

Marcelo Alexandre de Matos

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

São José do Rio Preto
2008

Marcelo Alexandre de Matos

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

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

São José do Rio Preto
2008

de Matos, Marcelo Alexandre

Efeitos do Ciclamato de Sódio e do Aspartame na Placenta
de Ratas: Estudo Morfométrico / Marcelo Alexandre de Matos
São José do Rio Preto, 2008

82 p.;

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

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

1. Ciclamato; 2. Aspartame; 3. Placenta; 4. Cariometria

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	iii
Agradecimentos	iv
Epígrafe	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução	01
1.1. Objetivos	17
2. Material e Método	18
2.1. Material	19
2.1.1. O Animal.....	19
2.1.2. Período de Adaptação.....	19
2.1.3. Período de Acasalamento	20
2.1.4. Determinação do Primeiro dia de Prenhez da Rata.....	20
2.1.5. Tratamento	20
2.1.6. Técnica de Dissecção e Pesagem.....	21
2.2. Método	21
2.2.1. Técnica Histológica.....	21
2.2.2. Cariometria	22
2.3. Análise Estatística.....	23

3. Resultados	25
4. Discussão.....	45
4.1. O Animal de Experimentação.....	46
4.2. A Cariometria	47
4.3. A Estatística	48
4.3.1. O Tamanho da Amostra	50
4.4. A Placenta, o Ciclamato e o Aspartame.....	51
5. Conclusões	65
6. Referências Bibliográficas.....	67
7. Apêndices.....	81
7.1. Apêndice 1 – Aprovação do Comitê de Ética Animal	82

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima".

Louis Pasteur

- ✓ 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.

- ✓ Ao meu pai (*"in memoriam"*), sempre presente e responsável pela paz que necessito. Sábio, inspiram-me a sua retidão e benevolência; ponderaram-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

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

- ✓ Aos amigos e funcionários da Pós-graduação Rosimeire Cleide Souza Desidério, José Antonio Silistino, Fabiana Cristina Godoy e Guilherme Martins Dias pelo apoio e colaboração ao meu estudo, e a amizade estabelecida entre todos.

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

- ✓ Ao Prof. Sebastião Hetem, coordenador do Laboratório de Histotecnologia da FEB (Fundação Educacional de Barretos), pela colaboração na confecção das lâminas deste experimento.

- ✓ 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.
- ✓ À Professora Adília Maria Pires Sciarra pela recente, mas sincera amizade.
- ✓ Ao Prof. Altino Bessa Marques Filho pela amizade e apoio.
- ✓ Aos Professores Doutores João Armando Padovani Júnior e Gabriela Soares Portela pela cooperação neste trabalho.
- ✓ Aos amigos Sérgio Bastos da Silva e Emília Cristina Vicente pela amizade, apoio, tolerância e compreensão no decorrer desta jornada.
- ✓ Aos amigos João Fernando Ganzerli, Rosa Maria Amaral Ganzerli e Thiago Amaral Ganzerli pelo acolhimento amigo e a solicitude demonstrada e, em especial, a doçura de Sylvia Amaral Ganzerli que, com carinho, auxiliou na tabulação dos resultados do estudo e viabilizou, assim, a finalização desta Tese.
- ✓ Aos professores e também amigos Walter Rodrigues Marques e Mônica Reusch Marques pela contribuição em meu condicionamento físico e por compartilharem a vivência de cada fase deste estudo.

- ✓ A fisioterapeuta e amiga Elaine Aparecida Colombo Paskakulis pelo auxílio profissional na minha reeducação postural global, fundamental para o término desta Tese, e pela solidariedade e paciência de compartilhar no meu dia a dia das dificuldades e conquistas de cada etapa deste trabalho.

“A vida é curta, a arte longa e o momento certo um instante”.

Hipócrates, 460-333 a.C.

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Valores médios do peso corporal (g) de fetos de ratas controles (C) e tratadas com ciclamato de sódio (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.....26
- Tabela 2. Valores médios dos pesos das placentas (g) de fetos de ratas controles (C) e tratadas com ciclamato de sódio (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.....27
- Tabela 3. Valores médios dos comprimentos dos cordões umbilicais (cm) de fetos de ratas controles (C) e tratadas com ciclamato de sódio (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney... 28
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney 30
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 31
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 32
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 33

- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 34
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 35
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.... 36
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 37
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 38
- 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 (Tc) com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 39

- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney 40
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.... 41
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 42
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney..... 43
- 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.... 44

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
Ta	- Grupo tratado com aspartame
Tc	- Grupo tratado com ciclamato de sódio
USP	- Universidade de São Paulo
WHO	- World Health Organization

Objetivo: Avaliar os efeitos do ciclamato de sódio e do aspartame na placenta de ratas com sua administração no período da embriogênese.

Método: Foi administrado por sonda orogástrica nas ratas de um grupo tratado a dose de 14 mg/Kg de aspartame, e nas ratas do outro grupo tratado a dose de 60 mg/Kg de ciclamato de sódio por via intraperitoneal, 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, 5 fetos de cada grupo foram escolhidos ao acaso para estudo. A técnica de cariometria foi utilizada para avaliação dos parâmetros nucleares das células das camadas decídua, esponjosa e das vilosidades coriônicas da placenta. **Resultados:** O

peso dos fetos tratados e de suas placentas, e o comprimento do cordão umbilical, foram menores que os do grupo controle. Não houveram alterações na camada decídua do grupo tratado com ciclamato de sódio, enquanto tal camada mostrou-se alterada no tratamento com aspartame. Foram alterados parâmetros nucleares nas camadas esponjosa e vilosidades coriônicas do grupo tratado com ciclamato de sódio, e do grupo tratado com aspartame.

Conclusões: Este estudo demonstrou numericamente a intoxicação placentária com o ciclamato de sódio e com o aspartame, e a conseqüente repercussão fetal com o uso destas substâncias durante a gravidez.

Palavras-chave: 1. Ciclamato; 2. Aspartame; 3. Placenta; 4. Cariometria.

Abstract

Objective: To evaluate the effects on the placenta of the administration to rats during embryogenesis, of sodium cyclamate or aspartame. **Method:** Administration of respectively, 14 mg/kg of aspartame via an orogastric sound to a group of rats during their tenth to fourteenth day of pregnancy, of 60 mg/Kg of sodium cyclamate intraperitoneally to another group, and of equivalent volumes of saline by the same routes to controls. On the twentieth day of pregnancy five foetuses of each group were aleatorily selected for study. Karyometry was used to evaluate nuclear parameters of the decidua, spongy layers and chorionic villi of the placenta. **Results:** Weights of foetuses and placentas, as well as lengths of umbilical cords were lower in treated rats, compared to control. While no changes were observed in the decidual layer of the cyclamate-treated group, this layer was altered by aspartame treatment. Nuclear parameters in the spongy layer and chorionic villi were altered in both, cyclamate and aspartame-treated groups. **Conclusions:** The study numerically demonstrated placenta intoxication by sodium cyclamate or aspartame, and consequent repercussion on foetuses of the use of these substances during pregnancy.

Key-words: 1. Cyclamate; 2. Aspartame; 3. Placenta; 4. Karyometry.

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, por Michael Sveda, que acidentalmente descobriu seu gosto adocicado ⁽⁶⁾, trinta 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 1ª 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 próximo de 8943 toneladas de acordo com Burbanki & Fraumeni ⁽¹⁰⁾.

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 nos tecidos.^(13,14) A fração não absorvida é excretada, em sua maior parte, nas fezes, 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⁾ onde foi administrado em ratas prenhas, por via endovenosa, ciclamato marcado com C¹⁴, e estas foram sacrificadas em 5 minutos ou 7 horas após a citada administração. No primeiro grupo detectou-se, por auto-radiografias, pequena radioatividade fetal e intensa radioatividade nos tecidos maternos. Já após 7 horas, foi observada pequena radioatividade nos tecidos maternos e intensa radioatividade nos órgãos fetais. Esses resultados sugerem que o feto tenha um 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. Essa descoberta

levou a Food and Drugs Administration (FDA) a considerar o ciclamato 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 pela dieta 2500 mg/Kg de peso corporal de ciclamato, pelo período de 78 a 105 semanas.

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 ou da obesidade.⁽⁹⁾ 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, a Alemanha, a Finlândia, o Paquistão, a África da Sul e a Suíça,⁽⁸⁾ embora resultados experimentais apresentassem razões para sua não utilização.

