

José Germano Ferraz de Arruda

Efeitos do Ciclamato de Sódio no Rim

Fetal de Ratos: Estudo Morfométrico

São José do Rio Preto

2003

José Germano Ferraz de Arruda

Efeitos do Ciclamato de Sódio no Rim

Fetal de Ratos: Estudo Morfométrico

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

São José do Rio Preto

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Faculdade
de Medicina de São José do Rio Preto

Arruda, José Germano Ferraz

Efeitos do ciclamato de sódio no rim fetal de ratos: estudo morfométrico/.

Arruda, José Germano Ferraz

São José do Rio Preto, 2003.

Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto -
Departamento de Especialidades Cirúrgicas.

Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

Unitermos: 1- Rim
 2- Ciclamato de sódio
 3- Morfometria
 4- Estudo experimental

BFMSJRP-SP/2-2003

À Márcia, esposa solidária, que comigo sentiu os espinhos para colhermos as rosas desses anos de convivência, pelas lutas vividas que nos ensinaram a caminhar, amar e juntos construirmos uma vida a nosso jeito de ser.

Aos meus filhos Germano, Jerônimo e Lara, razão maior das minhas lutas e vitórias, pela paciência e compreensão nas horas de estudo.

Aos meus pais Jerônimo e Leonilda, onde tudo começou, pelos ensinamentos dos valores morais, essenciais à minha formação pessoal, apoio e carinho.

À minha sogra Olga, pelo incondicional carinho, apoio e exemplo de vida, coragem e vontade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, pela sabedoria, humildade e dedicação com que orientou neste trabalho

Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), pela sua colaboração e enriquecimento constante da pós-graduação.

À Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, Chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Famerp, pela gentileza na confecção das fotografias das lâminas e pelo seu entusiasmo.

Ao Prof. M.Sc. Renato Braz de Araujo do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto, pela amizade, revisão e formatação da tese, e tradução do resumo para o inglês.

Ao Prof. Dr. José Maria Pereira de Godoy do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Famerp, pelos incentivos constantes.

Ao Prof. Dr. Carlos Abib Cury da Disciplina Urologia do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da Famerp, pela forma com que estimulou minha autonomia.

Ao Prof. Dr. José Carlos Mesquita, Vice-Chefe do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da Famerp, pelo estímulo, exemplo a seguir e idéia inicial do trabalho.

Ao Prof. Dr. Dulcimar Donizete de Souza, Chefe do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da Famerp, pela amizade sincera e incentivo contínuo na realização deste trabalho.

Ao Prof. M.Sc. Fernando Nestor Fácio Júnior, Sub-Chefe da Disciplina Urologia do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da Famerp, pelo apoio e companheirismo.

Ao Prof. M.Sc. Pedro Francisco Ferraz de Arruda, responsável pela Unidade de Transplante Renal da Disciplina Urologia do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da Famerp, pelas substituições durante a confecção desta tese.

Aos Profs. Drs. Ruberval Armando Lopes e Miguel Angel Di Matteo Sala do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), pela atenção, orientação e sugestões.

Ao pós-graduando Alex Tadeu Martins do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Famerp, pela amizade e colaboração efetiva durante o transcorrer deste trabalho.

Aos residentes da Disciplina Urologia do Departamento de Especialidades Cirúrgicas da Famerp, por serem fonte inesgotável de incentivo.

Ao Sr. Onivaldo Bizutti, técnico responsável pelo Laboratório de Farmacologia e Fisiologia da Famerp, pela colaboração e dedicação durante os experimentos.

Ao Sr. Domingos Zanqueta Netto, técnico do Laboratório de Histotecnologia da Famerp, pela colaboração na confecção das lâminas.

Ao Sr. Luiz Henrique de O. Ferreira, técnico em computação da Famerp, pela colaboração em diversos momentos deste trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação, especialmente José Antonio, Fabiana e Rose, pela atenção e apoio durante a realização deste trabalho.

À Sra. Zélia C. R. Brazolim, funcionária da Biblioteca da Famerp, pela presteza nas informações e pesquisas bibliográficas, fundamentais para a confecção desta tese.

À Profa. Márcia Rita Mesquista Ferraz de Arruda, pela revisão ortográfica desta tese.

À Profa. Lina Azoubel pelo incentivo e carinho sempre oferecidos.

*“Não há montanha que não possa ser transposta,
não há sonho que não possa ser conquistado
quando o coração é puro e o objetivo é digno...”*

Mahatma Ghandi

*“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito...
Não somos o que deveríamos ser, não somos
o que iremos ser, mas, graças a Deus,
não somos o que éramos.”*

Martin Luther King

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Mestre Reinaldo Azoubel

*“Nenhum homem poderá revelar-vos nada
senão o que já está no meio adormecido
na aurora do vosso entendimento.*

*O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos,
não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura.*

*Se ele for verdadeiramente sábio,
não vos convidará a entrar na mansão de seu saber;
mas antes vos conduzirá ao limiar de vossa própria mente...
Porque a visão de um homem não empresta suas asas a outro homem.”*

(Gibran Khalil Gibran)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Objetivo.....	10
2. MATERIAL E MÉTODO.....	11
2.1- Material.....	11
2.2- Método.....	11
2.2.1- Determinação do 1º dia de prenhez da rata.....	11
2.2.2- Tratamento com ciclamato de sódio.....	12
2.2.3- Técnica para obtenção dos fetos.....	12
2.2.4- Técnica histológica.....	13
2.2.5- Técnica morfométrica.....	16
2.2.5.1- Volume glomerular.....	16
2.2.5.2- Cariometria.....	16
2.3- Estudo Estatístico.....	19
3- RESULTADOS.....	20
3.1- Resultados Morfológicos.....	20
3.1.1- Peso fetal.....	20
3.1.2- Peso da placenta.....	21
3.1.3- Comprimento do cordão umbilical.....	21
3.2- Resultados Morfométricos.....	22
3.2.1- Glomérulo.....	22
3.2.2- Túbulo contornado proximal.....	26
3.2.3- Túbulo contornado distal.....	32
3.2.4- Ducto coletor.....	38
4- DISCUSSÃO.....	44
5- CONCLUSÕES.....	53
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fórmula estrutural do ciclamato de sódio e da ciclohexilamina..... 4
- Figura 2 - Fórmula estrutural de alguns metabólitos do ciclamato de sódio..... 5
- Figura 3 - Fotografia mostrando uma rata no 20º dia de prenhez com abdômen laparotomizado. Note o útero gravídico..... 14
- Figura 4- Fotografia mostrando abertura do útero de uma rata no 20º dia de prenhez para retirada dos fetos. Observe cordão umbilical e placenta..... 15
- Figura 5 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando glomérulo de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 23
- Figura 6 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando glomérulo de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 24
- Figura 7 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado proximal de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 27
- Figura 8 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado proximal de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 28
- Figura 9 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado distal de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 33

- Figura 10- Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado distal de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 34
- Figura 11- Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando ducto coletor de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 39
- Figura 12- Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando ducto coletor de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x)..... 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média dos pesos corporais (g) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 20
- Tabela 2 - Média dos pesos das placentas (g) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 21
- Tabela 3 - Média dos comprimentos dos cordões umbilicais (cm) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 22
- Tabela 4- Valores médios do volume glomerular (μm^3) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 25
- Tabela 5 - Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μm) e relação entre os diâmetros maior e menor (D/d) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 29
- Tabela 6- Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação entre volume e área (V/A) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 30
- Tabela 7 - Valores médios da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 31
- Tabela 8 - Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio e relação entre os diâmetros maior e menor (D/d) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados distais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T)..... 35

Tabela 9 - Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação entre volume e área (V/A) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados distais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T).....	36
Tabela 10 - Valores médios da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados distais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T).....	37
Tabela 11 - Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μm) e relação entre os diâmetros maior e menor (D/d) dos núcleos (n = 50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T).....	41
Tabela 12 - Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação entre volume e área (V/A) dos núcleos (n = 50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T).....	42
Tabela 13 - Valores médios da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos (n = 50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Área
cm	Centímetros
D	Diâmetro maior
d	Diâmetro menor
D/d	Relação entre os diâmetros maior e menor
E	Excentricidade
F	Coefficiente de forma
g	Gramas
h	Horas
I	Índice de contorno
M	Diâmetro geométrico médio
mm	Milímetros
mL	Mililitros
mg/kg	Miligramas por quilograma
mL/min	Mililitros por minuto
mmHg	Milímetros de mercúrio
n°	Número
P	Perímetro
p	Probabilidade de significância
t	Toneladas
V	Volume

V/A	Relação entre volume e área
μm	Micrômetros
\bar{x}	Média aritmética
π	Pi (= 3,1415)
%	Por cento
$\sqrt{\quad}$	Raiz quadrada

RESUMO

O ciclamato é usado como adoçante artificial não calórico em diversos alimentos e bebidas, sendo 30 vezes mais doce que a sacarose, sem o sabor amargo da sacarina. Aparece na composição dos produtos como ciclamato de sódio, ciclamato de cálcio e ácido ciclâmico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ciclamato de sódio em rins de fetos de ratas, considerando-se alterações morfométricas do glomérulo, túbulo contornado proximal, túbulo contornado distal e ducto coletor. Foram utilizadas 10 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar) pesando em média 238 g, sendo 5 para o grupo controle e 5 tratadas com ciclamato de sódio. Entre o 10º e 14º dia de gestação, 5 ratas receberam injeção diária intraperitoneal de 60 mg/kg de peso corporal de ciclamato de sódio, durante 5 dias. No 20º dia, os animais foram sacrificados e os fetos fixados em solução Alfac, incluídos em parafina, cortados e corados por hematoxilina e eosina. O método empregado foi a morfometria pela técnica cariométrica. Os resultados mostraram que o uso do ciclamato de sódio foi eficaz na redução do peso dos fetos, placentas e comprimento do cordão umbilical. Houve aumento significativo no volume glomerular e no tamanho nuclear das células dos túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor, sugerindo nefrotoxicidade.

ABSTRACT

The cyclamate is used as artificial non-caloric sweetener in a wide variety of foods and beverages, being 30 times as sweet as sugar without the bitter after-taste of saccharin. It appears in the composition of the products as sodium and calcium cyclamates and cyclamic acid. The purpose of this research was to assess the effect of sodium cyclamate in kidneys of rats fetuses considering morphometric changes of glomerulus, proximal and distal convoluted tubules, and collecting duct. Ten pregnant rat (*Rattus norvegicus*) weighting an average of 238 g were divided into two groups: 5 in the control group and 5 in treated group with sodium cyclamate. Between the 10th and the 14th pregnancy day, 5 rats received an intraperitoneal daily injection of 60 mg/kg of body weight of sodium cyclamate during 5 days. At the 20th, the animals were sacrificed and the fetuses were fixed in Alfac solution, included in paraffin, sectioned and stained with haematoxyline and eosine. Morphometry by the karyometric technique was the method used. The results showed that the use of sodium cyclamate was effective in the reduction of fetal and placentae weight, and lenght of umbilical cords. There was a significant increase in glomerular volume and in cell nuclei size of proximal and distal convoluted tubules and collecting duct, suggesting nephrotoxicity.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O ciclamato, sal do ácido N-ciclo-hexil-sulfâmico (CHS), é usado como adoçante artificial não calórico em diversos alimentos, bebidas^(1,2) e na indústria farmacêutica⁽³⁾. Aparece na composição dos produtos em três diferentes formas: ciclamato de sódio ($C_6H_{11}NH_2SO_3Na$), ciclamato de cálcio ($C_{12}H_{24}N_2S_2O_6Ca$) e ácido ciclâmico ($C_6H_{13}NO_3S$)⁽⁴⁾. É inodoro, solúvel em água, álcool e propilenoglicol⁽⁵⁾ e mais estável que o aspartame e a sacarina, podendo, por isso, suportar elevadas e baixas temperaturas⁽³⁾.

