

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Ângela Luzia Dreza

**“ASSOCIAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO
NEOPLÁSICO E GRAVIDEZ: ESTUDO DO PERFIL
HORMONAL E ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS EM
RATAS PRENHES PORTADORAS DO
CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>ANGELA LUZIA DREZA</u> <u>[Assinatura]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D535a	<p>Drezza, Angela Luzia Associação entre crescimento neoplásico e gravidez: estudo do perfil hormonal e alterações placentárias em ratas prenhes portadoras do carcinossarcoma de Walker 256 / Angela Luzia Drezza. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Câncer. 2. Prenhez. 3. Placenta. 4. Tumor Walker 256. 5. Líquido ascítico. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Neoplastic growth and pregnancy: hormonal profile and placental alterations in pregnant tumor-bearing rats.

Palavras-chave em inglês: Cancer; Pregnancy; Placenta; Walker 256 tumor; Ascitic fluid.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Maria Alice Rostom de Mello, Miguel Arcanjo Áreas.

Data da defesa: 15/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 15 de agosto de 2008.

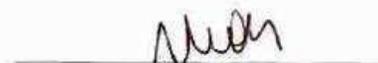
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
Orientadora



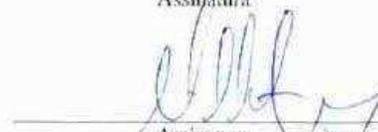
Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas



Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Assinatura

Prof. Dr. Antonio Carlos Boscheiro

Assinatura

Agradecimentos

Todos que participaram da minha vida ao longo desses dois anos foram, de alguma forma, parte desse trabalho. Portanto, gostaria imensamente de agradecer...

...à amada família, por sempre estarem por perto me dando segurança, me incentivando a sempre seguir em frente e por acreditar em mim algumas vezes até mais do que eu mesma;

...à Profa. Maria Cristina, primeiramente por ter me recebido de forma tão acolhedora quando conseguir um orientador tinha se tornado tão difícil, e também por toda a atenção dispensada a este trabalho e indiscutível auxílio científico;

...à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro;

...às queridas pessoas que encontrei no laboratório, André, Bread, Emilianne, Estela, Marcos, Tatiane e às novas Aline, Gisele e Rebeka por toda ajuda, auxílio e boa companhia, tornando o trabalho muito mais fácil de ser realizado;

...ao Juvani, técnico de laboratório do Departamento de Histologia, pela atenção e ajuda com meus experimentos e à técnica Beth, do Caism, pelo auxílio com as dosagens hormonais;

...às queridas amigas Grace, Júlia e Simone por estarem sempre perto, ajudando a tornar tudo mais legal;

...à turma 01 diurno da Biologia Unicamp, que fez com que minha vida e consequentemente minhas lembranças da Unicamp fossem todas muito boas e felizes;

...ao fantástico time de Handebol Feminino da Biologia Unicamp, que desde a graduação me trouxe tantas boas emoções e que, principalmente, me fez ver que independente do resultado, o importante sempre é poder reunir os amigos;

...às queridas amigas de república, que fizeram a volta diária para casa sempre divertida, tornando minha vida campineira muito mais fácil;

...aos fisicamente distantes, porém sempre presentes amigos de Jundiaí, que acompanham desde o início minhas escolhas e decisões. Nem lembro da minha vida antes de vocês existirem!

“É impossível ser feliz sozinho...”

Índice

Sumário de Figuras e Tabelas.....	vi
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	19
4. Resultados.....	28
5. Discussão.....	64
6. Conclusões.....	73
7. Referências Bibliográficas.....	75
8. Parecer do Comitê de Ética.....	86

Sumário de Figuras e Tabelas

Tabelas:

Tabela 1: Pesos (g) e número dos fetos obtidos em animais dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	30
Tabela 2: Número de núcleos nas diferentes regiões da placenta (decídua basal, espongiotrofoblasto e labirinto placentário) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	34
Tabela 3: Número de núcleos marcados contados com anti-corpo anti-receptor de estrógeno (ER α) nas diferentes regiões da placenta (espongiotrofoblasto e labirinto placentário) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	50
Tabela 4: Número de núcleos marcados com anti-corpo anti-receptor de progesterona (PR-A e PR-B) contados nas diferentes regiões da placenta (espongiotrofoblasto e labirinto placentário) de ratas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	56

Figuras:

Figura 1: Peso dos fetos observado nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	30
Figura 2: Número de fetos encontrado por fêmea nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	31
Figura 3: Concentração protéica encontrada ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	32
Figura 4: Análise de síntese protéica (nmol / mg / hora) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	32
Figura 5: Concentração de tirosina placentária (nmol/ μg de proteína tecidual; A) e degradação protéica placentária (%; B) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	33
Figura 6: Número de núcleos observadas na região da decídua basal nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	34
Figura 7: Análise morfológica da decídua basal das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	36
Figura 8: Número de núcleos dos grupos Controle, Tumor e Ascite na região do espongiotrofoblasto.....	37

Figura 9: Análise morfológica do espongiotrofoblasto e células gigantes (G) das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	39
Figura 10: Número de núcleos dos grupos Controle, Tumor e Ascite na região do labirinto placentário.....	40
Figura 11: Número total de núcleos dos grupos Controle, Tumor e Ascite em todas as áreas analisadas das placentas (decídua basal, espongiotrofoblasto e labirinto trofoblástico).....	40
Figura 12: Análise morfológica do labirinto das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	42
Figura 13: Síntese protéica em cultura celular primária de placentas provenientes de ratas controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico.....	43
Figura 14: Degradação protéica em cultura celular primária de placentas provenientes de ratas controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico.....	44
Figura 15: Concentração de estrógeno (pg/mL) em meio de cultura primária de placentas provenientes dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	45
Figura16: Teor de progesterona (ng/mL) em meio de cultura primária de células placentárias provenientes dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	45
Figura 17: Teor de prolactina (mUI/mL) em meio de cultura primária das células placentárias provenientes dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	46
Figura 18: Imagem de Western Blot referentes a bandas de expressão proteica ER α nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	47
Figura 19: Densidade óptica observada em gel de poliacrilamida referente à bandas de ER α dos tecidos placentários dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	47
Figura 20: Gel de poliacrilamida representando expressão protéica dos receptores de progesterona PR-A e PR-B nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	48
Figura 21: Expressão protéica para PR-A, receptor de progesterona, em relação à sua densidade óptica nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	48
Figura 22: Expressão protéica para de PR-B, receptor de progesterona, em relação à sua densidade óptica nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	49
Figura 23: Quantidade de núcleos marcados (ER α) na região do espongiotrofoblastonos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	50
Figura 24: Análise imunohistoquímica do espongiotrofoblasto das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	52

Figura 25: Número de núcleos marcados (ER α), pela análise imunohistoquímica, da região do labirinto placentário nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	53
Figura 26: Análise imunohistoquímica do labirinto das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	55
Figura 27: Análise imunohistoquímica dos receptores de progesterona (PR-A e PR-B) na região do espongiotrofoblasto nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	56
Figura 28: Análise imunohistoquímica do espongiotrofoblástico das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	58
Figura 29: Número de marcações (PR-A e PR-B) na região do labirinto placentário nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	59
Figura 30: Análise imunohistoquímica do labirinto placentário dos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	61
Figura 31: Concentração sérica de estrógeno nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	62
Figura 32: Concentração sérica de progesterona nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	63
Figura 33: Concentração sérica de prolactina nos grupos Controle, Tumor e Ascite.....	63

Resumo

A gravidez gera modificações no organismo materno para a implantação do blastocisto, que são provocadas por hormônios como estradiol e progesterona. O tempo e curso de gravidez dependem da unidade materno / fetal, a placenta, que é o órgão responsável pela trocas entre mãe e feto, além de secretar vários hormônios, dentre eles prolactina, estrógenos e progesterona. Quando a gravidez encontra-se associada ao desenvolvimento tumoral, situação de intensa multiplicação celular, podem ocorrer disfunções no desenvolvimento embrionário. Os hormônios sexuais e a prolactina têm suas concentrações alteradas durante a gravidez, para que a mesma transcorra corretamente e, além disso, esses hormônios podem interagir com células do sistema imune. A ação do desenvolvimento tumoral, por sua vez, também é responsável pela elevação, ainda maior, na quantidade de citocinas presentes no organismo. Dessa forma, no presente trabalho, avaliou-se a influência do câncer na regulação dos hormônios necessários à gravidez, bem como no desenvolvimento placentário, uma vez que citocinas presentes no líquido ascítico de animais portadores do carcinossarcoma de Walker 256 afetariam o curso normal da prenhez em ratas. Este trabalho foi realizado através da análise de 3 grupos experimentais (ratas prenhes controle, portadoras de tumor ou inoculadas com líquido ascítico), em relação a aspectos de morfometria placentária, concentrações hormonais (estrógeno, progesterona e prolactina), imunohistoquímica e expressão protéica para os receptores placentários de estrógeno e progesterona, além dos processos de síntese e degradação protéica e biossíntese dos hormônios placentários. Através da análise dos animais inoculados diariamente com líquido ascítico, pudemos comprovar que os fatores presentes no líquido ascítico seriam, então, os maiores responsáveis pela alteração anormal de alguns hormônios durante a gravidez. Neste grupo, verificamos desbalanço hormonal semelhante ao observado no grupo Tumor e, além disso, quando comparado ao grupo Controle, apresentava fetos com peso reduzido, alterações morfológicas, de síntese e alterações na expressão de receptores de estrógeno e progesterona. Como os animais inoculados diariamente com líquido ascítico não eram hospedeiros tumorais e, portanto, não sofriam competição nutricional entre feto e as células tumorais, pudemos observar a ação de efeitos diretos ou indiretos dos fatores produzidos pelo tecido hospedeiro e/ou células tumorais, causando redução do número de células trofoblásticas gigantes e das camadas decidual e labirinto-trofoblástica, além de menor expressão protéica dos receptores de estrógeno e progesterona placentário, como redução do peso fetal. Portanto, concluímos que moléculas efetoras provenientes do sistema imunológico hospedeiro ou produzidas pelas células tumorais são capazes de alterar o curso normal da gravidez, trazendo prejuízos ao desenvolvimento placentário e, por conseguinte, fetal.

Abstract

Pregnancy causes several modifications in the maternal organism for the blastocystic implantation that are made by hormonal action, as oestradiol and progesterone. The pregnancy progress depends on the placenta, maternal / foetal unit, which exchanges nutrients, gas and substances between mother and foetus, and can produce a variety of hormones, like prolactin, oestrogen and progesterone. The association between pregnancy and tumoral growth, two situations that involve intense cell multiplication, can be extremely harmful for the foetus development. Sex hormones and prolactin have their concentrations modified during normal gestational progress and can also interact and modulate many physiological functions, as well as immune cells. In turn, tumour growth can raise body cytokines that may influence the hormones necessary to pregnancy and placenta development. In this work we analyzed 3 experimental groups (Control - pregnant rats without tumour, Tumour - pregnant tumour-bearing rats and Ascitic – pregnant rats inoculated with ascitic fluid daily) evaluating the placental morphometry, serum hormonal concentration (oestrogen, progesterone and prolactin), immunohistochemistry, protein expression of the placental oestrogen and progesterone receptors, and also measurements of *in vitro* assays of protein synthesis and degradation and placenta's hormonal biosynthesis. Tumour group animals presented, when compared to the Control group, low foetus weight, molecular and morphological placenta alterations and abnormal pregnancy hormone variation (decrease in progesterone levels and increase in prolactin and oestrogen content). Animals of the ascitic fluid group also showed similar abnormal variation of these hormones in the pregnancy as observed in the Tumour group, indicating that some factors contained in the ascitic fluid could be the greatest responsible for these alterations. Moreover, when compared to the Control group, the ascitic fluid group also presented low foetus weight and molecular and morphological placenta alterations. Since the ascitic fluid group was not tumour host and, therefore, have no nutritional competition between foetus and tumoral cells, the results allowed to observe the direct and/or indirect effects of the factors produced by the host tissue or tumoral cells. These effects included reduction of trophoblastic giants cells and decidual and trophoblastic layers, less placental and foetal oestrogen and progesterone receptor protein expression and reduced foetal weight. We concluded that humoral effectors from hosts immune system or produced by the tumour cells are able to cause pathological conditions and, during pregnancy, can also cause damages to the placental and foetal development.

1. Introdução

O câncer é a causa morte mais importante depois das patologias cardiovasculares. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA – Ministério da Saúde, Brasil), apontam para a ocorrência de cerca de 466.730 novos casos de câncer, sendo que 234.870 são esperados para sexo feminino. Os tipos mais incidentes para as mulheres são os cânceres de mama (49 mil) e de colo do útero (19 mil). Neoplasias, em geral são de difícil controle e tratamento, envolvendo várias alterações bioquímicas e metabólicas, proporcionando, ao hospedeiro, desgaste das reservas energéticas e, principalmente, da massa estrutural - massa corpórea magra. Essas alterações fisiopatológicas culminam em menor qualidade de vida e, muitas vezes, com redução do tempo de sobrevivência.

Por outro lado, a prevalência de câncer durante a gravidez é rara, sendo que 3% dos carcinomas do colo são diagnosticados durante a gravidez e apenas 0,5% das gravidezes estão associadas a esse tipo de câncer (**Van der Vange et al., 1995**); por outro lado, o câncer de mama representa a neoplasia mais freqüente em gestantes (**Bottles & Taylor, 1985**), apresentando freqüência de 0,2 a 3,8% de todos os cânceres que ocorrem durante a gravidez. No Brasil, encontramos freqüências que variam entre 1,6 a 2,1% (**Petti et al., 1989**), sendo estimada em uma para cada 3000 gestações pela literatura mundial (**Peters & Meakin, 1965; Loibl et al, 2006**).

Atualmente, ainda há poucos estudos, quanto à influência da gravidez sobre o câncer e vice versa. Publicações recentes apontam para o efeito protetor da gestação contra o câncer, porém há outros autores que relatam a gravidade dessa associação, acelerando o crescimento e evolução da neoplasia. Além disso, alguns autores apontam para a dificuldade de diagnóstico precoce do tumor em mulheres grávidas. Zemlicks *et al* (**1992**) verificaram que pacientes com câncer de mama associado a gravidez apresentaram diagnóstico de estágio mais avançado e maior incidência de metástases a distância comparadas as controles não gestantes. King *et al* (**1985**) verificaram tumores em estádios mais avançados quando as pacientes eram grávidas.

Ressalta-se ainda que as pacientes grávidas com câncer descobrem a existência da doença quando está já se encontra em estágio avançado, devido ao atraso no

diagnóstico ou porque as alterações hormonais e fisiológicas da gravidez resultam em doenças mais agressivas.

As alterações endócrinas que ocorrem na gravidez associada ao desenvolvimento de um tumor, envolvem adaptações fisiológicas no organismo materno, centrada basicamente na unidade materno / fetal, a placenta, mas ainda são pouco estudadas.

Estudos experimentais aventam a hipótese para o efeito promotor dos estrógenos sobre o câncer e a influência da progesterona sobre o câncer de mama é incerta. Por outro lado, não há evidências clínicas sobre a prolactina e sua ação carcinogênica em pacientes, porém em estudos experimentais, alguns autores apontam para o efeito estimulatório de crescimento do câncer mamário em camundongas.

Assim, o aumento da progressão neoplásica em função da complexa alteração da homeostasia hormonal imposta pela gravidez, infere a importância do conhecimento e estudo do desenvolvimento tumoral em função do estímulo hormonal e/ou alterações dos produtos secretados pelo tumor (líquido ascítico), induzindo mudanças importantes no curso da gravidez e do bem estar da unidade materno / fetal. Assim, a determinação das alterações hormonais, bem como os fatores bioquímicos e moleculares envolvidos na associação entre gravidez e câncer são importantes e necessários para novas perspectivas terapêuticas.

1.1. Câncer:

O câncer ou tumor, também chamado de neoplasia, caracteriza-se pela proliferação desordenada das células de determinado tecido, derivadas de uma célula inicial que sofreu diferenciação anormal, apresentando crescimento desordenado com invasão dos tecidos ou órgãos, adjacentes ou não (**Argiles et al., 1990; Baggeto, 1992; Chen-Zion et al., 1992**). Neste caso, formam-se as metástases, pela migração dessas células neoplásicas através do sistema circulatório e linfático, desenvolvendo os centros secundários tumorais, além de alterações estruturais de componentes celulares, as anaplasias (**Beremblum, 1970**).

Inversamente relacionada ao grau de diferenciação celular, a taxa de proliferação celular dos tumores malignos tende a ser mais acelerada e agressiva. Portanto, para que essas células possam atingir esse estágio anormal de proliferação, alterações metabólicas são necessárias. Todas as alterações, mesmo as genéticas, são influenciadas por hormônios (**Da Poian & Carvalho-Alves, 2002**). Por isso, torna-se relevante o estudo da influência de alguns hormônios no desenvolvimento de determinados tipos de câncer.

O carcinossarcoma de Walker 256, freqüentemente utilizado em casos experimentais de estudos do câncer, tem origem espontânea de glândula mamária de rata (**Earle, 1935**) e alto poder de metástase por via linfática e hematogênica (**Iwama de Matos, 1980**), além de ser extremamente invasivo e agressivo. Seu rápido crescimento gera diversos sintomas, em ratos, que também são descritos em casos de câncer humano, como caquexia, anorexia, perda de peso, fraqueza e aumento do catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos (**Fernandes et al., 1990, Tisdale, 2003; Ventrucci et al., 2004**), além de reduzir os níveis de glicose sangüínea (**El Razi et al., 1996**) e proteínas (**Guantani, 1993; Villa et al., 1992**).

1.2. Gravidez:

A gravidez é outra situação que envolve intensa multiplicação celular. Após o encontro e fusão dos pró-núcleos gaméticos, que originam o embrião e posteriormente o feto, há intensa divisão, diferenciação e crescimento celular (**Pedersen, 1988**). O útero materno sofre profundas modificações para a implantação do blastocisto e subsequente formação da decídua, que notavelmente origina-se da proliferação e diferenciação das células endometriais (**Tressier et al., 2000**).

A implantação do blastocisto e formação da decídua ocorrem devido à ação da progesterona. Por sua vez, o estradiol é importante para o início da ligação do blastocisto no útero previamente preparado pela progesterona (**Wu & Meyer, 1970**) e para o máximo crescimento da decídua (**Yochim & De Feo, 1962**).

Dentre as complicações clínicas que podem ocorrer durante a gravidez, o câncer promove importantes efeitos pela sua coexistência com essa outra complexa condição metabólica, do que pela sua incidência. A ocorrência de neoplasia durante a prenhez, em roedores, causa redução no número de fetos por fêmea, promove redução no peso fetal e na quantidade de proteínas do mesmo, além de causar aumento no número de reabsorções fetais (**Gomes-Marcondes et al., 1998**). Por outro lado, a lactação associada à neoplasia também pode ter efeito desfavorável, promovendo o desenvolvimento e aumento do número de metástases (**Banks, 1985**).

O tempo e curso da gravidez dependem da unidade materno / fetal. A placenta, órgão de troca formado tanto por tecidos fetais (córion viloso) quanto maternos (decídua basal), tem principal função de permitir a difusão de substâncias alimentares e oxigênio do sangue da mãe para o feto e a difusão da excreção e CO₂ do feto para a mãe. Essa troca ocorre na barreira presente no labirinto trofoblasto (**Lopes, 1992**) e seu arranjo celular e organização própria podem suportar o fluxo bioquímico e nutricional, responsável pela ligação entre a mãe e o feto, e bem estar do seu desenvolvimento (**Yen, 1994; Bevilacqua & Abrahansohn, 1994**). A placenta secreta estrógenos, progesterona e lactogênio placentário (HPL), dentre outros hormônios, que preparam o organismo para a intensa mobilização dos nutrientes endógenos no final da gestação (**Metcalfe, 1988**).

O crescimento placentário em ratas é caracterizado pela proliferação de células e síntese protéica, no início da gestação (**Ogle et al., 1989**), hipertrofia e diferenciação celular, aumento do depósito de glicogênio celular e síntese de hormônio lactogênico pelas células do labirinto, no período transicional de gestação (**Jollie, 1964; Soares, 1987**). No final da gestação em ratas, a placenta permite, basicamente, trocas de nutrientes e produtos metabólicos entre os compartimentos materno e fetal (**Rosso, 1975**). Essas mudanças são produzidas pela progesterona e pelo baixo nível de estrógeno, necessários para manter a gravidez normal (**Gomes-Marcondes et al., 1998**).

O implante tumoral, durante a gravidez, causa redução do peso placentário, bem como de seu conteúdo protéico. Esse fato pode refletir em alterações teciduais que poderiam até mesmo alterar o balanço hormonal responsável pela manutenção da gravidez, levando à reabsorção fetal e aumentando a produção de substâncias que causariam a proteólise da placenta e feto (**Gomes-Marcondes et al., 1998**).

Roedoras acometidas de neoplasia têm redução significativa no tamanho e peso da placenta e feto, além de grande quantidade de hemorragia e edemas no tecido placentário, que podem diminuir as trocas de nutrientes entre mãe e feto (**Toledo & Gomes-Marcondes, 1999**).

1.3. Prolactina (PRL):

Prolactina (PRL) foi originalmente identificada como hormônio neuroendócrino de origem pituitária. A PRL pituitária é um peptídeo de 198 aminoácidos e peso molecular de 23.5 kDa (**Riddle & Braucher, 1931**), membro da família de hemopoietina / citocinas (**Bazan, 1989**) e pode regular a resposta imunológica celular ou humoral através de seus receptores nas células imune (**Spangelo et al., 1985; Spangelo et al., 1987; Freeman et al., 2000 e Dardenne et al., 1994**). Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que prolactina tem propriedades imunoestimuladoras (**Yu-Lee, 1997; Kooijman et al., 1996; Dogusan et al., 2001 e Matera et al., 2001**), pode atuar como fator mimetizante de interleucina - fator de crescimento autócrino (IL-2), além de atuar em paralelo com esse fator (**Matera, 1996**). Ratos hipofisectomizados apresentam clara imunossupressão, que pode ser reestabelecida com a administração de PRL (**Berczi et al., 1981 e Berczi & Nagy, 1991**).

Esse hormônio tem suas principais funções relacionadas ao desenvolvimento das mamas, a produção de leite, além de promover a formação do corpo lúteo (**Astwood, 1941**). Também é necessário para a manutenção da gravidez e inibição da ovulação. Grande número de ações biológicas associadas à prolactina deriva de sua ação combinada com outros hormônios pituitários (**Clevenger et al., 2003**).