Apesar da afirmação de Assunção *et al.*⁽²³⁾ de que o consumo desta substância em pelo menos 92% dos diabéticos brasileiros é menor que 50 mg/kg de peso corporal (dose padronizada como ingestão diária aceitável naquela ocasião), tem sido verificado que é crescente a substituição da sacarose por edulcorantes ou adoçantes artificiais. Isto em mulheres gestantes constitui 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 de 0,1% da dose do edulcorante em ciclohexilamina, enquanto que 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⁾

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

Segundo *Kroes et al.*,⁽³⁰⁾ num estudo sobre a toxicidade do ciclamato, ciclohexilamina e sacarina, a longo prazo, e seus efeitos na reprodução por seis gerações, que envolveu 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 quando consumido em elevadas quantidades por seres humanos causa diarreia devido ao seu efeito osmótico, segundo Egeberg *et al.*⁽⁹⁾ No entanto, não há evidências de agravo de patologias do sistema digestório.

Takayama *et al.*⁽³¹⁾ realizou um estudo com macacos administrando 100 mg e 500 mg/Kg de peso da referida substância por via oral, 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 estão 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 a esse edulcorante.

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, do cólon, do rim e da bexiga.

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

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

Outras investigações a respeito dos efeitos do edulcorante ciclamato de sódio para o rim ⁽³⁵⁾ e para 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 no 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*** mostra-se mais robusto a cada ano que passa. 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 de padrões sórdidos de beleza fazem as vendas de adoçantes dietéticos aumentarem mais de 10% ao ano ⁽³⁹⁾

(dados da **ABIAD – Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos**).

Esse mercado cresce assim como suas cifras, 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, apud Pachione). 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 têm ausência total de pelo menos um de seus componentes (açúcar, proteínas, gordura ou sal) ou produtos que têm 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 estão 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 aliado à avidez dos consumidores em conquistar 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,

elas produzem edulcorantes com dulçor cada vez mais acentuado e sabor o mais próximo possível do açúcar.⁽³⁹⁾

Na literatura científica alguns estudiosos têm ressaltado a importância da substituição da sacarose pelo edulcorante em estudo ou outros adoçantes. Isso se deve à necessidade de controle do peso corporal,⁽⁹⁾ de adequado controle da glicemia no diabetes mellitus⁽²³⁾ e da redução do número de casos de cárie dentária.^(40,41)

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. 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⁾

Quanto ao aspartame, o mesmo foi descoberto em 1965, de modo acidental, pelo químico James Schlatter que, com o intuito de sintetizar um tetrapeptídeo para tratar úlcera, descobriu um pó branco de intenso gosto doce:

o N-L-alfa-aspartil-L-fenilalanina-1-metil éster, ou seja, o aspartame **(edulcorante de 2ª geração)**.^(6,39,44,45)

O seu uso foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1974⁽⁴²⁾, com IDA (ingestão diária aceitável) de 20 mg/Kg de peso corporal.

Este valor foi aumentado para 50 mg/Kg de peso corporal em 1984, em função dos dados obtidos de estudos em humanos⁽⁴⁶⁾. Considerando os resultados de Molinary⁽⁴⁷⁾, que demonstrou que tal edulcorante em estudo não era carcinogênico, mutagênico ou teratogênico, ficou estabelecido que dada a ausência de efeitos colaterais na dose de 4000 mg/Kg de peso corporal, o IDA de ingestão deste substância seria de 40 mg/Kg de peso corporal.

Entretanto, várias objeções foram apresentadas na época em relação à sua toxicidade.⁽⁴⁸⁾ Em conseqüência, diversos estudos foram realizados, com a conclusão de que a dose diária máxima segura de ingestão seria de 34 mg/Kg de peso.⁽⁴⁹⁾ Assim permanece até hoje.

Sasaki *et al.*⁽³²⁾ não encontraram alterações no DNA de estômago, cólon, fígado, rim, bexiga, pulmão, cérebro ou medula óssea de ratos que ingeriram determinados edulcorantes, entre eles o aspartame.

Embora considerado seguro, consumidores relataram o surgimento de efeitos adversos devido ao uso do aspartame como dores de cabeça e náuseas⁽⁵⁰⁾, fato confirmado por outros estudos.^(51,52)

Apesar do laboratório responsável pela produção do aspartame afirmar não haver questionamentos quanto à segurança do edulcorante após 20 anos de uso diário do mesmo⁽⁴⁸⁾, alguns autores recomendam cautela neste uso e

garantem que o aspartame pode ser prejudicial ao ser humano dependendo da dose ingerida. ⁽⁵³⁾

De acordo com Roberts ⁽⁵⁴⁾, um quinto de 830 pessoas que consumiram o aspartame, em seus estudos, apresentaram reações alérgicas que incluíram: edema de lábios, língua e garganta; urticária; piora de alergias respiratórias e edema de glândulas salivares. Segundo o autor, estas reações podem ter sido causadas pela molécula de aspartame, seus três componentes, ou por aproximadamente 10 substâncias resultantes da quebra desta molécula, que ocorre devido ao aquecimento e/ou armazenamento prolongado deste edulcorante.

De acordo com o NCI (National Cancer Institute), o aspartame foi aprovado em 1981 pelo FDA após testes mostrarem que ele não causa câncer ou outros efeitos adversos em animais de laboratório, embora nem todos os experimentos laboratoriais tenham apresentado dados concordantes.

O interesse pelo aspartame foi renovado em 1996 devido ao relato sugestivo de que o aumento no número de pessoas com tumor de cérebro entre 1975 e 1992 poderia estar associado à introdução e uso deste adoçante nos Estados Unidos da América. Entretanto, a análise estatística do NCI mostrou que a incidência total de câncer de cérebro e do sistema nervoso central iniciou-se por volta de 1973, oito anos antes da aprovação do aspartame, e continuou a elevar-se até 1985. Além disso, o aumento na incidência total de câncer de cérebro ocorreu principalmente em pessoas de 70 anos ou mais, um grupo que não foi exposto a altas doses de aspartame desde

a sua introdução. Estes dados não permitem estabelecer uma ligação clara entre o consumo de aspartame e o desenvolvimento de tumores cerebrais.⁽⁵⁵⁾

Recentemente, um experimento laboratorial encontrou mais linfomas e leucemias em ratos alimentados com altas doses de aspartame (equivalente a beber 8 latas de soda diet por dia).⁽⁵⁶⁾ Entretanto, segundo o NCI, que examinou dados humanos do NIH-AARP Diet and Health Study, tais achados não eram consistentes. Concluiu-se que o aumento do consumo de bebidas com aspartame não estava associado ao desenvolvimento de linfoma, leucemia ou câncer cerebral.⁽⁵⁷⁾

O aspartame foi o primeiro edulcorante que mais se aproximou do sabor do açúcar. Sua entrada no mercado em 1981^(6,20,44) acabou com a hegemonia da mistura ciclamato/sacarina.⁽³⁹⁾

Em 2002, o aspartame movimentou R\$ 64,5 milhões (23% do mercado de adoçantes de mesa no Brasil)⁽³⁹⁾. Também tem importante uso em iogurtes, goma de mascar, gelatinas, pudins e no setor de bebidas, principalmente refrigerantes.^(6,39)

Composto sintético de dois aminoácidos, o aspartame é tecnicamente considerado calórico. No entanto, graças à doçura 200 vezes superior ao açúcar⁽⁴⁴⁾, seu valor energético se torna desprezível^(6,39), pois é utilizado em pequena quantidade. Com a composição de fenilalanina (50%), ácido aspártico (40%) e metanol (10%), o aspartame é metabolizado no trato gastrointestinal em seus três componentes⁽⁴⁸⁾ e apresenta restrição de uso aos portadores de fenilcetonúria.^(6,39,44) A fenilcetonúria é um distúrbio hereditário detectado nos recém-nascidos, com o teste de Guthrie ou teste do pezinho. Os portadores

desta doença não possuem quantidades suficientes da enzima necessária para metabolizar o aminoácido fenilalanina. Por isso, a fenilalanina pode acumular-se no sangue e no líquido cerebral causando problemas à saúde, inclusive retardamento mental.⁽³⁹⁾ As pessoas com fenilcetonúria devem evitar a ingestão destes aminoácidos em todas as fontes alimentares.

