

Marcelo Alexandre de Matos

Efeitos do Ciclamato de Sódio na Placenta de
Ratas: Estudo Morfométrico

São José do Rio Preto
2006

Marcelo Alexandre de Matos

Efeitos do Ciclamato de Sódio na Placenta de
Ratas: Estudo Morfométrico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

São José do Rio Preto
2006

de Matos, Marcelo Alexandre

Efeitos do Ciclamato de Sódio na Placenta de Ratas:

Estudo Morfométrico / Marcelo Alexandre de Matos

São José do Rio Preto, 2006

66 p.;

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José
do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

1. Ciclamato; 2. Placenta; 3. Cariometria

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	01
1.1. Objetivos.....	10
2. Material e Método.....	11
2.1. Material.....	12
2.1.1. O Animal.....	12
2.1.2. Período de Adaptação.....	12
2.1.3. Período de Acasalamento.....	13
2.1.4. Determinação do Primeiro dia de Prenhez da Rata.....	13
2.1.5. Tratamento.....	13
2.1.6. Técnica de Dissecção e Pesagem.....	14
2.2. Método.....	14
2.2.1. Técnica Histológica.....	14
2.2.2. Cariometria.....	15
2.3. Análise Estatística.....	16

3.	Resultados	17
4.	Discussão.....	36
4.1.	O Animal de Experimentação.....	37
4.2.	A Cariometria	38
4.3.	A Estatística	39
4.3.1.	O Tamanho da Amostra	41
4.4.	A Placenta e o Ciclamato	42
5.	Conclusões	51
6.	Referências Bibliográficas.....	53
7.	Apêndices	65

“Um poeta deve deixar vestígios da sua passagem, e não provas.

Só os vestígios fazem sonhar.”

René Char

- ✓ À minha família, pilar fundamental do meu equilíbrio, tão próxima e cuidadosa com o meu bem estar. Torcedora pelo desfecho feliz de minhas empreitadas e responsável pelo contexto favorável do qual faz parte a minha vida.
- ✓ À minha mãe, forte e guerreira no exemplo de como lutar, doce e amiga no aconchego de todos os momentos e zelosa no afago do meu espírito por vezes intranquilo.
- ✓ À Ana Lúcia Mingardi, esposa e maior incentivadora da minha vida, razão de minha caminhada e cúmplice eterna de nossas jornadas. Companheira incondicional de todas as horas, com sua doação e ternura, fica maior e iluminada no acolhimento cândido de minha alma, tantas outras vezes ansiosa.
- ✓ À meu pai (*“in memoriam”*), sempre presente e responsável pela paz que necessito. Sábio, inspiram-me a sua retidão e benevolência; ponderam-me as lembranças de suas seguras decisões e de suas firmes e carinhosas orientações. Como exemplo de homem e amigo, tão perto o

sinto que minhas intranqüilidades, se presentes, aquietam-se. E assim, minha maturidade se fortalece.

- ✓ Ao amor de todos vocês, muito obrigado.

Agradecimentos Especiais

*“Se o homem não sabe a que porto se dirige,
nenhum vento lhe será favorável.”*

Sêneca

- ✓ Aos Professores Doutores Reinaldo Azoubel e Lina, pela convivência conjugal harmoniosa, pela serenidade e consideração a mim dispensados, e pela simplicidade no jeito de ser. Também agradeço pela sábia orientação e a naturalidade da amizade surgida entre nós. Agradeço ainda pela preocupação e paciência em transmitir seus conhecimentos e fazer com que vossos ensinamentos fizessem, definitivamente, despertar em mim um pesquisador. Por fim, obrigado Prof. Azoubel, por viabilizar a realização deste nosso trabalho.

- ✓ Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto como um todo, e em particular, ao seu diretor Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile pela organização, competência e seriedade deste departamento, assim como ao Prof. Dr. Emmanuel Burdmann e a Profa. Dra. Dorotéia Silva e Souza pela conceituação avançada do curso e pelos conhecimentos ministrados e a metodologia orientada, que permitiram a elaboração e conclusão deste estudo.

Agradecimentos

“Um caminho de mil quilômetros começa com o primeiro passo.”

Lao Tse

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

- ✓ Ao Professor Alex Tadeu Martins pela grande amizade surgida, a confiança e a credibilidade dispensadas, e pela colaboração e estímulo à realização deste estudo.

- ✓ Ao Prof. Dr. José Germano Ferraz de Arruda pela amizade e apoio.

- ✓ Aos Professores Doutores João Armando Padovani Júnior e Gabriela Portela pela cooperação neste trabalho.

- ✓ Às Professoras Doutoras Valquíria Bueno e Patrícia Maluf Cury pela colaboração ao estudo e incentivo constante.

- ✓ Ao Sr. Onivaldo Bizzutti, responsável pelo Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da FAMERP, pela amizade, respeito e dedicação aos meus experimentos e a Ciência.

- ✓ Ao Professor Leandro Moreira Tempest pela amizade e atenção.

- ✓ Aos amigos e funcionários da Pós-graduação Rosimeire Cleide Souza Desidério, José Antonio Silistino, Fabiana Cristina Godoy, Guilherme Martins Dias e Carlos Rodrigo da Silva Viana pelo apoio e colaboração ao meu estudo, e a amizade estabelecida entre todos.
- ✓ Ao Prof. Sebastião Hetem, coordenador do Laboratório de Histotecnologia da FEB (Fundação Educacional de Barretos), pela colaboração na confecção das lâminas deste experimento.
- ✓ À Professora Adília Maria Pires Sciarra pela recente, mas sincera amizade.
- ✓ Aos alunos e amigos da pós-graduação Helenice Bianchi Bolini, Tatiana A. D. Theodoropoulos, João Eduardo de Miranda e Samira El Hassan, pelo contínuo incentivo e companheirismo sincero existente entre nós.
- ✓ Aos amigos Sérgio Bastos da Silva e Emília Cristina Vicente pela amizade, apoio, tolerância e compreensão no decorrer desta jornada.
- ✓ Aos fisioterapeutas e amigos Elaine Aparecida Colombo Paskakulis e Fábio Henrique Mariano de Paula pelo auxílio profissional na minha reeducação postural global, fundamental para o término desta dissertação, e pela solidariedade e paciência de compartilharem no meu dia a dia das dificuldades e conquistas de cada etapa deste trabalho.

“Acredito piamente na sorte. E quanto mais trabalho, mais sorte tenho.”

Erickson

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Valores médios do peso corporal (g) de fetos de ratos controles (C) e tratados com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	18
Tabela 2.	Valores médios dos pesos das placentas (g) de fetos de ratos controles (C) e tratados com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	19
Tabela 3.	Valores médios dos comprimentos dos cordões umbilicais (cm) de fetos de ratos controles (C) e tratados com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	20
Tabela 4.	Valores médios dos Diâmetros Maior e Menor (μm) dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	21
Tabela 5.	Valores médios do Diâmetro Médio (μm) e Relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	22
Tabela 6.	Valores médios do Volume (μm^3) e Área (μm^2) Nucleares dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney...	23
Tabela 7.	Valores médios do Perímetro (μm) e Relação Volume/Área dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney...	24

Tabela 8.	Valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	25
Tabela 9.	Valores médios dos Diâmetros Maior e Menor (μm) dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney...	26
Tabela 10.	Valores médios do Diâmetro Médio (μm) e Relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	27
Tabela 11.	Valores médios do Volume (μm^3) e Área (μm^2) Nucleares dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	28
Tabela 12.	Valores médios do Perímetro (μm) e Relação Volume/Área dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	29
Tabela 13.	Valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.....	30
Tabela 14.	Valores médios dos Diâmetros Maior e Menor (μm) dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney...	31

- Tabela 15. Valores médios do Diâmetro Médio (μm) e Relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney..... 32
- Tabela 16. Valores médios do Volume (μm^3) e Área (μm^2) Nucleares dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney..... 33
- Tabela 17. Valores médios do Perímetro (μm) e Relação Volume/Área dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney..... 34
- Tabela 18. Valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney..... 35

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABIAD	- Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos
C	- Grupo controle
CEEA	- Comitê de Ética em Experimentação com Animal
CHS	- Ciclo-hexil-sulfâmico
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FDA	- Food and Drugs Administration
FEB	- Fundação Educacional de Barretos
FORP	- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
IDA	- Índice diário aceitável
OMS	- Organização Mundial de Saúde
RNA	- Ácido ribonucléico
T	- Grupo tratado
USP	- Universidade de São Paulo
WHO	- World Health Organization

Objetivo: Avaliar os efeitos do ciclamato de sódio na placenta de ratas com sua administração no período da embriogênese. **Método:** Foi administrado por via intraperitoneal nas ratas do grupo tratado a dose de 60 mg / Kg de ciclamato de sódio, do décimo ao décimo quarto dia de gestação, e volume equivalente de solução salina no grupo controle, pela mesma via. No vigésimo dia de prenhez, 10 fetos (5 de cada grupo) foram escolhidos ao acaso para estudo. Foi utilizada a técnica de cariometria para avaliação dos parâmetros nucleares das células das camadas decídua, esponjosa e das vilosidades coriônicas da placenta de ratas. **Resultados:** O peso dos fetos tratados e de suas placentas foi menor que os do grupo controle, assim como o comprimento do cordão umbilical do grupo tratado foi mais curto que o dos fetos controles. Não houveram alterações na camada decídua. Na camada esponjosa placentária ocorreram alterações dos seguintes parâmetros: diâmetro maior, diâmetro médio, perímetro, área, volume, relação volume / área e excentricidade. Os parâmetros alterados nas vilosidades coriônicas foram os seguintes: diâmetro médio, perímetro, área, volume e relação volume / área. **Conclusões:** Este estudo demonstrou alteração placentária com o uso de ciclamato pela rata grávida, e sua repercussão no peso fetal e comprimento do cordão umbilical.

Palavras-chave: 1. Ciclamato; 2. Placenta; 3. Cariometria.