A produção local, ou seja, não pituitária de prolactina foi descoberta em roedores por Mershon e colaboradores (**1995**). Animais hipofisectomizados podem produzir cerca de 20% da prolactina ativa na circulação, podendo chegar a 50% do nível normal com o passar do tempo, sugerindo que, em algumas circunstâncias, a PRL extrapituitária pode compensar a ausência da pituitária (**Nagy & Berczi, 1991**). Hoje, sabe-se que a prolactina local pode agir sobre a mesma célula que a produziu (ação autócrina) ou nas células adjacentes do tecido onde foi produzida (ação parácrina). Também é importante notar que a síntese e secreção de prolactina, ainda parcialmente entendida, são multifatoriais

envolvendo regulação positiva e negativa, ocorrendo no epitélio mamário de mulheres (grávidas e não grávidas) e observada durante a prenhez em roedores adultos (**Clevenger et al., 2003**).

Além do epitélio mamário, a prolactina extrapituitária pode ser encontrada na decídua, glândula lacrimal, timo, baço, linfócitos circulantes, células linfóides da medula óssea e glândula sudorípara, além de porções líquidas, como plasma sanguíneo, fluido cérebro-espinal, líquido amniótico, lágrima, leite, fluido folicular e suor (**Ben-Jonathan et al., 1996**). Usando-se os mecanismos autócrinos ou parácrinos é possível ativar as ações da PRL sem afetar a concentração do hormônio circulante (**Bole-Feysot et al., 1998**).

A participação da prolactina no desenvolvimento de neoplasias é historicamente controversa. Nos primeiros estudos realizados com prolactina, considerava-se que esta contribuía significativamente no desenvolvimento da patologia e progressão de tumores em roedores, principais modelos para o estudo do câncer (**Harvey, 2005**). O desenvolvimento tumoral em roedores poderia ser realizado pela elevação da concentração sérica de prolactina através da administração de antagonistas de dopamina. A utilização de bromocriptina, agonista de dopamina / inibidor de prolactina, promovia, nos animais, profilaxia contra carcinomas insipientes ou, a longo prazo, a cura de carcinomas já estabelecidos (**Welsch & Nagasawa, 1977; Welsch, 1973**). Porém, a triagem farmacológica em pacientes portadores de carcinoma mamário, feita na década de 80, mostrou-se ineficiente no tratamento da doença após a administração de drogas agonistas de dopamina, que reduzem a prolactina sérica circulante (**Fritze et al., 1986; Bonnetterre et al., 1988; Holtcamp & Nagel, 1988**). Estes resultados reforçaram a tese de que não haveria relevância clínica entre hiperprolactinemia e desenvolvimento do câncer de mama (**Holtcamp et al., 1984; Wang et al., 1986**).

Hoje, sabe-se que a falha no uso das drogas agonistas de dopamina ocorria devido ao fato destas promoverem apenas a inibição da prolactina pituitária, enquanto aquela produzida pelas próprias células cancerosas permanecia fora de controle (**Goffin et al, 1999, 2002; Bhatavdekar et al., 2000**), já que a PRL é capaz de sensibilizar a resposta de certos tecidos, aumentando o número de receptores específicos (PRLR), representando o primeiro passo no processo da transdução de sinal desse hormônio (**Kelly et al., 1991**).

Atualmente, considera-se que a prolactina está associada com o crescimento e desenvolvimento do câncer de mama humano. Nas células tumorais, a prolactina age como mitógeno, promovendo sua divisão (**Vonderhaar, 1989; Das & Vonderhaar, 1997; Vonderhaar, 1998**), estimulando o crescimento e a motilidade, protegendo essas células da apoptose (**Perks *et al.*, 2004**), causando seu aumento e invasão no estroma dos tecidos vizinhos (**Clevenger, 2003**), além de aumentar o número de células na fase S (**Rose-Hellekant *et al.*, 2003**).

Mulheres com hiperprolactinemia, quando acometidas por carcinoma mamário, estão mais sujeitas à ocorrência de metástases, podendo acontecer num período de tempo menor do que em mulheres com nível de prolactina normal (**Mujagic & Mujagic, 2004**), além disso, pode também haver menor tempo para recorrência do tumor e maior mortalidade (**Hoticamp *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1986**). A prolactina pode também ativar linfócitos B malignos (**Walker *et al.*, 1995**), células linfóides (**Gout *et al.*, 1980**) e induzir a proliferação de prómielócitos (**Nishiguchi *et al.*, 1993**).

O período de amamentação é considerado profilático na prevenção do câncer de mama, porém, paradoxalmente, nesse período, há o aumento temporário do nível de prolactina. Uma possível explicação para essa discrepância seria que a gravidez está associada ao decréscimo no tempo de vida da prolactina (**Clevenger, 2003**) e este fator pode se sobrepor ao aumento hormonal. Outra explicação diz que o efeito da prolactina durante a amamentação pode diferir de seu efeito em outras fases da vida reprodutiva da mulher, p.e., pode levar ao término da diferenciação celular durante a lactação, mas não em outros períodos (**Tworoger *et al.*, 2004**).

1.4. Estrógenos e Progestinas:

Estrógenos e progestinas, esteróides ovarianos, são responsáveis, respectivamente, pela proliferação e crescimento de células relacionadas a vários tecidos e preparação do útero para a gravidez e das mamas para amamentação (**Guyton & Hall, 1998**).

No início da gravidez, o sinciciotrofoblasto (porção fetal da placenta) produz gonadotrofina coriônica e este hormônio estimula a produção inicial de estrógeno e progesterona pelo corpo lúteo. Esses hormônios difundem-se muito precocemente ao sangue materno e sua produção pela placenta aumenta gradativamente ao longo da gravidez (**Garcia & Frenández, 2001**).

Os receptores de progesterona, PR-A e PR-B, são produtos do mesmo gene transcritos sob o controle de dois promotores distintos (**Mulac-Jericevic et al., 2000** e **Mulac-Jericevic et al., 2003**). PR-A e PR-B possuem diferentes isoformas, sendo que PR-B contém uma cauda N-terminal adicional de aproximadamente 165 aminoácidos. A expressão espacial e temporal de PR-A e PR-B varia de acordo com os tecidos reprodutivos, de acordo com o desenvolvimento e estado hormonal, bem como carcinogênese. A ativação de PR-A pela progesterona é necessária e suficiente para o estabelecimento da gravidez. Em contraste, a indução da ativação transcricional de PR-B pela progesterona é insuficiente para a implantação e manutenção da gravidez (**Arck et al., 2007**).

Os dois tipos de receptores de estrógenos, ER α e ER β , têm alto grau de homologia apesar de serem produtos de genes distintos (**Kuiper et al., 1996**) e sua expressão relativa varia consideravelmente de acordo com o tecido ou tipo celular. ER α , por exemplo, tem amplo espectro de expressão, enquanto ER β apresenta padrão restrito, com níveis altos encontrados apenas no ovário, próstata, pulmão, epidídimo e hipotálamo (**Kuiper et al., 1997** e **Couse et al., 1997**).

1.5. Interação Prolactina / Receptores de Estrógeno:

A prolactina pode funcionar como regulador positivo de receptor de estrógeno, estimulando o estradiol a agir positivamente no crescimento de células derivadas de tumor mamário (**Kilic et al., 1998**). A prolactina está mais relacionada a tumores invasivos, particularmente aqueles cujas células são receptor de estrógeno positivo / receptor de progesterona positivo e receptor de estrógeno positivo / receptor de progesterona negativo (**Tworoger, 2004**).

Alguns estudos, porém nem todos, reportam que os receptores de estrógeno e de prolactina são coexpressos (**Gill et al., 2001; Ormandy et al., 1997; Murphy et al., 1984; Bonneterre et al., 1982 e Bonneterre et al., 1986; Reynolds et al., 1997; Waseda et al., 1985; De Plácido et al., 1990; Ben-David et al., 1988**). As diferenças observadas entre esses estudos seriam, então, devido aos diferentes métodos de detecção da prolactina. Portanto, a coexpressão de receptores de receptores de estrógeno e prolactina ainda não é clara.

Rose-Hellekant *et al.* (2003) relatou que camundongos transgênicos, com expressão constante de prolactina, desenvolvem tanto tumores ER+ quanto ER-, apesar de tumores receptor de estrógeno negativos serem extremamente raros em camundongos. Sabendo-se que a exposição à prolactina durante longos períodos pode aumentar a expressão de ER (**Gutzman et al., 2004 e Ormandy et al., 1997**), infere-se, então, que a prolactina pode ser importante no desenvolvimento de tumores ER+. A concentração de prolactina é, portanto, importante no prognóstico de carcinoma mamário, independente da concentração de estrógeno (**Tworoger, 2004**).

2. Objetivos

Pelo exposto na literatura pertinente, a determinação das alterações hormonais bem como os fatores bioquímicos e moleculares envolvidos na associação entre gravidez e câncer tornam-se necessários para perspectivas de novos procedimentos terapêuticos. Desse modo, no presente trabalho avaliou-se ratas prenhes portadoras do carcinossarcoma de Walker 256 e ratas prenhes tratadas diariamente com líquido ascítico (líquido proveniente de animais com tumor de Walker, contendo apenas fatores e citocinas produzidas pelas células do hospedeiro e / ou tumorais) comparando-as com ratas prenhes controles, objetivando-se:

- Verificar a relação entre o número e peso dos fetos e o peso das respectivas placentas dos grupos controle, ascite e tumor;
- Determinar o perfil hormonal relativo à variação de progesterona, estrógeno e prolactina em ratas prenhes dos grupos controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico, através da análise do sangue coletado no último dia de gravidez;
- Avaliar o processo de síntese de progesterona e estrógeno por células de placenta, em cultura, nos grupos controle (grávidas sem tumor), grávidas com tumor e grávidas injetadas com líquido ascítico;
- Analisar a síntese protéica em tecido placentário, *in vivo*, e em cultura de células de placenta, *in vitro*, provenientes de ratas controles, com tumor e injetadas com líquido ascítico;
- Verificar a interação / resposta dos receptores ao estrógeno e à progesterona através de imunohistoquímica de receptores de estrógeno e progesterona em tecido placentário de ratas controle, com tumor e com líquido ascítico;
- Analisar a interferências da citocinas e mediadores catabólicos presentes no líquido ascítico na regulação hormonal da gravidez, bem como sua influência no desenvolvimento placentário e fetal.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais:

Foram analisadas aproximadamente 70 ratas Wistar adultas, com 90 / 100 dias de idade e peso corporal médio de 185 +/- 10g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp (Cemib). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição e Câncer do Departamento de Fisiologia e Biofísica, no Instituto de Biologia, em gaiolas coletivas, com controle da temperatura ambiente (22 +/- 2°C) e ciclo claro-escuro (12/12 horas). Também receberam dieta semipurificada (18% de proteína, 63% de carboidrato, 7% de gordura e 5% de fibras (Reeves *et al.*, 1993)) e água *ad libitum*.

3.2. Cruzamento:

As fêmeas foram aleatoriamente mantidas *overnight* com machos, seguindo o sistema de harém descrito por Baker (1991), 4 fêmeas e 1 macho por gaiola. O primeiro dia de gravidez foi definido quando detectou-se a presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. As fêmeas grávidas foram, então, distribuídas em 3 diferentes grupos: Controle (**C**; grávidas sem tumor), grávidas com tumor sólido (**W**) e grávidas com líquido ascítico (**A**).

3.3. Implante do tumor:

Neste trabalho foram utilizadas células neoplásicas obtidas do Carcinossarcoma de Walker 256, provenientes da linhagem do Banco de Tumores Christ Hospital Line, Arthur D. Little, EUA. As células do carcinossarcoma foram mantidas *in vivo*, a cada 7 dias, após a inoculação na cavidade abdominal de ratos machos.

Após o período de aproximadamente 6 dias, o líquido ascítico formado pelo desenvolvimento neoplásico, foi retirado e centrifugado e as células que se depositaram, após centrifugação, foram ressuspensas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) colocadas

em gelo sob agitação lenta. O número de células viáveis da suspensão (aproximadamente $0,25 \times 10^6$ em 0,5 mL de solução salina) foi avaliado pelo método de exclusão com azul de Tripán e 0,2 mL e injetado subcutaneamente no flanco de ratas (grupo **W**), sem anestesia, a partir do segundo dia de prenhez. O sobrenadante do líquido ascítico centrifugado (líquido ascítico sem os componentes celulares) foi guardado em freezer a -20°C , para posterior inoculação no grupo **A**, fêmeas grávidas com ascite (**Gomes-Marcondes et al., 1998**). O grupo **C** recebeu inoculação de NaCl (0,9%) no subcutâneo da região do flanco para simulação do grupo **W**.

A partir do 9º dia do experimento (data que corresponde ao momento em que o tumor tornou-se palpável nos animais inoculados com câncer), o grupo **A** recebeu inoculação diária de 2,0 ml de líquido ascítico, via intraperitoneal até 20º dia de experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 8h e 10h, 18 dias após o implante do tumor, correspondendo ao 20º dia de gravidez. O tratamento de todos os animais e em especial dos animais portadores de tumor estão de acordo com o comitê internacional de pesquisa em câncer (UKCCCR National Register of Cancer Trials (**Vale et al., 2005**), seguiram protocolo experimental aprovado pelo Comissão de Ética para Experimentação Animal (CEEAA-IB) da UNICAMP, sob número 217-5.

3.4 Cultura primária de células placentárias.

Os tecidos placentários, de cada rata de cada grupo experimental, foram tratados com meio de cultura acrescido de 0,25 mg/mL de tripsina para dissociação dos diferentes tipos celulares. Após subseqüentes lavagens e centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em DMEM com 2% de soro fetal bovino (FCS), 5 mM de glicose e 20 mM de HEPES. As suspensões de células de placentas foram distribuídas nas placas de 6 poços para cultura de tecido e incubadas a 37°C , a atmosfera de 5% de CO_2 por 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e centrifugado sob refrigeração, a $2.000 \times g$ durante 20 minutos para separação do sobrenadante. Após essa separação, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C para posterior imunoprecipitação e dosagem hormonal.

3.5. Análise de Síntese e Degradação Protéica Placentária em Cultura Primária:

Duas placentas foram retiradas aleatoriamente de cada animal no dia do sacrifício, correspondente ao 20º de prenhez, dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Essas placentas foram, então, mantidas em meio DMEN e trituradas em pedaços de aproximadamente 1 mm. Os tecidos placentários foram tratados com meio de cultura acrescido de 0,25 mg/mL de tripsina para dissociação dos diferentes tipos celulares. Após subseqüentes lavagens e centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em DMEM com 2% de soro fetal bovino (FCS), 5 mM de glicose e 20 mM de HEPES. As células foram cultivadas em placas de 24 wells, sendo colocados 0,5 ml de meio com células em cada poço.

Após 48 horas, o meio foi retirado e substituído por DMEN sem fenol acrescido de 0,2 uL de L-[2,6³H]-fenilalanina (0.67 µCi/mM em DMEM acrescido de 2 mM/L fenilalanina fria). No último poço sem células, que foi tomado como controle branco, havia a mesma quantidade de meio e também de fenil que foi adicionada aos poços que continham células. Após 19 horas, todo meio foi recolhido para análise de síntese protéica e, então, substituído por mais 0,5 mL de DMEN sem fenol em cada poço. Após 24 horas, o meio e as células foram recolhidos para análise de degradação protéica.

Para análise de síntese protéica, o meio de cultura recolhido após 19 horas de incubação (500µL) foi acrescido com 3 mL de líquido de cintilação. A leitura foi realizada em Contador β (Beckman LS 6000TA).

Por sua vez, para a análise de degradação protéica, o meio de cultura e células foram recolhidos e centrifugados para precipitação das células. Adicionou-se, então, 100 µL de ácido tricloroacético (TCA, 10%) às amostras, e as mesmas foram centrifugadas por mais duas vezes.

O meio de cultura foi então retirado e ao precipitado adicionaram-se 500 µL de NaOH em cada amostra, e estas foram, então incubadas por 30 minutos à 45° C. Após esse período o precipitado foi, então, ressuspendido e em seguida centrifugado por mais 15 minutos. Foram retirados, então 400 µL da solução (meio ou precipitado celular) e

adicionados 3 mL de líquido de cintilação. A leitura também foi realizada em Contador β (Beckman LS 6000TA).

3.6. Análise de Síntese e Degradação Protéica Placentária em tecido fresco:

Durante o sacrifício, extraiu-se uma placenta de cada animal de cada grupo e a mesma foi dividida em duas partes, sendo uma delas utilizada para análise de síntese e outra de degradação protéica.

3.6. a) Síntese protéica:

Parte do tecido placentário foi colocado em tubo de perfusão com tampão Krebs-Hanseleits (KHB) (110mM NaCl; 25mM NaHCO₃, 3,4mM KCl; 1mM CaCl₂, 1mM KH₂PO₄; 1mM MgSO₄, 5,5mM glicose, 0,01% albumina bovina sérica, pH 7,4), incubado à 37 °C com agitação contínua e gaseamento com 95% O₂ e 5% CO₂ (**Vary et al., 1998** e **Fedele et al., 2001**) durante 30 minutos.

Após esse período, adicionou-se novo tampão KHB suplementado com L[³H]-fenilalanina (Amershan) e fenilalanina não marcada com radioisótopo. Ao final de 2 horas de incubação, as placentas foram retiradas do meio, secadas, pesadas, congeladas e guardadas em -20 °C, enquanto o meio de incubação foi utilizado para dosagem de fenilalanina marcada.

As placentas foram homogenizadas em TCA 30% e centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 10.000 x g. O precipitado foi, então, lavado por duas vezes com TCA 10% para eliminar a radioatividade, e então resuspendido em NaOH 1N e incubado a 40°C por 30 minutos.

Alíquotas foram analisadas quanto ao teor de proteína (**Lowry et al, 1951**) e também mediu-se a radioatividade, com líquido de cintilação, em Contador β . A taxa de síntese protéica foi calculada dividindo-se a concentração de fenilalanina incorporada no precipitado protéico pela radioatividade da fenilalanina no meio de incubação. A síntese protéica foi expressa em nmol de fenilalanina incorporada por miligrama de proteína por hora.

3.6. b) Degradação Protéica

A outra porção da placenta foi utilizada para análise da degradação protéica, sendo inicialmente incubada por 30 min a 37°C com meio RPMI 1640 sem fenol. Após este período, realizou-se a incubação com solução KHB acrescido de ciclohexamida (inibidor de síntese protéica), por 2 horas à 37°C, gaseado com 5% CO₂ e 95% O₂.

Em seguida, o tecido incubado foi homogeneizado utilizando-se solução KHB na proporção de 1:3 e precipitou-se uma alíquota desse homogeneizado com TCA (30%), seguido por centrifugação à 10.000 xg por 10 min. A dosagem de tirosina incorporada no tecido foi medida fluorimetricamente do sobrenadante, segundo método de Waalkes & Udenfriend (1957), utilizando-se reagente 1-nitroso-2-naphthol e ácido nítrico (20%).

3.7. Dosagem Hormonal em Soro:

As dosagens séricas de estrógeno e progesterona foram realizadas através de método enzimático de imunoluminescência, utilizando-se o aparelho Immulite DPC - Med Lab. As dosagens foram feitas de acordo com o kit específico (Immulite[®] 1000 Progesterone, Immulite[®] 1000 Estradiol) e especificações fornecidas pela Siemens Medical Solutions Diagnostics (Los Angeles, USA).

A dosagem sérica de prolactina, por sua vez, foi realizado pelo método de Elisa Sandwich (kit DSL10-4500 fabricado pela Diagnostics Systems Laboratories, Inc; Texas, USA). Foram utilizadas placas de poliestireno previamente revestidas com IgG sérica de cabra anti-soro de coelho anti-Prolactina, seguindo-se instruções do fabricante. Adicionaram-se, a essas placas, 25 µL de padrões de prolactina, nas concentrações 0,0, 2,0, 6,0, 20,0, 60,0 e 180,0 ng/mL, diluídas em soro de porco, 25 µL das soluções controle e 20 µL das amostras de soro a serem analisadas, seguindo-se da adição de 100 µL de tampão de ensaio e suave agitação da placa por cerca de 10 segundos. A placa foi, então, incubada sob agitação orbital média (500 rpm), por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, utilizando-se 200 µL de tampão de lavagem por cavidade em cada lavagem. Adicionaram-se, então, 100 µL de solução conjugado enzimático anticorpo (diluição, na razão 1:50 em

tampão de ensaio, de anticorpo anti-prolactina conjugado com enzima peroxidase de rábano (HRPO)) diluído em tampão protéico (BSA) em cada cavidade. Em seguida, a placa foi incubada, em agitação orbital moderada por 1 hora, à temperatura ambiente. Após esse procedimento, a placa foi lavada 5 vezes, utilizando-se 200 μ L de tampão de lavagem por cavidade em cada lavagem. Posteriormente, 100 μ L de solução cromógena TMB foram adicionados em cada cavidade, agindo por aproximadamente 10 minutos, sem exposição à luz, em agitação rápida, à temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se, em cada cavidade, 100 μ L de solução de parada (0,2 M de ácido sulfúrico) e a leitura da absorbância foi feita em 420 e 620 nm.

3.8. Dosagem Hormonal no meio de cultura primária placentária:

Meio de cultura primária foi recolhido após 72 horas, centrifugado para a exclusão das células presentes e, então, utilizado para análise da produção placentária de estrógeno e progesterona através da quantificação desses hormônios a partir de método enzimático de imunoquimioluminescência, utilizando-se o aparelho Immulite DPC - Med Lab, As dosagens foram feitas de acordo com o kit específico - Immulite[®] 1000 Progesterone e Immulite[®] 1000 Estradiol - fornecido pela Siemens Medical Solutions Diagnostics (Los Angeles, USA). A dosagem de prolactina, do meio de cultura, foi realizada, também, através do método Elisa Sandwich (kit DSL10-4500 fabricado pela Diagnostics Systems Laboratories, Inc; Texas, USA), conforme descrito anteriormente.

3.9. Western blotting:

Amostras de placenta, submetidas ao ensaio de degradação protéica, foram homogeneizadas utilizando-se tampão de homogeneização (20 mM Tris, 1mM DTT, 2 mM ATP e 5 mM MgCl₂), na proporção de 1:4 e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos, à 10.000 rpm e 4°C.

Alíquotas de 5 μ L foram retiradas de cada amostra para quantificação do teor total de proteína pelo método de Lowry *et al.* (1951). O resultado obtido foi usado para calcular a quantidade de amostra (de forma que todas tivessem a mesma quantidade de proteína).

Foram adicionados 100 μ L do homogenizado placentário já centrifugado e 100 μ L de tampão de amostra e os mesmos foram colocados em banho-maria por 5 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida através de choque térmico.

Foi realizada, então, eletroforese pelo método Laemmli SDS-PAGE, utilizando-se concentração de 5% gel de empilhamento e 12% gel de resolução e aplicou-se 30 μ g de proteína de cada amostra em cada poço, para que fossem separadas pelo peso molecular.

As proteínas, assim separadas em cada gel, foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 μ m. Após estarem secas, essas membranas foram deixadas sob agitação lenta em PBS Tween 0,1% acrescido de 5 % de leite desnatado (Molico ®) por 1 hora e, posteriormente, mais 1 hora secando.