Outra informação importante é que, sendo substância potencialmente tóxica, este edulcorante quando em contato com líquidos quentes, é decomposto em metanol e seus metabólitos. O formaldeído pode originar-se de baixas doses de metanol ou diretamente do aspartame. Ao administrar 3 g/Kg de ¹⁴C-metanol e ¹⁴C-formaldeído de forma endovenosa em macacos, Tephly⁽⁵⁸⁾ mostrou em seus experimentos que o formaldeído desapareceu do sangue dos mesmos em 1,5 minuto. Estes resultados corroboram dados de outros experimentos laboratoriais nos quais o formaldeído desapareceu do sangue de cães, gatos, coelhos e porcos após 1 à 2 minutos.⁽⁵⁹⁾ Como esperado, em consequência ao desaparecimento do formaldeído sangüíneo, altos níveis de ácido fórmico (ou formato) foram encontrados em todos os macacos em que houve a administração de metanol ou formaldeído. Este formato (um sal ou éster do ácido fórmico) é o metabólito responsável pela acidose metabólica e pela toxicidade ocular do metanol. Da mesma forma, o acúmulo de ácido fórmico é o responsável pela toxicidade do formaldeído. A intoxicação humana de formaldeído leva à rápida e intensa formação de ácido fórmico, que diminui o pH sangüíneo para 6,9 trinta minutos após a ingestão desta dose tóxica. Uma ingestão oral similar em ratos leva ao rápido acúmulo de formato e consequente acidose metabólica.⁽⁵⁸⁾

Trocho *et al.* ⁽⁶⁰⁾, estudando ratos adultos machos que foram submetidos a uma dose oral de 10 mg/Kg de aspartame marcado com ¹⁴C no carbono do metanol, mediram, a cada 6 horas, a radioatividade do plasma e dos principais órgãos dos ratos. A radioatividade específica do DNA, do RNA e das proteínas tissulares foi absolutamente uniforme. A radioatividade desta proteína apresentou-se concentrada em determinados aminoácidos de forma coincidente com os resultados encontrados na proteína exposta ao formaldeído marcado. Concluiu-se que o consumo de aspartame pode causar danos devido a sua contribuição para a formação de formaldeído plasmático.

O aspartame sofre hidrólise intestinal com a absorção de aminoácidos inócuos e pequenas quantidades de metanol livre (abaixo de seu limite mínimo de toxicidade). Acredita-se que a intoxicação aguda pelo aspartame seja baixa, dado que contribuiu para a promoção da larga distribuição do produto como um potente adoçante hipocalórico e um substituto seguro do açúcar.⁽⁶⁰⁾

Como já esclarecido, o metanol é oxidado principalmente em formaldeído e ácido fórmico em muitos tecidos. O ácido fórmico é considerado o principal metabólito responsável pelos efeitos deletérios da intoxicação aguda pelo metanol em humanos e em animais experimentais - apesar da reconhecida resistência desses animais ao formato. As enzimas envolvidas no metabolismo do metanol são a álcool desidrogenase e a aldeído desidrogenase. A intoxicação aguda pelo metanol pode causar cegueira e perda da função hepática, pois a retina, a córnea e o fígado contém a maior atividade da álcool desidrogenase. Assim, são nestes tecidos que se pode encontrar o maior acúmulo dos seus bioprodutos (formaldeído e formato) em uma eventual intoxicação. Desta

maneira, pode-se supor que a falência funcional do fígado devido a uma cirrose, pode resultar na perda de seu papel de barreira ao metanol intestinal e, conseqüentemente, acentuar os efeitos de uma intoxicação pelo metanol sobre outros tecidos.⁽⁶⁰⁾

O formaldeído, por sua vez, é uma pequena molécula altamente reativa com ligações fortes à proteínas e ácidos nucleicos. Ele forma produtos difíceis de serem eliminados através dos padrões metabólicos normais. Assim, o acúmulo de formaldeído provoca alterações funcionais severas, inclusive o desenvolvimento de câncer.⁽⁶⁰⁾ Segundo Trocho *et al.*, as pequenas quantidades de formaldeído que podem ser potencialmente produzidas como resultado de dietas com adição de aspartame têm sido freqüentemente omitidas em seu potencial tóxico.

Segundo Smith *et al.*⁽⁶¹⁾, estudos têm demonstrado que o glutamato age como um neurotransmissor no cérebro, e que a função anormal dos receptores do glutamato tem sido associada a desordens neurológicas, tais como: coréia de Huntington e doença de Alzheimer. Além disso, injeções de glutamato em animais de laboratório resultaram em danos às células nervosas do cérebro.

A importância desta informação está no fato de o aspartato (um constituinte do aspartame) ser um equivalente do glutamato na destruição de neurônios hipotalâmicos, além de apresentar efeitos neurotóxicos adicionais quando ambos estão combinados. O aspartato é derivado da hidrólise do aspartame. É mais potente que o glutamato, sendo usado, então, em pequenas doses. Entretanto, mesmo em pequenas quantidades, o aspartato tem efeitos aditivos similares a qualquer glutamato.⁽⁶¹⁾

Investigações científicas realizadas por quase duas décadas têm isentado o aspartame de qualquer suspeita de ser cancerígeno ou de desencadear processos cerebrais degenerativos.^(6,20,39,44)

Segundo Arruda *et al.*⁽³⁵⁾, 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.

Importante é destacar, também, que a maior parte das publicações de pesquisas sobre os efeitos do ciclamato de sódio ocorreu nas décadas de 1960 e 1970. A redução do número de publicações que ocorreu depois desse período deve-se, em grande parte, à proibição do uso desta substância pelo FDA nos Estados Unidos da América.⁽⁹⁾

A despeito da importância do órgão placentário, há uma escassez de estudos que envolvam a placenta e os edulcorantes em geral, e o ciclamato de sódio e o aspartame em particular.

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

1.1. Objetivos

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfométricas (cariométricas) placentárias detectadas em ratas submetidas a administração intraperitoneal de ciclamato de sódio e a administração oral de aspartame, separadamente, durante o período gestacional em ambas as situações. Além disso, as conseqüentes repercussões no desenvolvimento do feto e do cordão umbilical, da seguinte maneira:

- avaliação do crescimento fetal intrauterino através dos pesos do feto e da placenta, e a mensuração 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 15 ratas no 20º dia de gestação foram avaliadas, divididas em três grupos. 5 (cinco) placentas do grupo tratado com ciclamato de sódio, 5 (cinco) do grupo tratado com aspartame e 5 (cinco) do grupo controle, foram escolhidas ao acaso;

Para obtenção das placentas foram utilizadas 15 (quinze) ratas albinas, variedade Wistar, constituindo três grupos de 5 (cinco) animais cada: dois grupos tratados e um grupo 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 a 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 um dos três grupos, dois tratados e um 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, foi definido o diagnóstico do 1º dia da gravidez pela detecção de espermatozoides 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 com ciclamato de sódio receberam dose única e diária de 60 mg/Kg de peso corpóreo da substância, intraperitonealmente, do 10º ao 14º dia de gestação. As 5 (cinco) ratas do grupo tratado com aspartame receberam, no mesmo período, dose única e diária de 14 mg/Kg de peso corpóreo da substância, por sonda orogástrica. As

5 (cinco) ratas do grupo controle receberam, no mesmo período e 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 no 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 e 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 dos dois grupos tratados 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 que foram corados 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) e 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 para cada uma das placentas, nos grupos tratados e grupo controle, num total de 2250 imagens) foram então contornadas com lápis preto número 2 (dois), com o cuidado de se anotar 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 tratados e grupo 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 ao processamento dos

dados experimentais. Estes programas foram 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 **tratados** com **ciclamato de sódio** e com **aspartame**, assim como sua análise estatística, podem ser vistos na tabela 1. Verifica-se que a média do peso corporal, em gramas, dos animais tratados com ciclamato (2,31 g) e dos tratados com aspartame (1,79 g) apresenta-se diminuída em relação aos controles (2,94 g). Há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 1. Valores médios do peso corporal (em gramas) dos fetos de ratas controles (C) e tratadas com ciclamato de sódio (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

C	Tc	Ta
2,98	2,25	1,63
3,10	2,41	2,15
3,02	2,30	1,32
2,86	2,43	1,55
2,72	2,20	2,28
又	又	又
2,94	2,31	1,79
U calc: 0*	U calc: 0*	
p [U]: 0,004	p [U]: 0,004	

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

O peso da placenta dos **grupos controle e tratados com ciclamato de sódio** e com **aspartame**, 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 com ciclamato (0,29 g) e dos tratados com aspartame (0,25 g), apresenta-se diminuída em relação aos controles (0,44 g), também mostrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 2. Valores médios do peso das placentas (em gramas) dos fetos de ratas controles (C) e tratadas com ciclamato de sódio (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