Objective: To evaluate the effects of sodium cyclamate on the rat placenta by its administration in the period of embryogenesis. **Method:** The sodium cyclamate was administered by intraperitoneal route in rats of the treated group at the dose of 60 mg/kg, from the tenth to fourteenth day of gestation, while the equivalent volume of saline solution was given to the control group, by the same route. On the twentieth day of pregnancy, 10 fetuses (5 from each group) were chosen at random for study. The technique of cariometry was utilized for evaluation of nuclear parameters of cells in deciduous and spongy layers, and of chorionic villi in the rat placenta. **Results:** The weights of treated fetuses and their placentas were less than those of the control group, while umbilical-cord length in the treated group was shorter than that in control fetuses. There were no alterations in the deciduous layer. In the placental spongy layer were found alterations of the following parameters: major diameter, mean diameter, perimeter, area, volume, the volume/area ratio and eccentricity. The altered parameters in chorionic villi were the following: mean diameter, perimeter, area, volume, the volume/area ratio. **Conclusions:** This study demonstrated placental alteration with the use of cyclamate by the pregnancy rat, and its repercussion in fetal weight and umbilical-cord length.

Key-words: 1. Cyclamate; 2. Placenta; 3. Cariometry.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O ciclamato, derivado do ácido N – ciclo – hexil – sulfâmico (CHS), é amplamente utilizado como adoçante artificial não calórico em alimentos e bebidas^(1,2) e na indústria farmacêutica.⁽³⁾ O ciclamato é inodoro e solúvel em água, álcool e propileno glicol,⁽⁴⁾ é mais estável que o aspartame e a sacarina, e suporta variações da temperatura.⁽³⁾

Apresenta três formas diferentes de apresentação: ciclamato de sódio (C₆H₁₁NHSO₃Na), ciclamato de cálcio (C₁₂H₂₄N₂S₂O₆Ca) e ácido ciclâmico (C₆H₁₃NO₃S).⁽⁵⁾

O ciclamato foi descoberto em 1937 na Universidade de Illinois, EUA,⁽⁶⁾ por Michael Sveda, que acidentalmente descobriu seu gosto adocicado, 30 vezes mais doce que a sacarose mas sem o sabor amargo da sacarina.⁽⁷⁾ (que é 300 vezes mais doce que a sacarose). No início de 1959, a Food and Drugs Administration (FDA) adicionou o ciclamato na lista das substâncias seguras,⁽⁸⁾ permitindo seu uso como adoçante artificial para diabéticos.

A mistura de ciclamato e sacarina (**edulcorantes de 1º geração**) na proporção de 10:1 apresentou aumento de consumo nos Estados Unidos da América no final da década de 60. Em 1968 foram produzidas 7718 toneladas de ciclamato de sódio, sendo 69% utilizado em bebidas, 19% em adoçantes de mesa, 6% em alimentos, 4% em itens não alimentares e 2% exportado.⁽⁹⁾ No ano seguinte, em 1969, houve elevação adicional no consumo desta substância atingindo um nível aproximadamente de 8943 toneladas naquele ano,⁽¹⁰⁾ de acordo com Burbanki & Fraumeni.

Kojima & Ichibagase,⁽¹¹⁾ em 1966, verificaram que o ciclamato de sódio não era eliminado em sua forma original, mas metabolizado como ciclohexilamina.

O ciclamato não é absorvido totalmente no intestino, nos seres humanos e outros animais.^(8,12) Após sua absorção é eliminado na urina sem acumular-se no sangue ou tecidos.^(13,14) A fração não absorvida é excretada nas fezes em sua maior parte, e quantidades variáveis são convertidas em ciclohexilamina, seu metabólito mais importante, por microorganismos que habitam o cólo e o cecum.^(15,16)

A ciclohexilamina, por sua vez, é rapidamente absorvida e excretada pelos rins, e também apresenta eliminação fecal. As taxas de excreção urinária de ciclamato e ciclohexilamina evidenciam que, após administrações prolongadas e em altas doses, pouco permanece nos fluidos e tecidos corporais.⁽¹³⁾

Tal fato reproduz-se no trabalho de Schechter *et al.*,⁽¹⁷⁾ no qual foi administrado em ratas prenhas, por via endovenosa, ciclamato marcado com C¹⁴, e estas sacrificadas em 5 minutos ou 7 horas após a citada administração. No primeiro grupo detectou-se, por auto-radiografias, pouca radioatividade fetal e intensa nos tecidos maternos, ao passo que após 7 horas, foi observado pequena radioatividade materna e intensa nos órgãos fetais, sugerindo que o feto tenha papel de depósito desta substância.

Em 1970, Price *et al.*⁽¹⁸⁾ observaram o desenvolvimento de tumores de bexiga⁽¹⁹⁾ em ratos submetidos a altas doses de ciclamato, o que foi

interpretado pela Food and Drugs Administration (FDA) como uma substância possivelmente cancerígena.^(6-8, 10,18-20)

Em adição, Oser *et al.*,⁽²¹⁾ verificaram a ocorrência de carcinomas papilares de bexiga em 12 de 70 ratos que receberam 2500 mg/Kg de peso corporal de ciclamato, pelo período de 78 a 105 semanas, através da dieta.

Subseqüentemente a este estudo, o Departamento de Saúde e Educação Norte Americano concluiu que o ciclamato não apresentava qualquer valor para o tratamento do diabetes e obesidade,⁽⁹⁾ e seu uso foi proibido nos Estados Unidos da América, e assim permanece até hoje.⁽⁶⁾

Entretanto, em 1977, o *Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives* (Comitê de Aditivos Alimentares da Organização Mundial de Saúde – OMS), aprovou o uso do ciclamato de sódio como aditivo alimentar em mais de 40 países,⁽²²⁾ incluindo o Brasil, Alemanha, Finlândia, Paquistão, África da Sul e Suíça,⁽⁸⁾ embora resultados experimentais apresentassem razões para sua não utilização.

Apesar da afirmação de Assunção *et al.*⁽²³⁾ que o consumo desta substância pelos diabéticos brasileiros (em pelo menos 92% destes pacientes) é menor que 50 mg/kg de peso corporal (dose padronizada como ingestão diária aceitável naquela ocasião), sabe-se que é crescente a substituição da sacarose por edulcorantes ou adoçantes artificiais, e em mulheres gestantes há um grande risco, já que de acordo com Pitkin *et al.*,^(24,25) o ciclamato de sódio atravessa a barreira placentária atingindo uma concentração fetal desta substância equivalente a um quarto da concentração materna existente. Este

fato confirma as afirmações de Schechter *et al.*,⁽¹⁷⁾ a respeito da presença de ciclamato nos órgãos fetais.

Segundo dados mais recentes do *Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives* (Comitê de Aditivos Alimentares da Organização Mundial de Saúde – OMS), a ingestão diária aceitável (IDA) do ciclamato corresponde, atualmente, a 11 mg/Kg de peso corporal.⁽²⁶⁾

De acordo com Collings,⁽²⁷⁾ o aumento da dose do ciclamato de sódio determina maior excreção de ciclohexilamina. No entanto, este autor verificou que o percentual desta conversão diminui com a elevação da dose do adoçante artificial.

Nos seres humanos, a metabolização do ciclamato em ciclohexilamina não ocorre de forma homogênea. Cerca de 76% dos usuários convertem menos que 0,1% da dose do edulcorante em ciclohexilamina, enquanto 8 a 10% desta população realiza a metabolização de 1% ou mais do produto, e 4% dos consumidores são grandes conversores (conversão de 20% ou mais da dose recebida).⁽⁸⁾

Diversos estudos foram realizados com animais de laboratório para analisar a toxicidade deste adoçante e da sua associação com a sacarina,^(28,29) com poucas alterações fisiopatológicas conseqüentes a administração destas substâncias, mesmo em altas dosagens.⁽²²⁾

Segundo Kroes *et al.*,⁽³⁰⁾ num estudo sobre a toxicidade a longo prazo do ciclamato, ciclohexilamina e sacarina, e seus efeitos na reprodução por seis gerações, envolvendo 2400 ratos, houve ausência de efeito teratogênico e de

complicações na fase reprodutiva, com exceção da ciclohexilamina, que foi considerada embriotóxica quando em concentração de 0,5%.

O edulcorante artificial em estudo consumido em elevadas quantidades por seres humanos causa diarreia devido ao seu efeito osmótico, segundo Egeberg *et al.*,⁽⁹⁾ visto que não há evidências de agravo de patologias do sistema digestório.

Takayama *et al.*⁽³¹⁾ realizou um estudo com macacos sendo administrados por via oral 100 mg e 500 mg/Kg de peso da referida substância, cinco vezes por semana, durante o período de 24 anos. Os resultados mostraram apenas espermatogênese irregular e casos esporádicos de diferentes malignidades. Segundo os mesmos autores, estas evidências não são claramente relacionadas ao edulcorante estudado.

Boop *et al.*⁽²²⁾ apresentaram extensa revisão sobre ciclamato e ciclohexilamina em diversos órgãos e sistemas, não evidenciando efeitos adversos importantes atribuíveis ao edulcorante em estudo.

De outra forma, avaliando 39 substâncias consideradas aditivos alimentares quanto à toxicidade em vários órgãos (estômago, rim, fígado, bexiga urinária, cólon, pulmão, cérebro e medula óssea), entre elas o ciclamato, Sasaki *et al.*⁽³²⁾ constataram que após 3 horas e também após 24 horas de dose única oral de 2000 mg/Kg da referida substância, ocorreram danos significativos ao DNA (ácido desoxirribonucléico) de células do estômago, cólon, rim e bexiga.

Estudos envolvendo a placenta e diversas outras substâncias como o chumbo⁽³³⁾ e amicacina,⁽³⁴⁾ apresentaram interferência no órgão através da

morfometria alterada no trabalho com o chumbo, e diminuição dos pesos placentários e encurtamento dos cordões umbilicais em ambas as pesquisas.

Outras investigações do edulcorante ciclamato de sódio com o rim⁽³⁵⁾ e com o fígado,⁽³⁶⁾ também mostraram, além de alterações nos respectivos órgãos avaliados, diminuição dos pesos placentários e encurtamento dos cordões umbilicais.

Em estudo com macacos recebendo dose única oral de 4 e 8 g/Kg de peso corporal de ciclamato de sódio, Stein *et al.*⁽³⁷⁾ encontraram vacuolização dos hepatócitos estudados. Um trabalho posterior do mesmo grupo contrariou as informações relatadas inicialmente.