Lavou-se, então, as membranas com PBS 0,5% de Tween, por 3 vezes de 15 minutos cada e em seguida, adicionou-se os anticorpos primários para receptores de estrógeno (ER α (MC-20): sc-542) e progesterona (PR (C-20): sc-539), diluídos 1:500 μ L em PBS Tween 0,1% e deixados *overnight*.

Posteriormente, as membranas foram lavadas por 4 vezes de 15 minutos com PBS Tween 0,1% e adicionou-se o anticorpo secundário (goat anti-rabbit IgG-B; cat # 2040), também diluído em PBS 0,1% de Tween, na razão de 1:400, e mantido sobre a membrana, em agitação lenta, por 2 horas.

Após esse período, as membranas foram lavadas, por 3 vezes de 15 minutos cada, e reveladas por reação de quimioluminescência, realizada com o reagente ECL (Amershan), utilizando-se filme hipersensível. As imagens de cada revelação foram capturadas em fotocomentador (Amershan) e análise da densidade óptica de expressão protéica foi realizada utilizando software Gel-Pro Analyser (v.3.0 Windows Media Cybernetcs, USA).

3.10. Inclusão em Histo-Resina:

Duas amostras de placenta foram retiradas aleatoriamente de cada animal, dos diferentes grupos, para inclusão em histo-resina e posterior análise morfológica dos tecidos, morfometria, contagem de núcleos e relação deste valor com a quantidade de hormônio obtida em cada uma das dosagens.

Resina pura foi misturada com o polimerizador na proporção de 7:0,5 mL e a mistura foi mantida em gelo para retardar a polimerização. Aplicou-se uma fina camada de silicone líquido em cada uma das placas, onde seriam colocadas as amostras e também foram colocadas em gelo.

Preencheu-se, o espaço em que as amostras seriam colocadas em cada uma das placas com o polimerizador e, finalmente, adicionou-se a ele a amostra de tecido. Após a polimerização, realizaram-se cortes histológicos com 0,3 μm de espessura, as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de luz Leica[®].

Para análise morfométrica utilizou-se software Image-Pro Plus (v 1.0 Windows, Media Cybernetics, USA).

3.11. Imunohistiquímica:

Duas placentas retiradas aleatoriamente de cada animal, durante o sacrifício, foram fixadas em solução de paraformaldeído (4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4), durante 48 horas. Após serem fixadas, as placentas foram, então, desidratadas em bateria de álcool e posteriormente, embebidas em parafina.

Foram obtidos cortes de 5 μm de espessura para análise imunohistológica com anticorpos primários específicos para receptores de progesterona (PR (C-20): sc-539) e estrógeno (ER α (MC-20): sc-542).

Os cortes histológicos foram desparafinizados e mantidos em água destilada. E em seguida, lavados em tampão fosfato (PBS) durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Os cortes foram, então, incubados em tampão fosfato acrescido de 0,3% de peróxido de hidrogênio, por 30 minutos, e após esse período lavadas novamente em PBS, por 5 minutos.

Em seguida, os tecidos foram mantidos por mais 30 minutos, à temperatura ambiente, em PBS contendo 1% de soro bovino (BSA) e após esse período, incubados *overnight* em câmara úmida, à temperatura de 4°C, com o anti corpo primário específico, diluído 1:100 em PBS com 1% de BSA.

Os cortes foram, então, lavados em PBS em duas etapas de 15 minutos cada uma, à temperatura ambiente, e em seguida incubou-se com o anti-corpo secundário (Goat anti-rabbit, conjugado com peroxidase, na diluição de 1:200, em tampão PBS com BSA, durante 45 minutos em câmara úmida, também à temperatura ambiente.

Realizou-se, então, duas novas lavagens, de 15 minutos cada, com tampão Tris-HCl salino (NaCl 0,15 M e Tris-HCl 0,05 M de pH 7,6), à temperatura ambiente e então, os cortes histológicos foram mantidos em solução reveladora de diaminobenzidina (DAB; 500 µL de DAB, 4,5 mL de TSB e 4 µL de H₂O₂). Após a revelação, os tecidos foram lavados em água destilada e contracorados com hematoxilina, seguida de solução de lítio em água destilada.

Finalmente, os tecidos foram rehidratados e foi realizada a montagem das lâminas em meio sintético e a análise foi realizada em microscópio de luz Leica®. A contagem de células marcadas foi realizada a partir de software Image-Pro Plus (v. 1.0 for Windows, Media Cybernetics, USA).

3.12. Análise estatística:

Foram utilizados métodos estatísticos adequados para comparação entre os grupos experimentais, utilizando-se método de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Bonferroni, para comparação múltipla entre os grupos e detecção de diferenças significativas (**Gad & Weil, 1994**).

4.Resultados

4.1. Comparação entre os pesos dos fetos dos diferentes grupos:

Pudemos observar, em relação ao peso dos fetos de cada um dos grupos, que os grupos Ascite e Tumor apresentaram redução acentuada de peso quando comparados ao grupo Controle (**Tabela 1** e **Figura 2**). Da mesma forma, o grupo Ascite apresentou peso ligeiramente menor que do grupo Tumor. A análise estatística mostrou-nos haver diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e os grupos Tumor e Ascite, sendo o valor de P menor que 0,0001.

Tabela 1: Pesos (g) e número dos fetos obtidos em animais dos grupos Controle, Tumor e Ascite.

	Controle (76)	Tumor (44)	Ascite (42)
Peso dos fetos (g)	2,45 ± 0,02	1,96 ± 0,03*	1,91 ± 0,03*
Número de fetos	8,21 ± 0,65	7,72 ± 0,68	7,75 ± 0,76

Resultados expressos em média ± erro padrão da média; () representa o número de animais por grupo.

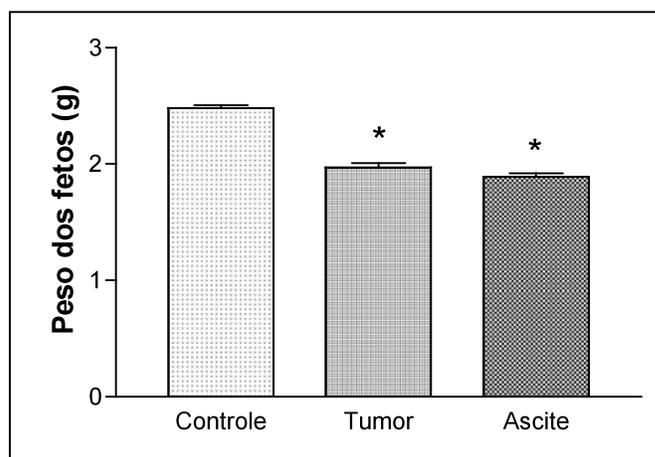


Figura 1: Peso dos fetos observado nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Resultados expressos em média ± erro padrão da média.

* Análise estatística mostra diferença significativa entre grupo Controle e os grupos Tumor e Ascite ($P < 0,01$).

Além disso, também pudemos observar que houve redução no número de fetos dos grupos Tumor e Ascite, quando comparados ao Controle, sendo portanto, semelhante aos dados obtidos por Gomes-Marcondes (1994 e 1998).

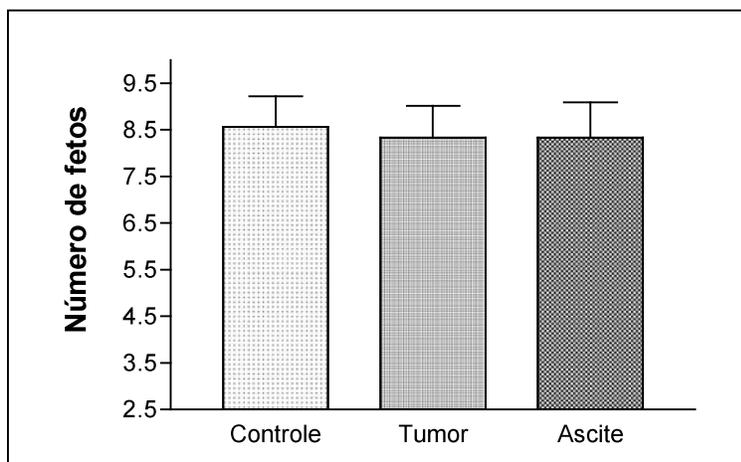


Figura 2: Número de fetos encontrado por fêmea nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra não haver diferença significativa entre os grupos.

4.2. Análise de Síntese e Degradação Protéica em Tecido Placentário dos diferentes grupos experimentais:

Após a retirada do tecido placentário fresco do animal, avaliamos a concentração de proteína presente nas placentas dos grupos C, W e A, assim como analisar a síntese e degradação protéica realizada por esses mesmos tecidos.

Observamos que a concentração protéica placentária foi menor nos grupos Tumor e Ascite quando comparado ao grupo Controle. Por sua vez, o grupo Tumor apresentou concentração protéica placentária mais elevada que o grupo Ascite, mas também sem apresentar diferença significativa (**Figura 3**). O teste estatístico mostrou-nos haver diferença significativa entre os grupos, sendo o valor de P igual a 0,0157.

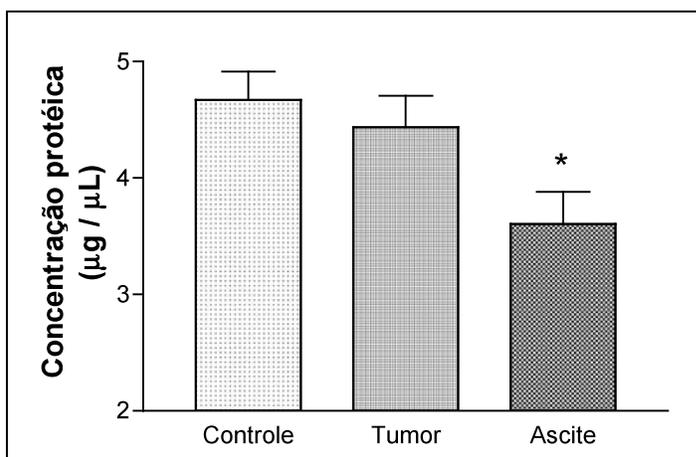


Figura 3: Concentração protéica encontrada ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) nos grupos Controle, Tumor e Ascite. A análise estatística apresentou diferença significativa entre os grupos (* $P < 0,05$). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média.

Analisando-se a síntese protéica placentária, verificamos que esta se encontra acentuadamente reduzida no grupo Tumor e com redução ainda mais pronunciada no grupo Ascite, quando comparadas ao grupo Controle (**Figura 4**). A diferença estatística entre os grupos foi significativa, destacando-se principalmente a observada entre os grupos Controle e Ascite, cujo valor de P foi menor que 0,001.

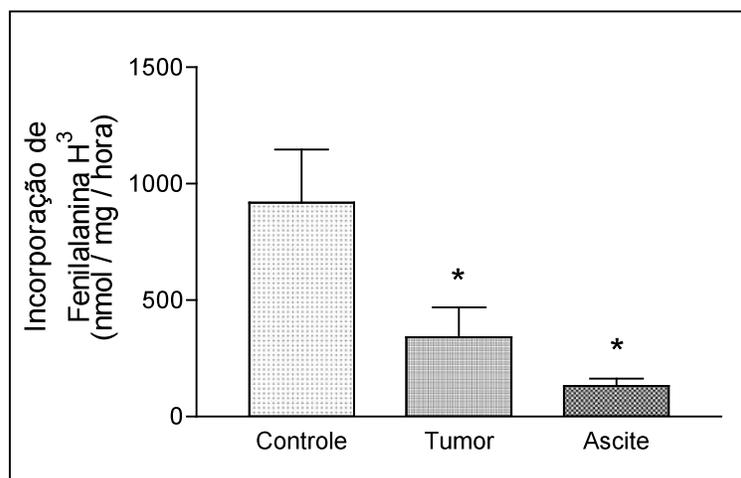


Figura 4: Análise de síntese protéica (nmol / mg / hora) nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Tumor ($P < 0,05$) e entre Controle e Ascite (* $P < 0,01$).

Analizamos também a taxa de degradação protéica através da quantificação da tirosina presente no tecido placentário. O resultado obtido mostrou-nos que o grupo Tumor apresentou quantidade reduzida de tirosina em seu tecido placentário, quando comparado ao grupo Controle (**Figura 5A**), indicando, portanto, maior liberação desse aminoácido para o meio e, com isso, maior degradação protéica. Da mesma maneira, o grupo Ascite apresentou quantidade de tirosina tecidual ainda menor que o grupo Tumor, mostrando que a taxa de degradação protéica foi ainda mais elevada nesse grupo (**Figura 5B**). A análise estatística mostrou-nos haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, apresentando valor de P igual a 0,0454.

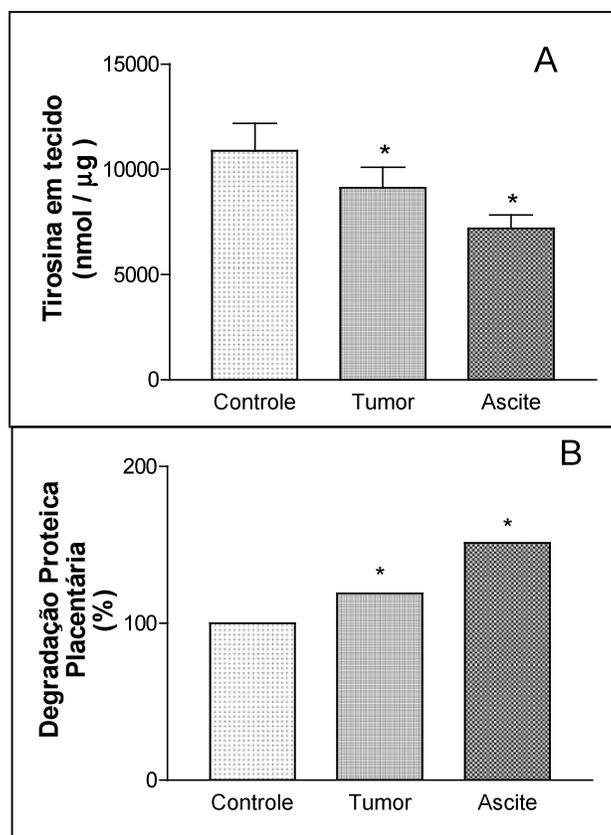


Figura 5: Concentração de tirosina placentária (nmol/μg de proteína tecidual; **A**) e degradação protéica placentária (%; **B**) nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados, gráfico A, encontram-se expressos em média ± erro padrão da média e em porcentagem em relação ao grupo C. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Ascite (* P < 0,05).

4.3. Contagem de núcleos em tecido placentário:

Após o sacrifício dos animais, duas amostras de placenta, por fêmea de cada grupo, foram tratadas e, posteriormente, incluídas em historesina para observação da estrutura tecidual e contagem de núcleos em cada uma das regiões placentárias (decídua basal, espongio trofoblasto e labirinto trofoblástico) em cada um dos grupos analisados (C, W e A), como observamos na Tabela 2.

Tabela 2: Número de núcleos nas diferentes regiões da placenta (decídua basal, espongiotrofoblasto e labirinto placentário) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.

	Controle	Tumor	Ascite
Decídua basal	59,00 ± 2,18	55,00 ± 1,79	46,00 ± 2,69*
Espongiotrofoblasto	17,30 ± 0,76	15,00 ± 0,63*	17,50 ± 0,71
Labirinto placentário	27,00 ± 0,68	25,00 ± 0,85	26,00 ± 0,88
Total	27,00 ± 1,57	25,00 ± 1,50	25,00 ± 1,54

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. * p<0,05 diferença estatística em relação a C.

Pudemos observar que, na região da decídua basal, as placentas do grupo Ascite apresentaram menor contagem de núcleos do que nos grupos Controle e Tumor, sendo inclusive significativamente diferente do grupo Controle. O grupo Tumor, por sua vez, apresentou discreta redução do número de núcleos da decídua basal quando comparado ao grupo Controle (**Figura 6**).

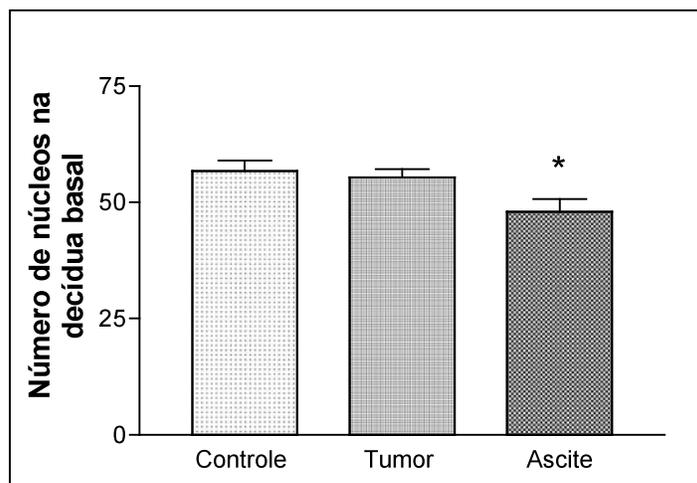


Figura 6: Número de núcleos observados na região da decídua basal nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média ± erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Ascite (* P < 0,05).

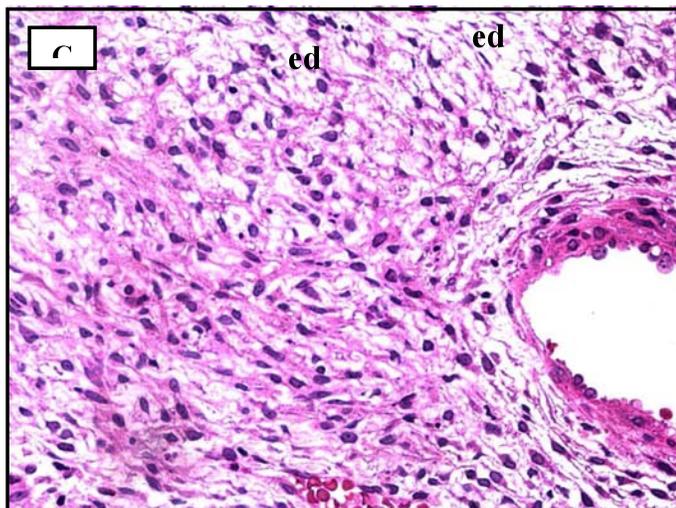
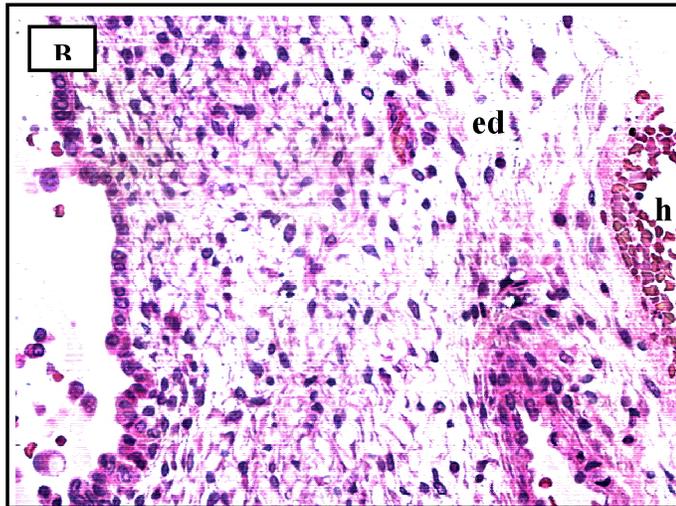
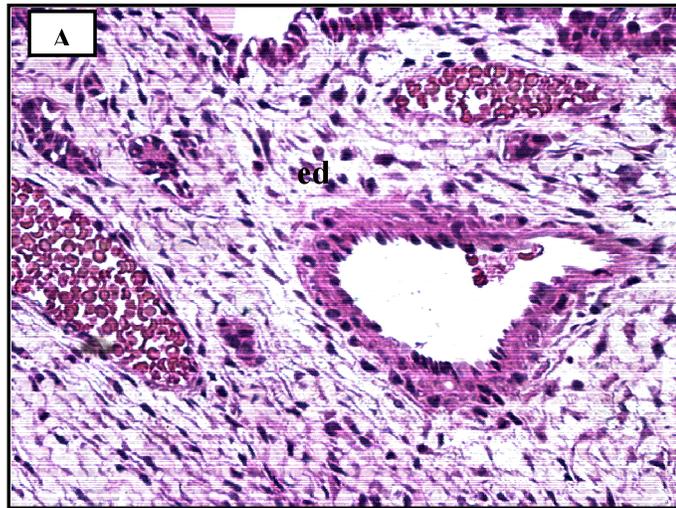


Figura 7: Análise morfológica da decídua basal das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 μm e aumento de 400x. **A:** Detalhe da decídua basal no grupo Controle; **B:** Decídua basal de placenta do grupo Tumor, apresentando área edemaciada (**ed**) e hemorrágica (**h**); **C:** Decídua basal de placenta do grupo Ascite apresentando pontos com edema (**ed**).

Na região do espongiotrofoblasto a contagem de núcleos do grupo Tumor apresentou redução acentuada em relação aos grupos Controle e Ascite que apresentaram contagem semelhante. A diferença entre os grupos Controle e Tumor é estatisticamente significativa, sendo $P < 0,05$ (**Figura 8**).

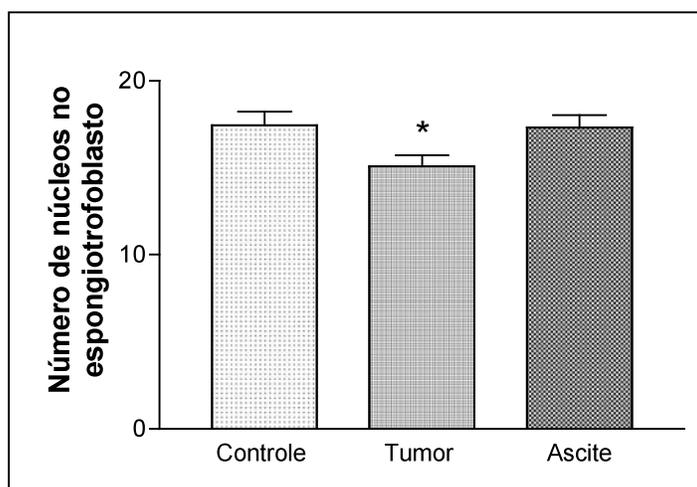


Figura 8: Número de núcleos dos grupos Controle, Tumor e Ascite na região do espongiotrofoblasto. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Tumor (* $P < 0,05$).