A descoberta do ciclamato ocorreu em 1937 por Michael Sveda, aluno de graduação da *University of Illinois*, Estados Unidos, que acidentalmente descobriu seu sabor adocicado, 30 vezes mais doce que a sacarose, sem o sabor amargo da sacarina⁽⁶⁾. Essa substância foi inicialmente comercializada em 1949 como adoçante artificial para diabéticos. Em 1959, o *Food and Drug Administration* (FDA), EUA, adicionou o ciclamato à lista das substâncias reconhecidas como seguras⁽⁷⁾.

A partir da mistura de ciclamato com sacarina na proporção 10:1, houve nos Estados Unidos aumento no consumo de adoçantes artificiais na década de 60. Em 1968, foram produzidas 7.718 t de ciclamato, sendo 69% utilizado em bebidas, 19% em adoçantes de mesa, 6% em alimentos, 4% em itens não alimentares e 2% exportado⁽⁸⁾. Segundo Burbank & Fraumeni⁽⁹⁾, em 1969 foram consumidos nesse país cerca de 8.943 t de ciclamato.

Em meados da década de 60, Kojima & Ichibagase⁽¹⁰⁾ constataram que o ciclamato de sódio não era eliminado de forma invariável, mas que poderia ser metabolizado como ciclohexilamina. Em 1969, o ciclamato associado à sacarina, na proporção 10:1, foi interpretado pelo FDA como indutor de câncer de bexiga em ratos⁽¹¹⁻¹³⁾. A partir desses estudos, seu uso foi proibido nos Estados Unidos após o *U.S. Department of Health, Education and Welfare* concluir que o ciclamato não apresentava qualquer valor no tratamento da obesidade ou diabetes⁽⁸⁾. Apesar disso, o *World Health Organization's Joint Expert Committee on Food Additives* aprovou o uso do ciclamato de sódio em 1977 como adoçante em alimentos e bebidas em mais de 40 países⁽¹⁴⁾, incluindo Brasil, Alemanha, Finlândia, Paquistão, África do Sul e Suíça⁽⁷⁾.

Em humanos e em várias espécies animais o ciclamato não é absorvido completamente no intestino^(7,15). Quando absorvido, rapidamente é excretado na urina sem considerável acúmulo no sangue ou tecidos^(16,17). A maior parte do ciclamato não absorvido normalmente é eliminado nas fezes, mas uma quantidade variável é convertida para ciclohexilamina por microorganismos que habitam o cólon e cecum^(18,19).

A ciclohexilamina, o principal metabólito do ciclamato, é rapidamente absorvido e excretado pelos rins, mas existe pouca excreção fecal. As taxas de excreção urinária de ciclamato e ciclohexilamina indicam que pouco permanece nos tecidos ou fluidos corpóreos após administração prolongada e em doses elevadas⁽¹⁶⁾. Além disso, ambos ciclamato e ciclohexilamina, podem ser

transportados pela barreira placentária e desse modo expostos ao feto⁽²⁰⁻²²⁾. De acordo com Pitkin *et al.*⁽²⁰⁾, os ciclamatos atravessam a placenta e, na circulação fetal, alcançam 1/4 da concentração materna, sendo encontrados, de preferência no fígado e nos rins.

Collings⁽²³⁾, investigando o metabolismo do ciclamato de sódio em humanos, constatou que com o aumento da dose dessa substância a quantidade de ciclohexilamina excretada também aumentou. Entretanto, segundo o autor, a porcentagem de conversão diminuiu com o aumento da dose de ciclamato de sódio. A conversão do ciclamato para ciclohexilamina (Figura 1) em humanos é heterogênea, sendo que aproximadamente 76% dos usuários regulares convertem menos que 0,1% de uma dose ingerida de ciclamato, cerca de 8 a 10% convertem 1% ou mais e 4% convertem 20% ou mais de ciclamato⁽⁷⁾.

Vários produtos do metabolismo da ciclohexilamina como N-hidroxíciclohexilamina, ciclohexanona, ciclohexanol e ciclohexeno (Figura 2) foram identificados em humanos^(24,25). No entanto, a falta de qualquer diferença entre as rotas de administração com relação à extensão do metabolismo da ciclohexilamina implica que os tecidos, mais que a flora intestinal, constituem o principal local para conversão desse metabólito⁽²⁶⁾.

Diversos estudos foram realizados em animais de laboratório visando verificar a toxicidade do ciclamato de sódio ou da mistura com a sacarina⁽²⁷⁻³⁰⁾. Os resultados revelaram poucos efeitos fisiopatológicos associados com a administração dessa substância, mesmo em doses elevadas. Considerando a

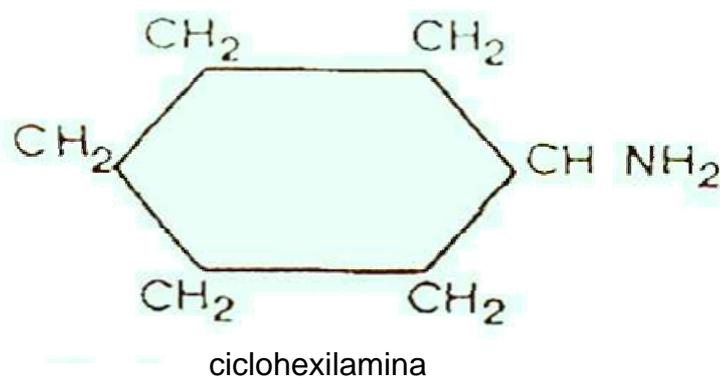
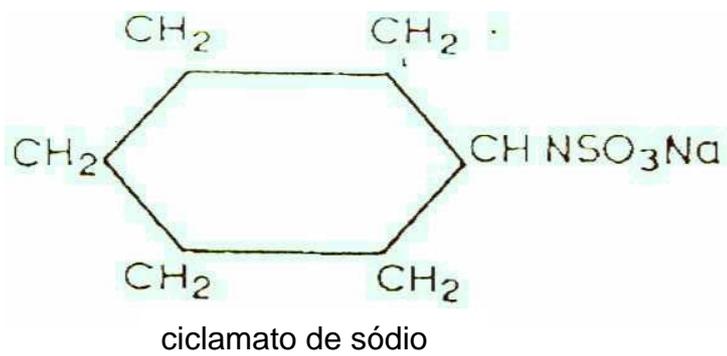


Figura 1 - Fórmula estrutural do ciclamarato de sódio e da ciclohexilamina. (Modificado de Cattana⁴).

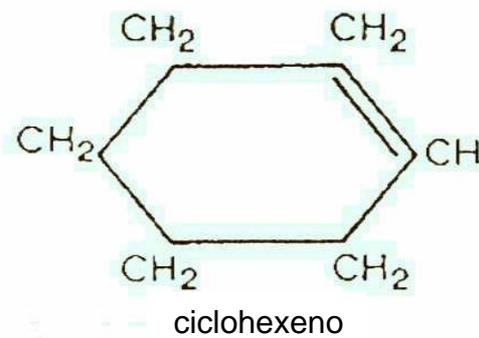
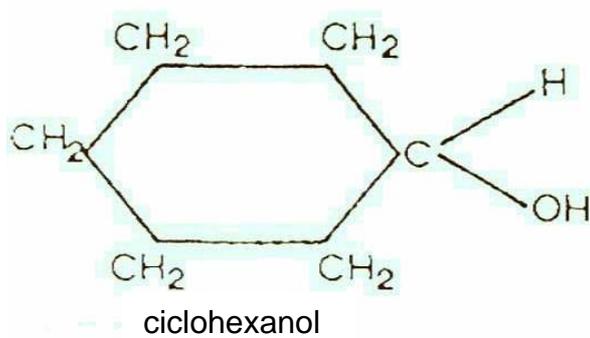
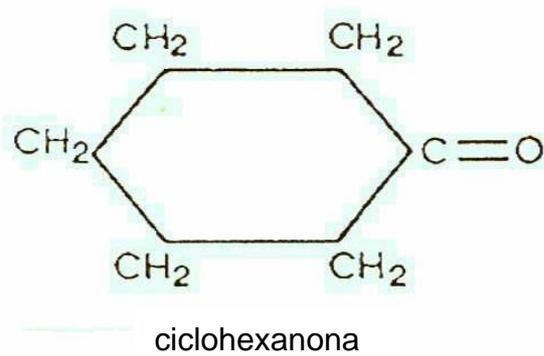
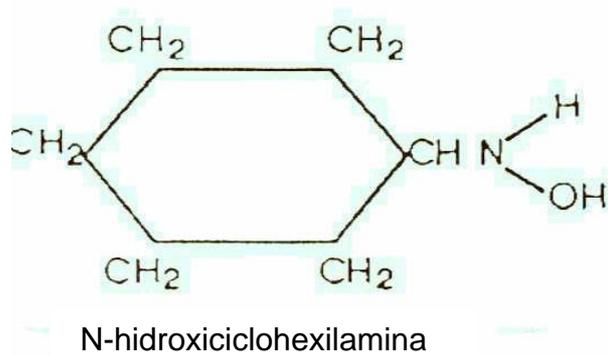


Figura 2 - Fórmula estrutural de alguns metabólitos do ciclamato de sódio.
(Modificado de Cattana⁴).

grande quantidade de trabalhos publicados na década de 60 sobre toxicidade do ciclamato, efeitos adversos foram relatados e atraíram a atenção da comunidade científica, sendo que muitas dessas contribuições foram consideradas achados isolados⁽¹⁴⁾.

Kroes *et al.*⁽³¹⁾, estudando a toxicidade a longo prazo do ciclamato, sacarina e ciclohexilamina em 2.400 ratos e seus efeitos na reprodução durante seis gerações, verificaram que nenhuma dessas substâncias apresentou efeito teratogênico e afetou a reprodução, sendo apenas a ciclohexilamina embriotóxica quando administrada em uma concentração de 0,5%.

O ciclamato, quando ingerido em grandes quantidades, produz diarreia em humanos. De acordo com Egeberg *et al.*⁽⁸⁾, isso é aparentemente o resultado de um efeito osmótico, pois não há evidência de que essa substância agrave doenças gastrointestinais orgânicas.

Analisando aspectos toxicológicos do ciclamato de sódio e da ciclohexilamina, Bopp *et al.*⁽¹⁴⁾ apresentam revisão sobre efeitos dessas substâncias em órgãos e sistemas como fígado, rim, trato gastrointestinal, coração, sangue, glândulas endócrinas (tireóide, adrenal, pâncreas) e sistema reprodutor (masculino e feminino), em animais e seres humanos.

Takayama *et al.*⁽³²⁾, investigando a toxicidade e carcinogenicidade a longo prazo em macacos alimentados com 100 mg/kg e 500 mg/kg de ciclamato, cinco vezes por semana, durante 24 anos, constataram espermatogênese irregular e casos esporádicos de diferentes malignidades. Segundo os referidos autores,

esses achados não fornecem evidência clara de efeito tóxico ou carcinogênico do ciclamato de sódio em macacos.

Recentemente, Sasaki *et al.*⁽³³⁾, avaliando a toxicidade de 39 substâncias químicas utilizadas como aditivos alimentares, entre elas o ciclamato de sódio, em órgãos como estômago, cólon, fígado, rim, bexiga urinária, pulmão, cérebro e medula óssea de ratos, constataram após 3 e 24 horas da administração de ciclamato de sódio em dose única e oral de 2000 mg/kg que essa substância induziu danos significativos ao ácido desoxirribonucleico de células do estômago, cólon, rim e bexiga urinária.

Segundo alguns autores, o rim de ratos pode ser afetado por elevadas doses de ciclamato de sódio^(34,35). Em alguns estudos, tem sido relatado leve aumento na incidência de nefrite e nefrose. Entretanto, tais alterações também foram comuns em ratos-controle⁽³⁴⁾. A alteração mais freqüente atribuída ao ciclamato envolve, em alguns casos, calcificação nos rins, seguida por hiperplasia do epitélio renal⁽³⁵⁾.

Friedman *et al.*⁽³⁴⁾, investigando ratos submetidos à dieta contendo 0,4%, 2% ou 10% de ciclamato de sódio ou cálcio durante 88 a 101 semanas, registraram nefrocalcinose em 5% dos ratos controle e 47 a 49% daqueles que receberam ciclamato. A incidência de nefrocalcinose foi relacionada à dose, pois a maioria dos ratos com tal alteração foi alimentada com 10% de ciclamato, mas foi similar com sais de sódio e cálcio.