Taylor *et al.*,⁽³⁸⁾ concluíram que a administração deste aditivo alimentar para animais, mesmo em doses agudas, não determina a ocorrência de distúrbios que poderiam ser atribuídos ao edulcorante. Este relato detecta, contudo, que os animais que receberam 400 mg/Kg da substância por 38 dias, desenvolveram lesões inflamatórias no fígado e rim, as quais foram atribuídas ao ciclamato de sódio.

Os produtos *diet* e/ou *light* trazem consigo a idéia do alcance de um corpo bonito, e sobretudo saudável.⁽³⁹⁾ O mercado ***diet / light*** a cada ano mostra-se cada vez mais robusto. As pessoas querem evitar ingerir excesso de calorias ou necessitam limitar a ingestão de açúcar por razões médicas.⁽⁶⁾

A crescente busca de dietas saudáveis e padrões sórdidos de beleza fazem as vendas de adoçantes dietéticos aumentarem mais de 10% ao ano (dados da **ABIAD – Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos**⁽³⁹⁾).

Esse mercado cresce, e as suas cifras também; ajudado pela população de diabéticos e obesos no mundo (segundo a **Newsweek**, em agosto de 2003 totalizavam 300 milhões de obesos, dos quais 60% ou 176 milhões são diabéticos), esse mercado movimentou U\$ 1 bilhão em 1998, e em 2003 registrou faturamento de U\$ 2,5 bilhões.⁽³⁹⁾ Segundo a **ABIAD – Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos**, a estimativa de faturamento em 2005 gira em torno de U\$ 7 bilhões.⁽³⁹⁾

Se no passado essa indústria vendia apenas o amargo a um público doente (diabéticos, hipertensos e obesos), hoje a concepção é outra:⁽³⁹⁾ baixa caloria, pouca gordura, menos sal, tudo isso é sinônimo de boa saúde. Tudo é sinônimo de *diet* ou *light*, produtos que tem ausência total de pelo menos um de seus componentes (açúcar, proteínas, gordura ou sal) ou produtos que tem pelo menos 25% a menos de calorias (em açúcar, proteínas, gordura ou sal), respectivamente.⁽³⁹⁾

Produtos **diet** e/ou **light** estão no apogeu de seu consumo; suas vendas avançam sem restrição. As pessoas cada vez mais interessadas em comer o mais doce do açúcar, sem engordar um grama por isso.⁽³⁵⁾

Há no mundo 7 mil títulos de produtos **diet** e/ou **light** distribuídos em 750 categorias.⁽³⁹⁾

Tudo isto aliada a avidez dos consumidores por qualidade de vida e corpos perfeitos, fez com que as indústrias de edulcorantes buscassem a melhoria do sabor dos produtos **diet** e/ou **light**. Com o avanço tecnológico, produzem edulcorantes com dulçor cada vez mais acentuado, e sabor o mais próximo possível do açúcar.⁽³⁹⁾

Alguns aspectos da literatura científica têm ressaltado a importância da substituição da sacarose pelo edulcorante em estudo ou outros adoçantes, pela necessidade de controle do peso corporal,⁽⁹⁾ o adequado controle da glicemia no diabetes mellitus⁽²³⁾ e a redução de cáries dentárias.^(40,41)

E apesar do potencial benefício da substituição do açúcar por adoçantes artificiais, seu uso alargado pode privar o consumo de alimentos com nutrientes mais saudáveis e essenciais. É importante lembrar que **moderação** é a palavra-chave para todas as formas de alimentos e/ou adoçantes artificiais, e que alimentos com adoçantes artificiais não são necessariamente livres de calorias.⁽⁶⁾

Existem diversos adoçantes de mesa a base de ciclamato e sacarina em uso no Brasil, sendo que os mais vendidos apresentam a proporção de duas partes de ciclamato para 1 parte de sacarina.^(42,43)

Estudos mais recentes em animais têm falhado em demonstrar que o ciclamato é carcinogênico ou co-carcinogênico. Entretanto, outros estudos deverão ser realizados antes do ciclamato ser aprovado para uso comercial como aditivo alimentar nos Estados Unidos da América (EUA).⁽²⁰⁾

Vale ressaltar que pesquisas com animais de laboratório possibilitam obter, em pouco tempo e em condições controladas, informações a respeito do potencial tóxico de substâncias químicas sobre o organismo em desenvolvimento, segundo Arruda *et al.*⁽³⁵⁾

Importante destacar também, que a maior parte das publicações de pesquisas sobre efeitos do ciclamato de sódio ocorreram nas décadas de 1960

e 1970, reduzindo-se em seguida, em grande parte devido a proibição do uso desta substância pelo FDA nos Estados Unidos da América.⁽⁹⁾

Finalizando ainda, a despeito da importância do órgão placentário, há uma escassez de estudos envolvendo a placenta e edulcorantes em geral, e o ciclamato de sódio em particular.

Assim, este estudo representa uma avaliação morfométrica (cariométrica) do tecido placentário de ratas submetido a ação do ciclamato de sódio, mostrando a relevância desta investigação.

1.1. Objetivos

O objetivo deste estudo será avaliar as alterações morfométricas placentárias detectadas em ratas submetidas a administração intraperitoneal de ciclamato de sódio do décimo ao décimo quarto dia de gravidez, e suas repercussões nos desenvolvimentos do feto e cordão umbilical, da seguinte maneira:

- avaliação do crescimento fetal intrauterino através dos pesos do feto e da placenta e do comprimento do cordão umbilical;
- avaliação morfométrica do núcleo das células placentárias de ratas.

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Material

2.1.1. O Animal

No presente estudo as placentas de 10 ratas no 20º dia de gestação foram avaliadas, divididas em dois grupos, sendo 5 (cinco) placentas do grupo tratado e 5 (cinco) placentas do grupo controle, escolhidas ao acaso;

Para obtenção das placentas foram utilizadas 10 (dez) ratas albinas, variedade Wistar, constituindo dois grupos de 5 (cinco) animais cada, grupos tratado e controle, com idade média de 50 dias e peso médio de 240 g.

2.1.2. Período de Adaptação

De acordo com o protocolo, após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), os animais foram removidos do Biotério e permaneceram no Laboratório de Pesquisa da FAMERP.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com temperatura e luz ambiente, e receberam água e ração comercial *ad libitum* pelo período de 7 (sete) dias, para adaptação dos mesmos.

A distribuição das ratas em cada grupo, tratado e controle, foi realizada por meio de sorteio.

2.1.3. Período de Acasalamento

Após a adaptação ao novo ambiente, as ratas foram colocadas em gaiolas comunitárias na proporção de 4 (quatro) fêmeas para 1 (um) macho, para acasalamento noturno.

2.1.4. Determinação do 1º (primeiro) Dia de Prenhez da Rata

Na manhã seguinte ao período noturno de acasalamento e com a realização de esfregaços vaginais, é definido o diagnóstico do 1º dia da gravidez com a detecção de espermatozóides presentes ao microscópio óptico. A partir de então, as ratas foram pesadas em balança de precisão e ficaram em gaiolas individuais recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

2.1.5. Tratamento

As 5 (cinco) ratas do grupo tratado receberam dose única e diária de 60 mg/Kg de peso corpóreo de ciclamato de sódio, intraperitonealmente, do 10º ao 14º dia de gestação. As 5 (cinco) ratas do grupo controle receberam, pela mesma via, volume equivalente de solução salina (cloreto de sódio) a 0,9%.

2.1.6. Técnica de Dissecção e Pesagem

No 20º dia de gravidez, as ratas foram sacrificadas por inalação de éter sulfúrico e, por meio de incisão ampla no abdome e útero, os fetos e anexos fetais (placentas e cordões umbilicais) foram retirados e imediatamente imersos em solução de Alfac (álcool a 80% – 85 ml + formalina – 10 ml + ácido acético – 5 ml), na qual permaneceram por 24 horas.

Todos os fetos (escolhidos um de cada rata, ao acaso) e suas respectivas placentas, após fixação, foram limpos, secados em papel de filtro e pesados em balança de precisão Labof (Laboratorium Felszerelés, Budapeste, Hungria).

Os cordões umbilicais foram medidos com régua milimetrada. Em seguida, as estruturas foram imersas em álcool a 80% para conservação.

2.2. Método

2.2.1. Técnica Histológica

Os animais do grupo tratado e do grupo controle, após a fixação na solução de Alfac, foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. O material obtido foi então seccionado, obtendo-se cortes semi-seriados de 6 µm de espessura e corado pela hematoxilina-eosina no Laboratório de Histotecnologia da Faculdade de Odontologia da Fundação Educacional de Barretos – FEB.

2.2.2. Cariometria

Para estimar os parâmetros nucleares das células placentárias nos grupos estudados foi utilizado o microscópio óptico Hund H500 Wetzlar (Helmut Hund GmbH, Alemanha), com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes) munido de câmara clara Leitz Wetzlar (Alemanha) adaptada.

Foram avaliados os seguintes elementos placentários: decídua, camada esponjosa e vilosidades coriônicas placentárias.

Os núcleos foram projetados sobre folha de papel sulfite branca com aumento final de 1240 vezes. As imagens nucleares obtidas (50 imagens de cada estrutura avaliada de cada uma das placentas, nos grupos tratado e controle, num total de 1500 imagens), foram então contornadas com lápis preto número 2 (dois), com o cuidado de anotar-se somente as imagens elípticas. Para a obtenção dos diâmetros, foram medidos com régua milimetrada os eixos maior (D) e menor (d) das imagens elípticas referidas.

Após a determinação dos eixos citados em milímetros e com a utilização de um Software (NUC) desenvolvido no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), foram calculados os seguintes parâmetros nucleares: Diâmetro maior, Diâmetro menor, Diâmetro médio, Relação Diâmetro maior / Diâmetro menor, Perímetro, Área nuclear, Volume nuclear, Relação volume / área, Excentricidade, Coeficiente de forma e Índice de contorno.