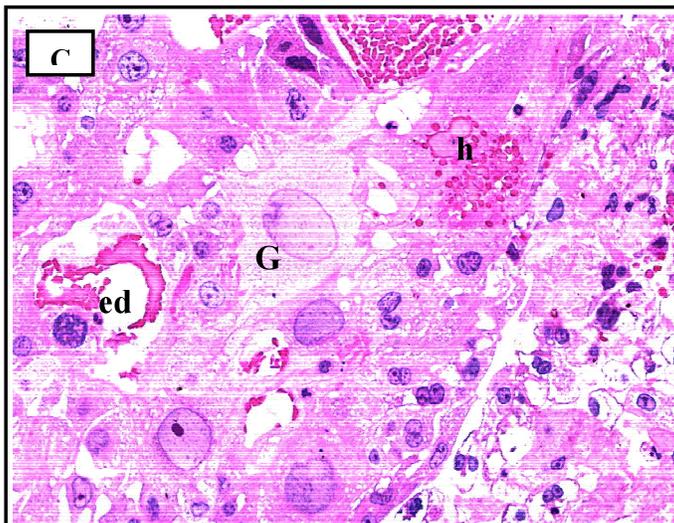
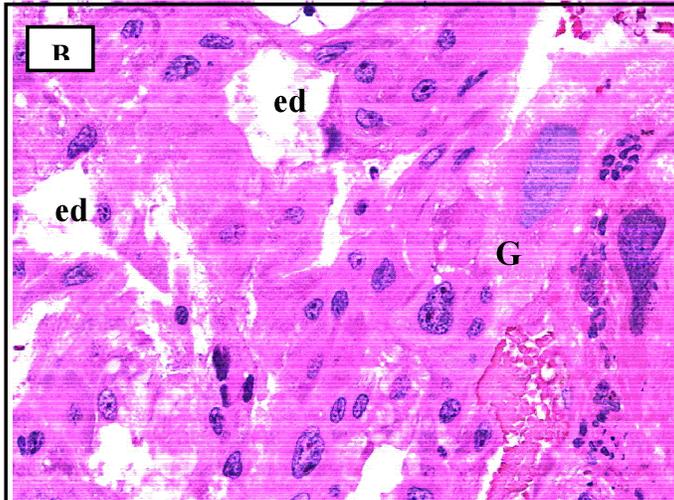
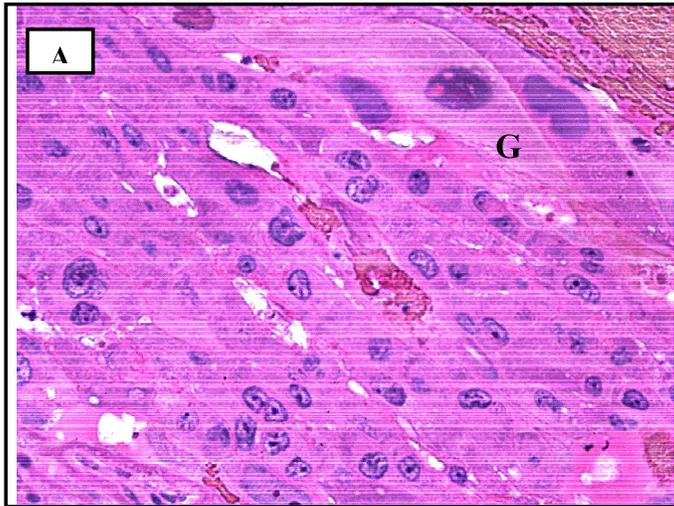


Figura 9: Análise morfológica do espongiotrofoblasto e células gigantes (**G**) das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 µm e aumento de 400x. **A:** Detalhe do espongiotrofoblasto no grupo Controle, onde observamos a presença de células trofoblásticas gigantes (**G**) bem definidas, bem como grande coesão entre as células do tecido; **B:** Espongiotrofoblasto de placenta do grupo Tumor, apresentando área edemaciada (**ed**) e célula trofoblástica gigante (**G**) com limites pouco definidos; **C:** Espongiotrofoblasto de placenta do grupo Ascite apresentando edema (**ed**), área hemorrágica (**h**) e célula trofoblástica gigante (**G**) com limites pouco definidos.

Na região do labirinto placentário, por sua vez, a contagem de núcleos não nos mostrou diferença, estatisticamente significativa, entre os grupos, havendo, porém, tendência à redução nesse número no grupo Ascite e discretamente mais acentuada no grupo Tumor, como observamos na Tabela 2 e Figura 10.

Entretanto, quando se avaliou a somatória da contagem de núcleos das três regiões notou-se que houve tendência ao decréscimo nos dois grupos experimentais, com tumor e inoculado com líquido ascítico (**Figura 11**), justificando assim a suposição para danos celulares, em consequência à morte celular e/ou menor proliferação, em função de prejuízo da maturação tecidual placentária nesses grupos. As Figuras 7, 9 e 12 mostram os aspectos morfométricos das diferentes camadas placentárias dos diferentes grupos, controle, tumor e ascite, indicando lesões hemorrágicas, regiões edemaciadas e alteração da população celular.

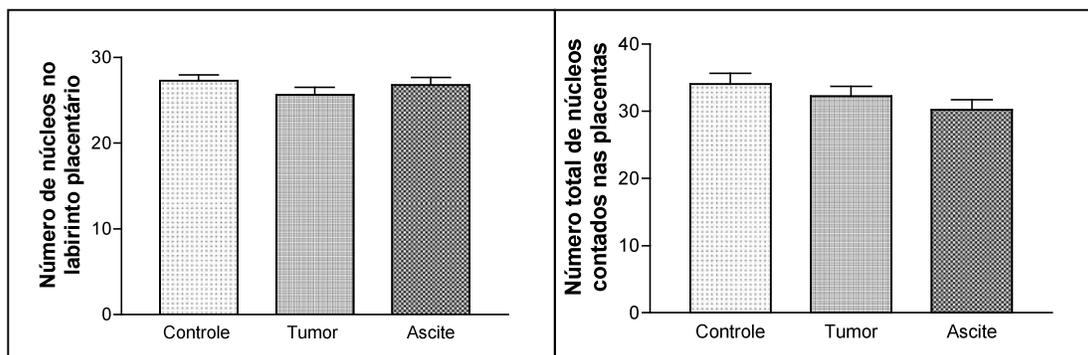


Figura 10: Número de núcleos dos grupos Controle, Tumor e Ascite na região do labirinto placentário. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra não haver diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 11: Número total de núcleos dos grupos Controle, Tumor e Ascite em todas as áreas analisadas das placentas (decídua basal, espongiotrofoblasto e labirinto trofoblástico). Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra não haver diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

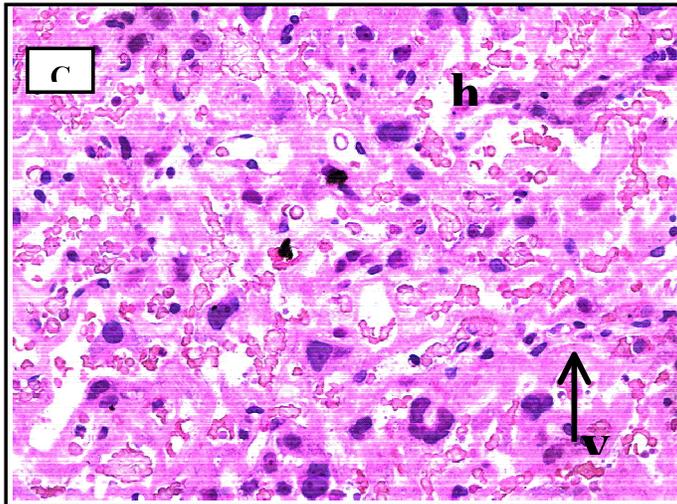
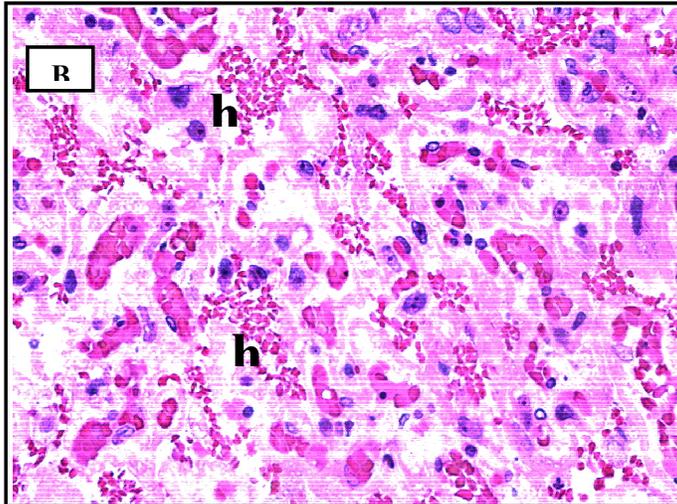
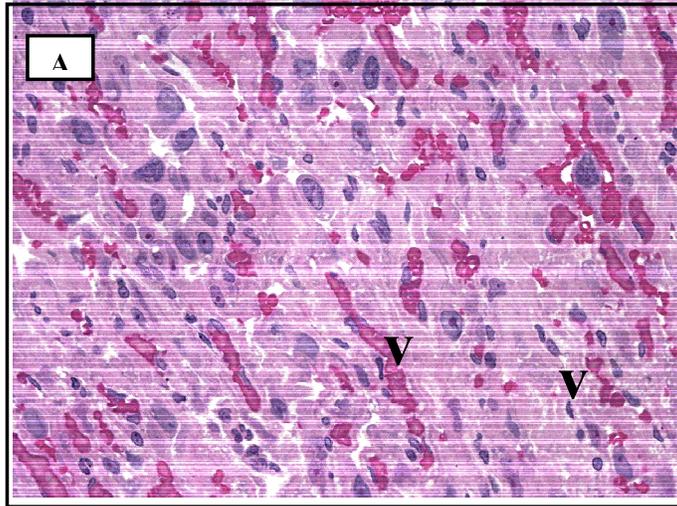


Figura 12: Análise morfológica do labirinto das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 μm e aumento de 400x. **A:** Detalhe do labirinto no grupo Controle, onde observamos a existência de vasos (**v**); **B:** Labirinto de placenta do grupo Tumor, apresentando áreas com extravasamento de sangue entre os espaços lacunares (**h**) e pouca definição de vasos (**v**); **C:** Labirinto de placenta do grupo Ascite apresentando áreas hemorrágicas (**h**) limite vasculares pouco definidos (**v**).

4.4. Análise de síntese e degradação protéica em cultura de células placentárias:

Quando analisamos a concentração de fenilalanina marcada no meio de cultura placentária, verificamos que os grupos Tumor e Ascite apresentaram redução da síntese em relação ao grupo Controle. Por sua vez, o grupo Ascite apresentou maior síntese que a apresentada pelo grupo Tumor, como observamos na figura 13. A análise estatística não mostrou diferença significativa dos grupos W e A, quando comparados ao Controle.

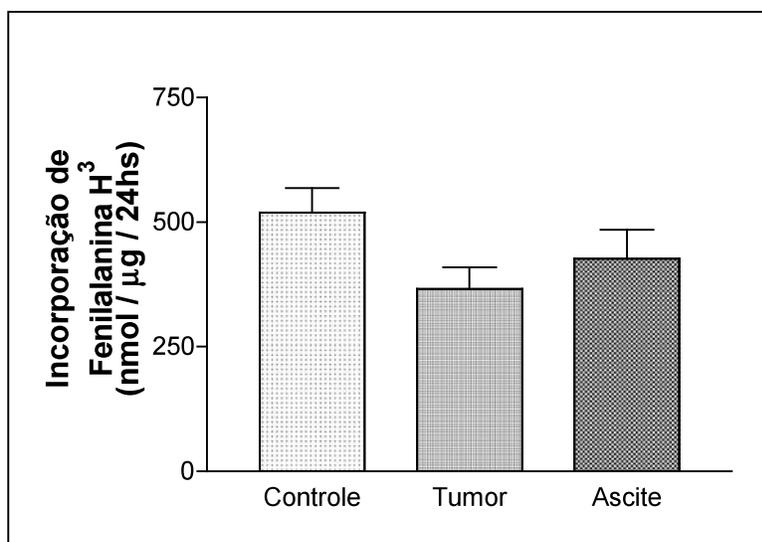


Figura 13: Síntese protéica em cultura celular primária de placentas provenientes de ratas controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística mostra não haver diferença significativa entre os grupos, sendo valor de $P > 0,05$.

Em relação à degradação protéica da cultura de células placentárias, analisando-se a liberação de fenilalanina marcada para o meio de cultura, as placentas provenientes dos grupos Controle e Ascite apresentaram tendências de valores semelhantes. O grupo Tumor, por sua vez, apresentou elevado valor de degradação protéica, maior que aos observados nos outros grupos (**Figura 14**).

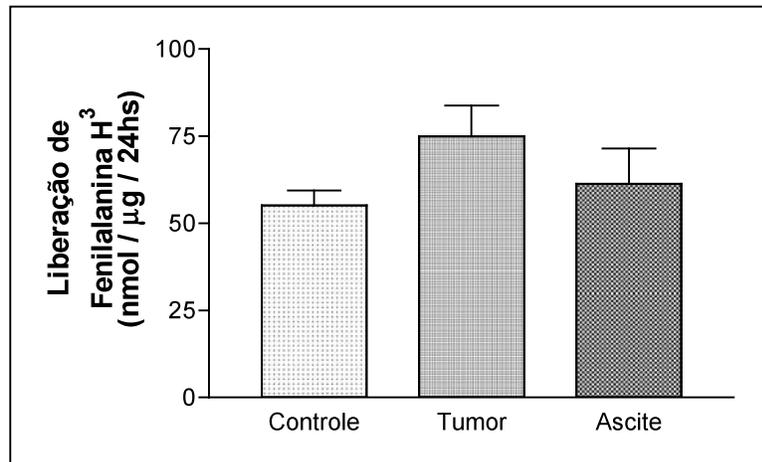


Figura 14: Degradação protéica em cultura celular primária de placentas provenientes de ratas controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico. Resultados expressos me média \pm erro padrão da média. Apesar da diferença observada entre os grupos, a análise estatística não apresentou diferença significativa, sendo valor de $P > 0,05$.

4.5. Dosagem hormonal em meio de cultura de células placentárias:

4.5. a) Estrógeno:

A concentração de estrógeno dos meios de cultura de células de placenta, provenientes de animais dos três grupos experimentais, mostrou-nos haver tendência à elevação na quantidade da produção desse hormônio por células placentárias do grupo Tumor, seguidas pelas do grupo Ascite, sendo a quantidade obtida na dosagem desses grupos mais elevada que a obtida no grupo Controle (**Figura 15**).

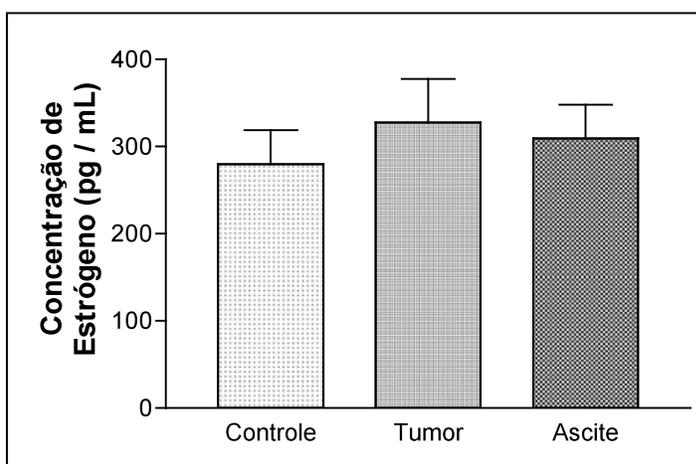


Figura 15: Concentração de estrógeno (pg/mL) em meio de cultura primária de placentas provenientes dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os grupos, sendo valor de $P > 0,05$.

4.5. b) Progesterona:

A concentração de progesterona dos meios de cultura de células placentárias mostrou-se reduzida nos grupos Tumor, e Ascite quando comparado ao produção desse hormônio pelas células do grupo Controle (**Figura 16**).

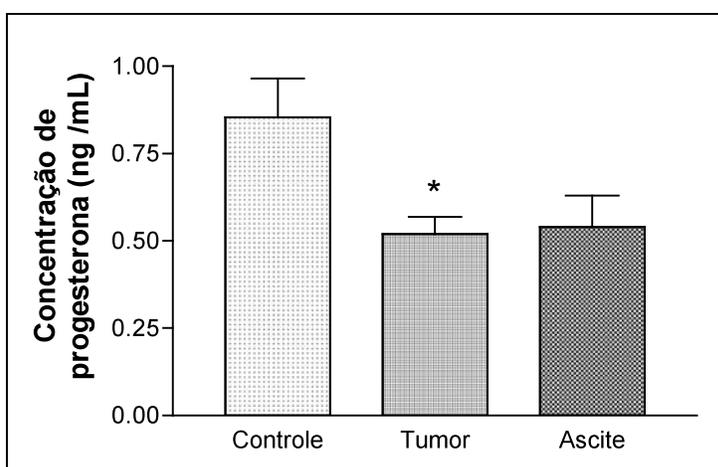


Figura16: Teor de progesterona (ng/mL) em meio de cultura primária de células placentárias provenientes dos grupos Controle, Tumor e Asite. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos Controle e Tumor, sendo * P igual a 0,0186. A comparação entre os outros grupos, porém, não apresentou diferença significativa, e o valor de P é igual a $P > 0,05$.

4.5. c) Prolactina:

A concentração de prolactina no meio de cultura de células placentárias, mostrou-nos que a quantidade desse hormônio produzida pelas células dos grupo Tumor e Ascite foi superior à produção pelas células do grupo Controle. Porém, a produção de prolactina pelas células do grupo Ascite ainda foi discretamente mais elevada que a do grupo Tumor (**Figura 17**).

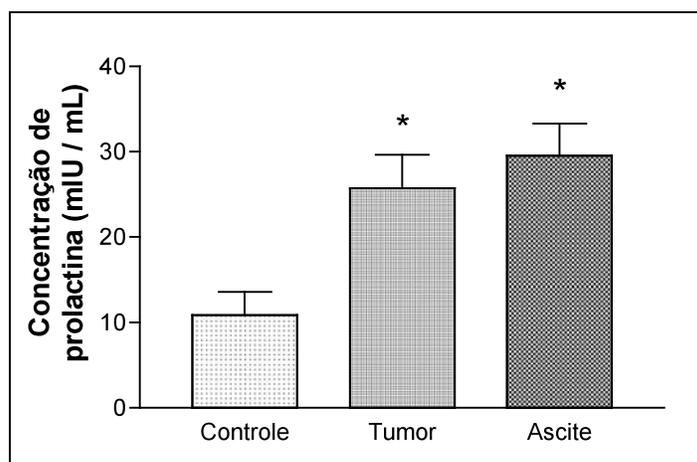


Figura 17: Teor de prolactina (mIU/mL) em meio de cultura primária das células placentárias provenientes dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. * A análise estatística mostrou haver diferença significativa entre o grupo Ascite em relação ao Controle ($P < 0,01$) e Tumor em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$).

4.6. Resposta do tecido placentário aos hormônios produzidos:

Analisamos a resposta do tecido placentário aos hormônios estrógeno e progesterona através da quantificação de receptores para esses hormônios que são encontrados em tecido placentário, através de Western Blot e Imunohistoquímica.

4.6. 1. a) Quantificação de receptores de estrógeno (ER α) por Western Blotting:

Através da análise da densidade óptica da banda referente ao receptor de estrógeno (ER α), observamos que a quantificação da densidade óptica encontrada nas bandas referentes aos grupos Tumor e Ascite foi mais intensa que a observada ao grupo Controle. Por sua vez, a densidade óptica das imagens obtidas do grupo Ascite foi menor que a do grupo Tumor (**Figuras 18 e 19**).

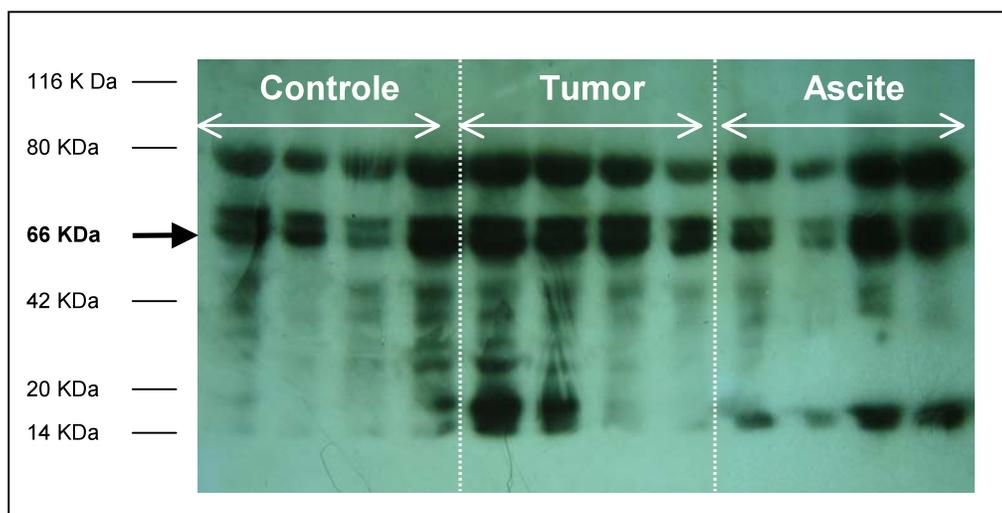


Figura 18: Imagem de Western Blot referentes a bandas de expressão proteica ER α nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Número de animais avaliados igual a 8 por grupo. Imagem representativa.

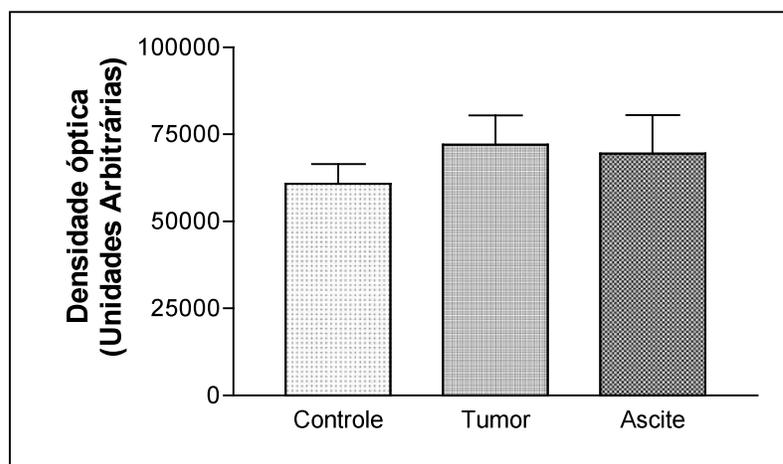


Figura 19: Densidade óptica observada em gel de poliacrilamida referente à bandas de ER α dos tecidos placentários dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

4.6. 1. b) Quantificação de receptores de progesterona (PR-A e PR-B) por Western Blotting:

Foram analisados os receptores de progesterona PR-A e PR-B, em relação a sua densidade óptica do tecido placentário proveniente de ratas controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico. O receptor PR-A apresentou, nos grupos Tumor e Ascite, decréscimo da densidade óptica das imagens avaliadas que a apresentada pelos controle, mostrando-nos haver tendência a menor resposta do tecido a esse hormônio, durante o desenvolvimento tumoral ou em resposta a evolução tumoral (grupo Ascite). O grupo Tumor também apresentou densidade óptica mais elevada que o grupo Ascite para esse receptor (**Figuras 20 e 21**).