C	Tc	Ta
0,41	0,26	0,18
0,46	0,31	0,35
0,45	0,29	0,27
0,41	0,28	0,11
0,48	0,32	0,32
又	又	又
0,44	0,29	0,25
U calc: 0*	U calc: 0*	
p [U]: 0,004	p [U]: 0,004	

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

O comprimento do cordão umbilical dos **grupos controle** e **tratados** com **ciclamato de sódio** e com **aspartame**, 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 com ciclamato (1,93 cm) e dos tratados com aspartame (1,62 cm) apresenta-se diminuída em relação aos controles (2,12 cm) e, da mesma forma, apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3. Valores médios dos comprimentos dos cordões umbilicais (cm) de fetos de ratas controles (C) e tratadas com ciclamato de sódio (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

C	Tc	Ta
2,23	1,91	1,60
2,02	2,03	1,90
2,01	1,94	1,50
2,24	2,07	1,40
2,11	1,75	1,70
又	又	又
2,12	1,93	1,62
U calc: 4**		U calc: 0*
p [U]: 0,048		p [U]: 0,004

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

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

Na análise da cariometria placentária de ratas dos **grupos controle**, **tratado com ciclamato de sódio** e com **aspartame**, observa-se o constatado nas tabelas 4 a 18.

Foi 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 com **ciclamato de sódio**, assim como a média do diâmetro menor (13,75) dos animais controles e a média do diâmetro menor (13,37) dos animais tratados com esta substância não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

De modo diferente, a mesma tabela mostra que as médias do diâmetro maior (12,34), e do diâmetro menor (8,42) dos animais tratados com **aspartame** apresentam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores dos animais controles.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior			Diâmetro Menor		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
20,27	22,06	11,29	14,26	15,58	8,03
21,06	20,13	13,37	14,71	13,02	9,03
16,58	18,10	13,82	11,18	12,82	8,87
21,27	17,61	11,97	15,53	12,19	8,44
17,98	19,27	11,24	13,06	13,26	7,74
又	又	又	又	又	又
19,43	19,43	12,34	13,75	13,37	8,42
U calc: 12***		U calc: 0*	U calc: 10***		U calc: 0*
p[U]: 0,500		p[U]: 0,004	p[U]: 0,345		p[U]: 0,004

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

***estatisticamente não significativa.

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

Verifica-se, na tabela 5, que a média do diâmetro médio (16,25) dos animais controles e a média do diâmetro médio (16,03) dos animais tratados com **ciclamato de sódio**, 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 com esta substância, não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Da mesma forma, a média da relação D/d (1,49) dos animais tratados

com aspartame também não mostra diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. No entanto, evidencia-se diferença estatisticamente significativa entre a média do diâmetro médio (16,25) dos animais controles e a média do diâmetro médio (10,14) dos animais tratados com o **aspartame**.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Médio			Relação D/d		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
18,11	14,56	10,02	1,40	1,51	1,44
16,87	18,47	9,48	1,50	1,46	1,43
17,53	16,08	10,92	1,46	1,60	1,52
13,50	15,14	10,98	1,57	1,47	1,62
15,27	15,89	9,29	1,40	1,52	1,46
又	又	又	又	又	又
16,25	16,03	10,14	1,47	1,51	1,49
U calc: 11***		U calc: 0*	U calc: 7***		U calc: 9***
p[U]: 0,421		p[U]: 0,004	p[U]: 0,155		p[U]: 0,274

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

***estatisticamente não significativa.

Na avaliação da decídua placentária em relação ao volume (μm^3) e à área (μm^2) nucleares, observa-se o mostrado na tabela 6. Verifica-se, nesta tabela, que a média do volume nuclear (2689,40) dos animais controles e a média do volume nuclear (2423,86) dos animais tratados com **ciclamato de sódio**, assim como a média da área nuclear (220,40) dos animais controles e a

média da área nuclear (209,85) dos animais tratados com esta substância não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. De outra forma, a média do volume nuclear (585,98) e a média da área nuclear (82,67) dos animais tratados com **aspartame** apresentam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores dos animais controles.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Volume Nuclear			Área Nuclear		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
3906,45	1730,15	560,86	278,78	170,44	80,46
2820,10	3629,53	467,80	232,27	276,55	71,76
3003,85	2304,01	725,82	246,33	207,04	95,61
1526,34	2024,16	731,66	151,10	186,59	96,45
2190,25	2431,47	443,76	193,51	208,61	69,05
又	又	又	又	又	又
2689,40	2423,86	585,98	220,40	209,85	82,67
U calc: 10***	U calc: 0*		U calc: 10***	U calc: 0*	
p[U]: 0,345	p[U]: 0,004		p[U]: 0,345	p[U]: 0,004	

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

***estatisticamente não significativa.

Também ao ser avaliada a decídua placentária em relação ao perímetro (μm) nuclear e ao parâmetro relação volume/área observa-se o ilustrado na tabela 7. Verifica-se, nesta tabela, que a média do perímetro nuclear (52,65) dos animais controles e a média do perímetro nuclear (52,13) dos animais

tratados com **ciclamato de sódio**, 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 com esta substância não mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. De outra forma, a média do perímetro nuclear (32,99) e a média da relação V/A (6,76) dos animais tratados com **aspartame** apresentam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores dos animais controles.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney. (*)

Perímetro Nuclear			Relação V/A		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
58,27	47,36	32,34	12,08	9,71	6,68
54,87	59,69	30,63	11,25	12,31	6,32
56,75	52,83	35,63	11,69	10,72	7,28
44,19	49,07	36,22	9,00	10,10	7,32
49,17	51,69	30,14	10,18	10,59	6,19
又	又	又	又	又	又
52,65	52,13	32,99	10,84	10,69	6,76
U calc: 11***		U calc: 0*	U calc: 11***		U calc: 0*
p[U]: 0,421		p[U]: 0,004	p[U]: 0,421		p[U]: 0,004

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

***estatisticamente não significativa.

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

Foi verificado, nesta tabela, que as médias 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 significativa quando comparadas aos valores do grupo tratado com **ciclamato de sódio** (0,69, 0,93 e 3,68, respectivamente). Da mesma forma, também as médias da excentricidade (0,68), do coeficiente de forma (0,94) e do índice de contorno (3,67) nucleares dos animais do grupo tratado com **aspartame** não mostram diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos valores apresentados pelo grupo controle.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Excentricidade			Coeficiente de Forma			Índice de Contorno		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
0,66	0,68	0,69	0,95	0,93	0,95	3,63	3,68	3,64
0,65	0,68	0,65	0,93	0,94	0,95	3,68	3,65	3,65
0,68	0,73	0,70	0,94	0,92	0,93	3,65	3,71	3,68
0,68	0,66	0,70	0,92	0,94	0,91	3,70	3,66	3,72
0,65	0,68	0,67	0,95	0,93	0,94	3,64	3,68	3,66
又	又	又	又	又	又	又	又	又
0,66	0,69	0,68	0,94	0,93	0,94	3,66	3,68	3,67
U calc: 6*** U calc: 6***			U calc: 10*** U calc:10***			U calc: 7*** U calc:10***		
p[U]: 0,111 p[U]: 0,111			p[U]: 0,345 p[U]: 0,345			p[U]: 0,155 p[U]: 0,345		

***estatisticamente não significante.

Os parâmetros cariométricos da camada esponjosa placentária dos grupos controle, tratado com **ciclamato de sódio** e tratado com **aspartame**, assim

como 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 com **ciclamato de sódio** é menor de maneira estatisticamente significativa que a média do diâmetro maior (17,09) dos animais controles. No entanto, a média do diâmetro menor (11,00) do grupo tratado com esta substância e a média do diâmetro menor (11,83) do grupo controle não tem diferença estatística entre si. Já a média do diâmetro maior (23,44) e a média do diâmetro menor (15,91) dos animais tratados com **aspartame** são maiores que a média dos animais controles e de maneira estatisticamente significativa.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior			Diâmetro Menor		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
16,71	13,90	21,18	11,34	10,21	14,98
17,40	16,45	20,97	12,23	11,34	14,92
18,11	15,08	23,98	12,82	10,90	16,60
16,02	15,90	28,63	10,31	11,31	17,58
17,19	16,40	22,44	12,47	11,26	15,48
又	又	又	又	又	又
17,09	15,54	23,44	11,83	11,00	15,91
U calc: 2**		U calc: 0*	U calc: 5***		U calc: 0*
p[U]: 0,016		p[U]: 0,004	p[U]: 0,075		p[U]: 0,004

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

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

***estatisticamente não significante.

Na avaliação do diâmetro médio (μm) e da relação diâmetro maior/diâmetro menor destes núcleos, de acordo com a tabela 10, verifica-se que a média do diâmetro médio dos animais tratados com **ciclamato de sódio** (13,01) é menor e a dos tratados com **aspartame** (19,21) é maior (ambas de maneira estatisticamente significativa) que a média do diâmetro médio (14,15) dos animais controles. No entanto, a média da relação D/d dos animais tratados com ciclamato de sódio (1,44) e dos tratados com aspartame (1,53) não mostra diferença estatística quando comparada à média dos animais controles (1,48).