1. Diâmetro maior
2. Diâmetro menor
3. Diâmetro médio: $M = (D \cdot d)^{1/2}$
4. Relação entre diâmetro maior e diâmetro menor : D/d
5. Perímetro: $P = (\pi/2) [1.5 \times (D + d) - M]$
6. Área: $A = \pi M^2 / 4$
7. Volume: $V = \pi / 6 M^3$
8. Relação entre volume e área: $^{3/2} M$
9. Excentricidade: $E = (D + d)^{1/2} (D - d)^{1/2} / D$
10. Coeficiente de forma: $F = 4 \pi A/P^{1/2}$
11. Índice de contorno: $I = P / (A)^{1/2}$

2.3. Análise estatística

Para o confronto estatístico dos resultados obtidos nos grupos tratado e controle, foi utilizado a prova U de Mann-Whitney.

Para a análise estatística dos resultados deste estudo, assim como para os diversos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos morfométricos dos dados, foram utilizados programas para computador do tipo IBM-PC em linguagem BASIC AVANÇADO (BASICA), visando o processamento dos dados experimentais, programas estes elaborados por Maia Campos e Sala, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os parâmetros quantitativos de peso fetal dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, assim como sua análise estatística, podem ser vistos na tabela 1. Verifica-se que a média do peso corporal, em gramas, dos animais tratados (2,31 g) apresenta-se diminuída em relação aos controles (2,94 g), mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1. Valores médios do peso corporal (g) de fetos de ratos controles (C) e tratados com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

C	T
2,98	2,25
3,10	2,41
3,02	2,30
2,86	2,43
2,72	2,20
又	又
2,94	2,31
U calc: 0*	
p [U]: 0,004	

*estatisticamente significativa para $\alpha < 0,01$.

O peso da placenta dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, assim como sua análise estatística, podem ser vistos na tabela 2. Observa-se

que a média do peso da placenta, em gramas, dos animais tratados (0,29 g) apresenta-se diminuída em relação aos controles (0,44 g), também mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 2. Valores médios dos pesos das placentas (g) de fetos de ratos controles (C) e tratados com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

C	T
0,41	0,26
0,46	0,31
0,45	0,29
0,41	0,28
0,48	0,32
又	又
0,44	0,29
U calc: 0*	
p [U]: 0,004	

*estatisticamente significativa para $\alpha < 0,01$.

O comprimento do cordão umbilical dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, assim como sua análise estatística, podem ser vistos na tabela 3. É mostrado que a média do comprimento do cordão umbilical, em centímetros, dos animais tratados (1,93 cm) apresenta-se diminuída em relação aos controles (2,12 cm), e da mesma forma apresenta, mais uma vez, diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3. Valores médios dos comprimentos dos cordões umbilicais (cm) de fetos de ratos controles (C) e tratados com Ciclamato de Sódio (T).
Teste de Mann-Whitney.

C	T
2,23	1,91
2,02	2,03
2,01	1,94
2,24	2,07
2,11	1,75
又	又
2,12	1,93
U calc: 4*	
p [U]: 0,048	

*estatisticamente significativa para $\alpha < 0,05$.

Na análise da cariometria placentária de ratas dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, é verificado na avaliação dos parâmetros da decídua placentária em relação aos diâmetros maior e menor (μm) destes núcleos o que mostra a tabela 4. Observa-se que a média do diâmetro maior (19,43) dos animais controles e a média do diâmetro maior (19,43) dos animais tratados, assim como a média do diâmetro menor (13,75) dos animais controles e a média do diâmetro menor (13,37) dos animais tratados não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 4. Valores médios dos Diâmetros Maior e Menor (μm) dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor	
C	T	C	T
20,27	22,06	14,26	15,58
21,06	20,13	14,71	13,02
16,58	18,10	11,18	12,82
21,27	17,61	15,53	12,19
17,98	19,27	13,06	13,26
又	又	又	又
19,43	19,43	13,75	13,37
U calc: 12**		U calc: 10**	
p[U]: 0,500		p[U]: 0,345	

**estatisticamente não significante.

Na avaliação dos parâmetros da decídua placentária em relação diâmetro médio (μm) e relação diâmetro maior/diâmetro menor destes núcleos, é observado o que mostra a tabela 5.

Verifica-se que a média do diâmetro médio (16,26) dos animais controles e a média do diâmetro médio (16,03) dos animais tratados, assim como a média da relação D/d (1,47) dos animais controles e a média da relação D/d (1,51) dos animais tratados não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 5. Valores médios do Diâmetro Médio (μm) e Relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T
16,87	18,47	1,50	1,46
17,53	16,08	1,46	1,60
13,50	15,14	1,57	1,47
18,11	14,56	1,40	1,51
15,27	15,89	1,40	1,52
又	又	又	又
16,26	16,03	1,47	1,51
U calc: 11**		U calc: 7**	
p[U]: 0,421		p[U]: 0,155	

**estatisticamente não significante.

Na avaliação da decídua placentária em relação ao volume (μm^3) e área (μm^2) nucleares, observa-se o mostrado na tabela 6.

Verifica-se que a média do volume nuclear (2689,40) dos animais controles e a média do volume nuclear (2423,86) dos animais tratados, assim como a média da área nuclear (220,40) dos animais controles e a média da área nuclear (209,85) dos animais tratados não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6. Valores médios do Volume (μm^3) e Área (μm^2) Nucleares dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Volume Nuclear		Área Nuclear	
C	T	C	T
2820,10	3629,53	232,27	276,55
3003,85	2304,01	246,33	207,04
1526,34	2024,16	151,10	186,59
3906,45	1730,15	278,78	170,44
2190,25	2431,47	193,51	208,61
又	又	又	又
2689,40	2423,86	220,40	209,85
U calc: 10**		U calc: 10**	
p[U]: 0,345		p[U]: 0,345	

**estatisticamente não significante.

Também ao ser avaliada a decídua placentária em relação ao perímetro (μm) nuclear e relação volume/área observa-se ilustrado na tabela 7.

Verifica-se que a média do perímetro nuclear (52,65) dos animais controles e a média do perímetro nuclear (52,13) dos animais tratados, assim como a média da relação V/A (10,84) dos animais controles e a média da relação V/A (10,69) dos animais tratados não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 7. Valores médios do Perímetro (μm) e Relação Volume/Área dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney. (*)

Perímetro Nuclear		Relação V/A	
C	T	C	T
54,87	59,69	11,25	12,31
56,75	52,83	11,69	10,72
44,19	49,07	9,00	10,10
58,27	47,36	12,08	9,71
49,17	51,69	10,18	10,59
又	又	又	又
52,65	52,13	10,84	10,69
U calc: 11**		U calc: 11**	
p[U]: 0,421		p[U]: 0,421	

**estatisticamente não significante.

Na análise da decídua placentária em relação a excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno, observa-se o que mostra a tabela 8.

É verificado que a média da excentricidade (0,66), do coeficiente de forma (0,94) e do índice de contorno (3,66) nucleares dos animais controles não mostram diferença estatisticamente significante quando comparados aos valores do grupo tratado (0,69, 0,93 e 3,68, respectivamente).

Tabela 8. Valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles (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
0,65	0,68	0,93	0,94	3,68	3,65
0,68	0,73	0,94	0,92	3,65	3,71
0,68	0,66	0,92	0,94	3,70	3,66
0,66	0,68	0,95	0,93	3,63	3,68
0,65	0,68	0,95	0,93	3,64	3,68
又	又	又	又	又	又
0,66	0,69	0,94	0,93	3,66	3,68
U calc: 6**		U calc: 10**		U calc: 7**	
p[U]: 0,111		p[U]: 0,345		p[U]: 0,155	

**estatisticamente não significante.

Os parâmetros cariométricos da camada esponjosa placentária dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, e sua análise estatística, podem ser vistos nas tabelas 9 a 13. Em relação aos diâmetros maior e menor (μm) destes núcleos, segundo a tabela 9, a média do diâmetro maior (15,54) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significativa que a média do diâmetro maior (17,08) dos animais controles; no entanto, a média do diâmetro menor (11,00) do grupo tratado e a média do diâmetro menor (11,83) do grupo controle não tem diferença estatística entre si.

Tabela 9. Valores médios dos Diâmetros Maior e Menor (μm) dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor	
C	T	C	T
17,40	16,45	12,23	11,34
18,11	15,08	12,82	10,90
16,02	15,90	10,31	11,31
16,71	13,90	11,34	10,21
17,19	16,40	12,47	11,26
又	又	又	又
17,08	15,54	11,83	11,00
U calc: 2*		U calc: 5**	
p[U]: 0,016		p[U]: 0,075	

*estatisticamente significante; **estatisticamente não significante.

Na avaliação do diâmetro médio (μm) e relação diâmetro maior/diâmetro menor destes núcleos, de acordo com a tabela 10, verifica-se que a média do diâmetro médio (13,01) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significante que a média do diâmetro médio (14,15) dos animais controles; no entanto, a média da relação D/d (1,44) dos animais tratados e a média da relação D/d (1,48) dos animais controles não mostram diferença estatística entre si.

Tabela 10. Valores médios do Diâmetro Médio (μm) e Relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T
14,50	13,58	1,47	1,51
15,18	12,78	1,45	1,41
12,77	13,35	1,60	1,43
13,71	11,86	1,50	1,39
14,60	13,50	1,40	1,48
又	又	又	又
14,15	13,01	1,48	1,44
U calc: 4*		U calc: 9**	
p[U]: 0,048		p[U]: 0,274	

*estatisticamente significativa; **estatisticamente não significativa.

Em relação ao volume (μm^3) e área (μm^2) nucleares da camada esponjosa, observa-se o mostrado na tabela 11.

Nota-se que a média do volume nuclear (1398,07) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significativa que a média do volume nuclear (1921,11) dos animais controles, assim como a média da área nuclear (141,73) dos animais tratados também é menor de maneira estatisticamente significativa que a média da área nuclear (171,45) dos animais controles.

Tabela 11. Valores médios do Volume (μm^3) e Área (μm^2) Nucleares dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Volume Nuclear		Área Nuclear	
C	T	C	T
2206,84	1550,38	184,11	152,90
2278,29	1403,60	194,40	139,09
1413,55	1498,79	139,65	149,23
1644,48	991,17	157,74	115,16
2062,40	1546,43	181,36	152,30
又	又	又	又
1921,11	1398,07	171,45	141,73
U calc: 3*		U calc: 3*	
p[U]: 0,028		p[U]: 0,028	

*estatisticamente significante.