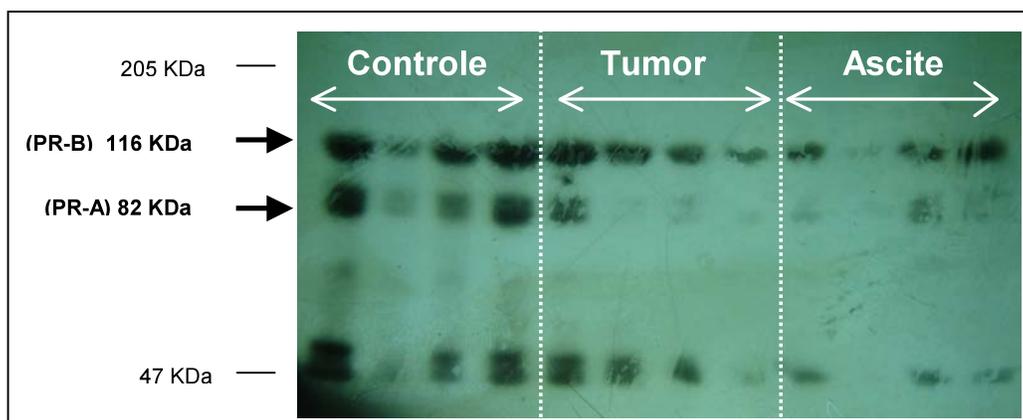


Figura 20: Gel de poliacrilamida representando expressão protéica dos receptores de progesterona PR-A e PR-B nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Imagem representativa de 8 animais por grupo.

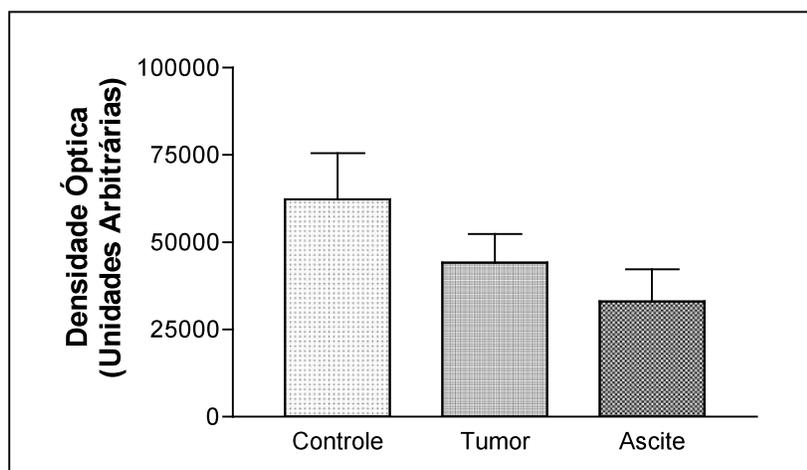


Figura 21: Expressão protéica para PR-A, receptor de progesterona, em relação à sua densidade óptica nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. A análise estatística dos grupos mostra não haver diferença significativa ($P > 0,05$).

Em relação à densidade óptica da expressão protéica apresentada pelo receptor PR-B, verificou-se mesma resposta nos grupos Tumor e Ascite, os quais mostraram redução da expressão dos receptores, em relação ao grupo Controle. Esse receptor, também, mostrou tendência à diminuição ainda maior quando observamos o grupo Ascite em relação ao Tumor (**Figuras 20 e 22**).

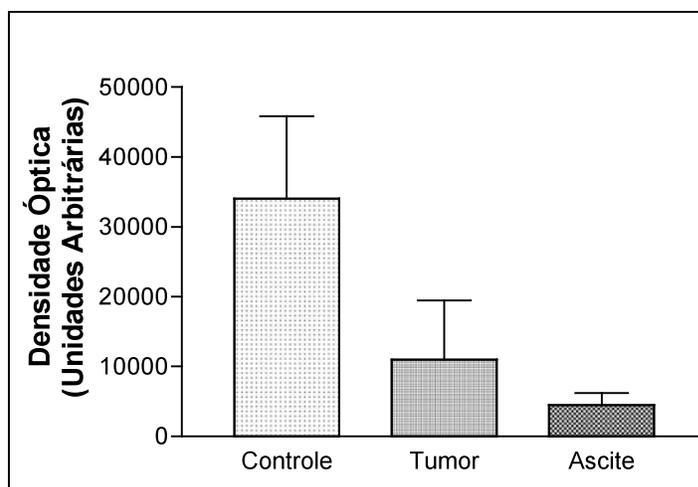


Figura 22: Expressão protéica para de PR-B, receptor de progesterona, em relação à sua densidade óptica nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. A análise estatística dos grupos mostra não haver diferença significativa ($P > 0,05$).

4.6. 2 a) Imunohistoquímica de receptor de Estrógeno (ER α):

Através da imunohistoquímica realizada nas placentas dos grupos experimentais analisados, observamos na região do espongiotrofoblasto a existência de maior quantidade de núcleos marcados com anticorpo anti-receptor de estrógeno (ER α) no grupo Tumor, quando comparado aos grupos Ascite e Controle, sendo esta última diferença estatisticamente significativa (Tabela 3 e Figura 23).

Tabela 3: Número de núcleos marcados contados com anti-corpo anti-receptor de estrógeno (ER α) nas diferentes regiões da placenta (espongiotrofoblasto e labirinto placentário) nos grupos Controle, Tumor e Ascite.

	Controle	Tumor	Ascite
Espongiotrofoblasto	26,77 \pm 5,86	55,50 \pm 3,07 *	32,00 \pm 4,05
Labirinto placentário	19,50 \pm 3,14	33,00 \pm 3,41 *	30,00 \pm 1,98 *

Resultados expressos em média \pm erro padrão da média;

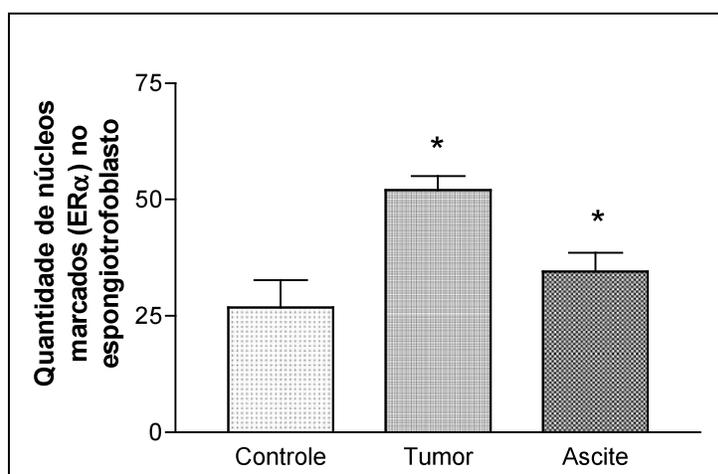


Figura 23: Quantidade de núcleos marcados (ER α) na região do espongiotrofoblasto nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Tumor (* P < 0,05).

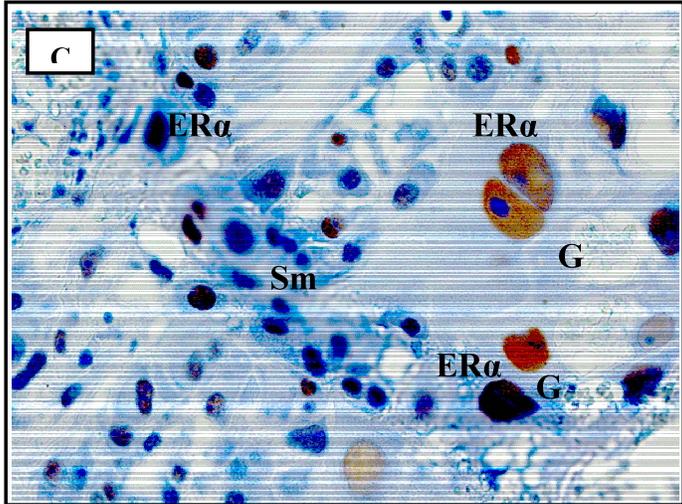
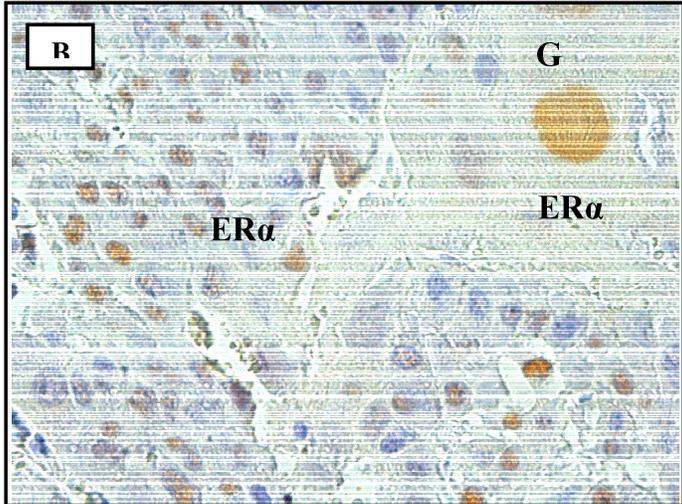
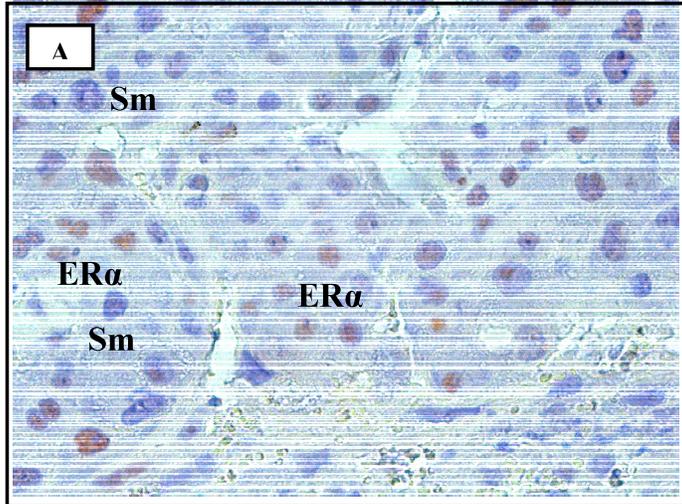


Figura 24: Análise imunohistoquímica do espongiotrofoblasto das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 μm e aumento de 400x. **A:** Detalhe dos núcleos celulares marcados no espongiotrofoblasto da placenta do grupo Controle, onde observamos a existência de grande quantidade de células que não se encontram marcadas (**Sm** – células com núcleo em azul) pelo Anti-corpo anti-receptor de estrógeno **ER α** (células com núcleo marcado em marrom); **B:** Espongiotrofoblasto das placentas do grupo Tumor, onde podemos observar que quase a totalidade das células encontram-se marcadas pelo Anti-corpo anti-receptor de estrógeno **ER α** (núcleo marcado em marrom), incluindo células gigantes (**G**). **C:** Observamos o espongiotrofoblasto do grupo Ascite, onde há grande quantidade de células marcadas pelo Anti-corpo anti-receptor de estrógeno **ER α** (núcleo marcado em marrom), incluindo as células gigantes (**G**), porém, ainda há células sem marcação (**Sm** – Núcleo em azul).

Pudemos observar também que, quando analisamos a região do labirinto placentário, os grupos Tumor e Ascite apresentaram elevada marcação do núcleos para receptor de estrógeno (ER α), quando comparado ao grupo Controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Devemos nos atentar, porém a quantidade de núcleos marcados apresentado pelo grupo Ascite, que sofreu acentuado aumento, aproximando-se inclusive da quantidade de núcleos marcados apresentado pelo grupo Tumor (Tabela 3 e Figura 25).

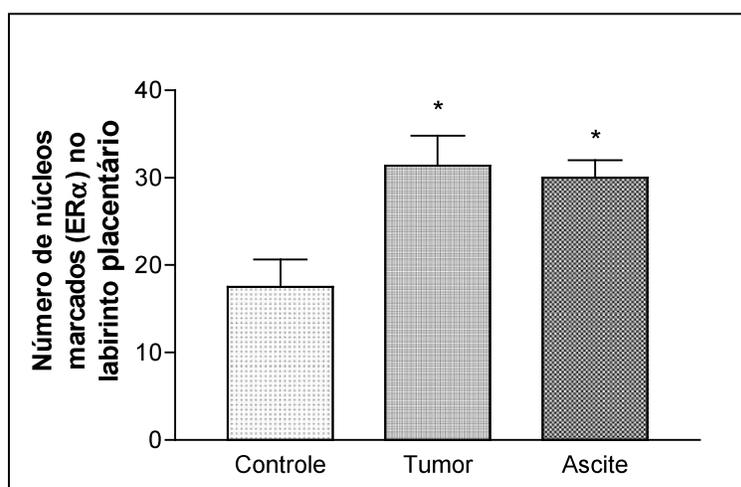


Figura 25: Número de núcleos marcados (ER α), pela análise imunohistoquímica, da região do labirinto placentário nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa do grupo Controle em relação aos grupos Tumor e Ascite ($P < 0,05$).

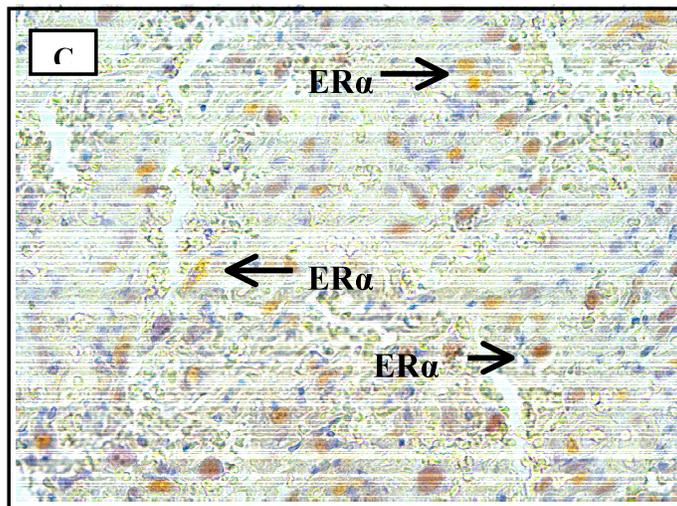
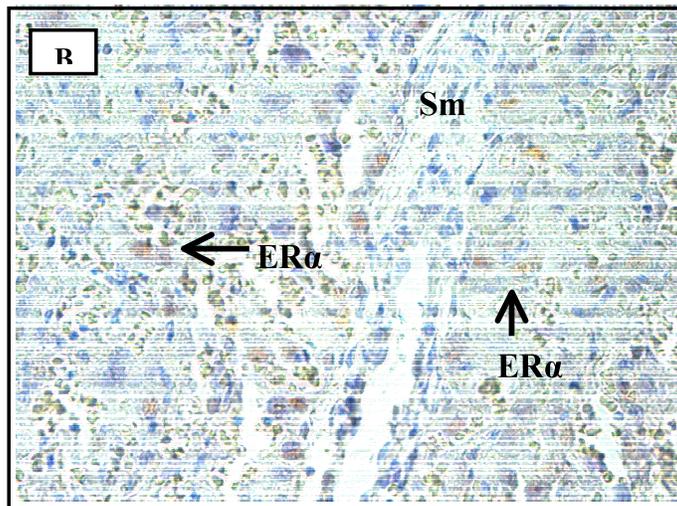
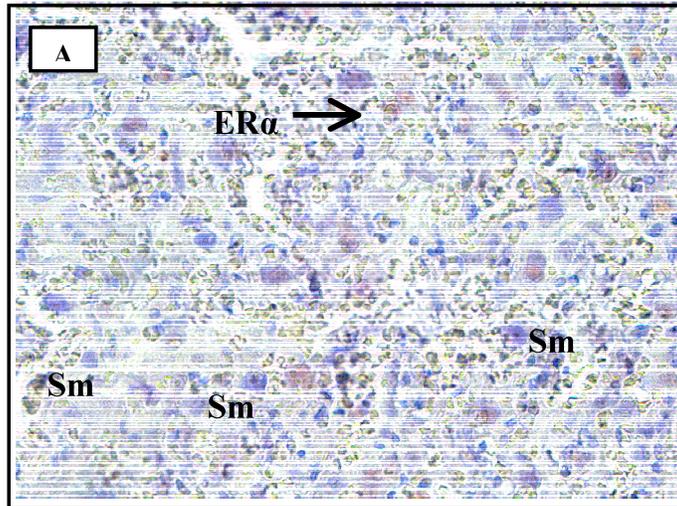


Figura 26: Análise imunohistoquímica do labirinto das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 μm e aumento de 400x. **A:** Detalhe dos núcleos celulares marcados no labirinto da placenta do grupo Controle, onde observamos a existência de células que não se encontram marcadas (**Sm** – células com núcleo em azul) pelo Anti-corpo anti-receptor de estrógeno (**ER α**); **B:** Labirinto placentário do grupo Tumor, onde podemos observar que grande quantidade das células encontram-se marcadas pelo Anti-corpo anti-receptor de estrógeno **ER α** (marcação marrom); **C:** Observamos o labirinto placentário do grupo Ascite, onde há grande quantidade de células marcadas pelo Anti-corpo anti-receptor de estrógeno **ER α** (marcação marrom) e pequena quantidade de células não marcadas.

4.6. 2. b) Imunohistoquímica de receptores de Progesterona (PR-A e PR-B) no tecido placentário dos diferentes grupos experimentais:

A imunohistoquímica, realizada nas placentas dos grupos experimentais analisados, revelou que a região do espongiotrofoblasto apresentou menor quantidade de núcleos marcados com anti-receptor de progesterona (PR-A e PR-B) no grupo Tumor, quando comparado ao grupo Controle, sendo esta última diferença estatisticamente significativa. O grupo Ascite também apresentou, porém de forma não significativa, menor quantidade de núcleos marcados que o grupo Controle (**Tabela 4 e Figura 27**).

Tabela 4: Número de núcleos marcados com anti-corpo anti-receptor de progesterona (PR-A e PR-B) contados nas diferentes regiões da placenta (espongiotrofoblasto e labirinto placentário) de ratas dos grupos Controle, Tumor e Ascite.

	Controle	Tumor	Ascite
Espongiotrofoblasto	14,00 ± 2,46	12,50 ± 2,79 *	12,00 ± 2,23 *
Labirinto placentário	20,00 ± 1,73	18,50 ± 1,13	12,00 ± 2,01 *

* P<0,05 diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

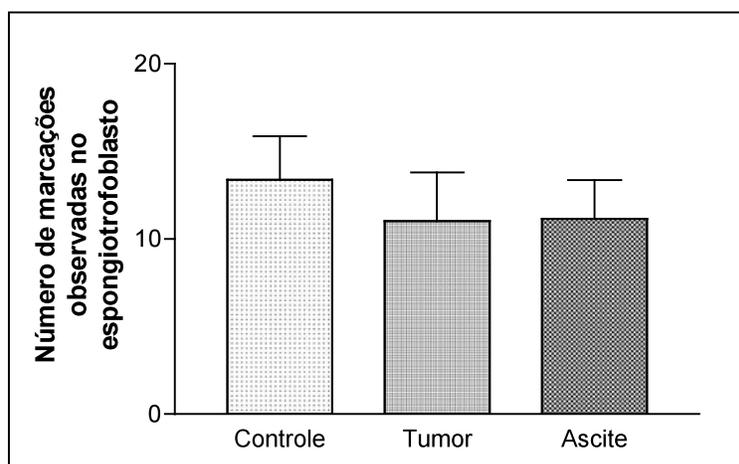


Figura 27: Análise imunohistoquímica dos receptores de progesterona (PR-A e PR-B) na região do espongiotrofoblasto nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média ± erro padrão da média. Análise estatística mostra não haver diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

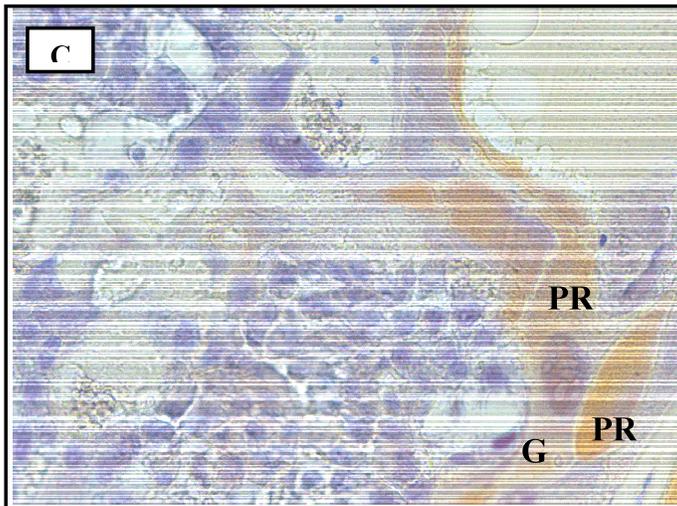
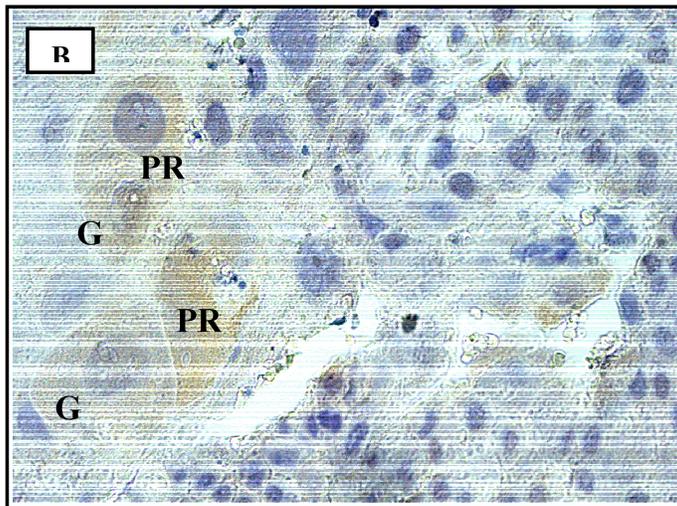
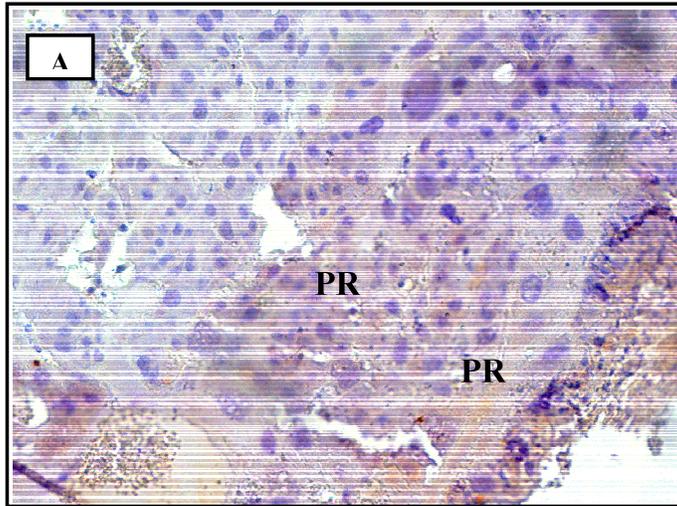


Figura 28: Análise imunohistoquímica do espongiotrofoblástico das placentas dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 μm e aumento de 400x. **A:** Detalhe dos citoplasmas celulares marcados no espongiotrofoblasto da placenta do grupo Controle (**PR** – marcação marrom); **B:** Espongiotrofoblasto de placenta do grupo Tumor, onde podemos observar a marcação dos citoplasmas de algumas células (**PR** – marcação marrom), e marcação também das células gigantes (**G**); **C:** Observamos o espongiotrofoblasto de placenta do grupo Ascite, onde há grande quantidade de células marcadas pelo Anticorpo anti-receptor de progesterona (**PR** – marcação marrom) e pequena quantidade de células não marcadas, principalmente as células gigantes (**G**).