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Médio			Relação D/d		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
13,71	11,86	17,69	1,50	1,39	1,53
14,50	13,58	17,63	1,47	1,51	1,43
15,18	12,78	19,86	1,45	1,41	1,50
12,77	13,35	22,30	1,60	1,43	1,69
14,60	13,50	18,55	1,40	1,48	1,49
又	又	又	又	又	又
14,15	13,01	19,21	1,48	1,44	1,53
U calc: 4**		U calc: 0*	U calc: 9***		U calc: 8***
p[U]: 0,048		p[U]: 0,004	p[U]: 0,274		p[U]: 0,210

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

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

***estatisticamente não significativa.

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

Nota-se, na tabela 11, que a média do volume nuclear (1398,07) e a média da área nuclear (141,73) dos animais tratados com **ciclamato de sódio** são, de forma estatisticamente significativa, menores que a média do volume nuclear (1921,11) e a média da área nuclear (171,45) dos animais controles, assim como a média do volume nuclear (4436,53) e a média da área nuclear (307,94) dos animais tratados com **aspartame** são, de maneira estatisticamente significativa, maiores que as médias 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Volume Nuclear			Área Nuclear		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
1644,48	991,17	3515,39	157,74	115,16	263,34
2206,84	1550,38	3214,37	184,11	152,90	253,97
2278,29	1403,60	4911,69	194,40	139,09	329,50
1413,55	1498,79	6618,34	139,65	149,23	408,24
2062,40	1546,43	3922,84	181,36	152,30	284,67
又	又	又	又	又	又
1921,11	1398,07	4436,53	171,45	141,73	307,94
U calc: 3**		U calc: 0*	U calc: 3**		U calc: 0*
p[U]: 0,028		p[U]: 0,004	p[U]: 0,028		p[U]: 0,004

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

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

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

De acordo com a tabela 12, a média do perímetro nuclear (42,11) e a média da relação V/A (8,67) dos animais tratados com **ciclamato de sódio** são menores, de maneira estatisticamente significativa, que a média do perímetro nuclear (45,91) e a média da relação V/A (9,43) dos animais controles. Da mesma maneira, a média do perímetro nuclear (62,55) e a média da relação V/A (12,80) dos animais tratados com **aspartame** são maiores de maneira estatisticamente significativa que as médias 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney. (*)

Perímetro Nuclear			Relação V/A		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
44,55	38,18	57,42	9,14	7,91	11,79
47,03	44,15	56,86	9,67	9,05	11,75
49,04	41,15	64,42	10,12	8,52	13,24
41,96	43,14	73,86	8,51	8,90	14,86
46,96	43,96	60,21	9,73	9,00	12,37
又	又	又	又	又	又
45,91	42,11	62,55	9,43	8,67	12,80
U calc: 3**		U calc: 0*	U calc: 4**		U calc: 0*
p[U]: 0,028		p[U]: 0,004	p[U]: 0,048		p[U]: 0,004

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

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

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 com **ciclamato de sódio** é menor de maneira estatisticamente significativa que a média da excentricidade (0,69) do grupo controle. Por outro lado, a média do coeficiente de forma e do índice de contorno nucleares do grupo tratado com esta substância (0,94 e 3,65), assim como a excentricidade, o coeficiente de forma e o índice de contorno nucleares do grupo tratado com **aspartame** (0,70, 0,93 e 3,69 respectivamente) não mostram diferença em relação ao grupo controle (0,69, 0,94 e 3,67).

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Excentricidade			Coeficiente de Forma			Índice de Contorno		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
0,71	0,62	0,67	0,94	0,95	0,93	3,67	3,63	3,70
0,66	0,69	0,67	0,94	0,93	0,95	3,67	3,68	3,64
0,68	0,66	0,70	0,94	0,95	0,94	3,65	3,64	3,67
0,73	0,65	0,76	0,92	0,95	0,90	3,71	3,64	3,75
0,66	0,65	0,68	0,96	0,94	0,94	3,63	3,67	3,67
又	又	又	又	又	又	又	又	又
0,69	0,65	0,70	0,94	0,94	0,93	3,67	3,65	3,69
U calc: 4** U calc: 10***			U calc: 10*** U calc: 10***			U calc: 8*** U calc: 10***		
p[U]: 0,048 p[U]: 0,345			p[U]: 0,345 p[U]: 0,345			p[U]: 0,210 p[U]: 0,345		

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

***estatisticamente não significativa.

Os parâmetros cariométricos das vilosidades coriônicas placentárias dos

grupos controle, tratado com **ciclamato de sódio** e tratado com **aspartame**, assim como sua análise estatística, podem ser vistos nas tabelas 14 a 18. Em relação aos diâmetros maior e menor (μm) destes núcleos, conforme a tabela 14, observa-se que as médias do diâmetro maior (11,46) dos animais tratados com **ciclamato de sódio** e do diâmetro maior (12,21) dos animais controles, assim como as médias do diâmetro menor (7,82) dos animais tratados com esta substância e do diâmetro menor (8,31) dos animais controles não mostram diferença estatisticamente significativa. De outra forma, as médias do diâmetro maior (15,49) e do diâmetro menor (9,82) dos animais tratados com **aspartame** são maiores que as dos controles de maneira estatisticamente significativa.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Maior			Diâmetro Menor		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
11,52	12,10	16,00	8,13	8,45	9,95
12,95	11,23	15,94	9,37	7,85	10,40
11,44	10,97	15,05	7,76	7,50	9,73
12,05	11,31	17,60	8,11	7,48	10,40
13,11	11,69	12,84	8,16	7,82	8,60
又	又	又	又	又	又
12,21	11,46	15,49	8,31	7,82	9,82
U calc: 5***		U calc: 2**	U calc: 6***		U calc: 1*
p[U]: 0,075		p[U]: 0,016	p[U]: 0,111		p[U]: 0,008

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

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

***estatisticamente não significativa.

Na avaliação dos 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 com **ciclamato de sódio** é menor de modo estatisticamente significativa que a média do diâmetro médio (10,02) dos animais controles; no entanto, as médias da relação D/d (1,51) dos animais tratados com esta substância e da relação D/d (1,51) dos animais controles não mostram diferença estatística entre si. Ao contrário, a média do diâmetro médio (12,25) e a média da relação D/d (1,62) dos animais tratados com **aspartame**, apresentam-se estatística e significativamente maiores que as dos controles.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro Médio			Relação D/d		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
9,63	10,07	12,53	1,45	1,47	1,68
10,97	9,33	12,80	1,42	1,49	1,57
9,38	9,02	12,05	1,50	1,50	1,57
9,84	9,14	13,41	1,52	1,57	1,73
10,28	9,51	10,44	1,64	1,54	1,55
又	又	又	又	又	又
10,02	9,41	12,25	1,51	1,51	1,62
U calc: 4**		U calc: 1*	U calc: 10***		U calc: 3**
p[U]: 0,048		p[U]: 0,008	p[U]: 0,345		p[U]: 0,028

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

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

***estatisticamente não significante.

Em relação ao volume (μm^3) e à área (μm^2) nucleares das vilosidades coriônicas, observa-se o mostrado na tabela 16. Nota-se, na tabela 16, que a média do volume nuclear (466,51) dos animais tratados com **ciclamato de sódio** é menor de maneira estatisticamente significativa que a média do volume nuclear (563,00) dos animais controles, assim como a média da área nuclear (71,16) dos animais tratados com esta substância também é menor de maneira estatisticamente significativa que a média da área nuclear (80,64) dos animais controles. Já as médias do volume nuclear (1119,35) e da área nuclear (123,92) dos animais tratados com **aspartame** são maiores que as médias dos animais controles de maneira estatisticamente significativa.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Volume Nuclear			Área Nuclear		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
500,52	573,35	1163,43	74,55	81,57	128,39
737,13	449,04	1328,24	96,64	69,62	137,22
451,43	408,88	995,43	70,11	65,27	117,33
522,37	430,88	1459,47	77,23	67,26	148,49
603,56	470,44	650,18	84,65	72,10	88,15
又	又	又	又	又	又
563,00	466,51	1119,35	80,64	71,16	123,92
U calc: 4**		U calc: 1*	U calc: 4**		U calc: 1*
p[U]: 0,048		p[U]: 0,008	p[U]: 0,048		p[U]: 0,008