Na avaliação do perímetro (μm) nuclear e relação volume/área verifica-se o ilustrado na tabela 12.

De acordo com a mesma, a média do perímetro nuclear (42,11) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significante que a média do perímetro nuclear (45,90) dos animais controles, assim como a média da relação V/A (8,67) dos animais tratados também é menor de maneira estatisticamente significante que a média da relação V/A (9,43) dos animais controles.

Tabela 12. Valores médios do Perímetro (μm) e Relação Volume/Área dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney. (*)

Perímetro Nuclear		Relação V/A	
C	T	C	T
47,03	44,15	9,67	9,05
49,04	41,15	10,12	8,52
41,96	43,14	8,51	8,90
44,55	38,18	9,14	7,91
46,96	43,96	9,73	9,00
又	又	又	又
45,90	42,11	9,43	8,67
U calc: 3*		U calc: 4*	
p[U]: 0,028		p[U]: 0,048	

*estatisticamente significativa.

Na análise da camada esponjosa placentária em relação a excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno nucleares, observa-se o que mostra a tabela 13. Segundo a mesma, a média da excentricidade (0,65) do grupo tratado é menor de maneira estatisticamente significativa que a média da excentricidade (0,68) do grupo controle. Por outro lado, o coeficiente de forma e o índice de contorno nucleares do grupo tratado (0,94 e 3,65) e do grupo controle (0,94 e 3,66) não mostram diferença estatística entre si.

Tabela 13. Valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles (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
0,66	0,69	0,94	0,93	3,67	3,68
0,68	0,66	0,94	0,95	3,65	3,64
0,73	0,65	0,92	0,95	3,71	3,64
0,71	0,62	0,94	0,95	3,67	3,63
0,66	0,65	0,96	0,94	3,63	3,67
又	又	又	又	又	又
0,68	0,65	0,94	0,94	3,66	3,65
U calc: 4*		U calc: 10**		U calc: 8**	
p[U]: 0,048		p[U]: 0,345		p[U]: 0,210	

*estatisticamente significante; **estatisticamente não significante.

Os parâmetros cariométricos das vilosidades coriônicas placentárias dos grupos controle e tratado com ciclamato de sódio, e sua análise estatística, podem ser vistos nas tabelas 14 a 18. Em relação aos diâmetros maior e menor (μm) destes núcleos, conforme ilustra a tabela 14, observa-se que a média do diâmetro maior (11,46) dos animais tratados e a média do diâmetro maior (12,21) dos animais controles, assim como a média do diâmetro menor (7,82) dos animais tratados e a média do diâmetro menor (8,30) dos animais controles não mostram diferença estatisticamente significante.

Tabela 14. Valores médios dos Diâmetros Maior e Menor (μm) dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor	
C	T	C	T
11,52	12,10	8,13	8,45
13,11	11,69	8,16	7,82
12,05	11,31	8,11	7,48
12,95	11,23	9,37	7,85
11,44	10,97	7,76	7,50
又	又	又	又
12,21	11,46	8,30	7,82
U calc: 5**		U calc: 6**	
p[U]: 0,075		p[U]: 0,111	

**estatisticamente não significante.

Na avaliação do diâmetro médio (μm) e relação diâmetro maior/diâmetro menor destes núcleos, de acordo com a tabela 15, verifica-se que a média do diâmetro médio (9,41) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significativa que a média do diâmetro médio (10,02) dos animais controles; no entanto, a média da relação D/d (1,51) dos animais tratados e a média da relação D/d (1,50) dos animais controles não mostram diferença estatística entre si.

Tabela 15. Valores médios do Diâmetro Médio (μm) e Relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T
9,63	10,07	1,45	1,47
10,28	9,51	1,64	1,54
9,84	9,14	1,52	1,57
10,97	9,33	1,42	1,49
9,38	9,02	1,50	1,50
又	又	又	又
10,02	9,41	1,50	1,51
U calc: 4*		U calc: 10**	
p[U]: 0,048		p[U]: 0,345	

*estatisticamente significante; **estatisticamente não significante.

Em relação ao volume (μm^3) e área (μm^2) nucleares das vilosidades coriônicas, observa-se o mostrado na tabela 16.

Nota-se que a média do volume nuclear (466,51) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significante que a média do volume nuclear (563,00) dos animais controles, assim como a média da área nuclear (71,16) dos animais tratados também é menor de maneira estatisticamente significante que a média da área nuclear (80,63) dos animais controles.

Tabela 16. Valores médios do Volume (μm^3) e Área (μm^2) Nucleares dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney.

Volume Nuclear		Área Nuclear	
C	T	C	T
500,52	573,35	74,55	81,57
603,56	470,44	84,65	72,10
522,37	430,88	77,23	67,26
737,13	449,04	96,64	69,62
451,43	408,88	70,11	65,27
又	又	又	又
563,00	466,51	80,63	71,16
U calc: 4*		U calc: 4*	
p[U] : 0,048		p[U] : 0,048	

*estatisticamente significante.

Na avaliação do perímetro (μm) nuclear e relação volume/área verifica-se o ilustrado na tabela 17.

De acordo com a mesma, a média do perímetro nuclear (30,63) dos animais tratados é menor de maneira estatisticamente significante que a média do perímetro nuclear (32,60) dos animais controles, assim como a média da relação V/A (6,27) dos animais tratados também é menor de maneira estatisticamente significante que a média da relação V/A (6,67) dos animais controles.

Tabela 17. Valores médios do Perímetro (μm) e Relação Volume/Área dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (C) e tratadas com Ciclamato de Sódio (T). Teste de Mann-Whitney. (*)

Perímetro Nuclear		Relação V/A	
C	T	C	T
31,16	32,59	6,42	6,72
33,97	31,04	6,85	6,34
32,04	29,92	6,56	6,09
35,36	30,30	7,31	6,22
30,49	29,34	6,25	6,02
又	又	又	又
32,60	30,63	6,67	6,27
U calc: 4*		U calc: 4*	
p[U]: 0,048		p[U]: 0,048	

*estatisticamente significante.

Na análise das vilosidades coriônicas placentárias em relação a excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno nucleares, observa-se o que mostra a tabela 18. É verificado que a média da excentricidade (0,69), do coeficiente de forma (0,93) e do índice de contorno (3,67) nucleares dos animais tratados não mostram diferença estatisticamente significante quando comparados aos valores do grupo controle (0,69, 0,93 e 3,67, respectivamente).

Tabela 18. Valores médios da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles (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
0,66	0,69	0,94	0,94	3,65	3,66
0,75	0,70	0,91	0,93	3,73	3,69
0,70	0,71	0,93	0,92	3,68	3,70
0,65	0,67	0,95	0,94	3,64	3,67
0,70	0,69	0,94	0,93	3,67	3,67
又	又	又	又	又	又
0,69	0,69	0,93	0,93	3,67	3,67
U calc: 12**		U calc: 12**		U calc: 9**	
p[U]: 0,500		p[U]: 0,500		p[U]: 0,274	

**estatisticamente não significante.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. O Animal de Experimentação

A necessidade de investigações e experimentos científicos é fundamental para a evolução da Ciência. E a experimentação com animais têm permitido grandes avanços no conhecimento biológico, com benefícios inequívocos à saúde do ser humano, em relação à tratamento e prevenção de diversas enfermidades, no âmbito individual ou populacional.⁽⁴⁴⁾

Em todo o mundo, no campo da medicina, depende-se do uso de animais de experimentação para realização de ensaios de novas substâncias (com registro empírico de seus benefícios, contra-indicações e efeitos colaterais), e procedimentos de prevenção, diagnóstico e tratamento em seres humanos, das mais variadas afecções.⁽⁴⁴⁾

Desta forma, são muitos os campos da investigação biomédica em que, pelo menos num futuro próximo, ainda há a necessidade de experimentos com animais, e sua substituição por métodos alternativos não reproduz o modelo biológico que satisfaça, com propriedade, o complexo conjunto representado pelo ser vivo vertebrado. Um animal com vida e intacto é muito mais que uma soma de reações celulares, tecidos e órgãos independentes.⁽⁴⁴⁾ Existem complexas interações num animal completo que os métodos alternativos de experimentação, biológicos ou não, não conseguem reproduzir.

De acordo com as Normas Internacionais para a Investigação Biomédica com Animais (criadas no Consenso de Organizações Internacionais de

Ciências Médicas)⁽⁴⁴⁾ há de respeitar-se alguns princípios básicos para a pesquisa com animais, entre os quais destaca-se o que estabelece que “os animais selecionados para um experimento devem ser da espécie e qualidade apropriadas para o mesmo e seu número deve constituir-se no mínimo necessário para obter resultados cientificamente válidos”,⁽⁴⁴⁾ o que foi adequadamente realizado por este estudo.

4.2. A Cariometria

A morfometria (onde também encontra-se inserida a cariometria), tem a palavra formada pelo radical grego *morphé*, que significa a forma, associado ao radical grego *metrikós*, ou do latim *metricu*, que significa o ato de medir ou o processo de estabelecer dimensões.⁽⁴⁵⁾ Desta maneira, sendo *caríos* (núcleo), a cariometria é a parte da morfometria responsável pelo ato de medir núcleos.

Embora o termo morfometria tenha aplicação ampla na Ciência, o sentido em biomedicina seria, em última análise, a “atividade de medir estruturas anatômicas”.⁽⁴⁵⁾

Esta maneira de quantificar (morfometria e cariometria) tem demonstrado ser uma importante metodologia para avaliar objetivamente as alterações morfológicas que ocorrem tanto em condições patológicas como em estudos experimentais.⁽⁴⁶⁾

Trata-se de um procedimento simples para estimar alguns parâmetros citológicos (nucleares no presente estudo) por microscopia óptica,⁽⁴⁶⁾ a partir dos diâmetros maior e menor da estrutura avaliada.

Esse método tem por função tornar mais objetiva e precisa a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos em pesquisas e na rotina de laboratório, permitindo ainda se relacionar as diferentes estruturas anatômicas com as funções.⁽⁴⁵⁾

4.3. A Estatística

Estatística é uma coleção de métodos para planejar um estudo, envolvendo a obtenção, organização, análise e a interpretação dos dados, deles extraindo as conclusões, segundo Triola, 1999, modificado, apud Reis *et al.*⁽⁴⁷⁾

O teste de hipótese é utilizado em geral para comprovar uma hipótese científica previamente formulada. Há situações em que, somente pela média e pela variância isto não é possível, uma vez que estas informações não levam em consideração as probabilidades de erros que podem estar associados ao rejeitarmos uma hipótese.⁽⁴⁸⁾

Existem vários testes estatísticos que podem ser utilizados. No entanto, para cada um deles, é necessário o cumprimento de alguns critérios para que possam ser aplicados.⁽⁴⁸⁾

Empregando-se a estatística inferencial (como a usada nesta pesquisa), são utilizados os testes Paramétricos ou os testes Não-paramétricos na dependência da distribuição ser “normal” e “com homogeneidade da variância” ou “não normal” e “sem homogeneidade da variância”, respectivamente.⁽⁴⁷⁾

Nos casos de testes paramétricos, a principal suposição é a de que os dados provenham de uma distribuição normal, isto é, que a sua distribuição seja simétrica em torno da média e que a sua variabilidade não seja muito grande. Neste caso a amostra terá distribuição normal e a média de cada grupo também terá distribuição normal (com a mesma média). A média é vista como uma variável aleatória. No experimento todos os elementos devem ter a mesma chance de pertencer à amostra (por ex., ratas da mesma espécie, idade, etc.).⁽⁴⁸⁾

Deve ser observado ainda que a normalidade se verifica para amostras suficientemente numerosas. Em muitas situações, porém, esta condição não é possível, como ocorre no presente estudo. Ainda assim aplica-se a análise estatística, mas agora, usando-se testes ditos não paramétricos.⁽⁴⁸⁾

Nos testes não paramétricos a suposição de normalidade não é exigida, pois os mesmos baseiam-se na soma de pontos das observações, portanto, um conjunto pequeno de dados cuja distribuição não é normal,⁽⁴⁸⁾ situação que se aplica à esta pesquisa.

Somente a variável peso da placenta mostrou uma distribuição normal. Assim, foram aplicados somente testes estatísticos não paramétricos baseados na ordenação dos dados em cada grupo.

Como os grupos avaliados neste estudo são de distribuição “não normal” e “sem homogeneidade da variância”, e trata-se de grupos independentes, o teste indicado para adequada análise estatística dos mesmos foi o teste de Mann-Whitney⁽⁴⁷⁾ (usado para as situações como a descrita aqui). Trata-se de

um dos mais eficientes testes não paramétricos e constitui uma alternativa extremamente útil para a prova paramétrica *t*.

As diferenças observadas são consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade é menor que 0,05 (5%).⁽⁴⁷⁾

4.3.1. O Tamanho da Amostra

Uma etapa que o pesquisador deve desenvolver durante seu projeto de pesquisa é o cálculo do tamanho da amostra suficiente estatisticamente para descrever o fenômeno em estudo, ou seja, definir quantos campos microscópicos devem ser analisados para que a amostra seja representativa do processo avaliado. Um destes métodos foi proposto por Williams, em 1977.⁽⁴⁹⁾

Este método (a média acumulada de Williams) consiste, inicialmente, em contar o número de eventos do fenômeno em estudo em 100 (cem) campos aleatórios que representem todo o corte histológico. Para calcular a média acumulada, soma-se o número de eventos por campo e divide-se pelo número de campos (fator de divisão); a centésima média acumulada corresponde ao chamado "100%", e assim, aplicando-se a regra de três é calculada as porcentagens das demais médias de cada campo.⁽⁴⁹⁾ Pode ser observado que a partir da 50ª. medida (campo) todos os valores ficam entre 95% e 105%.⁽⁴⁹⁾ Assim, assumido como significativo estatisticamente o $p < 0,05$, o número representativo de campos na avaliação de determinada estrutura é 50 (cinquenta).⁽⁴⁹⁾ Isso significa, em termos de probabilidade estatística, que

contar 50 campos aleatórios não é diferente de contar maior quantidade de campos, como 100, 200 ou 1000 campos aleatórios.⁽⁴⁹⁾

Desta forma, o presente experimento mostra a avaliação de 50 núcleos de cada estrutura analisada, de cada órgão (placenta) em estudo, num total de 1500 núcleos avaliados (750 núcleos do grupo tratado e 750 núcleos do grupo controle).

Assim sendo, pelo raciocínio exposto, é suficiente o número de 5 animais para o grupo tratado e 5 animais para o controle, para satisfazer o tamanho da amostra necessário e ter validade representativa do processo em estudo, cumprindo-se com isso, as Normas Internacionais para a Investigação Biomédica com Animais que estabelece que o número de animais utilizados em experimentação científica deve constituir-se no **mínimo necessário** para obter resultados cientificamente válidos.

4.4. A Placenta e o Ciclamato

O princípio dos edulcorantes sempre será o mesmo: conferir sabor doce em substituição ao açúcar.⁽³⁹⁾ A preocupação com seu uso deve-se ao grande crescimento das classes de edulcorantes, com a classe do ciclamato sendo a pioneira a surgir no mercado.

Com evidências mais fortes ou menos claras de carcinogenicidade do edulcorante ciclamato ou da mistura ciclamato / sacarina, suas limitações apóiam-se nos próprios dados da ciência como indutores ou pelo menos, co-fatores de câncer de bexiga em humanos, que se não comprovam

absolutamente, no mínimo deixam a dúvida, assustam e desconfortam.^(6-8,10,18-20)

Com o objetivo de identificar possíveis efeitos danosos com o uso do ciclamato, este estudo avaliou o tecido placentário de ratas através de três estruturas (decídua, camada esponjosa e vilosidades coriônicas), após a administração de 60 mg/Kg de peso corporal de ciclamato de sódio, do décimo ao décimo quarto dia de gestação. Foi utilizada esta dosagem do edulcorante, pois a quantidade máxima para uso em humanos de ciclamato de sódio, segundo o FDA, correspondeu a 50 mg/Kg de peso corporal por muitos anos.⁽²⁶⁾

A placenta é o órgão responsável pela íntima união entre os tecidos fetal e materno. Ela é responsável pelo crescimento e bem estar do feto, pois controla a homeostasia materno-fetal relacionada à nutrição e excreção, proteção mecânica e de barreira à fatores de indução de teratogênese, produção hormonal e passagem de hormônios, vírus, anticorpos e medicamentos.⁽³³⁾

A passagem de substâncias químicas através da placenta por diferentes tipos de transporte permite a exposição fetal às mesmas. Assim, devem ser consideradas a permeabilidade e a espessura placentárias, além de sua capacidade metabolizadora. Outros fatores importantes nesse processo estão relacionados ao perfil farmacológico da substância (lipossolubilidade e tamanho de sua molécula) e também a aspectos biológicos como o fluxo sanguíneo materno-fetal.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

Além dos trabalhos de Pitkin^(24,53) evidenciando a passagem transplacentária do ciclamato, Hianik *et al.*⁽⁵⁴⁾ mostraram em seu estudo a afinidade que o ciclamato de sódio tem por membranas lipídicas, o que ratifica seu transporte pela barreira placentária e sua potencial ação neste órgão.

Na placenta de ratas destacam-se três estruturas submetidas a estudo na presente pesquisa: decídua basal (região de origem exclusivamente materna), camada esponjosa ou reticular (onde concentram-se as células do citotrofoblasto, predominantemente, como os espongioblastos,⁽⁵⁵⁾ avaliados neste estudo), e vilosidades coriônicas.⁽⁵⁶⁾ A morfologia, posição e função distintas atribuídas às células placentárias podem ser usadas como índice de maturação da placenta.⁽⁵⁷⁾

A decídua é composta por células responsáveis pela nutrição do embrião. Além disso, após a constituição final da placenta, participa da absorção ativa de sua membrana fornecendo ao feto nutrientes que necessita em maior proporção que a mãe, como o cálcio e fosfato, segundo Guyton *et al.* 1992 *apud* Brandini.⁽³³⁾

As células deciduais predominam na placenta no 6º dia de prenhez, aumentam em número até o 10º dia e diminuem no 14º dia, de acordo com Iguchi *et al.*, 1993 *apud* Brandini.⁽³³⁾

A principal função das células da camada esponjosa é endócrina. Uma diminuição do tamanho nuclear destas células da placenta de ratas, como a observada neste estudo, pode indicar uma queda da sua produção hormonal de estrógeno, hormônio responsável pela velocidade de multiplicação celular do feto (crescimento fetal).⁽³³⁾

A camada placentária das vilosidades coriônicas representa 2/3 do total da placenta. Estas células vilositárias são responsáveis pelo transporte bidirecional de nutrientes e resíduos de excreção fetais.⁽³³⁾ É a região onde se estabelece a mais íntima relação entre os sangues fetal e materno, permitindo a ocorrência de trocas materno-fetais.⁽⁴⁸⁾

Observa-se que o peso fetal do grupo tratado foi menor que o peso fetal do grupo controle de maneira estatisticamente significativa, sugerindo ação da substância ciclamato sobre o desenvolvimento fetal. Este resultado está em concordância com os achados de Tanaka *et al.*⁽⁵⁸⁾ que, após a administração de altas doses de ciclamato de sódio por via oral à camundongos no sétimo dia de prenhez, detectou restrição no crescimento fetal. Também é corroborado pelo trabalho de Verret *et al.*⁽⁵⁹⁾ que encontrou teratogenicidade do ciclamato em embriões de galinha.

O peso corporal alterado do feto é um indicador de alteração do organismo fetal ou embriotoxicidade.⁽⁶⁰⁾

Outros trabalhos não encontraram alterações ou efeitos adversos do edulcorante em estudo sobre o organismo fetal.⁽²²⁾

Em relação ao peso da placenta, verifica-se que o peso médio das placentas do grupo tratado (0,29g) também foi menor e de maneira estatisticamente significativa que o peso médio das placentas do grupo controle (0,44g), sugerindo toxicidade do edulcorante utilizado, com interferência nas funções placentárias e conseqüente comprometimento do crescimento fetal.