Pudemos observar também que, quando analisamos a região do labirinto placentário, os grupos Tumor e Ascite apresentaram redução da quantidade de marcação para receptor de progesterona (PR), quando comparado ao grupo Controle, sendo estatisticamente diferente em relação ao grupo Ascite ($P < 0,01$). Devemos nos atentar que a redução de marcação no grupo Ascite encontrou-se tão acentuada que diferiu significativamente também do Tumor que, por sua vez, apresentou marcação reduzida em relação ao grupo Controle (**Tabela 4 e Figura 29**).

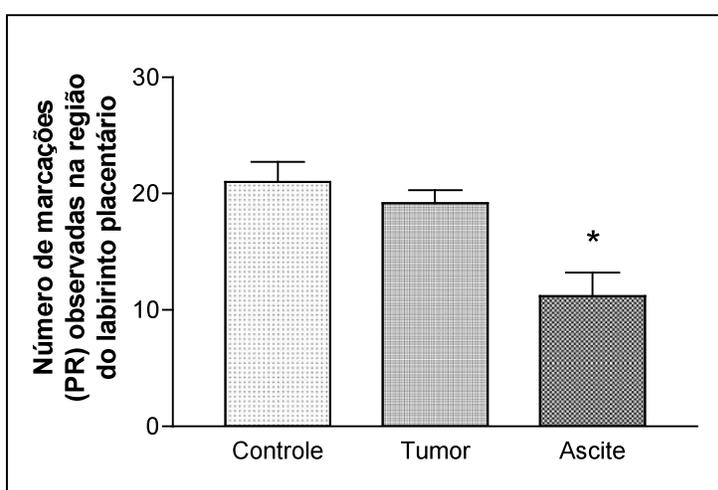


Figura 29: Número de marcações (PR-A e PR-B) na região do labirinto placentário nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Ascite ($P < 0,01$) e Tumor e Ascite (* $P < 0,05$).

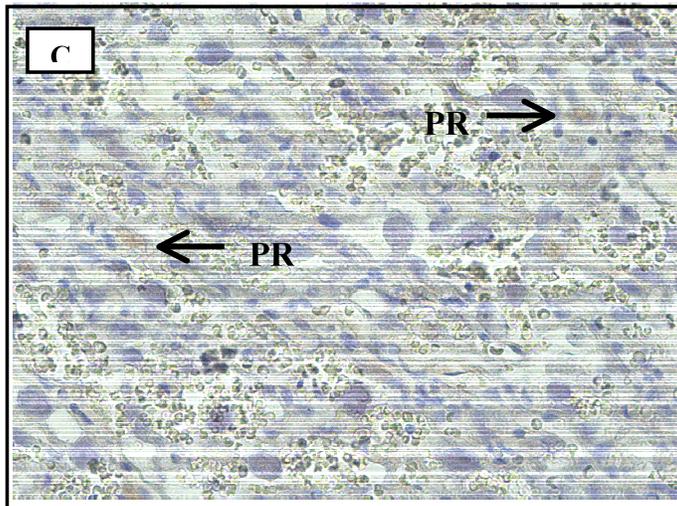
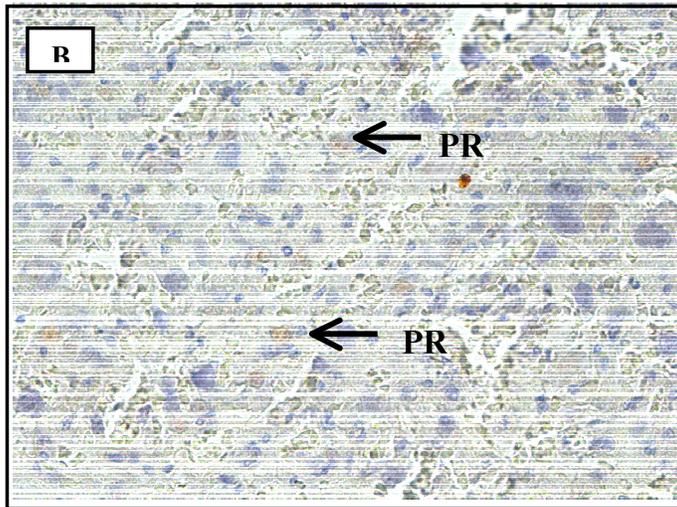
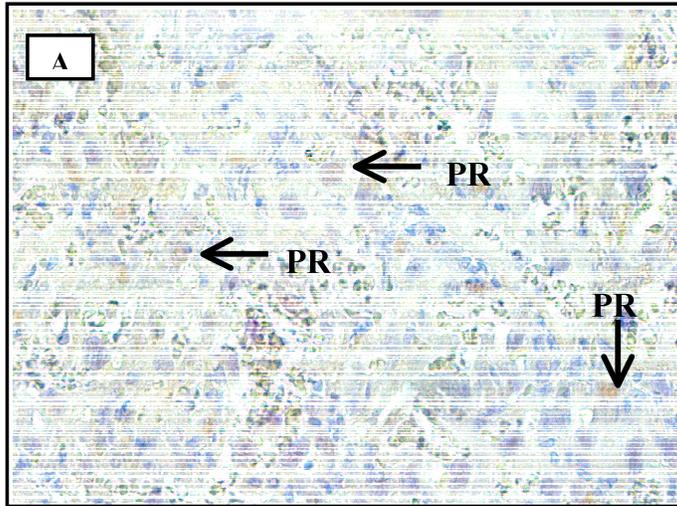


Figura 30: Análise imunohistoquímica do labirinto placentário dos grupos Controle, Tumor e Ascite. Cortes de 5 µm e aumento de 400x. **A:** Detalhe dos núcleos celulares marcados no labirinto da placenta do grupo Controle (**PR** – marcação marrom); **B:** Labirinto placentário do grupo Tumor, onde podemos observar a marcação dos núcleos de algumas células (**PR** – marcação marrom); **C:** Observamos o labirinto placentário do grupo Ascite, onde a marcação pelo Anticorpo anti-receptor de progesterona (**PR** – marcação marrom) ocorre apenas em poucas células.

4.7. Dosagens séricas hormonais:

4.7.1. Estrógeno:

A análise da dosagem sérica de estrógeno das ratas dos diferentes grupos experimentais mostrou-nos haver aumento da concentração desse hormônio nos grupos Ascite e Tumor, quando comparados ao grupo Controle, sendo a diferença entre os grupos A e C estatisticamente significativa. O grupo Ascite também apresentou, mesmo sem diferença significativa, aumento da concentração sérica de estrógeno quando comparado ao grupo Tumor (**Figura 31**).

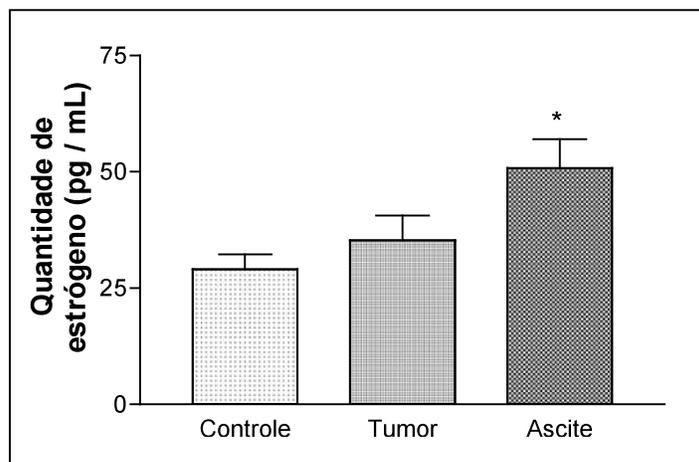


Figura 31: Concentração sérica de estrógeno nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Ascite (* $P < 0,05$).

4.7.2. Progesterona:

Analisamos a dosagem sérica de progesterona dos grupos experimentais, e pudemos observar que houve redução acentuada dos níveis séricos desse hormônio nos grupos Tumor e Ascite em relação ao grupo Controle, sendo a redução observada no grupo Tumor estatisticamente significativa (Figura 32).

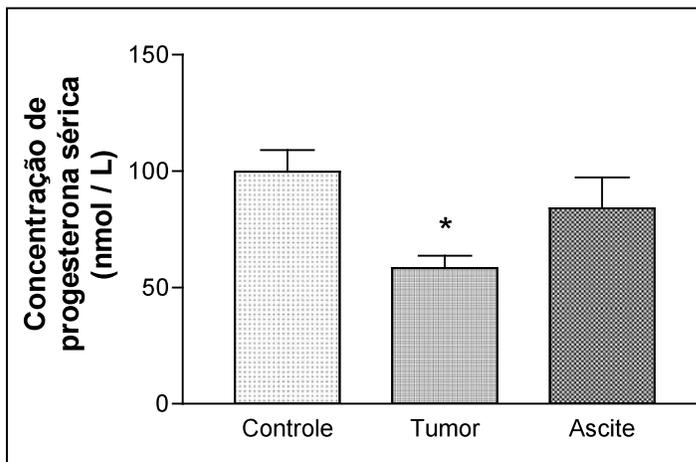


Figura 32: Concentração sérica de progesterona nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística mostra haver diferença significativa entre os grupos Controle e Tumor (* $P < 0,05$).

4.7.3. Prolactina:

A dosagem sérica de prolactina mostrou-nos que houve aumento da concentração desse hormônio em quantidade semelhante nos grupos Tumor e Ascite em relação ao grupo Controle, apesar de não serem estatisticamente significativo (**Figura 33**).

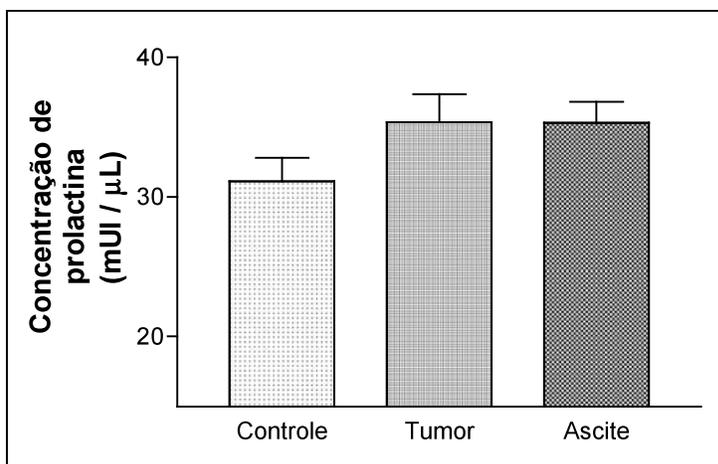


Figura 33: Concentração sérica de prolactina nos grupos Controle, Tumor e Ascite. Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média. Análise estatística não mostra haver diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

5. Discussão

O curso normal da gestação é dependente de alterações fisiológicas particulares a esse estado, como a elevação e manutenção dos níveis de alguns hormônios, principalmente de progesterona, estrógeno e prolactina, e também aumento do processo anabólico e gerenciamento de processos celulares, são entre outros fatores aspectos importantíssimos para a gravidez a termo. Por outro lado, esta complexa condição fisiológica é severamente prejudicada quando associada a processos patológicos, como câncer, que também envolvem intensa alteração metabólica e hormonal. Assim o presente trabalho abordou aspectos bastante pontuais quanto à associação de duas condições metabolicamente muito complexas, como gravidez e câncer, mostrando as alterações que ocorrem na prenhez da rata com tumor e as lesões teciduais e de atividade celular placentária, que culminaram em prejuízo para a gravidez como um todo.

No início da gravidez, a elevação de estrógeno e progesterona ocorre através da síntese ovariana pelo corpo lúteo, que não entra em luteólise, diferentemente do que ocorre após a ovulação quando não há concepção. O corpo lúteo, por sua vez, depende da prolactina pituitária para sua manutenção, cuja síntese é estimulada através do cruzamento, em roedores (**Freeman, 1994**) e somente esta prolactina pituitária é responsável pelo sustento do nível basal de progesterona (**Kraicer & Shelesnyak, 1964**). A prolactina também estimula a transcrição de receptores de estrógeno (**Telleria et al., 1998** e **Frasor et al., 2001**) e o estradiol lúteo contribui para elevar o nível de progesterona que é induzida por prolactina (**Gibori & Keyes, 1980**). A prolactina pituitária (PRL) continua a ser produzida apesar de não mais necessária a partir do sexto dia de prenhez em ratos (**Morishige & Rothchild, 1974**). Isso ocorre devido à expressão de fatores luteotróficos prolactina-*like* que são produzidos pela placenta (**Jayatilak et al., 1989** e **Jayatilak et al., 1985**), chamados de luteotrofina decidual (**Gibori et al., 1974**) e que tem capacidade de se ligar em receptores de prolactina (**Basuray & Gibori, 1980**; **Jayatilak & Gibori, 1986** e **Herz et al., 1986**). Após a clonagem desses fatores, determinou-se que eram idênticos a prolactina pituitária (**Prigent-Tessier et al., 1999**).

Na segunda metade da gravidez (entre os dias 12 e 21), além dos estrógenos e progestágenos, a prolactina pituitária aumenta drasticamente (**Morishige et al., 1973**) e a produção pela decídua é reduzida (**Jayatilak et al., 1989**, **Jayatilak et al., 1985** e **Prigent-**

Tessier et al., 1999). Por sua vez, a capacidade esteroidogênica do corpo lúteo é elevada devido a fatores que são produzidos pela placenta e a luteotrofina prolactina-*like* produzida nesse estágio da gravidez é o lactogênio placentário, produzido pelas células trofoblásticas gigantes (**Faria et al., 1990**). Nesse período da gestação o nível de hormônio luteinizante (LH) não é suficiente para estimular a secreção folicular (**Bogovich et al., 1981**) ou secreção lútea de andrógenos (**Khan et al., 1987**). Porém, os níveis desses andrógenos no sangue materno aumentam dramaticamente devido à sua produção pela placenta (**Gibori et al., 1988**). A necessidade de progesterona para a manutenção da gravidez é observada quando as regiões de ligação desse hormônio são bloqueadas e o aborto é causado em várias espécies animais. Além de seu efeito endócrino, progesterona também atua como imunoesteróide (**Arck et al., 2007**).

Assim a gravidez associada a outra condição metabólica e hormonal complexa, como o câncer, envolve alterações que culminam em prejuízo para ambos mãe e feto. Embora, nossos resultados não apresentem expressiva redução no número de filhotes por fêmea em cada um dos grupos, observamos que houve acentuada redução no peso dos fetos dos grupos Tumor e Ascite, quando comparados ao grupo Controle, sendo, portanto, semelhante aos dados obtidos por Gomes-Marcondes (**1994 e 1998**). Sabe-se que, tanto o crescimento fetal quanto tumoral requerem aumento de síntese protéica e que em condições fisiológicas normais, aminoácidos essenciais são transportados da mãe para o feto em diferentes taxas (**Chung et al., 1998; Lemons et al., 1976 e Marconi et al., 1989**). Por outro lado, essa associação do crescimento tumoral com a gravidez, pode resultar em danos para o feto e levar à reabsorção e morte do mesmo (**Gomes-Marcondes et al., 1998; Gomes-Marcondes et al., 1990 e Williamson et al., 1988**). Da mesma maneira, essa existência concomitante da gravidez e tumor pode induzir competição nutricional entre o tumor e o feto (**Toledo et al, 2004**), causando efeito protetor do organismo materno contra o crescimento da neoplasia (**Ioachim & Moroson, 1986; Gullino et al, 1985**). Estudo realizado por Gomes-Marcondes (**1994**), mostrou que ratas prenhez portadoras de tumor apresentavam menor massa tumoral quando comparadas às sem gravidez, confirmando as informações acima apresentadas e justificando a redução de peso que encontramos nos fetos do grupo Tumor.

Provavelmente, tais fatores foram ocasionados pela alteração hormonal importante que a condição neoplásica impôs à gravidez. O fato da placenta, totalmente desenvolvida, ser

capaz de produzir concentrações significativas de gonadotrofina coriônica (**Brody & Carlstrom, 1962**) e lactogênio placentário (**Kaplan et al., 1968, Saxena et al., 1968**) é a maior prova de sua habilidade em atuar como um órgão endócrino e produzir esteróides e hormônios protéicos, porém pode ser intensamente influenciada pela presença de neoplasia. De fato, em relação à regulação de estrógeno, verificamos que este hormônio teve sua concentração sérica ligeiramente elevada nos animais portadores de tumor (W), redução do teor de progesterona sérica e elevação da prolactina, fatos esses observados também *in vitro*, pela cultura primária de placenta. Igualmente, o grupo que apenas recebeu líquido ascítico diariamente (A), também, apresentou perfis hormonais similares (significativamente diferente em relação ao grupo C), inclusive maiores dos que os observados no grupo W, portanto, é provável que durante a gravidez a necessidade de manutenção da homeostasia depende do perfeito equilíbrio hormonal, sendo que nesse caso (grupos Tumor e Ascite) conduziu à menor capacidade de manter o peso, número fetal e relação feto/placenta.

Sabe-se também que a elevação no nível de estrógeno causa atenuação de IL-6, interleucina que em grande quantidade age como imunossupressora, de forma ainda não totalmente elucidada, mas acredita-se que é feita através do fator nuclear NF- κ B (**Wolbink et al., 1996; Culley et al., 1996 e Kotake et al., 1996**). Além disso, o estrógeno, também, é visto como mediador na produção de muitas outras citocinas, como IL-1, TNF- α e PGE₂ (**Burger & Dayer, 2002; Frazier-Jessen & Kovacs, 1995; Straub et al, 1998; Carruba et al., 2003 e Salem et al., 2000**).

Por sua vez, o efeito da progesterona no sistema imunológico de grávidas pode ser, ao menos em parte, mediado por sua interação com os receptores (**Szekeres-Bartho et al., 1990; Chiu et al., 1996; van den Heuvel et al., 1996 e Roussev et al., 1993**). A exposição a estresse moderado (**Wiebold et al., 1986**) ou profundo (**Joachim et al., 2003**), como por exemplo, no caso do desenvolvimento tumoral ou manipulação diária para inoculação de líquido ascítico, pode induzir aborto em ratas prenhes através de redução no nível de progesterona e diminuição de receptores de progesterona (PR) na interface materno-fetal (**Blois et al., 2004**). Esses resultados corroboram os observados em nossos experimentos, nos quais verificamos redução no nível sérico de progesterona nos grupos Tumor e Ascite, bem como quantidades reduzidas de PR-A e PR-B nesses grupos, quando comparados ao Controle. Estudos mostraram que se houver neutralização da ação da progesterona, encontra-se

redução significativa no número de fetos viáveis, associando-se com a redução de células *natural-killer* (NK) viáveis no endométrio que, por sua vez, causa redução de IL-10 e aumento de aumento de IFN- γ (Szekeres-Bartho *et al.*, 1997). Células NK, subpopulação de linfócitos predominantes no endométrio uterino (Croy *et al.*, 2006 e Ark *et al.*, 2007), são controladas por hormônios e apresentam importante função na criação de ambiente apropriado para o estabelecimento da gravidez (King *et al.*, 1998) e têm grande importância na resposta imunológica, mediando os efeitos citotóxicos nas células alvo através da liberação de citocinas como IFN- γ e TNF- α , além de induzir lise espontânea de células infectadas por vírus e células tumorais pela secreção de perforina e outras enzimas líticas (Solana & Mariani, 2000). Essas células NK, também, secretam uma série de fatores angiogênicos e induzem o crescimento vascular na decídua através da produção de IL-8 e *interferon* (Hanna *et al.*, 2006).

A prolactina é o primeiro hormônio, entre os necessários para o curso normal da gestação, que sofre elevação em sua concentração, nos grupos tumor e ascite, ligeiramente além daquela esperada na condição normal (grupo Controle). Da mesma forma, a prolactina é capaz de promover a síntese de citocinas para ativar células do sistema imunológico, a fim de combater o desenvolvimento tumoral, e também há regulação positiva da síntese de prolactina por essas citocinas. Assim, em nossos experimentos, pudemos confirmar que a quantidade sérica de prolactina encontrava-se ligeiramente aumentada de forma semelhante nos grupos Tumor e Ascite e, além disso, sendo este último (A) não afetado pelas células tumorais, aventamos a hipótese de que as citocinas injetadas diariamente proporcionaram tal alteração hormonal e do tecido placentário. Hayden & Ghosh (2004) comprovaram que a prolactina, quando aumentada, pode induzir a fosforilação do complexo NF- κ B/ I κ B, dissociando a subunidade I κ B e tornando ativo NF- κ B. Este, por sua vez, atua na transcrição de citocinas como IL-1, IL-2, TNF- α e IL-12 (Caamano & Hunter, 2002). IL-1 e IL-2 podem estimular a resposta inflamatória e ativar linfócitos e IL-2 pode ainda estimular a proliferação de células NK, enquanto o TNF- α é necessário para ativar a resposta imunológica promovida pelo tumor (Burstein & Fearon, 2008) e sua produção por macrófagos tratados com prolactina já foi reportada (Kumar *et al.*, 1997) além da expressão das citocinas IFN- γ , IL-10 (Levings *et al.*, 2002).

O sistema imunológico em fêmeas apresenta níveis mais elevados de imunoglobulinas e respostas imunológicas mais consistentes e efetivas, pois a interação entre os sistemas

imunológico, endócrino e nervoso central é influenciada pelos esteróides sexuais (**Schuurs & Verheul, 1990** e **Davis et al., 1993**). Dessa forma, o organismo materno conta com a existência de sistema imunológico que pode prevenir a incidência de câncer, bem como combater um pré-existente. Como as células cancerígenas são, em geral, idênticas à outra célula sadia do corpo do hospedeiro, o sistema imunológico é menos eficiente na ação contra o tumor do que contra algum agente infeccioso. Mas são conhecidos adjuvantes capazes de manipular o sistema imunológico contra antígenos tumorais (**Gabriel, 2004**).