Estudos clínicos têm indicado que a administração de ciclamato de sódio em doses de 2 a 10 g/dia não afeta a função renal em humanos^(16,36,37). Zöllner & Pieper⁽³⁸⁾, estudando pacientes com doenças crônicas renais e hepáticas que receberam doses diárias de ciclamato de sódio (2 ou 5 g), por mais de três anos, não encontraram por meio de monitorização de variáveis bioquímicas e resultados de uroanálise qualquer efeito negativo na função renal desses pacientes. Resultados similares foram obtidos por Van der Hem *et al.*⁽³⁹⁾ ao administrarem doses diárias de ciclamato de cálcio de 5,3 g durante 6 meses.

Por outro lado, Becker & Gibson⁽⁴⁰⁾, avaliando a teratogenicidade da ciclohexilamina em ratos, registraram dois casos de hidronefrose num total de 84 fetos. Segundo os autores, esse achado parece não estar relacionado com as doses ingeridas (61 e 122 mg/kg).

Atualmente, existem no Brasil diversos adoçantes de mesa à base de ciclamato e sacarina, sendo que os mais vendidos possuem a proporção de duas partes de ciclamato para uma de sacarina^(41,42). Assunção *et al.*⁽⁴³⁾, avaliando a quantidade de adoçante consumida diariamente por 36 indivíduos diabéticos, constataram que 92% deles consomem adoçantes artificiais não calóricos à base de ciclamato e sacarina, em quantidades inferiores à ingestão diária aceitável (IDA). De acordo com o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*⁽¹²⁾, a IDA do ciclamato corresponde a 50 mg/kg de peso corpóreo.

Na literatura são encontrados vários trabalhos que ressaltam a importância do ciclamato de sódio como substituto da sacarose, principalmente em casos de

diabetes ou quando a redução e controle do peso corpóreo são essenciais para a saúde desses indivíduos⁽⁸⁾. Outro aspecto positivo inclui a redução do desenvolvimento de cárie dentária⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

Diante desse contexto, a investigação do efeito do ciclamato de sódio sobre os rins de fetos de ratas se torna relevante, uma vez que inexitem informações na literatura internacional sobre morfometria do túbulo contornado proximal, túbulo contornado distal e ducto coletor no período de maior teratogenicidade. Além disso, uma possível nefrotoxicidade poderá reforçar a hipótese de que esse sal, muito utilizado como adoçante, pode ser prejudicial à saúde de animais e seres humanos.

1.1- Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ciclamato de sódio em rins de fetos de ratas, considerando-se alterações morfométricas das seguintes estruturas:

- 1- glomérulo;
- 2- túbulo contornado proximal;
- 3- túbulo contornado distal;
- 4- ducto coletor.

MATERIAL E MÉTODO

2- MATERIAL E MÉTODO

2.1- Material

Foram utilizadas 10 ratas adultas (*Rattus norvegicus albinus*, variedade Wistar), pesando em média 238 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração peletizada e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Famerp (Anexo 1).

Todos os animais receberam cuidados conforme recomendações do *Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources* (ILAR), Estados Unidos⁽⁴⁷⁾.

2.2- Método

2.2.1- Determinação do 1º dia de prenhez da rata

Para determinar o 1º dia de prenhez, as fêmeas foram colocadas para acasalamento com os machos na proporção de 1:4 durante a noite, e, pela manhã, foram examinadas por meio de esfregaços vaginais, visando verificar a presença de espermatozóides, sendo considerado como o primeiro dia de gestação.

2.2.2- Tratamento com ciclamato de sódio

Entre o 10º e 14º dia de prenhez, cinco ratas receberam injeção diária intraperitoneal de 60 mg/kg de peso corporal de ciclamato de sódio (Labsynth Ltda., Diadema, SP) durante cinco dias. Os animais controle receberam solução salina pela mesma via e no mesmo período.

2.2.3- Técnica para obtenção dos fetos

No 20º dia de prenhez, as ratas foram sacrificadas por inalação de éter sulfúrico.

Por meio de uma incisão ampla no abdômen e no útero, coletaram-se os fetos (Figuras 3 e 4), que foram imediatamente imersos em solução fixadora de Alfac (álcool a 80%: 85 mL; formalina: 10 mL de ácido acético glacial: 5 mL), sendo deixados a fixar durante 5 dias. Após esse período, foi escolhido aleatoriamente um feto de cada rata. Em seguida, efetuou-se a separação da placenta e do cordão umbilical. Foram pesados separadamente feto e placenta em balança de precisão Labof (Laboratorium Felszerelése, Budapeste, Hungria) e mensurado o comprimento do cordão umbilical com o auxílio de escala milimetrada.

2.2.4- Técnica histológica

O processamento histológico do material foi realizado no Laboratório de Histotecnologia da FAMERP. Os fetos, previamente fixados em solução de Alfac, foram desidratados e incluídos em blocos de parafina para realização de cortes seriados de 6 μm de espessura. Em seguida, foram corados com hematoxilina eosina (HE), visando possibilitar o exame morfométrico.

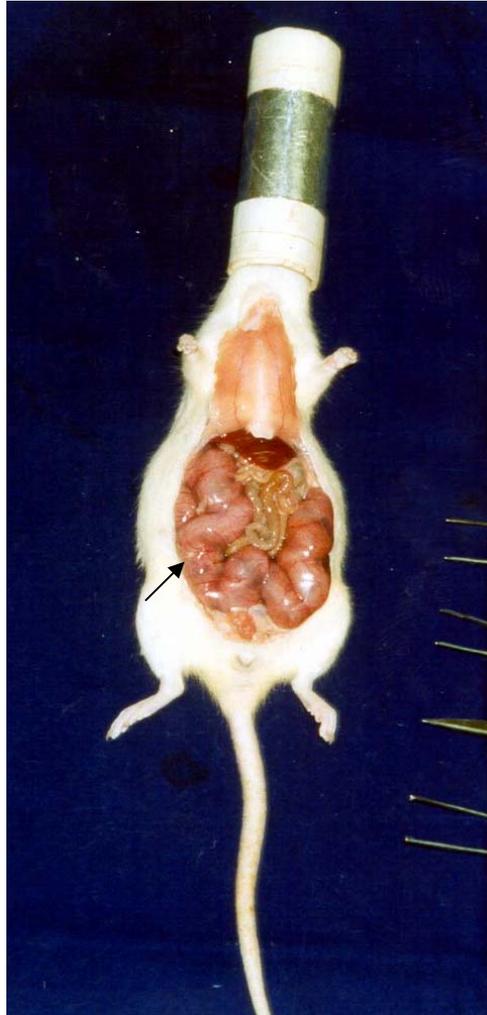


Figura 3 - Fotografia mostrando uma rata no 20º dia de prenhez com abdômen laparotomizado. Note o útero gravídico.

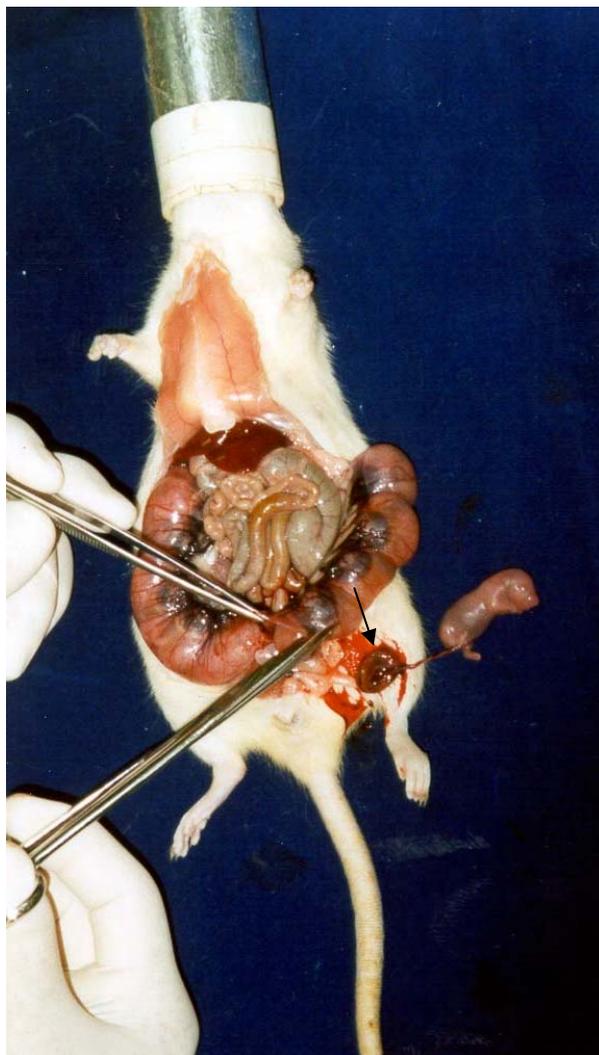


Figura 4 - Fotografia mostrando abertura do útero de uma rata no 20º dia de prenhez para retirada dos fetos. Observe cordão umbilical e placenta.

2.2.5- Técnica morfométrica

2.2.5.1- Volume glomerular

Para o cálculo do volume glomerular foi utilizado microscópio óptico Hund H500 Wetzlar (Helmut Hund GmbH, Alemanha), com objetiva de 40 vezes de aumento, munido de câmara clara Leitz Wetzlar (Alemanha) com aumento final de 496 vezes. Os glomérulos foram projetados sobre papel sulfite branco, sendo contornados com lápis preto nº 2.

Foram obtidas 20 estruturas por animal, totalizando 100 estruturas para cada grupo (controle e tratado). Para obtenção dos diâmetros foram medidos os eixos maior e menor de cada uma dessas imagens.

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

a) $M = \sqrt{D.d}$

b) Volume (V): $V = \frac{\pi}{6} \cdot M^3$

2.2.5.2- Cariometria

Para o estudo morfométrico, utilizou-se a cariometria para avaliação dos parâmetros nucleares de forma e volume, assim como suas relações por meio da obtenção dos diâmetros maior e menor dos núcleos das células do epitélio dos túbulos contornados proximal e distal e ductos coletores renais. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico Hund H500 Wetzlar

(Helmut Hund GmbH, Alemanha), com objetiva de imersão (100 vezes), munido de câmara clara Leitz Wetzlar (Alemanha).

Os núcleos foram projetados sobre o papel sulfite branco, com aumento final de 1.240 vezes. Foram obtidas 50 imagens para cada estrutura estudada, totalizando 250 imagens por grupo, sendo então contornadas com lápis preto nº 2, tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens elípticas. Para a obtenção dos diâmetros, foram medidos os eixos maior e menor dessas imagens.

Após a determinação dos eixos maior e menor (mm) e mediante utilização do programa computacional NUC (Anexo 2), desenvolvido pelo Prof. Dr. Geraldo Maia Campos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), foram avaliados os seguintes parâmetros cariométricos conforme Sala *et al.*⁽⁴⁸⁾: diâmetro maior (μm), diâmetro menor (μm), diâmetro médio (μm), relação diâmetro maior/diâmetro menor, volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm), relação volume/área, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno.

a) diâmetro maior (D)

b) diâmetro menor (d)

c) diâmetro geométrico médio (M): $M = \sqrt{D \cdot d}$

d) relação entre os diâmetros maior e menor (D/d): D/d

e) volume (V): $V = \frac{\pi}{6} \cdot M^3$

f) área (A): $A = \frac{\pi}{4} \cdot M^2$

g) perímetro (P): $P = (X/2) \cdot [3/2 \cdot (D + d) - M]$

h) relação entre volume e área (V/A): V/A

i) excentricidade (E): $E = \frac{\sqrt{(D+d)} \cdot \sqrt{(D-d)}}{D}$

j) coeficiente de forma (F): $F = 4 \cdot \pi \cdot \frac{A}{P^2}$

k) índice de contorno (I): $I = \frac{P}{\sqrt{A}}$

2.3- Estudo Estatístico

Para a análise estatística dos resultados obtidos nos dois grupos, controle e tratado com ciclamato de sódio, foi utilizado teste não paramétrico de Mann-Whitney⁽⁴⁹⁾. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Todos os cálculos e análises foram efetuados por meio dos programas computacionais NUC (FORP-USP, Ribeirão Preto, SP) e GraphPad Instat, versão 3.00⁽⁵⁰⁾ (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1- Resultados Morfológicos

Os fetos tratados com ciclamato de sódio apresentaram-se menores quando comparados aos controle, mas sem apresentar malformações macroscópicas evidentes.