Substâncias capazes de provocar alterações circulatórias e endócrinas placentárias podem provocar menor desenvolvimento placentário e restrição de

crescimento fetal, de acordo com Fuentes *et al.*,⁽⁶¹⁾ em seu trabalho com placenta e chumbo. No entanto, no estudo histológico da placenta de hamsters intoxicadas com sais de chumbo Ferm *et al.*⁽⁶²⁾ não encontraram quaisquer alterações.

Alterações no fluxo sanguíneo placentário podem modificar o tamanho e peso fetais. Do fluxo sanguíneo placentário diminuído resulta uma hipóxia fetal significativa, que provoca restrição do crescimento intra-uterino, gerando fetos de menor comprimento e peso.^(63,64) Neste estudo da placenta e ciclamato de sódio também foi observado menor peso fetal, sugerindo que esta substância possa também interferir nestas funções placentárias.

De acordo com Pitkin *et al.*,^(24,53) o ciclamato de sódio atravessa a barreira placentária em humanos e macacos, atingindo o líquido amniótico na proporção de um quarto da concentração sanguínea materna, e dessa forma, alcançando os tecidos fetais.

O adequado desenvolvimento fetal depende de substâncias que vem do sangue materno através da placenta. Esta, se comprometida pela substância em estudo, pode apresentar fluxo sanguíneo diminuído com conseqüente menor aporte de nutrientes, oxigênio e outros elementos para a circulação fetal, resultando em deficiência de crescimento e peso fetal.

Com referência ao comprimento do cordão umbilical, este diminuiu de 2,12g (grupo controle) para 1,93g (grupo tratado), o que foi estatisticamente significativo.

Brandini,⁽³³⁾ no seu estudo da placenta e chumbo, também corrobora com nossos resultados ao identificar interferência da substância estudada na

placenta através de alterações da morfometria placentária (cariometria e estereologia), ou seja, através do mesmo método nas estruturas que também foram avaliadas neste trabalho (cariometria das camadas da decídua e esponjosa). Mostra ainda, a conseqüente diminuição do peso da placenta, e a diminuição do peso fetal do grupo tratado, sugerindo um retardo no desenvolvimento da placenta e restrição de crescimento fetal intrauterino; outro dado adicional é a diminuição do comprimento do cordão umbilical deste grupo, pela possível diminuição dos movimentos fetais; o comprimento do cordão umbilical é um dos fatores relacionados ao crescimento fetal em geral. Ele cresce em resposta às forças tensoras que dependem do movimento fetal e do espaço intrauterino durante o desenvolvimento.⁽³³⁾

Barron⁽⁶⁵⁾ e Oliveira⁽⁶⁶⁾ também observaram além de cordão umbilical mais curto, movimentos fetais abolidos ao trabalharem com prenhez de ratas tratadas com álcool. Cordões umbilicais mais curtos também foram relatados em vários experimentos de prenhez de ratas tratadas com altas dose de vitamina A,⁽⁶⁷⁾ submetidas à restrição protéica,⁽⁶⁸⁾ intoxicadas com metilmercúrio⁽⁶⁹⁾ submetidas à hipertermia⁽⁷⁰⁾ e exposta a ação da ciclofosfamida.⁽⁷¹⁾

Assim, a diminuição do cordão umbilical como observado neste estudo, sugere uma diminuição da movimentação fetal durante a gestação.

Outros estudos na literatura envolvendo o ciclamato de sódio também obtiveram resultados semelhantes em relação ao menor peso placentário e fetal de ratas, e menor comprimento do cordão umbilical, como Arruda *et al.*,⁽³⁵⁾ que trabalhou com ciclamato e rim fetal e Martins *et al.*,⁽³⁶⁾ que estudou

ciclamato e fígado fetal. Além disso, estes trabalhos mostraram alterações na cariometria dos tecidos respectivos de cada estudo.

Da mesma maneira, Portela e Azoubel⁽³⁴⁾ encontraram achados similares em relação a pesos fetal e placentário, e comprimento do cordão umbilical, ao estudar a amicacina e rim fetal, além de nefrotoxicidade com a substância.

Num estudo com ciclamato, Schechter e Roth⁽¹⁷⁾ observaram que após 5 minutos da infusão de ciclohexilamina marcada com carbono 14 em ratas prenhas as mesmas mostravam grande radioatividade o que não ocorria com os organismos fetais; todavia, após 7 horas desta administração endovenosa de ciclohexilamina marcada com carbono 14 nas citadas ratas prenhas, o mais importante metabólito do ciclamato, não foi encontrado radioatividade em órgãos maternos. Ao contrário do organismo materno, o fetal apresentava intensa radioatividade. Assim, além da passagem pela barreira placentária, confirmando os trabalhos de Pitkin *et al.*,^(24,53) o estudo fornece dados valiosos em relação a presença de ciclamato nos órgãos fetais e sua ausência em órgãos maternos.

Estes resultados podem sustentar os achados da presente pesquisa, dado que neste estudo não houve alteração em quaisquer parâmetros cariométricos de forma estatisticamente significativa relacionados a camada da decídua (placenta materna), como mostram nossos resultados que avaliam os Diâmetros maior e menor, o Diâmetro médio e relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor, o Volume nuclear e a Área nuclear, o Perímetro nuclear e a Relação Volume/Área, e a Excentricidade, o Coeficiente de Forma

e o Índice de Contorno dos núcleos da decídua da placenta de ratas controles e tratadas com ciclamato de sódio.

No entanto, na análise da cariometria da camada esponjosa (placenta fetal) observou-se os seguintes parâmetros alterados com significância estatística: Diâmetro maior, Diâmetro médio, Volume e Área nucleares, Perímetro nuclear e Relação entre volume e área, sugerindo que o núcleo esteja encurtado e diminuído. O volume nuclear diminuído da camada esponjosa do grupo tratado pode estar refletindo uma ploidia menor e, conseqüentemente, uma alteração da diferenciação celular, prejudicando a invasão da decídua.

A Excentricidade alterada de forma estatisticamente significativa apresentada no grupo tratado, pode significar que os núcleos que apresentam-se com diminuição importante de seu tamanho, também mostram alteração de sua forma (são mais excêntricos).

Desta forma, os parâmetros cariométricos que permitem avaliar a forma nuclear mostraram que os núcleos das células da camada esponjosa da placenta dos animais tratados são mais excêntricos que os núcleos pertencentes às placentas do grupo controle. Essa excentricidade alterada sugere que o metabolismo da célula não está adequado.

Não houve alteração de forma estatisticamente significativa ao se avaliar o Diâmetro menor e Relação Diâmetro maior/Diâmetro menor, assim como na avaliação do Coeficiente de forma e Índice de contorno dos núcleos da camada esponjosa da placenta de ratas controles e tratadas com ciclamato de sódio, não foi obtida diferença com significância estatística.

Já análise da cariometria das vilosidades coriônicas (placenta fetal) observou-se os seguintes parâmetros alterados com significância estatística: Diâmetro médio, Volume e Área nucleares, Perímetro nuclear e Relação entre volume e área, sugerindo também diminuição importante do tamanho nuclear das vilosidades coriônicas.

Não houve alteração de forma estatisticamente significativa ao se avaliar o Diâmetro maior, Diâmetro menor e Relação Diâmetro maior/Diâmetro menor. Também não existe diferença na análise da Excentricidade, Coeficiente de Forma e Índice de Contorno dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas controles e tratadas com ciclamato de sódio.

É conhecido que variações do volume nuclear refletem o estado funcional das células. Isto deve-se provavelmente às modificações induzidas pela síntese de DNA, RNA e/ou proteínas relacionados ao processo de manutenção celular.⁽⁷²⁻⁷⁴⁾

Assim, as alterações nucleares detectadas neste estudo poderiam ser atribuídas à síntese inadequada de DNA, RNA e/ou proteínas responsáveis pela homeostase celular.

Todos estes achados estão em concordância e corroboram com a literatura científica citada. Nossos resultados expressam numericamente a intoxicação placentária com o ciclamato de sódio e a conseqüente repercussão fetal com o uso desta substância na gravidez.

Todavia, persiste a necessidade de novas pesquisas para esclarecer os mecanismos através dos quais este aditivo alimentar em estudo determina as alterações nucleares placentárias detectadas nesta investigação.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem que a administração de 60 mg/Kg de peso corporal de ciclamato de sódio do décimo ao décimo quarto dia de prenhez da rata causa:

- diminuição do peso fetal;
- diminuição do peso placentário;
- diminuição do comprimento do cordão umbilical;
- diminuição do diâmetro maior, diâmetro médio, perímetro, área, volume e relação entre volume e área dos núcleos da camada esponjosa da placenta;
- alteração da excentricidade dos núcleos da camada esponjosa da placenta;
- diminuição do diâmetro médio, perímetro, área, volume e relação entre volume e área das vilosidades coriônicas da placenta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Suenaga A, Wada T, Ichibagase H. Studies on synthetic sweetening 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; 57:1132-34.
3. Barlattani M. Rassegne sintetiche di terapia. Il problema dei ciclamati. *Cl Terap* 1970; 52:565-60.
4. Sain OL, Berman JM. Efectos adversos de edulcorantes em pediatria sacarina y ciclamato. *Arch Arg Pediatr* 1984; 82: 209-11.
5. Cattanach BM. The mutagenicity of cyclamates and their metabolites. *Mutation Res* 1976; 39: 1-28.
6. EHHP. Artificial sweeteners – What's out there?. *Nutrition Notes Newsletter* 2000; 1:3.

7. Audreith LF, Sveda M. Preparation and properties of some N-substituted sulphamic acids. *J Org Chem* 1944; 9:89-101.
8. Ahmed FE, Thomas DB. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetener cyclamate. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22:81-118.
9. Egeberg RO, Steinfeld JL, Frantz I, Griffith GC, Knowles Jr. H, Rosenow E, *et al.* Report to the secretary of HEW from the Medical Advisory Group on cyclamates. *JAMA* 1970; 211:1358-61.
10. Burbank F, Fraumeni Jr JF. Synthetic sweetener consumption and bladder cancer trends in the United States. *Nature* 1970; 227:296-7.
11. Kojima S, Ichibagase H. Studies on synthetic sweetening agents. VIII Cyclohexylamine, a metabolite of sodium cyclamate. *Chem Pharm Bull* 1966; 14: 971-4
12. Dick CE, Schniepp ML, Sonders RC, Wiengand RG. Cyclamate and cyclohexylamine: lack of effect on the chromosomes of man and rats in vivo. *Mutation Res* 1974; 26: 199-203.
13. Renwick AG, Williams RT. The fate of cyclamate in man and other species. *Biochem J* 1972; 129: 869-79.

14. Collings AJ. Metabolism of cyclamate and its conversion to the cyclohexylamine. *Diabetes Care* 1989; 12: 50-5.
15. Wills JH, Serrone DM, Coulston F. A 7-month study of ingestion of sodium cyclamate by human volunteers. *Regul Toxicol Pharmacol* 1981; 1: 163.
16. Renwick AG, Williams RT. The metabolites of cyclohexylamine in man and certain animals. *Biochem J* 1972; 129: 857-67.
17. Schechter PJ, Roth LJ. Whole – body autoradiography of ¹⁴C – sodium cyclamate in pregnant and fetal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971; 20: 130-133.
18. Price JM, Biava CG, Oser BL, Vogin EE, Steinfeld J, Ley HL. Bladder tumors in rat fed cyclohexylamine or high doses of a mixture of cyclamate and saccharin. *Science* 1970; 167: 1131-2.
19. Bryan GT, Ertürk E. Production of mouse urinary bladder carcinomas by sodium cyclamate. *Science* 1970; 167: 996-8.
20. National Cancer Institute. Artificial sweeteners, *Cancer Facts* 2003; 3.19.
21. Oser BL, Carson S, Cox GE, Vogin EE, Sternberg J, Ley HL. Chronic toxicity study of cyclamate: saccharin (10:1) in rats. *Toxicology* 1975; 4: 315-30.

22. Boop BA, Sonders RC, Kesterson JW. Toxicological aspects of cyclamate and cyclohexylamine. *Crit Rev Toxicol* 1986; 16: 213-306.
23. Assunção MCF, Anderson GB, Cavalcanti ZCH. Uso de adoçantes alternativos pelos diabéticos. *J Bras Med [JBM]* 1994; 67:62-9.
24. Pitkin RM, Reynolds WA, Fiter LJ. Placental transmission and fetal distribution of cyclamate in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 108:1043-50.
25. Pitkin RM, Reynolds WA, Filer LJ. Cyclamate and cyclohexylamine: transfer across the hemochorial placenta. *Proc Soc Biol Med* 1969; 132: 993-5.
26. Oga S. *Fundamentos de toxicologia*. 1º. ed. São Paulo: Atheneu; 1996.
27. Collings AJ. The metabolism of sodium cyclamate. In: Birch GG, editor. *Sweetness and sweeteners*. London: Applied Science Publishers 1971; p.51-68.
28. Richards RK, Taylor JD, O'Brien JL, Duescher HO. Studies on cyclamatesodium (sucaryl sodium), a new non-caloric sweetening agent. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 1951; 40:1.

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. 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.
31. Takayama S, Renwick AG, Johansson SL, Thorgeirsson UP, Tsutsumi M, Dalgard DW, *et al.* Lon-term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates. *Toxicol Sci* 2000; 53:33-9.
32. 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.
33. Brandini DA. Efeitos tóxicos dos metais comumente utilizados em reabilitação oral: estudo histométrico das alterações provocadas pelo chumbo no assoalho da cavidade bucal e cartilagem de Meckel de fetos de rato [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2000.
34. Portela GS, Azoubel R. Nefrotoxicidade fetal com o uso da amicacina. Estudo cariométrico. *J Bras Nefrol* 2004; 26 (1): 12-18.

35. Arruda JGF, Martins AT, Azoubel R. Ciclamato de sódio e rim fetal. Rev Bras Saúde Matern Infant 2003; 3 (2): 147-150.
36. Martins AT, Azoubel R, Lopes RA, Di Matteo MAS, Arruda JGF. Efectos del ciclamato de sódio en el hígado fetal de ratas: estudios cariométrico y estereológico. Int J Morphol 2005; 23 (3): 221-226.
37. Stein A, Serrone DM, Coulston F. Ultrastructural and biochemical studies of sodium cyclamate. Toxicol Appl Pharmacol 1967; 10:381
38. Taylor JD, Richards RK, Wiegand RG. Toxicological studies with sodium cyclamate and saccharin. Fd Cosmet Toxicol 1968; 6:313-27.
39. Pachione R. Indústria do diet engorda as vendas. Revista Química e Derivados 2003; 419:38-50.
40. Hunter PB. Risk factors in dental caries. Int Dent J 1998; 38:211-7.
41. Andrade JP, Volschan BCG. A praticidade do uso de adoçantes alternativos. Rev Bras Odontol 1998; 55:40-4.
42. Cardello HMAB, Silva MAAP, Damásio MH. Análise descritiva quantitativa de edulcorantes em diferentes concentrações. Cienc Tecnol Alim 2000; 20: 318-28.

43. Cardello HMAB. Avaliação tempo-densidade de doçura e amargor de aspartame e ciclamato / sacarina em equivalência à sacarose em altas concentrações. Bol Centro Pesqui Process Aliment 2001; 19:391-400.
44. Normas Internacionales para la investigación biomédica com animales (traducción de la redacción del Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana). Códigos internacionales de ética de la investigación 1982; 235-238.
45. Teixeira VPA, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Lino Jr. 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.
46. Sala MA, Lopes RA, Matheus M. Método morfométrico para análisis cuantitativo de los tejidos. Determinación de los parâmetros normales para el hepatocito de rata. Archivos de la Facultad de Medicina de Zaragoza 1992; 32(1): 29-31.
47. Reis MA, Terra SA, Oliveira FA, Teixeira VPA. Métodos de estudo dos processos patológicos gerais – ênfase à aplicação da estatística em estudos morfológicos. Disciplina de patologia geral da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – FMTM – 2002.

48. Meneguette C. Estudo experimental da transmissão transplacentária da infecção aguda e das alterações placentárias causadas por várias cepas do *T. cruzi* em camundongas (*Mus musculus*) [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina; 1997.
49. 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.
50. Marieb MJ. Essentials of anatomy and physiology. 6^a. ed. San Francisco, Califórnia: Cummings Science Publishing; 2000.
51. Alcântara P, Marcondes E. Pediatria Básica. 6^a. ed. São Paulo: Sarvier; 1978.
52. Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Enrofloxacina: uma fluorquinolona de uso exclusivo em veterinária. Parte I: química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistència bacteriana. *Analecta Veterinária* 2001; 21(1): 31-41.
53. Pitkin RM, Reynolds WA, Fiter LJ. Cyclamate and cyclohexylamine: transfer across the hemochorial placenta. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132: 993-5.

54. 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.
55. Schiebler TH, Knoop A. Histochemische und elektroenmikroskopische Untersuchungen na der Rattenplazenta. *Z.Zellforsch* 1959; 50: 494-552.
56. Davies J, Glasser SR. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat* 1968; 69: 542-608.
57. Roby KF, Soares MJ. Trophoblast cell differentiation and organization: role of fetal and ovarian signals. *Placenta* 1993; 14: 529-545.
58. Tanaka R. LD50 of saccharin or cyclamate for mice embryos on the 7th day of pregnancy (fetal median lethal dose: FLD50). *J Iwate Med Assoc* 1964; 16: 330.
59. Verrett MJ. Teratogenic effects of cyclamate and related compounds in the chicken embryo. Food and Drug Administration (Não Publicado); 1969.
60. Schardein JL. Chemically induced birth defects. 2^a ed. New York: MarcelDekker; 1985.
61. Fuentes M, Torregrosa A, Mora R, Götzens V, Corbella J, Domingo JL. Placental effects of lead in mice. *Placenta* 1996; 17: 371-376.

62. Ferm VH, Carpenter SJ. Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Experimental and Molecular Pathology* 1967; 7: 208-213.
63. Emmanouilides GC, Hobel CJ, Yashiro K, Klyman G. Fetal responses to maternal exercise in the sleep. *Am J Obstet Gynec* 1972; 112:130-137.
64. Bittencourt AL. Congenital Chagas' disease. *Am J Dis Child* 1976; 130:97-103.
65. Barron S, Riley EP, Smotherman WP. The effect of prenatal alcohol exposure on umbilical cord length in fetal rats. *Alcoholism: clinical and experimental research* 1986; 10: 493-495.
66. Oliveira C. Estudo morfológico, morfométrico e estereológico das alterações do epitélio de revestimento glandular de palato, língua e glândula submandibular de fetos de ratos submetidos ao alcoolismo [Tese]. Jaboticabal: UNESP; 1989.
67. Cunha SA, Contrera MGD, Lopes RA, Azoubel R, Contrera JD. Experimental hipervitaminosis A in the rat XXV. The effect of a high single dose of vitamin A on umbilical cord length. *Anais da 44 Reunião da SBPC* 1992; 712.

68. Leão LLS, Lopes RA, Novaes Jr. AB, Sala MA, Komesu MC, Maia Campos G. The effect of maternal protein deprivation during pregnancy in rat umbilical cord length. Resumos do 14 Encontro de Pesquisas Veterinárias de Jaboticabal 1992; 259.
69. Lopes RA, Sala MA, Maia Campos G, Petenusci SO, Komesu MC. The effect of methylmercury on umbilical cord length. An Farm Quím 1991-1992; 66: 31-32.
70. Oliveira PT, Lopes RA, Toneto ADR, Sala MA, Maia Campos G, Vatanabe I. The effect of hyperthermia on umbilical cord and placenta. An Farm Quím 1994; 91: 33-34.
71. Liedtke Jr. H, Azoubel R, Tubino PJG, Lopes RA. Estudo morfológico de fetos de ratas tratadas com ciclofosfamida durante a gestação. Rev Reg Ciências 1995; 4: 95-104.
72. De Robertis EMF. Bases da biologia celular e molecular. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
73. Trabulsi LR. Microbiologia. 2^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1989.
74. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. 3^a ed. New York: Garland Publishing; 1994.

7. APÊNDICES

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Aprovação do Comitê de Ética Animal.