O fator nuclear kappa- β (NF- κ B) é um fator de transcrição pleiotrópico com função de iniciar as respostas imunológicas, inata e adaptativa, sendo requerido para a expressão de vários fatores pró-inflamatórios (**Hacker & Karin, 2006**), como citocinas e moléculas de adesão (**Podolsky, 2002** e **Sands, 2007**). Macrófagos, estimulados por NF- κ B, tornam-se ativos e produzem diversas citocinas (interleucinas (IL) - IL-1, IL-8, *tumour necrosis factor* - TNF- α e *interferon* - IFN- α) que estimulam a resposta inflamatória e trazem resposta adicional das células e moléculas até os sítios de infecção, que podem destruir os patógenos invasores, ou células tumorais, de forma mais eficiente (**Wood, 2001**).

Baseado nos resultados apresentados neste trabalho, pudemos verificar que na associação entre gravidez e evolução tumoral, houve alterações hormonais importantes que proporcionaram modificações severas na constituição morfológica placentária, além de prejuízo quanto aos processos de síntese, aumentando a degradação, como também suas respostas aos hormônios presentes e sintetizados pela própria placenta e quanto a população de receptores e/ou resposta a ação hormonal, conseqüentemente reduzindo a atividade celular. Paralelamente, com o desenvolvimento do tumor, o hospedeiro aumenta a produção de citocinas na tentativa de combater a injúria. Dessa forma, as citocinas aumentadas, quando em concomitância à gestação, podem regular positivamente hormônios como estrógeno e prolactina que, quando elevados, também regulam positivamente a síntese das mesmas ou de outras citocinas, além de poder diminuir a síntese de algumas que podem agir como imunossupressoras. Nesse caso, então, podemos aventar que a resposta imunológica exacerbada nesta associação, fazendo-se paralelo com o grupo ascite, já que o líquido ascítico é formado por concentrado de citocinas, dentre elas também citocinas antiinflamatórias, produzidas pelas células tumorais e/ou hospedeiras (**Tisdale, 2004; Yano et al., 2008**), possivelmente reduziu as células NK uterinas, e diminuiu o número de receptores de

progesterona, além de também regular negativamente esse hormônio, prejudicando o desenvolvimento placentário e conseqüentemente fetal.

Nossos dados mostraram-nos que o tecido placentário sofreu efeito direto e/ou indireto da evolução tumoral. Menor peso fetal, menor relação feto / placenta indicam prejuízos que se refletem, basicamente, na redução da síntese protéica em tecido fresco nos grupos Tumor e Ascite, bem como o aumento da degradação, quando comparados ao valor observado no grupo Controle. De fato, quando colocadas em cultura e, portanto, sem sofrer a influência tumoral, nem dos agentes imunológicos derivados dele, as placentas, provenientes dos animais dos grupos Tumor e Ascite, ainda continuaram tendo sua quantidade de síntese protéica inferior ao grupo Controle, bem como valores mais elevados de degradação. A produção tumoral de citocinas também é responsável pela produção de mediadores catabólicos como o Fator Mobilizador Lipídico (LMF) e o Fator de Indução de Proteólise (PIF) que podem causar redução de peso na ausência de anorexia ou proteólise em cultura celular (**Tisdale, 2004; Yano et al., 2008**). Além disso, algumas citocinas podem agir independentemente na geração de caquexia como, por exemplo, $TNF\alpha$ que pode ativar NF- κ B para ativação de proteossomo causando proteólise, como também atuando diretamente na fragmentação do DNA e geração de apoptose. Da mesma forma, $IFN\gamma$ apresenta atividades biológicas que potencializam a ação de $TNF\alpha$ (**Argilés et al., 2003**). Outra citocina que pode atuar positivamente para degradação protéica é IL-6, mas sua ação ainda é controversa e alguns estudos mostram que sua ação proteolítica pode ser mais intensa até que de $TNF\alpha$ (**Argilés et al., 2003**). Porém, verificou-se que a elevação no nível de estrógeno pode atenuar a ação dessa interleucina (**Wolbink et al., 1996; Culley et al., 1996 e Kotake et al., 1996**).

A inoculação diária de líquido ascítico, e conseqüentemente dos fatores contidos no mesmo, provocou nas fêmeas do grupo Ascite redução de peso fetal discretamente maior que a observada no grupo Tumor, mas sem que esses animais fossem hospedeiros tumorais. Portanto, no grupo Ascite há evidencia de que não houve competição nutricional entre o feto e o tumor. Dessa forma, acredita-se que a redução de peso tenha ocorrido pela elevação da proteólise nas placentas e, também, nos fetos desse grupo. Mediadores catabólicos, como PIF e LMF, também, atuariam contribuindo para a redução de peso nos fetos do grupo Tumor e, também, como verificado no grupo Ascite e, portanto, observaríamos ação acentuada desses fatores sobre vários tecidos inclusive sobre a unidade feto-placentaria.

Gomes-Marcondes *et al* (1998) demonstrou haver redução do conteúdo protéico fetal e placentário em animais com desenvolvimento tumoral, bem como naqueles que foram inoculados diariamente com líquido ascítico. Dessa forma, acreditamos que, de fato, os mediadores catabólicos e indutores de proteólise afetam o desenvolvimento placentário e, por conseguinte, fetal. Porém, o tecido placentário do grupo Ascite, quando colocado em cultura, apresentou resultados relativamente próximos aos valores observados no grupo Controle, ou seja, recuperando, ao menos parcialmente, os processos anabólico e catabólico placentário, onde a capacidade de síntese placentária foi ligeiramente reduzida e degradação protéica na placenta foi similar ao grupo controle. Entretanto, a regulação hormonal, por sua vez, ainda estaria sendo influenciada na situação *in vitro*, uma vez que o grupo Ascite produziu, em meio de cultura, maior quantidade de prolactina, hormônio protéico, quando comparado aos grupos Controle e Tumor. Apresentou também pequena redução na síntese de estrógeno e discreta elevação na síntese de progesterona, em relação ao grupo Tumor. Assim, concluiu-se que o balanço apropriado de moléculas efetoras seria importante para permitir a homeostase celular, sendo que o desbalanço desses fatores poderia levar as condições de patologia (Mateo *et al.*, 1996). Dessa forma, acredita-se que a resposta imunológica exacerbada na presença do tumor e regulação na síntese de citocinas por hormônios seja tão elevada, que mesmo sofrendo ação de fatores de mobilização de lipídios e de indução de proteólise, na condição *in vivo*, as placentas dos animais do grupo Ascite apresentaram aumento significativo da síntese de prolactina em relação ao grupo Controle, porém drasticamente diminuíram a síntese e aumentaram a degradação protéica placentária e, assim, diminuíram ainda mais a quantidade de nutrientes lipídicos e protéicos disponíveis para os fetos em desenvolvimento. Assim, como abordado anteriormente, a influência dos fatores presentes no líquido ascítico apontam preferencialmente para os efeitos diretos celulares ao nutricional propriamente dito.

Através da imunohistoquímica realizada nas placentas e, também, da expressão protéica dos receptores de estrógenos e progestágenos placentários, dos grupos experimentais analisados, observou-se maior quantidade de núcleos marcados e expressão protéica ao receptor de estrógeno (ER α), porém menor quantidade de núcleos marcados e expressão dos receptores de progesterona (PR-A e PR-B) no grupo Tumor, nas três regiões placentárias, decidua, espongiotrofoblastica e labiríntica. Perfil semelhante foi observado no grupo Ascite, sendo que, em determinadas regiões, as marcações aproximaram-se inclusive da quantidade de núcleos marcados apresentado pelo grupo Tumor.

Evidências mostram que o estrógeno induz diretamente a expressão de hPRL em células responsivas ao estrógeno (células ER- α e ER- β). Estudos mostraram, também, que há elemento funcional estrógeno responsivo (ERE) e sítio AP1 localizado de forma distal ao promotor de hPRL através do qual o estradiol age. Experimentos realizados por Fujimoto *et al.*, (2004) e Paech *et al.*, (1997) mostraram que ambos os receptores de estrógeno (ER) ligam-se a ERE, mas apenas ER- α interage com proteínas AP1, que se ligam aos sítios AP1 no sítio promotor distal de hPRL. Mostrando que ambos, ERE e o sítio AP1, são necessários para indução da atividade promotora por E2.

Alguns estudos *in vitro* reportam que a exposição prolongada à prolactina pode aumentar a expressão de receptores de estrógeno (Gutzman *et al.*, 2004 e Ormandy *et al.*, 1997), que potencializaria ainda mais a síntese de prolactina extrapituitária. Como, de fato, observamos em nosso trabalho, os grupos Tumor e Ascite foram afetados, apresentando assim maior quantidade de prolactina sérica e maior número de ER α placentário. A exacerbação da resposta imunológica, causada pela regulação positiva de algumas citocinas sobre a síntese de estrógeno e prolactina que, por sua vez, também regulam positivamente a produção de citocinas ativando ainda mais células do sistema imunológico, permite que exista grande quantidade de TNF α na circulação. Esse fator, por sua vez, age de forma citotóxica em células endoteliais e causa danos ao sistema vascular da decídua, podendo ocasionar hemorragias (Toledo & Gomes-Marcondes, 1999). A hemorragia pôde ser observada em várias regiões das placentas dos grupos Tumor e Ascite, bem como vascularização pouco definida, ou mesmo deficiente, principalmente na região do labirinto placentário. Apesar de TNF α ser originalmente descrito como molécula citotóxica, produzida por macrófago em resposta a determinado estímulo, há evidências de que pode ser sintetizado pelo endométrio, placenta e pelo próprio feto (Toledo & Gomes-Marcondes, 1999). Toledo & Gomes-Marcondes (1999) verificaram que esses mediadores atuam, de fato, em tecido placentário através da observação de infiltrados linfocitários nas camadas placentárias, principalmente nas regiões do espongiotrofoblasto e labirinto placentário, na porção fetal da placenta. Segundo os autores, esses fatores interfeririam no mecanismo de morte celular, verificado pela incidência de núcleos picnóticos nas células deciduais. Essas observações foram condizentes com nossos resultados e a ação desses mediadores nas células placentárias podem ser verificados através da contagem de núcleos apresentada pelos grupos Ascite e Tumor, que apresentou-se reduzido em relação ao grupo Controle, indicando, provavelmente, maior incidência de apoptose nas células placentárias desses grupos.

Dessa forma, observamos que a influência dos hormônios da gravidez no desenvolvimento placentário, e conseqüentemente fetal, e também a influencia das citocina presentes no liquido ascítico alterando o *milieu* hormonal da condição normal da gravidez, ainda apresenta diversos campos que podem ser pesquisados e desenvolvidos. No caso de doenças complexas, como o câncer, que envolvem fatores genéticos, hormonais e fisiológicos, a necessidade da análise integrada desses fatores torna-se evidente.

6. Conclusões

Os resultados encontrados neste trabalho nos permitiram concluir que :

- A associação entre gravidez e evolução tumoral causa alterações hormonais importantes, que proporcionam modificações severas na constituição morfológica placentária, além de gerar prejuízo nos processos de síntese e aumentando a degradação protéica, como também as respostas à ação dos hormônios presentes e sintetizados pela própria placenta (progesterona e estrógeno), quanto à população de receptores a esses hormônios, conseqüentemente reduzindo a atividade celular placentária;
- A associação entre gravidez e o líquido ascítico, que corresponde à resposta do hospedeiro ao desenvolvimento do tumor, causa prejuízos à unidade feto / placentária independente da competição nutricional entre tecido fetal e tumoral.
- A associação entre gravidez e o líquido ascítico, que é formado em grande proporção por mediadores catabólicos em função da presença da neoplasia, como fator de indução de proteólise e fator de mobilização de lipídeos, causa aumento de proteólise nas placentas, com redução da síntese protéica, além de causar prejuízo nas respostas hormonais, bem como redução de síntese hormonal e população de receptores a estrógeno e progesterona no grupo de fêmeas inoculadas com líquido ascítico (grupo Ascite), resultados semelhantes às fêmeas portadoras de tumor, e conseqüentemente prejuízo aos fetos, em relação ao grupo Controle, mas sem que esse grupo fosse hospedeiro tumoral.
- Na condição *in vitro*, o tecido placentário ainda apresenta os efeitos produzidos pelo crescimento tumoral (grupo Tumor). Porém, na ausência dos efetores humorais (líquido ascítico), o tecido placentário recupera-se parcialmente de algumas alterações, como restabelecimento do processo de síntese e degradação protéica (similar ao tecido placentário do grupo controle), porém persistem as alterações hormonais influenciadas pelos fatores presentes no líquido ascítico.

7. Referências Bibliográficas

- Arck P, Hansen PJ, Jericevic BM, Piccini MP, Szekeres-Bartho J. **Progesterone during pregnancy: Endocrine-Immune cross talk in mammalian and the role of stress.** American Journal of Reproductive Immunology, 58: 268-279; 2007.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. **Why do cancer cell have such a high glycolytic rate?** Medical Hypotheses; 32: 151-155. 1990.
- Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. **Cancer cachexia: the molecular mechanisms.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35:405-409; 2003.
- Astwood EB. **The regulation of corpus luteum function by hypophysial luteotrophin.** Endocrinology 29:309–319; 1941.
- Baggeto LG. **Deviant Energetic Metabolism of Glycolytic Cancer Cells.** Biochimie; 74: 959-974. 1992.
- Baker HL. **Reproduction and Breeding.** In Baker HL, Lindsey JR, Weisbroth SH. The laboratory rat. Academic Press, New York; 1991.
- Banks PM. **Pregnancy and lymphoma.** Arch. Patol. Lab. Med. 109: 802-9; 1985.
- Basuray, R., and Gibori, G. **Luteotropic action of decidual tissue in the pregnant rat.** *Biol. Reprod.* 23, 507–512; 1980.
- Bazan JF. **A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain.** Biochem Biophys Res Commun; 64(2):788–95; 1989.
- Ben-David M, Wittliff JL, Fekete M, Kadar T, Biran S, Schally AV. **Lack of relationship between the levels of prolactin receptors and steroid receptors in women with breast cancer.** Biomed Pharmacother. 42(5): 327-34; 1998.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. **Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects.** Endocr Rev. 1996 Dec;17(6):639-69. Review. 1996.
- Berczi L, Nagy E, Kovacs K, Horvath E. **Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones.** Acta Endocrinol; 98:506–13; 1981.
- Berczi L, Nagy E. **Effect of hypophysectomy on immune function.** In: Ader R, Felten DI, Cohen N, editors. Psychoneuroimmunology. New York: Academic Press; p. 39; 1991.
- Beremblum I. **The nature of tumor growth.** In: Flory L. General Pathology, Philadelphia, Saunders; 1970.
- Berwaer, M., Martial, J.A., Davis, J.R. **Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene.** Mol. Endocrinol. 8, 635–642; 1994.

- Bevilacqua E, Abrahamsohn PA. **Invasiveness of mouse trophoblastic cells in connective tissue.** *Acta Anat (Basel)*. 150(4):246-52; 1994.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI. **Prolactin as a growth promoter in patients with breast cancer: GCR1 experience.** *Eur, J. Surg, Oncol.*, 26: 540 – 547; 2000.
- Blois SM, Joachim R, Kandil J, Margni R, Tometten M, Klapp BF, Arck PC: **Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1 / Th2 cytokine profile.** *J Immunol* 2004; 172:5893–5899.
- Bogovich, K., Richards, J. S., and Reichert, Jr., L. E. **Obligatory role of luteinizing hormone (LH) in the initiation of preovulatory follicular growth in the pregnant rat: Specific effects of human chorionic gonadotropin and follicle-stimulating hormone on LH receptors and steroidogenesis in theca, granulosa, and luteal cells.** *Endocrinology* 109, 860–867; 1981.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. **Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice.** *Endocr Rev.* Jun;19(3):225-68. Review; 1998.
- Bonneterre J, Mauriac L, Weber B, Roche H, Fargeot P, Tubiana-Hulim M, Sevin M, Chollet P, Cappelaere P. **Tamoxifen plus bromocriptine versus tamoxifen plus placebo in advanced breast cancer: results of a double blind multicentre clinical trial.** *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24: 1851- 1853; 1988.
- Bonneterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, Cappelaere P. **Prolactin receptors in human breast cancer.** *Eur J Cancer Clin Oncol.*, Nov;18(11):1157-62; 1982.
- Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscart R, Demaille A. **Correlation between prolactin receptors (PRL R), estradiol (ER) and progesterone receptors (PgR) in human breast cancer.** *Eur J Cancer Clin Oncol.*, Nov;22(11):1331-6; 1986.
- Bottles K, Taylor RN. **Diagnosis of the breast masses in pregnant women by aspiration cytology.** *Obstet & Gynec* 66: 76-78, 1985.
- Brody S & Carlstrom G. **Immuno-assay of human chorionic gonadotropin in normal and pathologic pregnancy.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 22 564–574; 1962.
- Burger, D., Dayer. J. M. **Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 464–473; 2002.
- Burstein E, Fearon ER. **Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines.** *J Clin Invest.* Feb;118(2):464-7; 2008
- Caamano J, Hunter CA. **NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions.** *Clin Microbiol Rev*;15(3):414–29; 2002.
- Carruba, G., D'Agostino, P., Miele, M., Calabro, M., Barbera, C., Bella, G. D., Milano, S., Ferlazzo, V., Caruso, R., Rosa, M. L., Cocciadiferro, L., Campisi, I., Castagnetta, L., Cillari, E. **Estrogen regulates cytokine production and apoptosis in PMA-differentiated, macrophage-like U937 cells.** *J. Cell. Biochem.* 90, 187–196; 2003.

- Chen-Zion M, Livnat T, Beitner R. **Insulin rapidly stimulates binding of phosphofructo-kinase and aldolase to muscle cytoskeleton.** *International Journal of Biochemistry*; 24 (5): 821-6. 1992a.
- Chiu L, Nishimura M, Ishi Y, Nieda M, Maeshima M, Takedani Y, Tadokoro K, Juji T: **Enhancement of the expression of progesterone receptor on progesterone -treated lymphocytes after immunotherapy in unexplained recurrent spontaneous abortion.** *Am J Reprod Immunol*; 35:552–557; 1996.
- Chung M, Teng C, Timmerman M, Meschia G, and Battaglia FC. **Production and utilization of amino acids by ovine placenta in vivo.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E13–E22, 1998.
- Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. 2003. **The role of prolactin in mammary carcinoma.** *Endocr. Ver.* 24: 1-27; 2003.
- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. **Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse.** *Endocrinology.* Nov;138(11):4613-21; 1997.
- Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C: **Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones.** *Immunol Rev*; 214:161–185; 2006.
- Culley FJ, Harris RA, Kaye PM, McAdam KP, Raynes JG. **C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages.** *J Immunol*; 156:4691-6; 1996.
- Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt Júnior PI, Guimarães AR. **Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils.** *Braz J Med Biol Res.* Jan;32(1):15-21; 1999.
- Da Poian AT, Carvalho-Alves PC. **Hormônios e Metabolismo – Integração e Correlações Clínicas.** São Paulo: Editora Atheneu, 2002.
- Dardenne M, Leite de Moraes MC, Kelly PA, Gagnerault MC. **Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flowcytometry.** *Endocrinology*; 134:2108–14; 1994.
- Das R, and Vonderhaar BK. **Prolactin as a mitogen in mammary cells.** *J. Mammary Gland Biol Neoplasia*; 2: 29-39. 1997.
- Davis HL, Michel M, Whalen RG. **DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody.** *Hum Mol Genet*; 2:1847–51; 1993.
- De Placido S, Gallo C, Perrone F, Marinelli A, Pagliarulo C, Carlomagno C, Petrella G, D'Istria M, Delrio G, Bianco AR. **Prolactin receptor does not correlate with oestrogen and progesterone receptors in primary breast cancer and lacks prognostic significance. Ten year results of the Naples adjuvant (GUN)study.** *Br J Cancer.* Oct;62(4):643-6, 1990.
- Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, Hooghe-Peters EL. **Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes.** *J Neuroimmunol*; 120:58–66; 2001.

- Earle WR. **A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro.** American Journal of Cancer; 24: 556-612. 1935.
- El Razi, Neto, S, Zorn TM, Curi R and Carpinelli AR. **Impairment of insulin secretion in pancreatic islet isolated from Walker 256 tumor-bearing rats.** Am. J. Physiol. 271: C804 - C809. 1996.
- Faria, T. N., Deb, S., Kwok, S. C. M., Talamantes, F., and Soares, M. J. **Ontogeny of placental lactogen-I and placental lactogen-II expression in the developing rat placenta.** *Dev. Biol.* 141, 279–291; 1990.
- Fedele MJ, Lang CH, Farrell PA. **Immunization against IGF-I prevents increases in protein synthesis in diabetic rats after resistance exercise.** Am J Physiol Endocrinol Metab. Jun; 280(6): E877-85; 2001.
- Fernandes LC, Nogueira CR, Machado UF, Carpinelli AR and Curi R. **Insulin secretion by isolated pancreatic islets from Walker 256 Tumor-bearing rats.** Am. J. Physiol., 258: E1033 - E1036. 1990.
- Frasor, J., Park, K., Byers, M., Telleria, C., Kitamura, T., Yu-Lee, L. Y., Djiane, J., Park-Sarge, O. K., and Gibori, G. **Differential roles for signal transducers and activators of transcription 5a and 5b in PRL stimulation of Era and ERb transcription.** *Mol. Endocrinol.* 15, 2172–2181; 2001.
- Frazier-Jessen, M. R., Kovacs, E. J. **Estrogen regulation of JE/MCP-1 mRNA expression in macrophages.** J. Immunol. 154, 1838–1845; 1995.
- Freeman, ME. **The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat.** In *The Physiology of Reproduction*, 2d ed., Vol. 2, eds. E. Knobil and J. D. Neill, 613–658. New York: Raven Press; 1994.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. **Prolactin: structure, function, and regulation of secretion.** *Physiol Rev*;80:1523–631; 2000.
- Fritze D, Queisser W, Schmid H, Kaufmann M, Massner B, Westernhausen M, Schimidt R, Elder L, Abel U. **Prospective randomized trial concerning hyper- and normoprolactinemia and the use of bromocriptina in patients with metastatic breast cancer.** *Oncologie.* 9: 305-312; 1986.
- Fujimoto, N., Honda, H., Kitamura, S. **Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta.** *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 53–59; 2004.
- Gabriel J. **The Biology of Cancer - The Application of Biology to Cancer Nursing,** Athenaem Press Limited, UK, Primeira Edição, 2004
- Gad SC and Weil CS. **Statistics for toxicologists. In Principles and Methods of Toxicology,** pp 221–274. Ed. H Wallace. New York: Raven Press Ltd; 1994.
- Garcia SLM and Frenández CG. **Embriologia.** Segunda Edição. Editora Artmed, Porto Alegre; 2001.
- Gellersen, B., Kempf, R., Telgmann, R., DiMattia, G.E. **Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma.** *Mol. Endocrinol.* 8, 356–373; 1994.