3.1.1- Peso fetal

Os pesos corporais médios dos fetos foram iguais a 2,93 g para o grupo controle e 2,29 g para o tratado. A análise estatística dos dados mediante teste de Mann-Whitney mostrou diferença significativa ($p = 0,004$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Média dos pesos corporais (g) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

C	T
2,90	2,30
2,73	2,56
3,23	2,27
2,64	1,71
3,14	2,60
$\bar{x} = 2,93$	$\bar{x} = 2,29$
C x T	U calculado = 0* p[U] = 0,004

* Diferença estatisticamente significativa para $p = 0,01$

3.1.2- Peso da placenta

O peso médio da placenta das ratas tratadas com ciclamato de sódio foi significativamente menor que o das placentas das ratas controle ($p = 0,004$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Média dos pesos das placentas (g) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

C	T
0,41	0,36
0,52	0,34
0,56	0,29
0,49	0,23
0,38	0,32
$\bar{x} = 0,47$	$\bar{x} = 0,31$
C x T	U calculado = 0* p[U] = 0,004

* Diferença estatisticamente significativa para $p = 0,01$

3.1.3- Comprimento do cordão umbilical

Os fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio apresentaram cordões umbilicais mais curtos que os do grupo controle, mas sem diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3 - Média dos comprimentos dos cordões umbilicais (cm) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

C	T
2,2	1,6
1,5	2,1
2,4	2,0
2,4	2,2
2,1	2,1
$\bar{x} = 2,12$	$\bar{x} = 2,00$
C x T	U calculado = 7 ^{ns}
	p[U] = 0,155

ns = diferença não significativa

3.2- Resultados Morfométricos

3.2.1- Glomérulo

As fotomicrografias do glomérulo de rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio e controle estão nas Figuras 5 e 6.

Os resultados relativos ao volume glomerular dos rins pertencentes aos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio estão expressos na Tabela 4. Nota-se que o volume do glomérulo no grupo tratado foi significativamente maior em relação ao obtido no grupo controle.

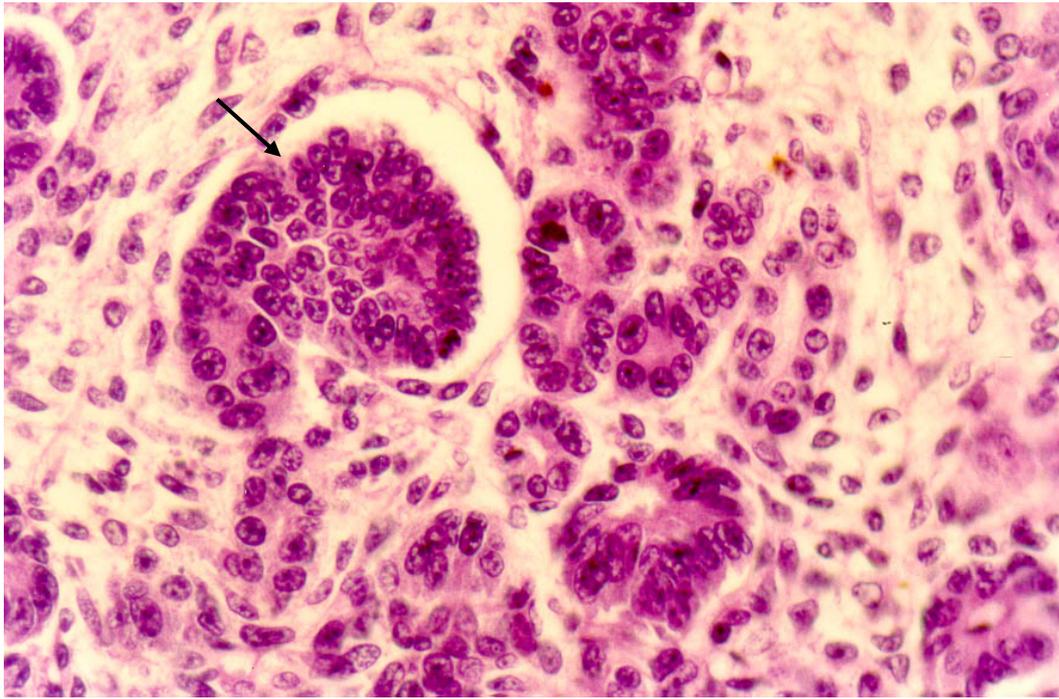


Figura 5 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando glomérulo de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x).

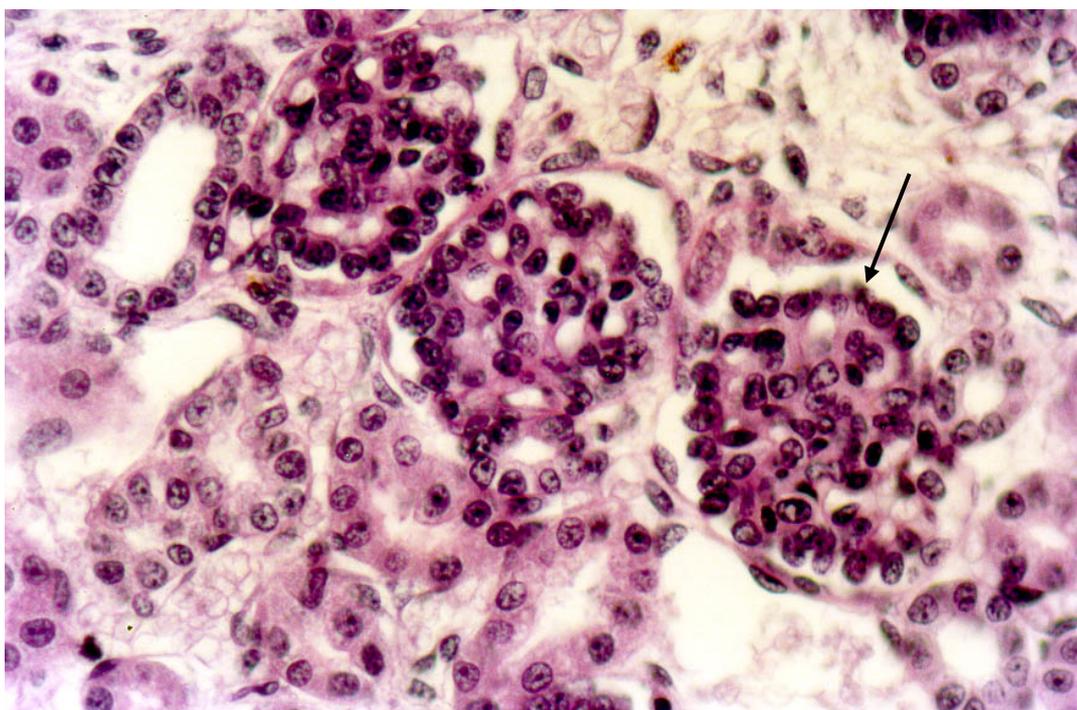


Figura 6 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando glomérulo de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x).

Tabela 4 - Valores médios do volume glomerular (μm^3) de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

C	T
42723,87	76897,08
50873,53	51942,88
60369,97	67076,22
50973,16	88445,77
47913,00	77906,75
$\bar{x} = 50570,71$	$\bar{x} = 72453,74$
C x T	U calculado = 1
	p[U] = 0,007

* Diferença estatisticamente significativa para $p = 0,01$

3.2.2- Túbulo contornado proximal

As fotomicrografias do túbulo contornado proximal dos rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio e controle encontram-se nas Figuras 7 e 8.

Os resultados correspondentes aos diâmetros nucleares do túbulo contornado proximal dos rins pertencentes aos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio são apresentados na Tabela 5. Observa-se que os diâmetros maior, menor e médio dos núcleos das células do túbulo contornado proximal do grupo tratado foram significativamente maiores que os respectivos controles.

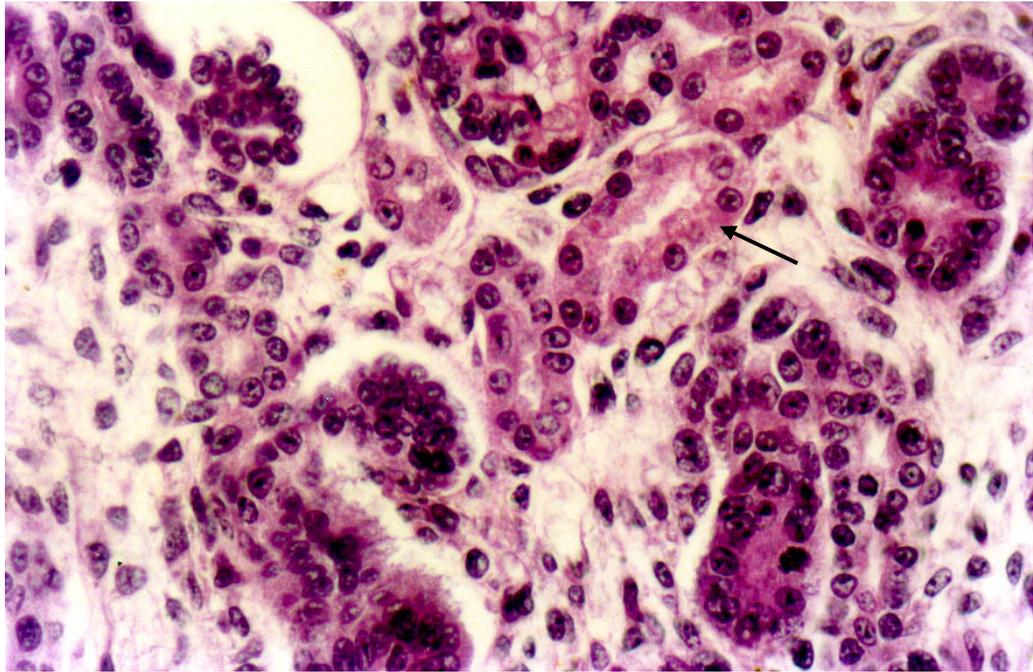


Figura 7 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado proximal de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x).

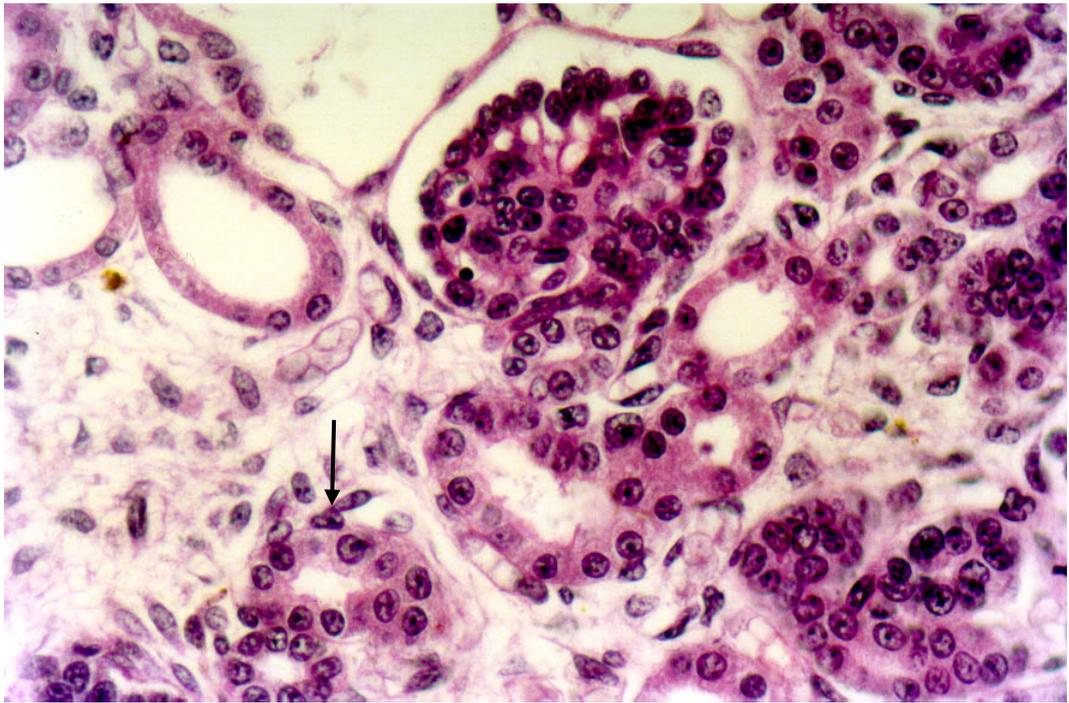


Figura 8 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado proximal de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x).

Tabela 5 - Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μm) e relação entre os diâmetros maior e menor (D/d) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor		Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
10,77	11,68	8,08	9,31	9,31	10,41	1,35	1,26
8,84	11,74	6,55	9,03	7,59	10,27	1,36	1,32
10,79	11,50	8,40	8,94	9,51	10,11	1,29	1,30
9,52	11,10	7,11	8,24	8,20	9,55	1,36	1,36
10,74	11,85	7,74	8,90	9,06	10,19	1,47	1,61
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
10,13	11,57	7,58	8,88	8,73	10,11	1,37	1,37
Ucalc = 0*		Ucalc = 1*		Ucalc = 0*		Ucalc = 9 ^{ns}	
p[U]: 0,004		p[U]: 0,008		p[U]: 0,004		p[U]: 0,274	

* Diferença estatisticamente significativa para $p = 0,01$

ns = diferença não significativa

Pela Tabela 6, nota-se aumento significativo do volume, área e perímetro dos núcleos e da relação volume/área do epitélio do túbulo contornado proximal nos animais tratados. Não houve alteração significativa no formato nuclear quando comparado ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 6 - Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação entre volume e área (V/A) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
447,24	610,73	69,40	86,05	29,80	33,09	6,21	6,94
246,18	580,24	46,40	83,74	24,33	32,82	5,06	6,85
469,77	552,37	72,02	80,86	30,29	32,26	6,34	6,74
305,94	469,04	53,88	72,29	26,30	30,57	5,47	6,36
435,69	575,29	66,96	82,76	29,33	32,91	6,04	6,79
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
380,96	557,53	61,73	81,14	28,01	32,33	5,82	6,74
Ucalc = 1*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*	
p[U]: 0,008		p[U]: 0,004		p[U]: 0,004		p[U]: 0,004	

* Diferença estatisticamente significante para p = 0,01

Tabela 7 - Valores médios da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados proximais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de contorno	
C	T	C	T	C	T
0,64	0,58	0,96	0,98	3,61	3,59
0,65	0,61	0,96	0,97	3,62	43,61
0,61	0,60	0,97	0,97	3,60	3,60
0,63	0,65	0,96	0,96	3,62	3,61
0,65	0,62	0,94	0,95	3,67	3,73
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,64	0,61	0,96	0,97	3,62	3,63
Ucalculado = 5 ^{ns} p[U]: 0,075		Ucalculado = 8 ^{ns} p[U]: 0,210		Ucalculado = 10 ^{ns} p[U]: 0,345	

ns = diferença não significativa.

3.2.3- Túbulo contornado distal

Nas Figuras 9 e 10 estão fotomicrografias do túbulo contornado distal de rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio e controle.

No grupo tratado com ciclamato de sódio quando comparado ao grupo controle, os núcleos do epitélio do túbulo contornado distal apresentaram aumento significativo em seus diâmetros (Tabela 8) e de tamanho (Tabela 9), porém no formato nuclear não houve alteração (Tabela 10).

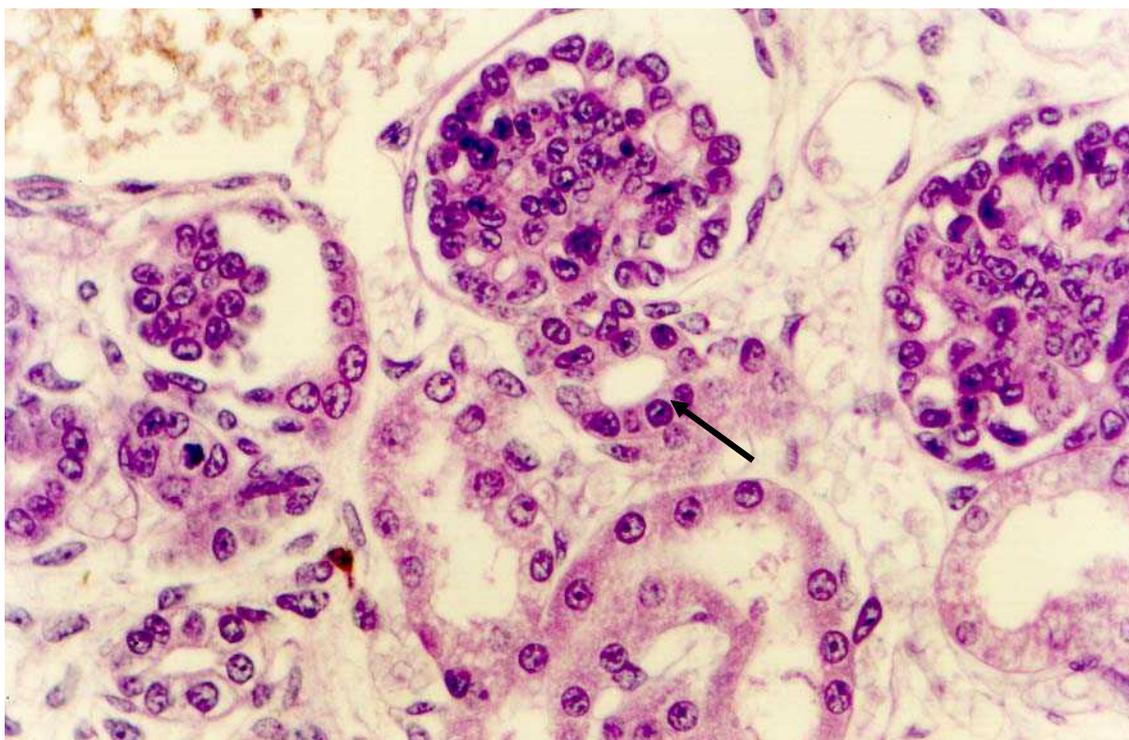


Figura 9 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado distal de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x).

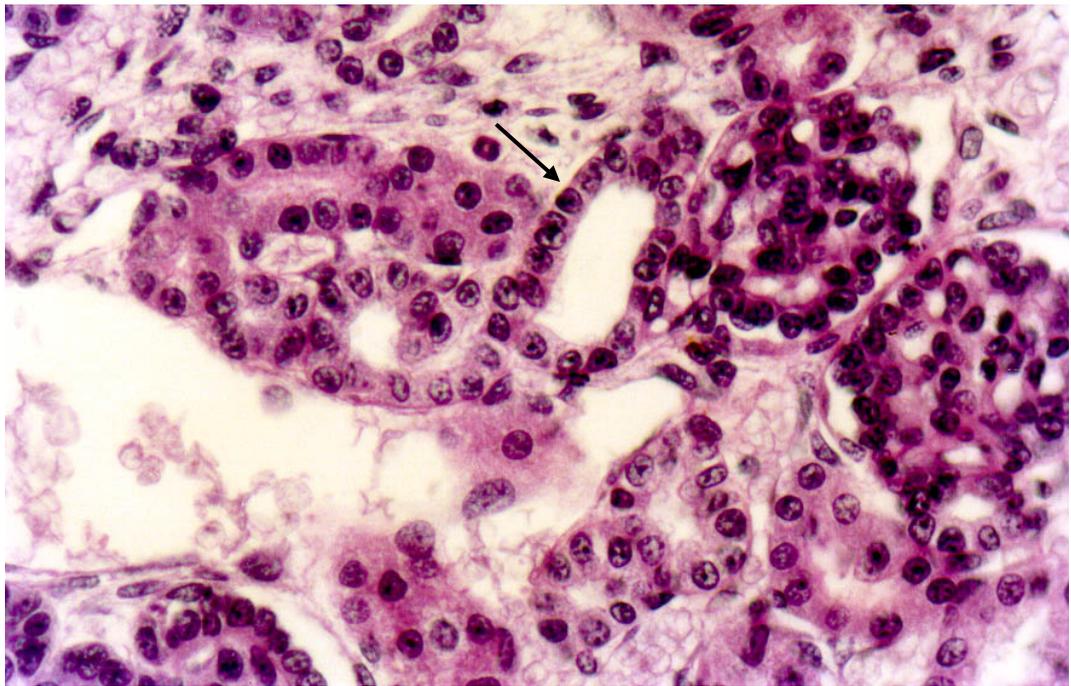


Figura 10- Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando túbulo contornado distal de rim de feto de rata controle. Coloração Hematoxilina Eosina (400x).

Tabela 8 - Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio e relação entre os diâmetros maior e menor (D/d) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados distais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor		Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
11,10	11,53	6,98	7,76	8,78	9,41	1,60	1,53
8,76	13,18	6,00	8,11	8,76	10,28	1,50	1,67
11,23	12,18	7,69	8,23	11,23	9,97	1,49	1,51
9,65	11,98	6,34	8,56	9,65	10,11	1,56	1,42
10,02	12,00	7,45	8,73	8,60	10,21	1,42	1,40
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
10,15	12,17	6,89	8,28	9,40	10,00	1,51	1,51
Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 6 ^{ns}		Ucalc = 12 ^{ns}	
p[U]: 0,004		p[U]: 0,004		p[U]: 0,111		p[U]: 0,500	

* Diferença estatisticamente significante para p = 0,01

ns = diferença não significante

Tabela 9 - Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação entre volume e área (V/A) dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados distais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
381,90	459,55	62,55	70,79	28,82	30,57	5,85	6,28
209,92	593,43	41,80	84,19	23,45	34,02	4,80	6,85
441,13	534,44	68,54	78,86	30,06	32,41	6,16	6,65
271,80	560,48	49,18	81,23	25,43	32,54	5,19	6,74
382,74	575,57	60,89	82,74	27,65	32,80	5,73	6,81
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
337,50	544,69	56,49	79,56	27,08	32,49	5,55	6,67
Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*	
p[U]: 0,004		p[U]: 0,004		p[U]: 0,004		p[U]: 0,004	

* Diferença estatisticamente significante para p = 0,01

Tabela 10 - Valores médios da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos (n = 50) das células dos túbulos contornados distais de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de contorno	
C	T	C	T	C	T
0,75	0,71	0,92	0,93	3,70	3,68
0,69	0,76	0,94	0,90	3,67	3,74
0,68	0,71	0,94	0,94	3,67	3,67
0,74	0,68	0,93	0,95	3,69	3,93
0,64	0,67	0,95	0,96	3,65	3,63
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,70	0,71	0,94	0,94	3,68	3,67
Ucalc = 12 ^{ns} p[U]: 0,500		Ucalc = 12 ^{ns} p[U]: 0,500		Ucalc = 10 ^{ns} p[U]: 0,500	

ns = diferença não significativa

3.2.4- Ducto coletor

As fotomicrografias do ducto coletor de rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio e controle estão nas Figuras 11 e 12.

O estudo morfométrico dos ductos coletores revelou que os núcleos apresentaram diâmetros aumentados (Tabela 11, página 41), o que implica aumento do perímetro, área e volume desses núcleos e da relação volume/área nos fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio (Tabela 12, página 42). A forma dos núcleos dos ductos coletores mostrou-se inalterada quando comparada àquela do grupo controle (Tabela 13, página 43).

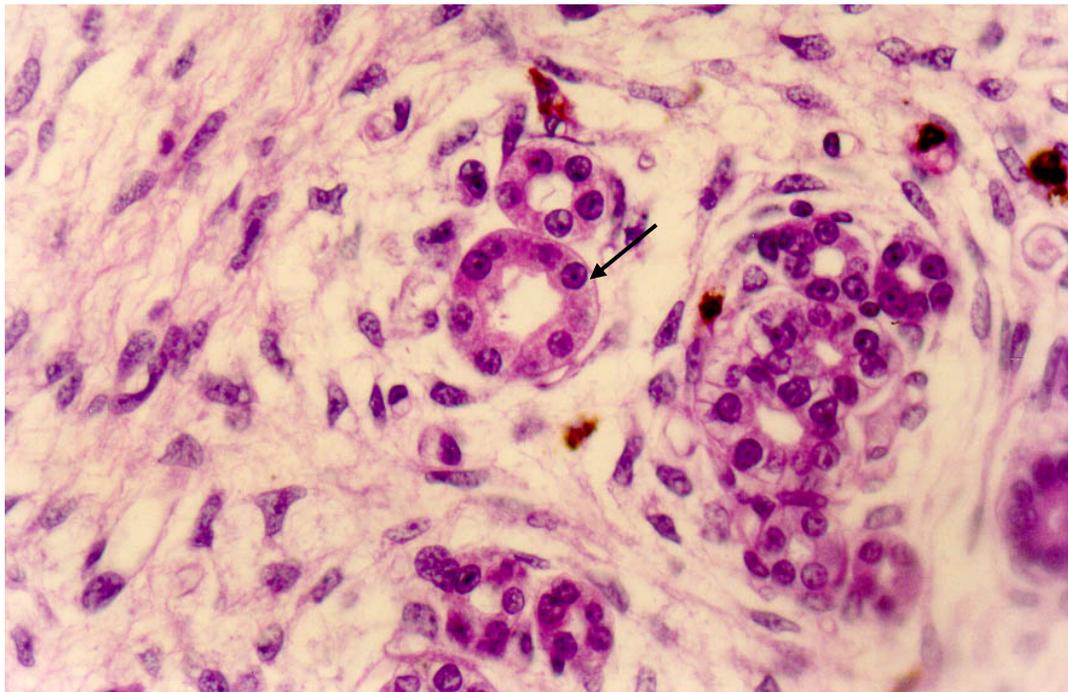


Figura 11 - Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando ducto coletor de rim de feto de rata tratada com ciclamato de sódio. Coloração hematoxilina eosina (400x).

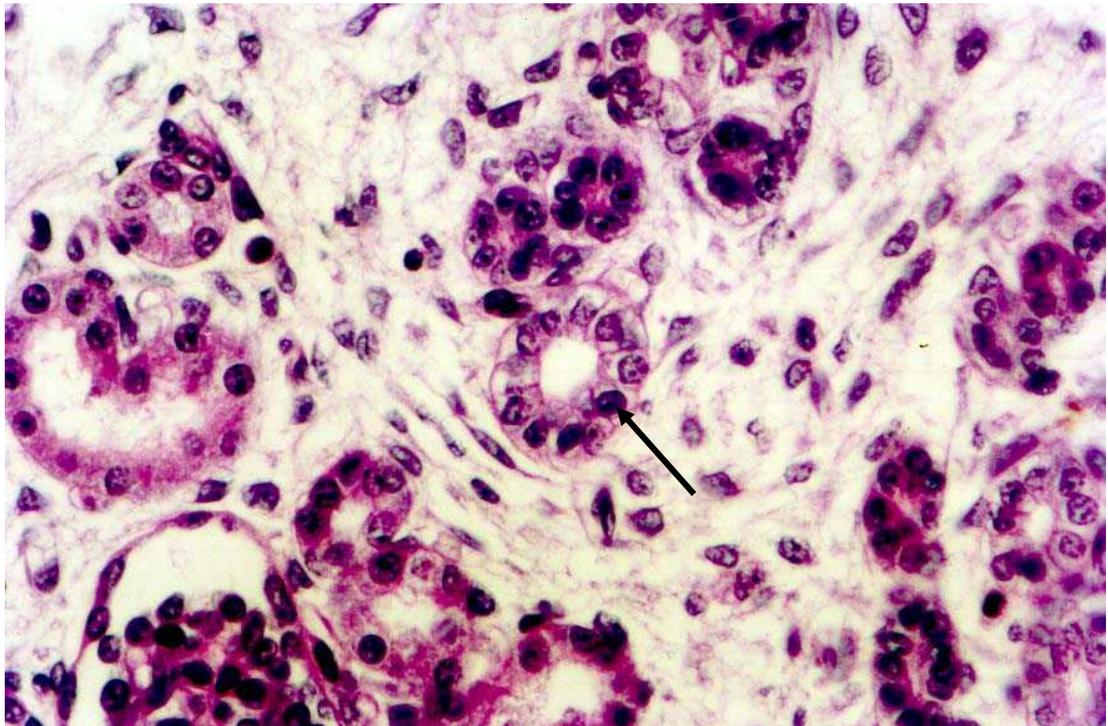


Figura 12- Fotomicrografia em microscopia óptica mostrando ducto coletor de rim de feto de rata controle. Coloração hematoxilina eosina (400x).

Tabela 11 - Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μm) e relação entre os diâmetros maior e menor (D/d) dos núcleos ($n = 50$) das células dos ductos coletores de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor		Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
12,06	13,31	7,85	8,97	9,68	10,88	1,57	1,52
9,15	13,06	6,89	9,19	7,91	10,94	1,36	1,44
11,73	12,95	8,73	9,37	10,08	10,99	1,38	1,40
10,77	12,40	6,74	8,94	8,46	10,49	1,68	1,42
10,84	11,92	7,58	8,98	9,01	10,31	1,49	1,34
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
10,91	12,73	7,56	9,09	9,03	10,72	1,50	1,42
Ucalc = 1*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 9 ^{ns}	
p[U]: 0,008		p[U]: 0,004		p[U]: 0,004		p[U]: 0,274	

* Diferença estatisticamente significante para $p = 0,01$

ns = diferença não significante

Tabela 12 - Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação entre volume e área (V/A) dos núcleos (n = 50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
512,63	700,51	75,49	94,12	31,73	35,40	6,45	7,25
279,64	707,21	50,45	94,95	25,34	35,26	5,28	7,29
567,05	713,60	81,33	95,70	32,35	35,33	6,72	7,33
359,43	631,69	58,55	87,73	27,98	33,80	5,64	7,00
409,98	593,99	65,25	84,43	29,25	33,06	6,00	6,87
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
425,74	669,40	66,21	91,39	29,33	34,57	6,02	7,15
Ucalc = 0* p[U]: 0,004		Ucalc = 0* p[U]: 0,004		Ucalc = 0* p[U]: 0,004		Ucalc = 0* p[U]: 0,004	

* Diferença estatisticamente significante para p = 0,01

Tabela 13 - Valores médios da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos (n = 50) das células dos ductos coletores de fetos de ratas controle (C) e tratadas com ciclamato de sódio (T).
Teste de Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de contorno	
C	T	C	T	C	T
0,72	0,71	0,92	0,93	3,70	3,68
0,63	0,70	0,96	0,95	3,62	3,64
0,64	0,67	0,96	0,96	3,63	3,63
0,75	0,67	0,90	0,95	3,74	3,64
0,68	0,61	0,94	0,96	3,67	3,61
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,68	0,67	0,94	0,95	3,67	3,64
Ucalc = 10 ^{ns} p[U]: 0,345		Ucalc = 8 ^{ns} p[U]: 0,210		Ucalc = 8 ^{ns} p[U]: 0,210	

ns = diferença não significante

DISCUSSÃO

4- DISCUSSÃO

Neste estudo, o ciclamato de sódio, substância considerada pelo FDA como indutora de câncer de bexiga em animais de laboratório⁽¹¹⁻¹³⁾, produziu em rins de fetos de ratas alterações morfométricas estatisticamente significantes nos glomérulos, túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor, sugerindo nefrotoxicidade. Nos animais tratados com ciclamato de sódio, o aumento do glomérulo e no tamanho nuclear das células do tecido epitelial foi significativamente maior em relação aos do grupo controle.

O ciclamato não é absorvido totalmente no intestino, sendo uma parte não absorvida, eliminada pelas fezes e outra é convertida como ciclohexalamina^(7,15-19). Essa conversão é bastante heterogênea variando de indivíduo para indivíduo, sendo que alguns convertem menos que 0,1% e outros da mesma espécie convertem mais de 20% do ciclamato ingerido⁽⁷⁾. Diante dessa variação, fica muito difícil saber o quanto de ciclamato está sendo realmente absorvido quando usado via oral. Na presente pesquisa foi utilizada a via peritoneal, pois desse modo tem-se controle rigoroso da dose de ciclamato que está agindo, podendo-se concluir que as alterações ocorridas no feto são realmente induzidas por essa substância.

Investigações sobre os efeitos de substâncias como o ciclamato de sódio sobre a espécie humana são necessárias, pois, além de substituir a sacarose⁽⁴²⁾,

prejudicial em casos de diabetes⁽⁵¹⁾ ou quando a redução e controle do peso corpóreo representam melhor qualidade de vida para esses indivíduos, não propicia desenvolvimento de cárie dentária^(46,52). Vale ressaltar que pesquisas com animais de laboratório possibilitam obter, em pouco tempo e em condições controladas, informações sobre o potencial tóxico de substâncias químicas sobre o organismo em desenvolvimento⁽⁵³⁾.

Apesar do *European Council of Medical Research* ter concluído que resultados obtidos em animais variam nas diferentes espécies e muitas vezes não produzem aqueles observados em humanos, os estudos experimentais representam, a curto prazo, um importante modelo complementar que deve ser utilizado como um indicador potencial de teratogenicidade humana de agentes químicos⁽⁵³⁾. Testes em animais são importantes porque podem ter um valor preditivo dos possíveis efeitos de substâncias químicas sobre a espécie humana, além de permitirem a investigação dos mecanismos de ação.

Cerca de 20% dos experimentos animais são realizados utilizando o rato como modelo animal, pois são de fácil acasalamento (razão sexual 1:4), apresentam períodos gestacionais definidos e baixo custo. Porém, existem substâncias que são modelos de teratogênese para roedores (ratos e camundongos) e não são nocivas para o homem. Um exemplo é a cortisona que provoca 100% de malformações no camundongo e não é embrio ou fetotóxica para o homem.

A precaução de se considerar qualquer efeito sobre o desenvolvimento experimental induzido como possível forma de previsão de teratogenicidade humana é válida. Entretanto, apenas o acúmulo de conhecimento sobre os mecanismos de ação de agentes fetotóxicos poderá fazer com que se desenvolvam métodos mais adequados e eficazes que permitam prever, com segurança, efeitos teratogênicos de muitas substâncias químicas no homem.

Na literatura internacional são encontrados diversos relatos sobre a ação tóxica, mutagênica e carcinogênica, intra-útero, além da teratogênica, de compostos químicos⁽⁵⁴⁻⁵⁸⁾.

A cariometria, utilizada neste estudo, é uma técnica morfométrica coadjuvante para o diagnóstico de alterações celulares⁽⁵⁹⁾, que auxilia a fisiologia e a patologia na obtenção de dados quantitativos de volume e formato dos núcleos e suas mudanças com o crescimento, nas doenças e em exposições a agentes químicos e físicos. A partir desses dados, pode-se efetuar correlações entre estruturas e funções normais ou alteradas. Essa técnica vem sendo empregada para estimar volumes nucleares, estabelecendo graus de malignidade de tumores⁽⁶⁰⁾ ou efeitos da toxicidade sobre o organismo⁽⁶¹⁾, podendo-se ainda, determinar malformações, reduções ou alterações nas formas.

Utilizando medidas nucleares, diversos estudos foram realizados visando interpretar em diferentes tecidos de ratos em fase fetal e adulta a toxicidade química de substâncias como cloreto de níquel⁽⁶²⁾, cádmio⁽⁶³⁾, chumbo⁽⁶⁴⁾,

albendazol⁽⁶⁵⁾, etanol e vitamina A⁽⁶⁶⁾, metilmercúrio⁽⁶⁷⁾, ciclofosfamida⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾, etanol⁽⁷¹⁾, ofloxacina⁽⁷²⁾, amicacina⁽⁷³⁾, ciclamato de sódio e aquelas contidas na fumaça do cigarro⁽⁷⁴⁾.

Outra aplicação da cariometria consiste na obtenção de resultados sobre exposição a agentes físicos. Alguns exemplos são os trabalhos de Pedrazzi *et al.*⁽⁷⁵⁾, que estudaram efeitos da hipertermia nos epitélios de revestimento e glandular das fossas nasais de feto de rata, e o de Miraglia & Hayahi⁽⁷⁶⁾, que avaliaram efeito da temperatura sobre o testículo de rato.

Em humanos, estudos morfométricos com tecido renal têm sido realizados para investigar lesões túbulo-intersticiais no diabetes mellitus insulino-dependente⁽⁷⁷⁾, na doença glomerular primária⁽⁷⁸⁾ e nos carcinomas de células renais^(79,80). Em ratos, a morfometria tem sido utilizada na descrição tridimensional de túbulos contornados proximais⁽⁸¹⁾, nos efeitos da manidipina na estrutura e função renal⁽⁸²⁾, e no efeito nefrotóxico do aciclovir nas estruturas tubulares renais, pesos fetal e placentário e comprimento do cordão umbilical⁽⁸³⁾.

Assim, o presente estudo representa uma investigação inédita sobre o efeito do ciclamato de sódio em quatro estruturas renais de fetos de ratas, considerando-se alterações morfométricas ocorridas nos glomérulos, túbulos contornados proximal, distal, e ducto coletor. Trata-se de um estudo que pretende contribuir para a elucidação de dúvidas com relação aos malefícios que essa substância pode causar ao tecido renal.

Com relação à morfometria, houve aumento estatisticamente significativo no volume glomerular (30,21%) dos rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio quando comparado com o grupo controle ($p = 0,007$). Esse achado foi similar ao verificado por Portela⁽⁷³⁾ que, investigando toxicidade fetal no uso do fármaco amicacina, constatou aumento de 40,69% no volume glomerular de ratos tratados. Segundo a autora, esse resultado pode ser devido à proliferação de células glomerulares por aumento de atividade mitótica.

Pereira & Mandarim-de-Lacerda⁽⁸⁴⁾, pesquisando alterações quantitativas em glomérulos de ratos devido à inibição da síntese de óxido nítrico por meio da administração de L-arginina metil éster (L-Name), verificaram aumento de 33% no volume glomerular.

Resultados da análise cariométrica mostraram que os valores do diâmetro médio dos núcleos das células dos túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor do rim de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio foram significativamente maiores que os respectivos controles. Esses resultados diferem daqueles obtidos por Ravagnani⁽⁸³⁾ que, avaliando 66 fetos de ratas tratadas com aciclovir, conhecido agente nefrotóxico, constatou uma significativa redução no diâmetro nuclear das células dessas estruturas. Apesar das diferenças entre ciclamato de sódio e aciclovir, é importante destacar que ambas substâncias foram estudadas utilizando-se a mesma técnica, a cariometria.

O túbulo contornado proximal tem sido analisado por técnicas morfométricas em ratos⁽⁸⁵⁾, coelhos⁽⁸⁶⁾, humanos⁽⁸⁷⁾ e anfíbios⁽⁸⁸⁾. Entretanto, as variações existentes na ultraestrutura de um néfron não são totalmente conhecidas⁽⁸¹⁾.

A análise dos parâmetros cariométricos volume, área e perímetro dos núcleos das células do epitélio dos túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor de rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio mostrou que houve aumento estatisticamente significante nas dimensões do grupo tratado em relação ao controle. Esses resultados foram opostos àqueles obtidos por Ravagnani⁽⁸³⁾, que obteve significante redução desses parâmetros no grupo tratado por aciclovir quando comparado ao grupo controle.

As variáveis excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, responsáveis pela avaliação do formato do núcleo, não apresentaram diferença significante entre os grupos tratado e controle, contrastando com os dados de Ravagnani⁽⁸³⁾ para os núcleos das células do epitélio do túbulo contornado distal e ducto coletor, que obteve maiores valores para fetos expostos ao aciclovir.

O peso corporal médio dos fetos foi estatisticamente menor no grupo em que as mães receberam ciclamato de sódio (média = 2,29 g) quando comparado aos valores obtidos para o grupo controle (2,93 g). Esse resultado confirma o obtido por Liedtke *et al.*^(68,69) que, analisando efeitos da ciclofosfamida em fetos de ratos, também registraram menor peso corporal nos animais tratados com a

referida substância (média = 1,92 g) em relação ao grupo controle (4,07 g). Esse parâmetro parece ser um indicador de alteração fetal ou embriotoxicidade de ambas substâncias.

A placenta é o órgão que controla a homeostasia das trocas materno-fetais e produção de hormônios, sendo responsável pelo crescimento e proteção do feto à indução de teratogenicidade, regulando a passagem de microorganismos, anticorpos e medicamentos⁽⁵³⁾. A passagem de substâncias através da placenta por difusão simples, difusão facilitada, transporte ativo ou por poros pode torná-las disponíveis ao embrião. Assim, fatores como permeabilidade, espessura e capacidade metabolizadora da placenta devem ser considerados. Além disso, para que ocorra teratogenicidade, o momento de formação e desenvolvimento embrionário em que a fêmea é exposta é relevante.

Diversas drogas e agentes químicos atravessam a placenta rapidamente e atingem o feto. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesses processos foram pouco estudados. Segundo Pitkin *et al.*^(20,21), o ciclamato de sódio atravessa a placenta e, na circulação fetal, alcança 1/4 da concentração materna, sendo encontrado preferencialmente no fígado e nos rins.

O peso médio da placenta das ratas tratadas com ciclamato de sódio (média = 0,31 g) foi significativamente menor que o das ratas do grupo controle (média = 0,47 g). Esse resultado confirma o obtido por alguns autores^(58,69,89), que verificaram placentas de ratas tratadas com ciclofosfamida e cádmio com

pesos menores. Placentas menores provavelmente apresentam fluxo sanguíneo reduzido, resultando em hipóxia fetal considerável, o que poderia causar retardo do crescimento intra-uterino^(90,91). Embora o objetivo deste trabalho não tenha sido testar a hipótese de o ciclamato de sódio atravessar a placenta, os resultados obtidos sugerem que esse fenômeno pode ter ocorrido.

Quanto ao comprimento do cordão umbilical, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, os cordões umbilicais dos fetos de mães tratadas com ciclamato de sódio foram mais curtos que os do grupo controle. Essa medida está relacionada ao crescimento fetal em geral. Esse cordão cresce em resposta às forças tensoras que dependem do movimento fetal e do espaço intra-uterino, viável durante o desenvolvimento precoce. Desse modo, o cordão umbilical, como observado nesta investigação, pode indicar redução do movimento fetal no período gestacional^(69,92,93). De fato, Moessinger *et al.*⁽⁹³⁾, avaliando o comprimento do cordão umbilical de fetos de ratas colocados em meio extra-uterino, constataram que o comprimento desses também era maior que o dos fetos controle a termo.

Este trabalho abre perspectivas para novas pesquisas a respeito das alterações morfológicas produzidas pelo ciclamato de sódio tais como: o tempo de duração das modificações celulares produzidas, a reversibilidade ou não das mesmas e as repercussões sobre a fisiologia celular ou dos tecidos envolvidos.

Portanto, novos trabalhos são necessários visando confirmar se os efeitos do uso de ciclamato de sódio são temporários ou permanentes.

Nesse contexto, e tendo em vista a lesão causada pelo ciclamato de sódio em fetos de ratas tratadas, conclui-se que essa substância, muito usada pela população mundial, deveria ser utilizada com restrições durante a gravidez, principalmente no primeiro trimestre, que na espécie humana corresponde ao período de formação do tecido nervoso, ou seja, o de maior teratogenicidade.

CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

1- Houve aumento significativo no volume glomerular de rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio;

2- Houve aumento significativo no tamanho nuclear das células dos túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor de rins de fetos de ratas tratadas com ciclamato de sódio;

3- As alterações morfométricas constatadas nos glomérulos, túbulos contornados proximal, distal e ducto coletor sugerem nefrotoxicidade.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Suenaga A, Wada T, Ichibagase H. Studies on synthetic sweetning agents. XVIII. Metabolism of sodium cyclamate. Dicyclohexylamine, a metabolite of sodium cyclamate in rabbits and rats. *Chem Pharm Bull* 1983;31:2079-84.
- 2- Yamamura HI, Lee IP, Dixon RL. Study of the sympathomimetic action of cyclohexylamine, a possible metabolite of cyclamate. *J Pharm Sci* 1968;57:1132-4.
- 3- Barlattani M. Rassegne sintetiche di terapia. II problema dei ciclamati. *Cl Terap* 1970;52:565-60.
- 4- Cattanach BM. The mutagenicity of cyclamates and their metabolites. *Mutation Res* 1976;39:1-28.
- 5- Sain OL, Berman JM. Efectos adversos de edulcorantes en pediatria sacarina y ciclamato. *Arch Arg Pediatr* 1984;82:209-11.
- 6- Audreith LF, Sveda M. Preparation and properties of some N-substituted sulphamic acids. *J Org Chem* 1944;9:89-101.
- 7- Ahmed FE, Thomas DB. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetner cyclamate. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:81-118.
- 8- Egeberg RO, Steinfeld JL, Frantz I, Griffith GC, Knowles H Jr, Rosenow E, et al. Report to the secretary of HEW from the Medical Advisory Group on cyclamates. *JAMA* 1970;211:1358-61.

- 9- Burbank F, Fraumeni JF Jr. Synthetic sweetener consumption and bladder cancer trends in the United States. *Nature* 1970;227:296-7.
- 10- Kojima S, Ichibagase H. Studies on synthetic sweetening agents. VIII. Cyclohexylamine, a metabolite of sodium cyclamate. *Chem Pharm Bull* 1966;14:971-4.
- 11- Price JM, Biava CG, Oser BL, Vogin EE, Steinfeld J, Ley HL. Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. *Science* 1970;167:1131-2.
- 12- Oser BL, Carson S, Cox GE, Vogin EE, Sternberg SS. Chronic toxicity study of cyclamate:saccharin (10:1) in rats. *Toxicology* 1975;4:315-30.
- 13- Bryan GT, Ertürk E. Production of mouse urinary bladder carcinomas by sodium cyclamate. *Science* 1970;167:996-8.
- 14- Bopp BA, Sonders RC, Kesterson JW. Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexamine. *Crit Rev Toxicol* 1986;16:213-306.
- 15- Dick CE, Schniepp ML, Sonders RC, Wiegand RG. Cyclamate and cyclohexylamine: lack of effect on the chromosomes of man and rats in vivo. *Mutation Res* 1974;26:199-203.
- 16- Renwick AG, Williams RT. The fate of cyclamate in man and other species. *Biochem J* 1972;129:869-79.
- 17- Collings AJ. Metabolism of cyclamate and its conversion to cyclohexylamine. *Diabetes Care* 1989;12:50-5.

- 18- Wills JH, Serrone DM, Coulston F. A 7-month study of ingestion of sodium cyclamate by human volunteers. *Regul Toxicol Pharmacol* 1981;1:163.
- 19- Renwick AG, Williams RT. The metabolites of cyclohexylamine in man and certain animals. *Biochem J* 1972;129:857-67.
- 20- Pitkin RM, Reynolds WA, Filer LJ. Placental transmission and fetal distribution of cyclamate in early human pregnancy. *Amer J Obstet Gynec* 1970;108:1043-50.
- 21- Pitkin RM, Reynolds WA, Filer LJ. Cyclamate and cyclohexylamine: transfer across the hemochorial placenta. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969;132:993-5.
- 22- Schechter PJ, Roth LJ. Whole-body autoradiography of ¹⁴C sodium cyclamate in pregnant and fetal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971;20:130-3.
- 23- Collings AJ. The metabolism of sodium cyclamate. In Birch GG et al. (editores). *Sweetness and sweeteners*. London: Applied Science Publishers, 1971, p. 51-68.
- 24- Kojima S, Ichibagase H. Studies on synthetic sweetening agents. XII. The binding of sodium cyclamate with bovine serum albumin. *Chem Pharm Bull* 1968;16:1619-22.
- 25- Kojima S, Ichibagase H. Studies on synthetic sweetening agents. XIII. Metabolism of sodium cyclamate: detection of metabolites of sodium

- cyclamate in rabbit and rat by gas-liquid chromatography. *Chem Pharm Bull* 1968;16:1851-4.
- 26- Roberts A, Renwick AG. The metabolism of ¹⁴C-cyclohexylamine in mice and two strains of rat. *Xenobiotica* 1985;15:477-83.
- 27- Richards RK, Taylor JD, O'Brien JL, Duescher HO. Studies on cyclamate sodium (sucaryl sodium), a new non-caloric sweetening agent. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 1951;40:1.
- 28- Althoff J, Cardesa A, Pour P, Shubik P. A chronic study of artificial sweeteners in Syrian golden hamsters. *Cancer Lett* 1975;1:21-4.
- 29- Dalderup LM, Visser W. Influence of extra sucrose, fats, protein and of cyclamate in the daily food on the life-span of rats. *Experientia* 1971;15:519-21.
- 30- Ferrando R, Huchet B. Etude de l'activité éventuelle du cyclamate de soude sur le rat au cours de trois générations. *Bull Acad Nat Med* 1968;153:36-41.
- 31- Kroes R, Peters PWJ, Berkvens JM, Verschuuren HG, De Vries TH, Van Esch GJ. Long-term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine. *Toxicology* 1977;8:285-300.
- 32- 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. *Toxicol Sci* 2000;53:33-9.

- 33- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 2002;519:103-19.
- 34- Friedman L, Richardson HL, Richardson ME, Lethco EJ, Wallace WC, Sauro FM. Toxic response of rats to cyclamates in chow and semisynthetic diets. *J Natl Cancer Inst* 1972;49:751-64.
- 35- Oser BL, Carson S, Vogin EE. Growth and reproduction studies with cyclamate-saccharin (10:1) in rats [Resumo]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1968;12:290-1.
- 36- Bernryma GH, Hazel GR, Taylor JD, Sanders PG, Weinberg MS. A case for safety of cyclamate and cyclamate-saccharin combinations. *Am J Clin Nutr* 1968;21:673-87.
- 37- Wills JH, Jameson E, Stoewsand G, Coulston F. A three-month study of daily intake of sodium cyclamate by man [Resumo]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1968;12:292.
- 38- Zöllner VN, Pieper M. Concluding report of a 3-year clinical study on cyclamate. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1971;21:431-2.
- 39- Van der Hem GK, Freeland JP, Kallmeyer JC, Kark RN. Longitudinal study of renal function in aged patients. Abbott Laboratories, unpublished report, 1967.
- 40- Becker BA, Gibson JE. Teratogenicity of cyclohexylamine in mammals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970;17:551-2.

- 41- Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Análise descritiva quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. *Ciênc Tecnol Aliment* 2000;20:318-28.
- 42- Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Avaliação tempo-intensidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato/sacarina em equivalência à sacarose em altas concentrações. *Bol Centro Pesqui Process Aliment* 2001;19:391-410.
- 43- Assunção MCF, Andersson GB, Cavalcanti ZCH. Uso de adoçantes alternativos pelos diabéticos. *JBM* 1994;67:62-9.
- 44- Hunter PB. Risk factors in dental caries. *Int Dent J* 1988;38:211-7.
- 45- Imfeld T. Efficacy of sweeteners and sugar substitutes in caries prevention. *Caries Res* 1993;27:50-5.
- 46- Andrade JP, Volschan BCG. A praticidade do uso de adoçantes alternativos. *Rev Bras Odontol* 1998;55:40-4.
- 47- Committee on Care and Use of Laboratory Animals - Institute of Laboratory Animal Resources - Commission on Life Sciences - National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1996, 125 p.
- 48- Sala MA, Komesu MC, Lopes RA, Maia Campos G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz Dent J* 1994;5:11-4.
- 49- Bland M. *An introduction to medical statistics*. Oxford: Oxford University Press; 1996. 396 p.

- 50- GraphPad InStat for windows, release 3.00. GraphPad Software, San Diego, CA, USA; 1997.
- 51- Hianik T, Rybár P, Svobodová L, Kresák S, Nikolelis DP. Liposome aggregation in presence of the sweeteners cyclamate and saccharine. *Pharmazie* 2001;56:633-5.
- 52- Menten A. pH changes in dental plaque after using sugar-free pediatric medicine. *J Clin Pediatr Dent* 2001;25:307-12.
- 53- Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R. Teratogênese e toxicologia do desenvolvimento. In Rabello-Gay MN et al. (editores). *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 195-241.
- 54- Melachian JA, Dixon RL. Effect of gestational exposure to DDT or diethylbestrol on the reproductive capacity of the offspring. *Pharmacologist* 1973;15:199-205.
- 55- Moore JA, Gupta BN, Zinkl JG, Vos LG. Postnatal effects of maternal exposure to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Env Health Perspect* 1973;5:81-5.
- 56- Nashman RL. Low birth weight related to toxicity. *J Pediatr* 1970;76:327-8.

- 57- Neubert D, Zens P, Rothenwallner A, Merker HJ. A survey of the embryotoxic effects of TCDD in mammalian species. *Env Health Perspect* 1973;5:67-79.
- 58- Kurzel RB, Cetrulo CL. The effect of environmental pollutants on human reproduction, including birth defects. *Env Sci Technol* 1981;15:626-40.
- 59- Chalkley HW, Cornfield J, Park H. A method for estimating volume-surface ratios. *Science* 1949;23:110.
- 60- Mandarim-de-Lacerda CA. Estereologia e urologia: volume nuclear médio ponderado na classificação e prognóstico de tumores. *J Bras Urol* 1999;25:286-90.
- 61- Sartori IAM, Mattos MGC, Sala MA, Semprini M, Lopes RA, Watanabe LS. A ação do níquel nas glândulas nasais de fetos de rato: estudo cariométrico. *HB Cient* 1997;7:22-5.
- 62- Martins MP. Efeitos da exposição pré-natal ao cloreto de níquel em fetos de ratos [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996.
- 63- Bonilha JL. Ação do cádmio no epitélio de revestimento e na musculatura da língua do feto de rato: estudo morfológico, morfométrico e estereológico [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 1997.
- 64- Brandini DA. Efeitos tóxicos dos metais comumente utilizados em reabilitação oral: estudo histométrico das alterações provocadas pelo

chumbo no assoalho da cavidade bucal e cartilagem de Meckel de fetos de rato [tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2000.

- 65- Mizusaki CI, Watanabe IS, Semprini M, Lopes RA, Sala MA, Vale SAL, et al. Estudio cariometrico del epitélio de fetos de ratas tratadas con albendazol durante la preñez. Rev Chil Anat 1996;14:79-85.
- 66- Andrade DHL. Efeitos do etanol e vitamina A nas áreas de suporte de prótese dental [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2001.
- 67- Mendes GEF, Azoubel R, Lopes RA, Sala MA, Lacerda SA, Silva Júnior AR. Effects of low-dose exposure of rat fetuses pancreas to methylmercury: morphometric and stereologic studies. Rev Chil Anat 1998;16:177-83.
- 68- Liedtke Jr H. Estudo do efeito teratogênico da ciclofosfamida em ratos: morfologia, morfometria e estereologia do palato fetal [tese]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 1997.
- 69- Liedtke Jr H, Azoubel R, Tubino PJG, Lopes RA. Estudo morfológico de fetos de ratas tratadas com ciclofosfamida durante a gestação. Rev Region Ciências 1995;4:95-104.
- 70- Ingraci-De Lucia MB. Estudo histológico e histométrico do epitélio de revestimento da língua do feto do rato sob a ação da ciclofosfamida [tese].

São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 1997.

- 71- Caputo LRG, Iunes DH, Hernandez JWR, Lopes RA, Sala MA, Semprini M, et al. Efectos del etanol sobre la epidermis de fetos de rata: estudio morfologico y morfometrico. *Rev Chil Anat* 1997;15:165-74.
- 72- Paschoal VD. Efeitos da ofloxacina no desenvolvimento dos testículos de ratos: estudo cariométrico [tese]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2002.
- 73- Portela GS. Nefrotoxicidade fetal no uso da amicacina: estudo cariométrico [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2003.
- 74- Bernal Balález AE. Estudio cariométrico de la mucosa bucal en modelo carcinogénesis química. *Rev Fed Odont Colomb* 1998;55:23-31.
- 75- Pedrazzi V, Cruz Filho AM, Tambasco P, Lopes RA, Sala MA, Mattos MGC, et al. Efeitos da hipertemia nos epitélios de revestimento e glandular das fossas nasais de feto de rata: estudo cariométrico. *Rev Esc Farm Odontol Alfenas* 1996;18:27-9.
- 76- Miraglia SM, Hayashi H. Histomorphometry of immature rat testis after heating. *J Morphol* 1993;217:65-74.
- 77- Ueno M, Kawashima S, Nishi S, Shimada H, Karasawa R, Suzuki Y, et al. Tubulointerstitial lesions in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int Suppl* 1997;63:191-4.

- 78- Hruby Z, Smolska D, Filipowski H, Rabczynski J, Cieslar E, Kopec W, et al. The importance of tubulointerstitial injury in the early phase of primary glomerular disease. *J Intern Med* 1998;243:215-22.
- 79- Barth PJ, Siebel A, Gerharz E, Köhler HH. Nuclear morphometry of renal cell carcinomas. *Gen Diagn Pathol* 1995;141:29-33.
- 80- Carducci MA, Piantadosi S, Pound CR, Epstein JI, Simons JW, Marshall FF, et al. Nuclear morphometry adds significant prognostic information to stage and grade for renal cell carcinoma. *Urology* 1999;53:44-9.
- 81- Dorup J, Maunsbach AB. Three-dimensional organization and segmental ultrastructure of rat proximal tubules. *Exp Nephrol* 1997;5:305-17.
- 82- Fujimaki M, Nagase M, Uchida S. Long-term effect of manidipine on renal function and structure in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Clin Pharmacol Physiol* 1997;24:506-12.
- 83- Ravagnani JE. Nefrotoxicidade do aciclovir em fetos de ratos: estudo cariométrico [tese]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2000.
- 84- Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Glomerular profile numerical density per area and mean glomerular volume in rats submitted to nitric oxide synthase blockade. *Histol Histopathol* 2001;16:15-20.
- 85- Pfaller W, Rittinger M. Quantitative morphology of the rat kidney. *Int J Biochem* 1980;12:17-22.

- 86- Nielsen JT, Christensen EI. Ultrastructure of isolated perfused proximal tubules from rabbit kidney: a comparison with proximal tubules fixed by perfusion in vivo. *Lab Invest* 1983;49:400-11.
- 87- Moller JC, Skriver E, Olsen S, Maunsbach AB. Ultrastructural analysis of human proximal tubules and cortical interstitium in chronic renal disease (hydronephrosis). *Virchows Arch [A]* 1984;402:209-37.
- 88- Maunsbach AB, Boulpaep EL. Quantitative ultrastructure and functional correlates in proximal tubule of *Ambystoma* and *Necturus*. *Am J Physiol* 1984;246:710-24.
- 89- Matheus MTG, Heten S, Guimarães Neto OM, Silveira ZV. Efeitos da ação da ciclofosfamida administrada durante a prenhez no desenvolvimento de molares de fetos de camundongos. *Rev Endontol Unesp* 1994;23:9-20.
- 90- Longo LA, Hewitt CW, Lorijn RHW, Gilbert RD. To what extent does maternal exercise affect fetal oxygenation and uterine blood flow ? *Fed Proc* 1978;37:905.
- 91- Emmanouilides CG, Hobel CJ, Yashiro K, Klyman G. Fetal responses to maternal exercise in the sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1972;112:130-7.
- 92- Miller ME, Higginbottom M, Smith DW. Short umbilical cord: its origin and relevance. *Pediatrics* 1981;67:618-21.

93- Moessinger AC, Blanc WA, Marone PA, Polsen DC. Umbilical cord length as an index of fetal activity: experimental study and clinical implications. *Pediatr Res* 1982;16:109-12.

FONTE CONSULTADA

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES E TESES.

Comissão de Elaboração de Normas do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. 1999.