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

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

Na avaliação do perímetro (μm) nuclear e da 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 com **ciclamato de sódio** é menor de maneira estatisticamente significativa que a média do perímetro nuclear (32,60) dos animais controles, assim como a média da relação V/A (6,27) dos animais tratados com esta substância também é menor de maneira estatisticamente significativa que a média da relação V/A (6,68) dos animais controles. Do mesmo modo, a média da perímetro nuclear (40,38) e a média da relação V/A (8,16) dos animais tratados com **aspartame** são maiores e de maneira estatisticamente significativa que as médias 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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney. (*)

Perímetro Nuclear			Relação V/A		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
31,16	32,59	41,47	6,42	6,72	8,35
35,36	30,30	41,96	7,31	6,22	8,53
30,49	29,34	39,44	6,25	6,02	8,04
32,04	29,92	44,91	6,56	6,09	8,94
33,97	31,04	34,10	6,85	6,34	6,96
又	又	又	又	又	又
32,60	30,63	40,38	6,68	6,27	8,16
U calc: 4**		U calc: 1*	U calc: 4**		U calc: 1*
p[U]: 0,048		p[U]: 0,008	p[U]: 0,048		p[U]: 0,008

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

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

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 as médias da excentricidade (0,69), do coeficiente de forma (0,93) e do índice de contorno (3,67) nucleares dos animais tratados com **ciclamato de sódio** não mostram diferenças estatisticamente significante quando comparadas aos valores do grupo controle (0,69, 0,93 e 3,67, respectivamente). No entanto, as médias da excentricidade (0,73), do coeficiente de forma (0,91) e do índice de contorno (3,72) nucleares dos animais tratados com **aspartame** apresentam diferença estatisticamente significante comparadas às médias dos animais controles.

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 (Tc) e com aspartame (Ta). Teste de Mann-Whitney.

Excentricidade			Coeficiente de Forma			Índice de Contorno		
C	Tc	Ta	C	Tc	Ta	C	Tc	Ta
0,66	0,69	0,75	0,94	0,94	0,90	3,65	3,66	3,74
0,65	0,67	0,72	0,94	0,93	0,92	3,64	3,67	3,70
0,70	0,69	0,74	0,95	0,94	0,92	3,67	3,67	3,69
0,70	0,71	0,75	0,93	0,92	0,89	3,68	3,70	3,77
0,75	0,70	0,71	0,91	0,93	0,93	3,73	3,69	3,69
又	又	又	又	又	又	又	又	又
0,69	0,69	0,73	0,93	0,93	0,91	3,67	3,67	3,72
U calc: 12***		U calc: 3**	U calc: 12***		U calc: 4**	U calc: 9***		U calc: 3**
p[U]: 0,500		p[U]: 0,028	p[U]: 0,500		p[U]: 0,048	p[U]: 0,274		p[U]: 0,028

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

***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.⁽⁶²⁾

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.⁽⁶²⁾

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.⁽⁶²⁾ 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) ⁽⁶²⁾ 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” ⁽⁶²⁾, 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.⁽⁶³⁾ Desta maneira, sendo *carios* (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”.⁽⁶³⁾

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.⁽⁶⁴⁾

Trata-se de um procedimento simples para estimar alguns parâmetros citológicos (nucleares no presente estudo) por microscopia óptica,⁽⁶⁴⁾ 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.⁽⁶³⁾

4.3. A Estatística

Estatística é um conjunto 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.*⁽⁶⁵⁾

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.⁽⁶⁶⁾

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.⁽⁶⁶⁾

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.⁽⁶⁵⁾

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.).⁽⁶⁶⁾

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.⁽⁶⁶⁾

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,⁽⁶⁶⁾ 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 (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 .⁽⁶⁵⁾

As diferenças observadas são consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade é menor que 0,05 (5%).⁽⁶⁵⁾

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.⁽⁶⁷⁾

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 dividi-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.⁽⁶⁷⁾ Pode ser observado que a partir da 50^o. 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).⁽⁶⁷⁾ 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.⁽⁶⁷⁾

Desta forma, o presente experimento mostra a avaliação de 50 núcleos de cada estrutura analisada, de cada órgão (placenta) em estudo, num total de 2250 núcleos avaliados (750 núcleos do grupo tratado com ciclamato de sódio, 750 núcleos do grupo tratado com aspartame e 750 núcleos do grupo controle).

Assim sendo, pelo raciocínio exposto, é suficiente o número de 5 animais para o grupo tratado com ciclamato de sódio, 5 animais para o grupo tratado com aspartame e 5 animais para o grupo 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, o Ciclamato e o Aspartame

Geralmente, os teratógenos exercem seu efeito de forma indireta, ou seja, através de seus metabólitos. Se a exposição ocorre durante a organogênese, esta pode levar especificamente a malformações dos diversos órgãos que se encontram em desenvolvimento durante a fase em que o agente teratogênico esteve agindo sobre o embrião. No período fetal a sensibilidade aos agentes exógenos cai drasticamente, porém esses agentes podem ainda causar

crescimento retardado ou uma alteração na função ⁽⁶⁸⁾ (como o observado nesta investigação).

A essência da prevenção de defeitos congênitos devido a exposição aos teratógenos é a exclusão desses agentes do meio ambiente pré-natal. Inúmeros agentes potencialmente teratogênicos podem agir durante a gestação. Informações disponíveis na literatura médica sobre esses agentes podem ser, na maioria das vezes, insuficientes para uma conclusão definitiva a respeito de seus efeitos sobre o produto gestacional ⁽⁶⁸⁾.

Com o objetivo de identificar possíveis efeitos danosos com o uso do ciclamato e do aspartame, este estudo avaliou o tecido placentário de ratas através de três elementos histológicos (decídua, camada esponjosa e vilosidades coriônicas), após a administração de 60 mg/Kg de peso corporal de ciclamato de sódio, e de 14 mg/Kg de peso corporal de aspartame, do décimo ao décimo quarto dia de gestação. Foram utilizadas estas dosagens dos edulcorantes, 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⁾, e atualmente, em relação ao aspartame, o IDA (índice diário aceitável) é de 34 mg/Kg de peso corporal ⁽⁴⁹⁾ (mas já foi de 20 mg/Kg).

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, cofatores de câncer de bexiga em humanos, que se não comprovam absolutamente, no mínimo deixam a dúvida, assustam e desconfortam.^(6-8,10,18-20)

A principal função da placenta consiste em propiciar a difusão de nutrientes e oxigênio do sangue materno para o sangue fetal, bem como a difusão de produtos de excreção do feto para a mãe.⁽⁶⁹⁾

A placenta é um órgão transitório, multifuncional, 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 integração das necessidades hormonais dos dois organismos, além de regular a passagem de hormônios, vírus, anticorpos e medicamentos.^(33,70)

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⁽⁶⁹⁾, 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.⁽⁷¹⁻⁷³⁾

Importante destacar que as vísceras (entre as quais a placenta), apesar de representarem 10% do peso corporal, recebem $\frac{3}{4}$ da circulação (desta irrigação visceral o cérebro recebe cerca de 16%), e assim, quando o agente

químico encontrar-se no sangue, é fácil entender que as vísceras serão as mais facilmente atingidas por sua ação⁽⁷⁴⁾ e toxicidade.

Além dos trabalhos de Pitkin^(24,75) evidenciando a passagem transplacentária do ciclamato, Hianik *et al.*⁽⁷⁶⁾ 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,⁽⁷⁷⁾ avaliados neste estudo), e vilosidades coriônicas.⁽⁷⁸⁾ A morfologia, posição e função distintas atribuídas às células placentárias podem ser usadas como índice de maturação da placenta.⁽⁷⁹⁾

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 decíduais predominam na placenta no 6º dia de prenhez na rata, 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, principalmente, ou mesmo um aumento anormal, como as alterações

observadas neste estudo, podem 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 o sangue fetal e materno, permitindo a ocorrência de trocas materno-fetais.⁽⁶⁶⁾

Observa-se que o peso fetal dos grupos tratados foi menor que o peso fetal do grupo controle de maneira estatisticamente significativa, sugerindo ação das substâncias ciclamato de sódio e aspartame sobre o desenvolvimento fetal. Estes resultados estão em concordância com os achados de Tanaka *et al.*⁽⁸⁰⁾ 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.*⁽⁸¹⁾ que encontrou teratogenicidade do ciclamato em embriões de galinha. Em relação ao aspartame foi identificado, por Leme e Azoubel⁽⁸²⁾, menor peso fetal e diminuição do peso placentário ao estudarem aspartame e pâncreas exócrino, e por Portela⁽⁸³⁾ que mostrou pesos fetal e placentário diminuídos em seus estudos com aspartame (à temperatura ambiente e aquecido à 40° C) e fígado, corroborando, estes estudos, os achados da presente investigação.

O peso corporal alterado do feto é um indicador de alteração do organismo ou embriotoxicidade.⁽⁸⁴⁾

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

Em relação ao peso da placenta, verifica-se que o peso médio das placentas dos grupos tratados (0,29g com o ciclamato e 0,25g com o aspartame) também foi menor e de maneira estatisticamente significativa que o peso médio das placentas do grupo controle (0,44g), sugerindo toxicidade dos edulcorantes utilizados, 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.*,⁽⁸⁵⁾ em seu trabalho com placenta e chumbo. No entanto, no estudo histológico da placenta de hamsters intoxicadas com sais de chumbo Ferm *et al.*⁽⁸⁶⁾ não encontraram quaisquer alterações.

Alterações no fluxo sangüíneo placentário podem modificar o tamanho e peso fetais. Do fluxo sangüíneo placentário diminuído resulta uma hipóxia fetal significativa, que provoca restrição do crescimento intra-uterino, gerando fetos de menor comprimento e peso.^(87,88) Neste estudo da placenta e ciclamato de sódio e, placenta e aspartame, também foi observado menor peso fetal, sugerindo que estas substâncias possam também interferir nestas funções placentárias da maneira como discutido acima.

De acordo com Pitkin *et al.*,^(24,75) o ciclamato de sódio atravessa a barreira placentária em humanos e macacos, atingindo o líquido amniótico na

proporção de um quarto da concentração sangüínea 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 pelas substâncias em estudo, pode apresentar fluxo sangüíneo diminuído com conseqüente menor aporte de nutrientes, oxigênio e outros elementos para a circulação fetal, resultando em deficiência de crescimento e peso fetal. É o que foi observado também nos estudos de Arruda *et al.* ⁽³⁵⁾, estudando ciclamato de sódio e rim fetal, e Martins *et al.* ⁽³⁶⁾ ao estudar fígado fetal e ciclamato de sódio. Também corroborou-se os achados deste experimento com os estudos de aspartame e fígado fetal de Portela ⁽⁸³⁾, e aspartame e pâncreas do feto de Leme e Azoubel ⁽⁸²⁾.

Com referência ao comprimento do cordão umbilical, este diminuiu de 2,12cm (grupo controle) para 1,93cm e 1,62cm (grupos tratados com ciclamato de sódio e aspartame, respectivamente), 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⁽⁸⁹⁾ e Oliveira⁽⁹⁰⁾ 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,⁽⁹¹⁾ submetidas à restrição protéica,⁽⁹²⁾ intoxicadas com metilmercúrio⁽⁹³⁾, submetidas à hipertermia⁽⁹⁴⁾ e exposta a ação da ciclofosfamida.⁽⁹⁵⁾

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

Diferentes estudos na literatura envolvendo o ciclamato de sódio, e outros utilizando o aspartame, 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 de Portela⁽⁸³⁾, estudando aspartame e fígado fetal, e Leme e Azoubel⁽⁸²⁾ trabalhando com aspartame e pâncreas fetal. Além disso, estes trabalhos mostraram alterações também 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.

Também Portela ⁽⁸³⁾, agora trabalhando com fígado e aspartame (tanto em temperatura ambiente como aquecido a 40° C), encontrou diminuição do peso placentário em ambos os grupos tratados, além de menor peso fetal. Ainda ficou evidenciado o encurtamento do cordão umbilical e alterações da cariometria com o uso do aspartame em temperatura ambiente (sugestivo de toxicidade com a droga) ⁸³, mas não quando usado o aspartame aquecido a 40° C.

Também, em outro experimento, Góes e Azoubel ⁽⁹⁶⁾, observaram alterações em 7 (sete) dos 11 (onze) parâmetros cariométricos avaliados ao investigar a ação da fenitoína sobre o plexo coróide de ratos.

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.*, ^(24,75) 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 em relação ao ciclamato, 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.

De outra forma, apenas a relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor, e os parâmetros referentes à forma nuclear (a Excentricidade, o Coeficiente de Forma e o Índice de Contorno) dos núcleos da decídua da placenta de ratas tratadas com aspartame não mostraram alterações estatisticamente significantes em relação ao controle. Assim, os demais parâmetros cariométricos (Diâmetros maior e menor, o Diâmetro médio, o Volume nuclear e a Área nuclear, o Perímetro nuclear e a Relação Volume/Área), relacionados ao tamanho nuclear, apresentaram diminuição de seus valores de forma estatisticamente significativa.

Sugere-se assim, além da passagem pela barreira placentária, a presença da substância (aspartame) também nos órgãos maternos (placenta materna), e sua ação já a nível deste tecido, com interferência no desenvolvimento do órgão em estudo, e de seu respectivo feto.

Na análise da cariometria da camada esponjosa (placenta fetal) observou-se os seguintes parâmetros alterados nos animais tratados com ciclamato de sódio, 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.

Também analisando-se a cariometria da camada esponjosa dos animais tratados com aspartame, observou-se, como parâmetros cariométricos alterados com significância estatística, os Diâmetros maior e menor, o Diâmetro médio, o Volume nuclear e a Área nuclear, o Perímetro nuclear e a Relação Volume/Área, com aumento de seus valores em relação ao controle. A relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor, e os parâmetros referentes à forma nuclear (a Excentricidade, o Coeficiente de Forma e o Índice de Contorno), não apresentaram alterações de maneira estatisticamente significativa em relação ao controle.

O volume nuclear diminuído da camada esponjosa do grupo tratado com ciclamato de sódio pode estar refletindo uma ploidia menor e, conseqüentemente, uma alteração da diferenciação celular, prejudicando a invasão da decídua, o que também pode estar ocorrendo com o volume nuclear aumentado apresentado pela camada esponjosa dos animais tratados com aspartame (alteração de sua função).

A Excentricidade alterada de forma estatisticamente significativa apresentada no grupo tratado com ciclamato de sódio, 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 com ciclamato de sódio são mais excêntricos que os núcleos pertencentes às placentas do grupo controle. Essa

excentricidade alterada sugere que o metabolismo da célula não está adequado.

Assim, de acordo com as alterações observadas nos parâmetros cariométricos referidos, como a principal função das células da camada esponjosa é endócrina, esta interferência na produção estrogênica (déficit na síntese de estrogênios) está relacionada diretamente ao menor crescimento fetal e da placenta.

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 na 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, no grupo tratado com ciclamato de sódio.

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 das ratas controles e tratadas com ciclamato de sódio.

De forma diferente, todos os parâmetros cariométricos relacionados ao tamanho (aumento) e a forma (deformação) nucleares, quais sejam, Diâmetros

maior e menor, o Diâmetro médio, relação Diâmetro Maior/Diâmetro Menor, o Volume nuclear, a Área nuclear, o Perímetro nuclear, a Relação Volume/Área, e, a Excentricidade, o Coeficiente de Forma e o Índice de Contorno dos núcleos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas tratadas com aspartame, mostraram alterações de forma estatisticamente significante quando comparados aos valores do grupo controle.

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.⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾

Além disso, as alterações na forma nuclear, principalmente na excentricidade (observado na camada esponjosa do grupo tratado com ciclamato de sódio, e nas vilosidades coriônicas do grupo tratado com aspartame), mostram que tais núcleos são mais excêntricos que os núcleos pertencentes às placentas do grupo controle, sendo essa excentricidade alterada sugestiva de metabolismo inadequado da célula.

Assim, as alterações nucleares detectadas neste estudo poderiam ser atribuídas à síntese inadequada de DNA, RNA e/ou proteínas responsáveis pela homeostase celular, induzida pelas substâncias estudadas (ciclamato de sódio e aspartame).

Todos estes achados estão em concordância e corroboram com a literatura científica citada. Todavia, persiste a necessidade de novas pesquisas para esclarecer os mecanismos através dos quais estes aditivos alimentares

em estudo determinam as alterações nucleares placentárias detectadas nesta investigação.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho sugerem que a administração, em um grupo, de 60 mg/Kg de peso corporal de ciclamato de sódio e, em outro, de 14 mg/Kg de peso corporal de aspartame, do décimo ao décimo quarto dia de prenhez da rata causa:

- diminuição do peso fetal em ambos os tratamentos;
- diminuição do peso placentário em ambos os tratamentos;
- diminuição do comprimento do cordão umbilical em ambos os tratamentos;
- alteração dos parâmetros cariométricos da decídua da placenta de ratas tratadas com aspartame;
- alteração dos parâmetros cariométricos da camada esponjosa da placenta de ratas tratadas com ciclamato de sódio e com aspartame;
- alteração dos parâmetros cariométricos das vilosidades coriônicas da placenta de ratas tratadas com ciclamato de sódio e com aspartame;
- Assim, estes resultados expressam numericamente a intoxicação placentária tanto com o ciclamato de sódio como com o aspartame, e a conseqüente repercussão fetal com o uso destas substâncias durante a gravidez.

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. *CI 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: 318-328.
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. Calorie Control Council. *Low calorie sweeteners: aspartame*, 2004.
45. *Stedman's Medical Dictionary*, 25^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1990:117.
46. Food and drug administration (FDA). Food additives permitted in food for human consumption: Aspartame. *Fed Regist* 1974; 39: 27317-27320.
47. Molinary SV. Preclinical studies of aspartame in nonprimate animals. In: Stegink LD, Filer LJ editors. *Aspartame: physiology and biochemistry*. New York: Marcel Dekker 1984; 289-306.
48. Butchko HH, Stargel WW, Comer CP, Mayhew DA, Benninger C, Blackburn GL, *et al.* Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 35 (2Pt2): S1-93.

49. Stegink LD. Aspartame-sweetened beverage: effect on plasma aminoacid concentration in normal adults and adults heterozygous for fenilketonuria. *J Nutr* 1987; 117: 1989-1995.
50. Koehler SM, Glaros A. The effects of aspartame on migraine headache. *Headache* 1988; 28 (1): 10-14.
51. Roberts HJ. Aspartame and headache. *Neurology* 1995; 45 (8): 1631-1633.
52. Roberts HJ. Aspartame and brain cancer. *Lancet* 1997; 349 (9048): 362.
53. Oyama Y, Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaike N, Sakai K, *et al.* Cytotoxic effects of methanol, formaldehyde, and formate on dissociated rat thymocytes: a possibility of aspartame toxicity. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18 (1): 43-50.
54. Roberts HJ. Aspartame as a cause of allergic reactions, including anaphylaxis [carta]. *Arch Intern Med* 1996; 13 (156): 1027.
55. National Cancer Institute. Artificial sweeteners and cancer: questions and answers. {on line} Disponível em URL:<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/artificial-sweeteners/print?page=&key...> {citado 2007 Ago 22}

56. Soffritti M, Belpoggi F, Esposti DD, *et al.* First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114 (3): 379-385.
57. Lim U, Subar AF, Mouw T, *et al.* Consumption of aspartame-containing beverages and incidence of hematopoietic and brain malignancies. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 2006; 15.
58. Tephly TR. Comments on the purported generation of formaldehyde and adduct formation from the sweetener aspartame. *Life Sciences* 1999; 65 (13): 157-160.
59. Rietbrock V. Naunyn schmiedebergs. *Arch Pharmakol Exp Pathol* 1969; 263: 88-105.
60. Trocho C, Pardo R, Rafecas I, Virgili J, Remesar X, Fernández-López JA, and *et al.* Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components *in vivo*. *Life Sciences* 1998; 63 (5): 337-349.
61. Smith JD, Terpening CM, Schmidt SOF, Gums JG. Relief of fibromyalgia symptoms following discontinuation of dietary excitotoxins. *The annals of pharmacotherapy* 2001; 35: 702-706.
62. 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.

63. 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.
64. Sala MA, Lopes RA, Matheus M. Método morfométrico para análise quantitativo de los tejidos. Determinación de los parámetros normales para el hepatocito de rata. Archivos de la Facultad de Medicina de Zaragoza 1992; 32(1): 29-31.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Moraes EA. Agentes teratogênicos. In: Zugaib M, Medicina fetal 1997; 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 537-540.

69. Guyton AC, Hall JE. Gravidez e lactação. Tratado de fisiologia médica 2002; 10^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 884-886.
70. Altemani AM. Patologia da placenta, cordão umbilical e membranas. Obstetrícia básica 2000; 2^a. ed. São Paulo: Servier, 587-592.
71. Marieb MJ. Essentials of anatomy and physiology. 6^a. ed. San Francisco, Califórnia: Cummings Science Publishing; 2000.
72. Alcântara P, Marcondes E. Pediatria Básica. 6^a. ed. São Paulo: Sarvier; 1978.
73. Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Enrofloxacin: uma fluorquinolona de uso exclusivo em veterinária. Parte I: química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. Analecta Veterinária 2001; 21(1): 31-41.
74. Brito Filho D. Toxicologia humana e geral 1988; 2^a. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 3-9.
75. Pitkin RM, Reynolds WA, Fiter LJ. Cyclamate and cyclohexylamine: transfer across the hemochorial placenta. Proc Soc Exp Biol Med 1969; 132: 993-5.
76. 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.

77. Schiebler TH, Knoop A. Histochemische und elektroenmikroskopische Untersuchungen na der Rattenplazenta. *Z.Zellforsch* 1959; 50: 494-552.
78. Davies J, Glasser SR. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat* 1968; 69: 542-608.
79. Roby KF, Soares MJ. Trophoblast cell differentiation and organization: role of fetal and ovarian signals. *Placenta* 1993; 14: 529-545.
80. 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.
81. Verrett MJ. Teratogenic effects of cyclamate and related compounds in the chicken embryo. Food and Drug Administration (Não Publicado); 1969.
82. Leme FAGL, Azoubel R. Effects of aspartame on the exocrine pancreas of rat fetuses. *Int J Morphol* 2006; 24(4): 679-684.
83. Portela GS. Efeitos do aspartame sobre o peso corporal e fígado fetal de ratos: estudo morfométrico [Tese]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina; 2004.
84. Schardein JL. Chemically induced birth defects. 2^a ed. New York: MarcelDekker; 1985.
85. Fuentes M, Torregrosa A, Mora R, Götzens V, Corbella J, Domingo JL. Placental effects of lead in mice. *Placenta* 1996; 17: 371-376.

86. Ferm VH, Carpenter SJ. Developmental malformations resulting from the administration of lead salts. *Experimental and Molecular Pathology* 1967; 7: 208-213.
87. Emmanouilides GC, Hobel CJ, Yashiro K, Klyman G. Fetal responses to maternal exercise in the sleep. *Am J Obstet Gynec* 1972; 112:130-137.
88. Bittencourt AL. Congenital Chagas' disease. *Am J Dis Child* 1976; 130:97-103.
89. 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.
90. 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.
91. Cunha SA, Contrera MGD, Lopes RA, Azoubel R, Contrera JD. Experimental hipervitaminosis A in the rat XXV. The effect of a high single dosis of vitamin A on umbilical cord length. *Anais da 44 Reunião da SBPC* 1992; 712.
92. 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.

93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. Góes MJ, Azoubel R. Effects of low-dose phenytoin administered to rats fetuses on developing choroid plexus. Kariometric study. *Int J Morphol* 2003; 21(4): 285-290.
97. De Robertis EMF. *Bases da biologia celular e molecular*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
98. Trabulsi LR. *Microbiologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1989.
99. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. New York: Garland Publishing; 1994.

7. APÊNDICES

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Aprovação do Comitê de Ética Animal.

<p>Comissão de Ética na Experimentação Animal</p> <p>CEEA FAMERP</p>	<p><i>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto</i></p> <p>Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA</p> <p>FAMERP Autarquia Estadual – Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090 000 FAX 2276404 S.J.R.P – SP</p>
---	--

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto de pesquisa intitulado “Efeitos do ciclamato de sódio e do aspartame na placenta de ratas - Estudo morfométrico” sob responsabilidade da Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pela CEEA-FAMERP.

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

São José do Rio Preto, 22 de Novembro de 2006.



Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury
Presidente CEEA - FAMERP