁽²²⁾ encontrou associação entre atrofia testicular e a redução de peso corporal de ratos tratados com ciclamato de sódio ou com a mistura 10:1 ciclamato/sacarina em um nível dietético de 5%.

Nos Estados Unidos, Takayama *et al.*⁽⁶⁸⁾ desenvolveram um estudo de caso-controle à longo prazo envolvendo 21 (vinte e um) macacos no período de

1970 à 1994, os patologistas encontraram mudanças testiculares (principalmente atrofia) em 3 (três) animais do grupo tratado; entretanto a causa da mudança não foi atribuída ao ciclamato de sódio, pois os mesmos animais apresentaram problemas ou patologias nesses órgãos durante o período de estudo (em 1984 e 1990).

Assim, no presente trabalho, na observação dos núcleos dos gonócitos e dos núcleos das células de Leydig, verificou-se que os parâmetros cariométricos não apresentaram diferenças estatísticas significantes ($\alpha < 0,05$) entre os elementos dos grupos controle e tratado. Por estes resultados, percebe-se que os núcleos dessas células não sofrem alterações quando os animais são expostos ao edulcorante em discussão.

Porém, Roberts *et al.*⁽²⁰⁾ pesquisaram o metabolismo e a toxicidade testicular da CHA em ratos e camundongos adultos e, constataram que a adição na dieta de 400 mg/kg/dia desse produto, depois de 3 semanas causou degeneração ou esgotamento significativo das células germinativas em ratos DA, e depois de 7 semanas lesões severas foram observadas em grande proporção dos túbulos seminíferos e afetou toda a classe de células germinativas.

No estudo desenvolvido por Oser *et al.*,⁽⁶⁷⁾ o exame histopatológico dos testículos revelou uma grande incidência de alterações atróficas para os grupos de animais que receberam 50 e 150mg/kg/dia de CHA, apontando para os efeitos do consumo de doses elevadas da substância.

Mason e Thompson⁽⁶⁹⁾ observaram lesões testiculares provocadas pela CHA em ratos tratados com o produto durante 90 dias; além disso, os animais

que recebiam dosagens mais elevadas na dieta, diminuíram o consumo e ganharam menos peso.

Na atual pesquisa, o estudo cariométrico efetuado nas células de Sertoli revelou que no grupo tratado houve diminuição estatisticamente significativa ($\alpha < 0,05$) dos núcleos dessas células nos seguintes parâmetros: diâmetro menor, diâmetro médio, volume, área, relação volume/área e no perímetro. Portanto, constata-se que os núcleos das células de Sertoli dos fetos participantes do grupo tratado são significativamente menores que os dos elementos do grupo controle.

Por outro lado, constatou-se que a forma dos núcleos das células de Sertoli dos fetos do grupo tratado foi preservada, visto que os parâmetros cariométricos relação diâmetro maior/menor, excentricidade e índice de contorno não evidenciaram diferença estatística significativa ($\alpha < 0,05$) entre os controles e tratados.

Collings e Kirkby⁽⁷⁰⁾ acrescentaram 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 ou 1% de ciclohexilamina (CHA) nas dietas de ratos durante 13 semanas. Verificaram que os ganhos de pesos corporal e testicular absolutos foram diminuídos nos dois níveis mais elevados da dosagem; ocorreu decréscimo de consumo do alimento nos grupos tratados com 0,2, 0,5 e 1% de CHA e; uma incidência significativamente aumentada de mudança histológica nos testículos (degeneração tubular) no nível dietético de 1%.

Em estudo semelhante, Roberts e Renwick⁽⁷¹⁾ pesquisaram as concentrações de CHA nos tecidos de ratos e camundongos, quando foram adicionadas diferentes doses da substância na dieta; e entre outros achados

interessantes, observaram que em ratos, doses elevadas (200 e 500 mg/kg) estavam associadas a um decréscimo de eliminação na urina nas primeiras 24 horas e um aumento na excreção durante as 24 horas seguintes, indicando a saturação em ratos e, por ser solúvel em água, a passagem para os tecidos dos testículos é rápida, sugerindo que a CHA atravessa todas as membranas, e nesse caso causaria atrofia testicular.

Em outro trabalho desenvolvido na Espanha, Serra-Majem *et al.*⁽⁷²⁾ constataram que, em humanos, a ingestão de ciclamato e a excreção de CHA não estão relacionados com a fertilidade masculina e, que o epitélio germinativo testicular é um tecido suscetível a vários agentes tóxicos, e a espermatogênese é afetada somente quando o uso é intenso ou por tempo prolongado. Os autores alertam para, que antes da troca da Ingestão Diária Aceitável (IDA) do produto, deve-se enfatizar que a conservação dados observados em animais oferecem riscos quando taxados para o homem.

E sobre o estudo realizado nos Estados Unidos envolvendo 21 macacos, Huff e Tomatis,⁽⁷³⁾ em 2000, publicaram observações que são interessantes no que se refere aos resultados “negativos” encontrados na pesquisa; eles consideraram alguns pontos limitantes como: o pequeno número de animais envolvidos, os macacos teriam tolerado elevada quantidade de ciclamato, e a constatação de tumores de diferentes tipos.

Ainda, especialmente considerando o pouco conhecimento da classe dos tumores, a ocorrência de três tumores malignos e três benignos no grupo de animais expostos ao produto; parece ser de considerável significância biológica

e deve ser levado como uma séria advertência direcionada a possibilidade carcinogênica do ciclamato.

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele,
o oceano seria menor”.

(Madre Teresa de Calcutá)

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Nesta pesquisa, o estudo cariométrico desenvolvido em gonócitos, células de Sertoli e células de Leydig dos testículos de fetos de ratas *Wistar* tratadas com ciclamato de sódio na proporção de 50 mg/Kg de peso corporal, do décimo ao décimo terceiro dia de prenhez, possibilitou a identificação das seguintes alterações:

- ✓ Diminuição do peso fetal;
- ✓ diminuição de peso placentário;
- ✓ diminuição do comprimento do cordão umbilical;
- ✓ diminuição do diâmetro menor, diâmetro médio, volume, área, relação volume/área e no perímetro dos núcleos das células de Sertoli.

Sendo as células de Sertoli um importante tipo celular que compõe o testículo fetal, sugere-se toxicidade testicular do ciclamato de sódio.

“O trabalho é a melhor coisa para nos fazer amar a vida”.

(Ernest Renan)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yazlle MEHD, Patta MC. Assistência pré-natal em nível primário. In: Morais EM, Mauad Filho F, editores. Medicina materna e perinatal. Rio de Janeiro: Revinter Ltda; 2000. p. 4-8.
2. Reddy U, Rossiter J. Aconselhamento pré-concepção, cuidados pré-natais e aleitamento. In: Lambrou NC, Morse NA, Wallach EE. Ginecologia e Obstetrícia do Johns Hopkins. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda; 1999. p. 19-39.
3. Neuhouser MLS. Nutrição Durante Gravidez e Lactação. In: Mahan, LK, editor. Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia. 9 ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 181-212.
4. Moura EC. Nutrição. In: Carvalho MR de, Tamez RN, editores. Amamentação: bases científicas para a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.60-87.
5. Moore KL, Persaud TVN. Embriologia clínica. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

6. Cohlan SQ. Congenital anomalies in the rat produced by excessive intake of vitamin A during pregnancy. Society for Pediatric Research. New York City; 1953.
7. Góes MJ. Efeitos da exposição pré-natal à fenitoína sobre os plexos corioides dos ventrículos laterais do cérebro de ratos [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 1998.
8. Lemonica IP. Embriofetotoxicidade. In: Oga S, editor. Fundamentos de toxicologia. 2ª edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo; 2003. pg 91-100.
9. UERJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Adoçantes, mocinhos ou bandidos?. Boletim Acadêmico, 2004.
10. Cândido LMB, Campos AM. Adoçantes e Edulcorantes. In: Alimentos para fins especiais: Dietéticos. São Paulo: Livraria Varela, 1995. p. 115-225.
11. Caetano M. Ciclamato. In: Edulcorantes e Adoçantes em Alimentos. Ciclo de Debates. Campinas: Ital, 1990. p. 19-25.
12. Giese JH. Alternative sweeteners and bulking agents. Food Technology. Chicago 1993; 47(1):114-126.

13. Miller WT. The legacy of cyclamate. Food Technology. Chicago 1987; 41(1):116.
14. Carioca JOB, Arora HL, Park YK, Tavares FCA, Vasconcelos NM, Alves JMC. Adoçantes. Rev. Quími. Industr. RJ 1993; 61(691):17-20.
15. Cohen SM. Promotion in urinary bladder carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 1983; 50:51-9.
16. Grenby TH, Parker KJ, Lindley MG. Developments in sweeteners. 2nd ed. London: Applied Science Publishers, 1983. p 254.
17. Ichibagase H, Kojlman S, Suenaga A, Inove K. Studies on synthetic sweetening agents. XVI metabolism of sodium cyclamate (5). The metabolism of sodium cyclamate in rabbits and rats after prolonged administration of sodium cyclamate. Chem Pharm Bull 1972; 20:1093-1101.
18. Asahina M, Yamaka T, Sarrazin G, Watanabe K. Conversion of cyclamate to cyclohexylamine in guinea pig. Chem Pharm Bull 1972; 20:102-108.
19. Renwick AG, Williams RT. The fate of cyclamate in man and other species. Biochem J 1972; 129:869-879.

20. Roberts A, Renwick AG, Ford G, Creasy DM, Gaunt I. The metabolism and testicular toxicity of cyclohexylamine in rats and mice during chronic dietary administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 98(2): 216-29.
21. Oser BL, Carson S, Cox GE, Vogin EE, Sternberg SS. Chronic feeding studies with cyclamate: saccharin in rats. Report n° 88182, Food and Drug Research Laboratories, Maspeth, NY. 1970.
22. Miyaji T. Chronic toxicity study of sodium saccharin and sodium cyclamate in rats: 28-Month feeding department of Toxicology. National Institute of Hygienic Science. Tokyo, Japan 1973.
23. ChemicalLAND21.com Products. Cyclohexylamine: Product Identification. Industrial Chemicals - Seoul, Korea; 2006.
24. Oser BL, Carson S, Vogin EE, Sonders RC. Conversion of cyclamate to cyclohexylamine in rats. *Nature* 1968; 220: 178-179.
25. Kroes R, Berkvens JM, Peters PWJ, Verschuuren HG, Helleman PW, de Vries T, *et al.* Long term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine. Report 113/75 Tox.. 1975.

26. Bopp BA, Sonders RC, Kesterson JW. Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. (Pubmed) *Critical Reviews in Toxicology*. 1986;16(3):213-306.
27. Collings AJ. Metabolism of cyclamate and its conversion to cyclohexylamine. *Diabetes Care* 1989; 12(1):50-5.
28. Renwick AG, Thompson JP, O'Shaughnessy M, Walter EJ. The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004; 196(3):367-80.
29. Evangelista J. Coadjuvantes Domésticos. In: *Alimentos: um estudo abrangente: nutrição, utilização, alimentos especiais e irradiados, coadjuvantes, contaminação, interações* / José Evangelista. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. p. 125-132.
30. Martins AT. Efeitos do ciclamato de sódio no fígado fetal de rato: um estudo morfométrico e estereológico [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2004.
31. Matos MA. Efeitos do ciclamato de sódio na placenta de ratas: estudo morfométrico [Dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2006.

32. Arruda JGF, Martins AT, Godoy JMP, Fácio Jr. FN, Azoubel R. Effects of sodium cyclamate in kidneys of rats fetuses: a morphometric study. *Int. J. Morphol.*, 2004 22(2):127-132.
33. Torres de Mercau G, Villa NRM, Mercau GA, Riera NM, Santos NS, Vitalone H. Alteraciones en la citomembrana y células de superficie del intestino grueso por acción de los edulcorantes. *Acta Gastroent. Latinoamer.* 1995 25: 35-39.
34. Weihrauch MR, Diehl V. Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology* 2004 15: 1460-1465.
35. Luz MAM, Zanchetta Neto D. “Histoquímica e Imunocitoquímica – Introdução”. In: Luz MAM, Zanchetta Neto D., editores. *Histoquímica e Imunocitoquímica*. São José do Rio Preto – SP; 2002. p.5-67.
36. Harkema JR. Morphometric methods for studying airway cell density/proliferation. American Thoracic Society. American Lung Association. San Francisco (CA): Postgraduate Course 3; 1997.
37. Sala MAM, Matheus M, Valeri VA. A new stereological method for estimation: the thickness of a cellular layer on random sections. *Mikroskopie Wien* 1981; 38(516):127-130.

38. Portela GS. Efeitos do aspartame sobre o peso corporal e fígado fetal de ratos: estudo morfométrico [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2004.
39. IDEC (Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor). Adoçantes e bebidas light desrespeitam o Código de Defesa do Consumidor. Pesquisa do Idec publicada em Junho/2006.
40. Salles RK, Fiates GMR, Auler F, Lehrer KM. Uso de adoçantes durante a gravidez e ganho de peso gestacional. *Jornal Brasileiro de Ginecologia*. 1998;108(7): 247-254.
41. Ziegel E, Cranley M. Nutrição durante a gravidez. In: *Enfermagem Obstétrica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A; 1985. p. 180-194 .
42. Bernard C. An introduction to the study of experimental medicine (1865). In: *Images from the history of medicine division*. National Library of Medicine. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov>.
43. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo de animal de doença: critérios de escolha de espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004; 19(1): 59-65.

44. Pereira CEM, Silva JDOM, Romeiro VR. Aspectos éticos da experimentação animal. Acta Cir. Bras. [serial in the Internet]. 1998 Apr [cited 2006 Sep 04];13(2): 247-254.
45. Mandarim-de-Lacerda CA. Morfometria. In: Mandarim-de-Lacerda CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro:EDUERJ; 1995. p. 4-39.
46. Teixeira VPA, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Lino Junior RS, Oliveira FA, Castro ECC, *et al.* Princípios básicos e aplicações da morfometria. Disciplinas de patologia geral da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – FMTM, e da Universidade de Uberaba, 2001.
47. Mello MLS. Aspectos gerais de estrutura celular. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM, editores. A Célula 2001. Barueri - SP: Editora Manole Ltda; 2001. p.01-05.
48. Miraglia SM, Hayashi H. Histomorphometry of immature rat testis after heating. Journal of Morphology. 1993; 217: 66-74.
49. Lamano Carvalho TL, Ferreira LA, Sahão MA. Alterações do testículo humano na moléstia de Chagas II – Estudo morfométrico do tecido intersticial. Rev Inst Med Trop São Paulo 1982; 24(4):214-221.

50. Lamano Carvalho TL, Kempinas WG, Favaretto ALV. Morphometric evaluation of the rat testis, epididymis and vas deferens following chemical sympathectomy with guanethidine. *Annals of Anatomy* 1993; 175:453-457.

51. Paschoal Del'Arco V. Efeitos da ofloxacina no desenvolvimento dos testículos de ratos: estudo cariométrico [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2002.

52. Góes MJ. Telefone celular: efeitos da radiação sobre o córtex cerebral fetal em ratos [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2004.

53. Arruda JGF. Efeitos do ciclamato de sódio no rim fetal de ratos: estudo morfométrico [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2003.

54. Martins AT. Efeitos do ciclamato de sódio no pâncreas exócrino fetal de rato: estudo morfométrico e estereológico [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina, FAMERP; 2006.

55. Vieira Sônia. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro: Editora Campus; 1980.

56. Triola MF. Estimativas e Tamanhos de Amostras. In: Triola MF, editor. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos; 1999. p. 143-169.

57. Reis MA, Oliveira FA, Teixeira VPA. Método demonstrativo para o cálculo da média acumulada (Williams 1977). Disciplina de patologia geral da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – FMTM – 2001.

58. Dória Filho U. Introdução à bioestatística: para simples mortais / Ulisses Dória Filho. São Paulo: Negócio Editora, 1999.

59. Arango HG. Bioestatística: Teórica e Computacional. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2001.

60. Zanagnolo V, Pressman E. Complicações da gestação. In: Lambrou NC, Morse NA, Wallach EE, editores. Ginecologia e Obstetrícia do Johns Hopkins. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda; 1999. p. 82-102.

61. Ziegel E, Cranley M. A Placenta e as Membranas Fetais. In: Ziegel E, Cranley M, editores. Enfermagem Obstétrica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1985. p. 90-105

62. Guyton AC, Hall JE. Funções Reprodutoras e Hormonais Masculinas (e Função da Glândula Pineal). In: Guyton & Hall, editores. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.857-868.
63. Stevens A, Lowe JS. Histologia humana. 2a edição. São Paulo, 2001.
64. Renwick AG. The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica* 1986; 16(10-11): 1057-71.
65. Gaunt IF, Sharratt M, Grasso P, Lansdown AB, Gangolli SD. Short-term toxicity of cyclohexylamine hydrochloride in the rat. *Food Cosmet Toxicol.* 1974; 12(5-6): 609-24.
66. Gaunt IF, Hardy J, Grasso P, Gangolli SD, Butterworth KR. Long-term toxicity of cyclohexylamine hydrochloride in the rat. *Food Cosmet Toxicol.* 1976; 14(4): 255-67.
67. Oser BL, Carson S, Cox GE, Vogin EE, Sternberg SS. Long-term and mutltigeneration toxicity studies with cyclohexylamine hydrochloride. *Toxicology.* 1976; 6(1): 47-65.

68. Takayama S, Renwick AG, Johansson SL, Thorgeirsson UP, Tsutsumi M, Dalgard DW, *et al.* Long-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates. *Toxicological Sciences* 2000; 53:33-39.
69. Mason PL, Thompson GR. Testicular effects of cyclohexylamine hydrochloride in the rat. *Toxicology*. 1977; 8(2):143-56.
70. Collings AJ, Kirkby WW. The toxicity of cyclohexylamine hydrochloride in the rat. Unpublished report submitted to WHO, 1974.
71. Roberts A, Renwick AG. The pharmacokinetics and tissue concentrations of cyclohexylamine in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1989; 98:230-242.
72. Serra-Majem L, Bassas L, Garcia-Glosas R, Ribas L, Inglés C, Casals I, *et al.* Cyclamate intake and cyclohexylamine excretion are not related to male fertility in humans. *Food Additives and Contaminants* 2003; 20(12):1097-1104.
73. Huff J, Tomatis L. Long-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates – LETTER TO THE EDITOR. *Toxicological Sciences* 2000 57,186.

“Porque todo o que é nascido de Deus vence o mundo;
e esta é a vitória que vence o mundo: a nossa fé”.

(1 Jo 5,4).

7. APÊNDICES

7. APÊNDICES