- Gibori, G., and Keyes, P. L. **Luteotropic role of estrogen in early pregnancy in the rat.** *Endocrinology* 106, 1584–1588; 1980.
- Gibori, G., Khan, I., Warshaw, M. L., McLean, M. P., Puryear, T. K., Nelson, S., Durkee, T. J., Azhar, S., Steinschneider, A., and Rao, M. C. **Placental derived regulators and the complex control of luteal cell function.** *Rec. Prog. Hormone Res.* 44, 377–429; 1988.
- Gibori, G., Rothchild, I., Pepe, G. J., Morishige, W. K., and Lam, P. **Luteotropic action of decidual tissue in the rat.** *Endocrinology* 95, 1113–1118; 1974.
- Gill S, Peston D, Vonderhaar BK, Shousha S. **Expression of prolactin receptors in normal, benign, and malignant breast tissue: an immunohistological study.** *J Clin Pathol.*, Dec;54(12):956-60; 2001.
- Goffin V, Touraine P, Pichard C, Bernichtein S, Kelly P. **Should prolactin be reconsidered a therapeutic target in human breast cancer?** *Mol. Cell. Endocrinol.* 151: 79-87; 1999.
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P.A.. **Prolactin: the new biology of an old hormon.** *Annu. Rev. Physiol.* 64, 47–67; 2002.
- Gomes MCC, Bevilacqua RG, Lima-Gonçalves E, Resende L. **Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno.** *Cien. Cult.*, 35(7): 736; 1983.
- Gomes-Marcondes MCC. **Influência da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário: Estudo experimental em ratas Wistar inoculadas com carcinoma de Walker 256.** Doctoral thesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 1994.
- Gomes-Marcondes MCC, Cury L, Curi R: **Consequences of Walker tumour growth for the placental/foetal development in rats.** *Cancer Res Ther Con*, 5:277-283; 1998.
- Gomes-Marcondes MCC, Cury L, Parreira MR, Elias CF: **Effect of Walker 256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy.** *Braz J Med Biol Res*, 23:909-913; 1990.
- Gomes-Marcondes MC, Honma HN, Areas MA, Cury L. **Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats.** *Braz J Med Biol Res.* Oct;31(10):1345-8; 1998.
- Gout PW, Beer CT, Noble RL. **Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nbrat lymphomas.** *Cancer Res* 40:2433–2436; 1980.
- Guaitani A, Torre PD, Morasca L, et al. **Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interaction with the host.** *Tumori*, 69: 1 - 9, 1983.
- Gullino PM, Grantham FH, Hill DM, Pettigrew HM. **Effect of pregnancy and nursing on the growth of metastases from N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinomas.** *J Natl Cancer Inst.* Jan;74(1):229-34; 1985.
- Gutzman JH, Miller KK, Schuler LA. **Endogenous human prolactin and not exogenous human prolactin induces estrogen receptor alpha and prolactin receptor expression and increases estrogen responsiveness in breast cancer cells.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jan;88(1):69-77; 2004.
- Guyton AC and Hall JE. **Fisiologia Humana e Mecanismos das doenças.** Sexta Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1998.

- Häcker H, Karin M. **Regulation and function of IKK and IKK-related kinases.** Sci STKE. 2006 Oct 17; (357):re13. Review; 2006.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Nathanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Beaharoch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, **Mandelboim O: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface.** Nat Med; 12: 1065–1074; 2006.
- Harvey PW. **Human relevance of rodent prolactin-induced non-genotoxic mammary carcinogenesis: prolactin involvement in human breast cancer and significance for toxicology risk assessments.** J. Appl. Toxicol. 25: 179-183; 2005.
- Hayden MS, Ghosh S. **Signaling to NF- κ B.** Genes Dev 2004;18(18):2195–224.
- Herz, Z., Khan, I., Jayatilak, P. G., and Gibori, G. **Evidence for the synthesis and secretion of decidual luteotropin: A PRL-like hormone produced by rat decidual cells.** *Endocrinology* 118, 2203–2209; 1986.
- Holtkamp W, Nagel GA, Wander HE, Rauschecker HF, von Heyden D. **Hyperprolactinemia is an indicator of progressive disease and poor prognosis in advanced breast cancer.** Int. J. Cancer. 34: 323-328; 1984.
- Holtkamp W and Nagel GA. **Bromocriptine in chemotherapy-resistant, metastatic breast cancer. Results of the GO-MC-BROMO 2/82 AIO Study.** Onkologie. Jun;11(3):121-7. German; 1988.
- Joachim HL, Moroson H. **Protective effect of pregnancy against transplantation of lymphoma in rats.** J Natl Cancer Inst. Sep;77(3):809-14; 1986
- Iwama de Matos MCF, Montenegro MR, Silva CRV. **Walker 256 carcinosarcoma: pathology, microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells.** *Ciência e Cultura*; 32: 849-57, 1980.
- Jayatilak, P. G., Glaser, L. A., Basuray, R., Kelly, P. A., and Gibori, G. **Identification and partial characterization of a PRL-like hormone produced by the rat decidual tissue.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 217–221;1985.
- Jayatilak, P. G., and Gibori, G. **Ontogeny of PRL receptors in rat decidual tissue: Binding by a locally produced PRL-like hormone.** *J. Endocrinol.* 110, 115–121; 1986.
- Jayatilak, P. G., Puryear, T. K., Herz, Z., Fazleabas, A., and Gibori, G. **Protein secretion by mesometrial and antimesometrial decidual tissue: Evidence for differential gene expression.** *Endocrinology* 125, 659–666; 1989.
- Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, Klapp BF, Arck PC: **The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response.** Steroids; 68:931–940; 2003.
- Jolie WP. **Radioautographic observations on variations in desoxy-ribonucleic acid synthesis in rat placenti with gestacional age.** Am. J. Anat., 114: 161 – 171; 1964.
- Kaplan SL, Gurbide E, Sciarra JJ & Grumbach MM. **Metabolic clearance rate and production rate of chorionic growth hormone prolactin in late pregnancy.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 28 1450–1460; 1968.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. **The prolactin / growth hormone receptor family.** Endocr Rev 12:235–251; 1991.

- Khan, I., Sridaran, R., Johnson, D. C., and Gibori, G. **Selective stimulation of luteal androgen biosynthesis by luteinizing hormone: Comparison of hormonal regulation of P45017a activity in corpora lutea and follicles.** *Endocrinology* 121, 1312–1319; 1987.
- Kilic E, Canbay E, Goffin V, McArdle C, Norman M. **The proliferative effect of prolactin on breast cancer cells: synergy with estrogen, and abolition by anti-estrogen.** 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, LA, p 128, (Abstract); 1998.
- King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW: **Human uterine lymphocytes.** *Hum Reprod Update*; 4:480–485; 1998.
- King RM, Welch JS, Martin JK Jr, Coullam CB. **Carcinoma of the breast associated with pregnancy.** *Surg Gynecol Obstet* 1985; 160: 228-232.
- Kooijman R, Hooghe-Peters EL, Hooghe R. **Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-1 in the immune system.** *Adv Immunol*; 63:377–454; 1996.
- Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, et al. **Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.** *J Bone Miner Res*; 11:88-95; 1996.
- Kraicer, P. F., and Shelesnyak, M. C. **Studies on the mechanism of nidation. IX. Analysis of the response to ergocornine, an inhibitor of nidation.** *J. Reprod. Fertil.* 8, 225–233; 1964.
- Krauss WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. **Identification of multiple, widely spaced estrogen- responsive regions in the rat progesterone receptor gene.** *Mol. Endocrinol.* 8: 952 – 969; 1994.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. **Cloning of a novel receptor expression in rat prostate and ovary.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5925 – 5930; 1996.
- Kuiper GG, Carlson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. **Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β .** *Endocrinology*, 138: 863 – 870; 1997.
- Kumar A, Singh SM, Sodhi A. **Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal macrophages: role of Ca^{2+} and protein kinase C.** *Int J Immunopharmacol*; 19(3):129–33; 1997.
- Lemons JA, Adcock EW III, Jones MD Jr, Naughton MA, Meschia G, and Battaglia FC. **Umbilical uptake of amino acids in the unstressed fetal lamb.** *J Clin Invest* 58: 1428–1434, 1976.
- Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. **The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells.** *Int Arch Allergy Immunol.* Dec; 129(4):263-76. Review; 2002.
- Loibl S, Minckwitz G, Gwyn K, Ellis P, Blohmer Ju, Schlegelberger B, Keller M, Harder S, Theriault RI, Crivellari D, Klingebiel T, Louwen F, Kaufmann M. **Breast Carcinoma during Pregnancy.** *Cancer.* 106(2): 237-46, 2006.
- Lopes CMD. **Efeito da desnutrição proteico-calórica (PDC) sobre o labirinto placentário de ratas jovens: Observações morfológicas ultraestruturais.** Doctoral thesis, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1992.
- Lowry, O.H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol.Chem.* 193: 265-75, 1951.

- Mateo, R. B., Reichner, J. S. and Albina, J. E. **NO is not sufficient to explain maximal cytotoxicity of tumoricidal macrophages against an NO-sensitive cell line.** *J. Leukoc. Biol.* 60:245; 1996.
- Matera L, Galetto A, Mori M. **Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells.** *Lupus.*;10(10):728-34; 2001.
- Marconi AM, Battaglia FC, Meschia G, and Sparks JW. **A comparison of amino acid arteriovenous differences across the liver and placenta of the fetal lamb.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 257: E909–E915, 1989.
- Matera L. **Endocrine, paracrine and autocrine action of prolactin on immune cells.** *Life Sci* 1996;59(8):599–614.
- Mershon J, Sall W, Mitchner M, ben-Jonathan N. **Prolactin is a local growth factor in rat mammary tumors.** *Endocrinology*, 136: 3619 – 3623; 1995.
- Metcalfe J, Stock MK, Barron DH. **Maternal physiology during gestation.** In: Knobil E & Neill J. *The physiology of reproduction.* New York, Raven Press; 1988.
- Morishige, W. K., and Rothchild, I. **Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, PRL and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat.** *Endocrinology* 95, 260–274; 1974.
- Morishige, W. K., Pepe, G. J., and Rothchild, I. **Serum luteinizing hormone, PRL, and progesterone levels during pregnancy in the rat.** *Endocrinology* 92, 1527–1530; 1973.
- Mujagic Z, Mujagic H. **Importance of serum prolactin determination in metastatic breast cancer patients.** *Croat. Med. J.* 45: 176-180; 2004.
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. **Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19;100(17):9744-9; 2003.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. **Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform.** *Science.* Sep 8;289(5485):1751-4; 2000.
- Murphy LJ, Murphy LC, Vrhovsek E, Sutherland RL, Lazarus L. **Correlation of lactogenic receptor concentration in human breast cancer with estrogen receptor concentration.** *Cancer Res.*, May; 44(5):1963-8; 1984.
- Nagy E, Berczi I. **Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival.** *Endocrinology.* Jun;128(6):2776-84; 1991.
- Nishiguchi Y, Hibasami H, Komada Y, Sakurai M, Nakashima K. **Human promyelocytic cell line HL60 has the specific binding sites for prolactin and its ornithine decarboxylase, DNA synthesis and cellular proliferation are induced by prolactin.** *Leuk Res* 17: 633–637; 1993.
- Ogle TF, Millis TM and Soares MJ. **Changes in cytosolic and nuclear progesterone receptors during pregnancy in rat placenta.** *Biol. Reprod.*40: 1012 – 1019; 1989.
- Ormandy CJ, Hall RE, Manning DL, et al. **Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3692-3699; 1997.

- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, S.J., Kushner, P.J., Scanlan, T.S. **Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites.** Science 277, 1508–1510; 1997.
- Pedersen RA. **Early mammalian embryogenesis.** In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwalk GS Market CL, Pfaff, DW. The physiology of reproduction. Raven Press, New York; 1988.
- Perks CM, Keith AJ, Goodhew KL, et al. **Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines.** Br, J. Cancer. 91: 305-311; 2004.
- Peters MV, Meakin JW. **The influence of pregnancy in carcinoma of the breast.** Prog Clin Cancer 1: 471-493, 1965.
- Petti DA, Kemp C, Silva ND, Mendes S. **Câncer de mama no ciclo gravídico puerperal.** Ver Paul Méd 107: 139-143, 1989.
- Podolsky, DK. **Inflammatory bowel disease.** N. Engl. J. Med. 347: 417-429. 2002.
- Prigent-Tessier A, Tessier C, Hirose-Takamori M, Boyer C, Ferguson-Gottschall S, Gibori G. **Rat decidual prolactin. Identification, molecular cloning, and characterization.** J Biol Chem. Dec 31;274(53):37982-9. 1999.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey CG Jr. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents, final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing comité on reformulation of the AIN – 76 rodent diet.** J. Nutr. , 123: 1939 – 1951; 1993.et al., 1993.
- Reynolds C, Montone KT, Powell CM, Tomaszewski JE, Clevenger CV. **Expression of prolactin and its receptor in humanbreastcarcinoma.** Endocrinology. Dec;138(12):5555-60; 1997.
- Riddle O, Braucher PF. **Studies on the physiology of reproduction in birds XXX. Control of the special secretion of the crop-gland in pigeons by an anterior pituitary hormone.** Am J Phys;97:617–25; 1931.
- Rose-Hellekant TA, Arendt LM, Schroeder MD, Gilchrist K, Sandgren EP, Schuler LA. **Prolactin induces ERalpha-positive and ERalpha-negative mammary cancer in transgenic mice.** Oncogene. Jul 24;22(30):4664-74. 2003.
- Rosso P. **Changes in the transfer of nutrients across the placenta during normal gestation in the rat.** Am. J. Obstet. Gynecol., 122: 761 – 766; 1975.
- Roussev RG, Higgins NG, McIntyre JA: **Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells.** J Reprod Immunol; 25:15–29; 1993.
- Salem, M. L., Hossain, M. S., Nomoto, K. **Mediation of the immunomodulatory effect of -estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF- and IFN-.** Int. Arch. Allergy Immunol. 121, 235–245; 2000.
- Sands, BE. **Inflammatory bowel disease; past, present and future.** J. Gastroenterol. 42:16-25; 2007.
- Saxena BN, Refetoff S, Emerson K & Selenkow HA. **A rapid radioimmunoassay for human placental lactogen, Application to normal and pathologic pregnancies.** American Journal of Obstetrics and Gynaecology 101 874–885; 1968.
- Schuurs AHWM, Verheul HAM. **Effects of gender and sex hormones on the immune response.** Steroid Biochem; 35Ž2:157–72; 1990.

- Soares MJ. **Developmental changes in the interplacental distribution of placental lactogen and alkaline phosphate in the rat.** J. Reprod. Fertil., 79: 93 – 98; 1987.
- Solana R, Mariani E. **NK and NK/T cells in human senescence.** Vaccine. Feb 25;18(16):1613-20. Review; 2000.
- Spangelo BL, Hall NR, Goldstein AL. **Evidences that prolactin is an immunomodulatory hormone.** In: Macleod RM, Thorner MO, Scapagnini U, editors. Prolactin basic and clinical correlates. Padova: Livinia Press; p. 43; 1985.
- Spangelo BL, Hall NR, Ross PC, Goldstein AL. **Stimulation of in vivo antibody production and concanavalin-A induced mouse spleen cell mitogenesis by prolactin.** Immunopharmacology;14:11–20; 1987.
- Straub, R. H., Konecna, L., Hrach, S., Rothe, G., Kreutz, M., Scholmerich, J., Falk, W., Lang, B. **Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 83, 2012–2017; 1998.
- Szekeres-Bartho J, Par G, Dombay GY, Smart YC, Volgyi Z: **The anti-abortion effect of PIBF in mice is manifested by modulating NK activity.** Cell Immunol; 177:194–199; 1997.
- Szekeres-Bartho J, Szekeres GY, Debre P, Autran B, Chaouat G: **Reactivity of lymphocytes to a progesterone receptor-specific monoclonal antibody.** Cell Immunol; 125:273–283; 1990.
- Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK, Gibori G. **Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens.** Endocrinology. May;139(5):2432-42, 1998.
- Tessier C, Deb S, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gibori GB, Shiu RP, Gibori G. **Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin.** Endocrinology; 141:3842–3851; 2000.
- Tisdale MJ. **The ‘cancer cachectic factor’.** Supportive Care in Cancer 11 73–78; 2003.
- Tisdale MJ. **Tumor-host interactions.** J Cell Biochem. Nov 15;93(5):871-7; 2004.
- Toledo MT and Gomes-Marcondes MC. **Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma.** Oncol Res. 1999;11(8):359-66, 1999.
- Toledo MT, Gomes-Marcondes MCC. **Placental glycogen metabolism changes during Walker tumour growth.** Placenta, 25:456-462; 2004.
- Toledo, MT; Ventrucci G and Gomes-Marcondes, MCC; **Cancer during pregnancy alters the activity of rat placenta and enhances the expression of cleaved PARP, cytochrome-c and caspase 3.** BMC Câncer 6:168 – 178; 2006.
- Tressier C, Deb S, Prigent-Tressier A, et al. **Estrogen receptors α and β in rat deciduas cells: Cell-specific Expression and diferential regulation by steroid hormnes and prolactin.** Endocrinology. 141:10, 3842- 3851; 2000.

- Tworoger SS, Eliassen AH, Rosner B, Sluss P, Hankinson SE. **Plasma prolactin concentrations and risk of postmenopausal breast cancer.** *Cancer Res.* 2004 Sep 15;64(18):6814-9; 2004.
- Vale C, Stewart L, Tierney J. **Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials.** *Br J Cancer* 14; 92(5): 811-4, 2005.
- van den Heuvel M, McBey B-A, Hahnel AC, Croy BA: **An analysis of the uterine lymphocyte-derived hybridoma cell line GWM 1-2 for expression of receptors for estrogen, progesterone and interleukin 2.** *J Reprod Immunol*; 31:37-50; 1996.
- Van Der Vange, N. Et al. **The prognosis of cervical cancer associated with pregnancy: a matched cohort study.** *Obstet & Gynecol.*, 85(6): 1022- 1026, 1995.
- Vary T.C.; Dardevet D.; Grizard J.; Voisin L.; Buffiere C.; Denis P.; Breuille D.; & Obled C. **Differential regulation of skeletal muscle protein synthesis turnover by insulin and IGF-I after bacteremia.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 275. 584- 593E, 1998.
- Ventrucci G, Mello MAR and Gomes-Marcondes MCC. **Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet.** *Endocrine-Related Câncer.* 11 887-895; 2004.
- Villa P, Arioli P, Guaitani A. **Protein turnover, synthesis and secretion of albumin in hepatocytes isolated from rats bearing Walker 256 carcinoma.** *In vivo Cell Dev. Biol.*, 28: 157 - 160; 1992.
- Vonderhaar BK. **Estrogens are nor required for prolactin induced growth of MCF-7 human breast cancer cells.** *Cancer Lett.* 47: 105-110; 1989.
- Vonderhaar BK. **Prolactin:The forgotten hormone in breast cancer.** *Pharmacol. Ther.* 79: 169-178; 1998.
- Waalkes, T.P.; Udefriend, S. A. **fluorometric method for the estimationof tyrosine in plasma and tissues.** *J Lab Clin Med.*, 50(5): 733-736, 1957.
- Walker AM, Montgomery DW, Saraiya S, Ho TW, Garewal HS, Wilson J. **Prolactin-immunoglobulin G complexes from human serum act as costimulatory ligands causing proliferation of malignant B lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:3278-3282; 1995.
- Wang DY, Hampson S, Kwa HG, Moore JW, Bulbrook RD, Fentiman IS, Hayward JI, King RJ, Miliis RR, Rubens RD. **Serum prolactin levels in women with breast cancer and their relationship to survival.** *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 22: 487-492; 1986.
- Waseda N, Kato Y, Imura H, Kurata M. **Prognostic value of estrogen and prolactin receptor analysis in human breast cancer.** *Jpn J Cancer Res.*, Jun;76(6):517-23; 1985.
- Welsch CW. **Prophylaxis of spontaneously developing mammary carcinoma in C3H/HeJ female mice by suppression of prolactin.** *Cancer Res* 33:2939-2946; 1973.
- Welsch CW and Nagasawa H. **Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review.** *Cancer Res.* 1977 Apr;37(4):951-63; 1977.
- Wiebold JL, Stanfield PH, Becker WC, Hillers JK: **The effect of restraint stress in early pregnancy in mice.** *J Reprod Fertil*; 78:185-192; 1986.

- Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE. **CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes.** J Immunol; 157:473-9; 1996.
- Wood P. **Understanding Immunology.** Harlow: Prentice Hall; 2001.
- Williamson DH, Wood S, Evans RD: **Tumour growth and lipid metabolism during lactation in the rat.** Adv Enzyme Regul, 27:93-104; 1988.
- Wu JT and Meyer RK. **The effect on implantation of culturing delayed rat blastocysts in medium containing 17 β -estradiol.** Biol. Reprod. 3: 201-204; 1970.
- Yano CL, Ventrucchi G, Field WN, Tisdale MJ, Gomes-Marcondes MC. **Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes.** BMC Cancer. Jan 28;8(1):24; 2008.
- Yen SSC. **The placenta as the third brain.** J. Reprod. Med.39 (4): 277 – 280; 1994.
- Yochim JM and De Feo VJ. **Control of decidual growth in the rat by steroid hormones of the ovary.** Endocrinology. Jul;71:134-42. 1962.
- Yu-Lee Ly. **Molecular actions of prolactin in the immune system.** Proc Soc Exp Biol Med 1997;215:35–52.
- Zemlickis D, Lishner M, Degendorfer P, et al. **Maternal and fetal outcome after breast cancer and pregnancy.** Am J Obstet Gynecol; 166: 781-787; 1992.

INCA: consulta ao site <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf> e <http://www.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>. 18/02/2008.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

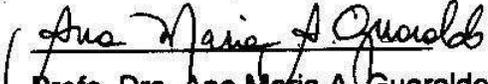
CERTIFICADO

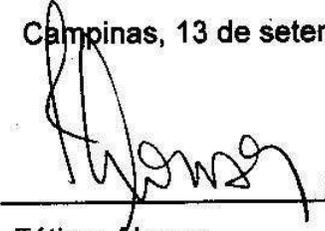
Certificamos que o Protocolo nº 217-5, sobre "ASSOCIAÇÃO ENTRE CÂNCER, GRAVIDEZ E NUTRIÇÃO" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 13 de setembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 217-5, entitled "EFFECTS OF CANCER, GROWTH ON PREGNANCY DEVELOPMENT", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 13, 2005.

Campinas, 13 de setembro de 2005.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP