

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

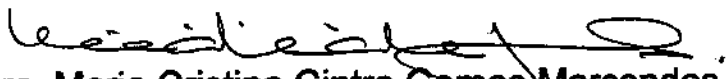


Mércia Tancredo Toledo

**“ ASSOCIAÇÃO GRAVIDEZ E CÂNCER:
COMPROMETIMENTO DA ATIVIDADE PLACENTÁRIA.
ESTUDO EM RATAS PRENHES PORTADORAS DO
TUMOR DE WALKER 256”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Mércia Tancredo Toledo</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a
Obtenção do Título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.


Orientador: Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

2004 13890

2003

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	T/UNICAMP
	+S75a
V	EX
TOMBO BC/	5972-1
PROC.	16-2-117/04
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

Bib ID 322072

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

T575a

Toledo, Mércia Tancredo

Associação gravidez e câncer: comprometimento da atividade placentária - estudo em ratas grávidas portadoras do tumor de Walker 256 /

Mércia Tancredo Toledo. --

Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .

Instituto de Biologia.

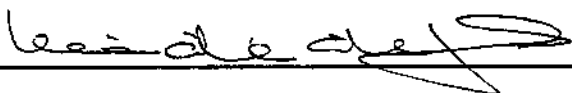
1. Gravidez. 2. Câncer. 3. Placenta. 4. Apoptose. 5. Metabolismo
I. Marcondes, Maria Cristina Cintra Gomes. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 25/09/2003

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Profª Drª Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes (Orientador)



Profª Drª Maria Alice Roston de Mello

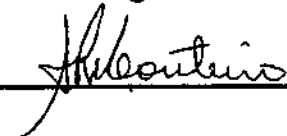


Profª Drª Marilza Vieira Cunha Rudge



Prof Dr Antônio Carlos Boschero

Profª Drª Alba Regina Souza Brito



Suplentes:

Prof Dr José Roberto Moreira Azevedo



Prof Dr Francesco Langone

"Agradeço a todos os animais que contribuíram com suas vidas em prol da ciência, como cobaias de laboratório;

Doaram suas células, para que sob a luz de um microscópio os cientistas pudessem revelar ao mundo novos conhecimentos no campo das pesquisas, na cura de tantos males, assim que afligem a humanidade..."

"Dedico este trabalho a meu marido Marcello Toledo e a meus filhos Matheus Tancredo Toledo e Maria Carolina Tancredo Toledo, por tudo que representam: Amor sublime. Obrigado pela paz, pelos momentos de alegria, folia e felicidade.."

Minha missão

Pesquisar apesar de tudo, sem medo de errar

Apesar da ansiedade, angústia e incerteza,

Pesquisar apesar do passado, do presente, do futuro,

Dos impasses, dos problemas, até de minha impossibilidade.

Pesquisar apesar do outro, das sombras das indefinições.

Apesar de Deus, pesquisar hoje mais do que nunca...

Procurar, por dias e dias, olhos atentos nas lentes do microscópio,

Procurando uma luz, para a ciência, para a cura.

Vencida uma partícula de minha jornada,

Novos caminhos esperam para serem percorridos.

No campo das pesquisas vou doando minha vida

Com coragem e determinação para enfrentar tantos desafios,

Aos meus mestres, minha eterna gratidão

Me fizeram sábia, humana.

Hoje concluo uma pequena parte de meu trabalho

Com orgulho e determinação para enfrentar,

Novos desafios que com certeza surgirão.

Peço a Deus que guie minhas mãos,

Para conduzir minha vida para que eu seja seu instrumento,

Servir à sociedade, aos meus irmãos, ao meu país,

E a ciência, sem jamais desanimar..."

AGRADECIMENTOS

Deus nos concede a inteligência mas nos dá responsabilidades e discernimento para podermos escolher caminhos retos ou tortuosos; fica assim em nossas mãos a decisão do ter ou ser. Maravilhoso é saber que a felicidade não é nosso destino, mas nosso caminho.

Agradeço a Deus pela inteligência, aos mestres pela paciência, aos meus colegas pelas alegrias e à Ciência por me dar a oportunidade de criar.

Agradeço à Jesus, mestre bondoso e amado, por me dar saúde física e mental para a realização deste trabalho. Aos espíritos amigos que sempre olharam por toda minha família em todos os momentos de paz e de incerteza, meus eternos agradecimentos.

Agradeço a meus pais, Manoel e Carmem pela segurança, amparo e presença, por acreditar em meu sonho. A todos de minha família pelo apoio e compreensão nas horas de ausência.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho:

À Prof Dra Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, minha orientadora e amiga, pelo carinho, companheirismo, pela paciência e tolerância; por me ensinar que a Ciência tem seu tempo certo; e por ter- me aberto as portas maravilhosas do saber.

A todos os mestres e doutores do Departamento de Fisiologia e Biofísica que forneceram drogas, reagentes, equipamentos para a realização deste trabalho. A todos os funcionários deste departamento muito obrigado.

Aos companheiros do laboratório de Nutrição e Câncer pelas horas agradáveis, pelo espírito de luta e perseverança; por me mostrar que a união faz a força e que o respeito mútuo foi a chave de todos estes 7 anos de convivência: Especialmente à Gislaine Ventrucchi, amiga e companheira de todas as horas, pela ajuda nos experimentos; Cláudia Yano, Emiliane Salomão, Leda Maria Totti Alferez, pela amizade e convivência harmoniosa e tantos outros que seguiram seus destinos: Karina Freitas, Elisângela Barbosa de Aquino, Wesley Campos, Rodolfo Valentim e a todos companheiros de pós graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelo incentivo e amizade.

Meus agradecimentos a todos os professores e funcionários do Departamento de Histologia pelo auxílio nas técnicas histológicas em especial ao Prof. Dr. Áureo T. Yamada.

Meus sinceros agradecimentos à Aparecida da Silva Geraldo e Machado que já não estão entre nós, por acreditarem num sonho que se tornou realidade... e continuam olhando por nós todos.

ÍNDICE REMISSIVO

Página

RESUMO _____	ix
ABSTRACT _____	xi
INTRODUÇÃO _____	1
OBJETIVOS _____	12
CAPÍTULOS	
I.1 Trabalho submetido à publicação no periódico Placenta _____	13
I.2 Trabalho submetido à publicação no periódico Biology of Reproduction _____	39
I.3 Trabalho a ser submetido à publicação no periódico Oncology Research _____	61
CONCLUSÃO _____	82
PERSPECTIVAS FUTURAS _____	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	86
ANEXO	
Trabalhos apresentados em congressos _____	91

RESUMO

A placenta provê todas as necessidades para o crescimento e desenvolvimento fetal. Na presença de neoplasia é difícil predizer qual será a duração, evolução e termo da gravidez. O crescimento tumoral é prejudicial à mãe e à unidade materno fetal. O substrato energético fundamental usado pelo feto é a glicose proveniente da placenta, já que o fígado fetal é incapaz de processar a gliconeogênese. A placenta armazena glicogênio para sua própria atividade metabólica e provê lactato para o metabolismo fetal. Em estudos prévios, observamos danos à unidade feto-placentária, através de alterações bioquímicas e morfológicas na placenta, associadas ao crescimento do tumor de Walker ou à inoculação do líquido ascítico. Apoptose placentária pode afetar as funções da placenta e pode estar associada ao retardo de crescimento fetal. Por isto, este trabalho teve por objetivos investigar: 1) Reserva de nutrientes placentários através da análise de armazenamento de glicogênio; 2) Precursores de apoptose placentária possivelmente produzidos em função do crescimento do Carcinossarcoma de Walker 256 ou pela inoculação de líquido ascítico; 3) Envolvimento do sistema ubiquitina-proteossomo no processo seletivo de proteínas placentárias. Ratas Wistar grávidas adultas foram distribuídas em três grupos: controle (C); tumor de Walker (W); inoculadas com líquido ascítico (A); sacrificadas no 16º, 19º e 21º dia após a cruzar. Os tecidos placentários foram homogenizados e analisados através de: I) ensaios bioquímicos para glicogênio, conteúdo protéico, fosfatase alcalina e atividade glutatona-S-transferase; II) ensaios imunohistoquímicos, contando-se células positivas para PARP, caspase-3 e citocromo c, e IV) quantificação de precursores apoptóticos (PARP, anti-caspase 3 e citocromo c) e do sistema ubiquitina-proteossomo subunidade 20S, P42 e ubiquitina E2 por Western blotting. Os pesos placentário e fetal foram significativamente reduzidos em ratos implantados com tumor e inoculados com líquido ascítico nos três dias de análise da gravidez. O efeito do crescimento tumoral aumentou os índices de reabsorções fetais que foram semelhantes ao dos grupos inoculados com líquido ascítico.

O labirinto trofoblasto apresentou-se reduzido no 21º dia em ambos os grupos W e A. Os estoques de glicogênio e a atividade da fosfatase alcalina foram reduzidos no grupo implantado com tumor. Os efeitos produzidos pelo crescimento tumoral foram semelhantes aos observados nos grupos inoculados com líquido ascítico. Diminuição do conteúdo protéico placentário foi observado nos grupos W e A. Placenta, de ratos implantados com tumor e inoculados com líquido ascítico, apresentaram diminuição na atividade de GST no 19º e 21º dia; paralelamente houve aumento significativo de PARP, caspase-3 e citocromo c placentário tanto na análise imunohistoquímica quanto na análise por Western blotting. O crescimento do tumor de Walker causou prejuízo ao tecido placentário e, especialmente, promoveu modificações nos precursores da apoptose. Considerando-se que o espongio trofoblasto é um dos responsáveis por manter a função placentária normal, a apoptose descontrolada destas células pode resultar em impacto negativo ao desenvolvimento fetal através de fatores produzido pelas células do tumor, ou, indiretamente, pelos efeitos causados pela inoculação do líquido ascítico aumentando a apoptose. Em animais implantados com tumor e inoculados com líquido ascítico os tecidos placentários não apresentaram diferença significativa de ubiquitina E2, embora as subunidades proteossômicas 20S e P42 fossem significativamente mais expressivas nos grupos W e A, com relação aos respectivos controles. O sistema ubiquitina-proteossomo está envolvido na reorganização e seleção de proteínas nucleares e citoplasmáticas; sendo assim, a presença de tumor ou a inoculação do líquido ascítico promoveu alterações neste sistema comprometendo, provavelmente, a viabilidade dos tecidos placentários e, conseqüentemente, a evolução da gravidez. Esses resultados podem ajudar na compreensão de eventos e identificação de métodos que venham garantir o bem-estar fetal e desenvolvimento da placenta. Assim o crescimento do tumor de Walker, juntamente com a inoculação de líquido ascítico, promovem danos irreversíveis á placenta alterando sua homeostasia assim prejudicando o desenvolvimento e a sobrevivência fetal no ambiente uterino.

ABSTRACT

The placenta provides all needs for healthy fetus development. The cancer development difficulties to predict the period, evolution and term of pregnancy. The tumour growth can be prejudicial to mother, foetus and, especially to maternal-fetal unit. The fundamental energy substrate used by fetus and placenta is glucose, although fetal liver is incapable to process gluconeogenesis. The placenta cells mobilise glycogen storage for its own energy activity and provides lactate to earlier fetal metabolism. In previous studies, we observed damage in the maternal-foetal unity, showed by biochemical and morphological alterations in placenta associated to tumour growth or ascitic fluid inoculation. Placental apoptosis may affect a range of placental functions and can be associated foetal growth retardation. For this reason the aim of this work was to analyse the effects of Walker 256 carcinosarcoma growth in pregnant rats studying 1) the nutrient reserves as glycogen storage 2) the effects on placental apoptotic precursors and 3) the involvement of the ubiquitin-proteasome system on the selective process of placental proteins. Adult pregnant Wistar rats were distributed into three groups: control, C; tumour bearing, W; injected ascitic fluid, A, and sacrificed on 16th, 19th or 21st day after breeding. The placental tissue aliquots were analysed after homogenising and measuring I) placental glycogen, and protein content and alkaline phosphatase and glutathione-S-transferase activity; II) histochemically the glycogen cells presence; III) Immunohistochemically assays counting [positive cells for PARP, caspase-3 and cytochrome c, and IV) The apoptotic precursors (PARP, anti-caspase-3 and cytochrome c) and ubiquitin-proteasome proteins (ubiquitin E2, P42 and subunit 20S) expression. The placenta and fetal weight were significantly reduced in both tumour bearing and ascitic fluid injected rats since 16th, 19th and 21st day of pregnancy. The effects of tumour growth, inducing high fetal reabsorption sites were similar in ascitic fluid injected group. Labyrinth layer was significantly reduced on 21st day in both tumour bearing and ascitic fluid injected. The placental glycogen cells and alkaline phosphatase activity were reduced in tumour groups. The effect produced by tumour growth were similar that observed in ascitic fluid injected group. Decrease in placental protein content was observe in both W and A groups.

Placental PARP, caspase-3 and cytochrome c positive cells, analysed by immunohistochemistry and cells and Western blot, were increased in tumour-bearing and ascitic fluid injection groups, showing that tumour growth clearly produced damage in placental tissue, especially inducing changes in apoptotic precursors. Since the trophoblastic cells are the responsible ones for maintaining normal placental function, the uncontrolled death of this cells could result in a negative impact to foetal development, as many factors either directed produced by tumour cells or indirectly effect produced by ascitic fluid substances, increasing the apoptosis rate. In tumour-bearing and ascitic fluid groups the placenta tissues showed no difference in ubiquitin E2 quantity, although the proteasome subunits 20S and P42 contents were significantly higher in the W and A rats. This results suggest that the ubiquitin proteasome system was involved in placental tissues probably being responsible for organizer and selection of cytoplasmatic and nuclear proteins. The presence of tumour or ascitic fluid injected probably promoted alterations in the placenta tissues that committed the pregnancy evolution. The knowledge of this events resulted by tumour effects may help to identify the better way to guarantee the welfare of fetal and placenta development. In conclusion the tumour growth and, especially, ascitic fluid injected promoted irreversible damage in a placenta tissue altering the homeostasis and compromising the foetal development.

INTRODUÇÃO

Entre todos os períodos do ciclo vital, a gravidez é um dos processos mais decisivos e singulares. Durante o período gestacional, mãe e feto tem um relacionamento íntimo e inseparável. A gravidez caracteriza-se pela formação de um órgão ímpar, a placenta, que tem duração limitada. Esse órgão desempenha funções diversificadas, funcionando como intestino fetal, responsável pelo suprimento de nutrientes, como pulmão fetal nas trocas de oxigênio e dióxido de carbono, como rim fetal, na regulação dos volumes líquidos e eliminação de metabólitos de refugo, e como glândula endócrina versátil, que sintetiza muitos hormônios esteróides e protéicos que afetam o metabolismo, tanto materno, quanto fetal.

O suprimento de nutrientes ao feto depende de reserva materna e ingestão de alimentos, bem como da função placentária. O crescimento placentário, aumenta ao longo do período gestacional, paralelamente ao crescimento fetal. A falha da função placentária pode ser observada experimentalmente ou naturalmente, e está diretamente relacionada ao decréscimo de bem estar e crescimento fetal.

A competição nutricional ou a carência alimentar, durante a gestação, pode alterar o desenvolvimento da placenta. Dessa forma, algumas patologias como o câncer, por exemplo, podem interferir no processo gestacional.

O câncer, crescimento desordenado das células dos tecidos, compromete, na maioria dos casos, a homeostasia do hospedeiro levando-o a processos de espoliação tecidual, culminando em morte. Associação gravidez e câncer não é rara e a escassez de relatos literários da real interferência do crescimento neoplásico sobre o estado grávidico, dificulta prever qual será a duração, a evolução e o termo da gravidez, pois tratam-se de dois pacientes, mãe e feto.

Portanto, estudos que visam elucidar o mecanismo de alteração da atividade celular placentária assumem importância significativa, quanto ao entendimento dos prejuízos causados na associação gravidez e câncer; sendo

úteis para que a medicina possa oferecer alternativas de tratamentos a essas pacientes, a fim de preservar a Vida do concepto no ambiente uterino.

GRAVIDEZ

A gravidez um dos quadros mais complexos de alterações e ajustes metabólicos que ocorrem no organismo, tem como principal função a formação de ambiente adequado para o desenvolvimento fetal (KNOPP, et al., 1981). Adaptações fisiológicas visam manter o crescimento fetal normal até o final da gestação, sem prejuízo materno, desde que a mãe, esteja em condições de saúde e nutrição adequadas, caracterizadas pelo aumento da ingesta de alimento e mudanças importantes no metabolismo envolvendo carboidratos, lipídeos e proteínas.

Durante a gravidez, o metabolismo materno ajusta-se para fornecer nutrição adequada para a mãe e para a unidade feto-placentária em crescimento. Alterações metabólicas ocorridas na gravidez, extensivamente descritas por FREINKEL et al. (1972) e HAY (1998), visam fornecimento contínuo de nutrientes e metabólicos, como aminoácidos, glicose, piruvato e lactato são necessários para a pré implantação do embrião no útero. Por outro lado, o trofoblasto placentário tem a capacidade de metabolizar nutrientes redirecionando-o para o embrião e, posteriormente, ao feto. A homeostase da glicose é alterada pelo aumento dos níveis de estrógenos e progesterona. Os estrógenos, principalmente, parecem aumentar a eficácia da ação insulínica, estimulando sua secreção e melhorando a utilização periférica da glicose; por essa razão, existe maior eficácia na manutenção dos níveis glicêmicos em jejum, melhor tolerância à glicose e maior armazenamento de glicogênio tissular (MATTHEWS et al., 1998). Os níveis de glucagon estão relativamente suprimidos após as refeições, nas grávidas, permitindo que o anabolismo seja marcado por aumento dos depósitos maternos de gorduras, da massa corpórea magra e proteínas na primeira fase da gravidez facilitados pela hiperinsulinemia.

Na segunda metade da gestação, a elevação sérica de hormônio lactogênio placentário (HLP) e de outros hormônios contra-insulínicos sintetizados pela placenta, modificam a utilização materna de glicose e de aminoácidos. O HLP estimula a lipólise no tecido adiposo materno e poupa glicose, o nutriente mais importante para o crescimento fetal. Essas modificações são, em grande parte, responsáveis pelo estado "diabetogênico" da gravidez, caracterizado por excessiva liberação de insulina, associado à diminuição da ação insulínica ao nível celular. Em gestações normais, a hiperplasia das células betas maternas leva a um suprimento de 30% da produção basal de insulina na gestação a termo e a resposta insulínica, na 2ª metade da gravidez é quase o dobro da observada no estado pré-gestacional (LOPEZ et al., 1995).

Em períodos de jejum materno, os cetoácidos constituem importantes nutrientes fetais. O desenvolvimento da placenta e feto é dependente da energia fornecida pela glicose; contudo, não é regulada pela insulina. O transporte da glicose é mediado por GLUT 1, mas sua transferência para o feto é mediada pelo GLUT 3 (LOPEZ et al., 1995). Processos metabólicos fetais consomem cerca de 6 mg/kg/min de glicose e os níveis glicêmicos fetais, normalmente, são mantidos em limites estreitos, já que existe uma homeostasia metabólica materna perfeita. Os aminoácidos, normalmente, estão mais concentrados no sangue fetal do que no materno demonstrando, por parte da placenta, um efetivo transporte ativo pois o sistema transportador deve operar contra um gradiente de concentração. Por outro lado modificações nos processos de síntese e degradação protéica da musculatura esquelética materna e decréscimo da capacidade urogênica são necessários para sustentar a alta demanda de nitrogênio essencial para o crescimento fetal (CARBÓ et al., 1996).

Paralelamente às alterações dos tecidos maternos, a placenta tem papel fundamental no redirecionamento de nutrientes ao feto. Cerca de 90% do glutamato circulante é metabolizado pelos trofoblastos por descarboxilação e oxidação, pela ação da glutamina sintetase, convertendo-o em glutamina e direcionando-o à circulação fetal, sendo utilizado pelo fígado e outros tecidos fetais como fonte de nitrogênio (MATTHEWS et al., 1998).

Em humanos é o sinciotrofoblasto, componente da barreira placentária, responsável pela regulação deste transporte. No que se refere aos lipídeos, ocorre um desdobramento parcial destes na superfície materna, para depois serem transferidos para o feto (GARCIA & FERNANDEZ, 2001).

Em vários estágios durante o desenvolvimento fetal, a placenta incube-se de notórias funções até que os órgãos fetais tornem-se funcionais. Estas incluem as trocas gasosas, a excreção, a manutenção da homeostasia, a secreção de hormônios, a hemopoiese e as funções metabólicas hepáticas (WHEATER, 2001).

A placenta apresenta grande complexidade bioquímica pois exerce funções múltiplas relacionadas com atividade efetuadas pelos pulmões, rins, hipófise, ovários, fígado e intestino no adulto (WHEATER, 2001). Agrupam-se as funções placentárias em: Metabólicas: a placenta fornece nutriente e energia para o embrião, pela sua capacidade de síntese de vários compostos (glicogênio, glicerol, ácidos graxos, principalmente nos estágios iniciais da gravidez); ela é a reserva fetal de glicogênio até o terceiro mês, pois a partir deste estágio o fígado fetal está funcionando. O trofoblasto, funcionalmente, pode ser comparado ao parênquima hepático pelas suas atividades anabólicas e catabólicas. Transferência: o aporte de substratos ao feto é dependente do modo específico de transferências das substâncias via placenta; a atividade placentária é altamente complexa no que se refere aos transportes, pois através dela passam várias substâncias que serão utilizadas na síntese dos tecidos fetais, bem como dos produtos resultantes do metabolismo fetal e que devem ser eliminados. Por outro lado, a placenta funciona como um filtro já que a passagem de materiais depende mais de sua estrutura química; porém, certas substâncias, muitas vezes nocivas ao feto, atravessam-na sem restrições (GARCIA & FERNANDEZ, 2001).

A glicose materna atravessa a placenta por difusão facilitada, enquanto os aminoácidos, são transportados ativamente; o glicerol e os cetoácidos fluem de acordo com a disponibilidade sanguínea materna. Endócrina: sintetiza hormônios esteróides e protéicos que irão afetar o metabolismo, tanto materno quanto fetal (GARCIA & FERNANDEZ, 2001).

Segundo LEDERMAN & ROSSO (1980), agressão nutricional sofrida na gestação traz sérios reflexos sobre o crescimento do feto. Por sua vez crescimento, desenvolvimento e, principalmente, a disfunção placentária são cruciais e podem estar correlacionadas ao comprometimento do desenvolvimento fetal (KATAYAMA et al., 2002). A competição nutricional ou carência alimentar da mãe, durante a gestação, pode alterar o processo de desenvolvimento do principal gerenciador da gravidez, a placenta (GOMES-MARCONDES, 1994).

ASSOCIAÇÃO GRAVIDEZ e Câncer

A neoplasia é um tecido que cresce ativamente devido a proliferação de células que sofreram diferenciação anormal irreversível. O mecanismo normal de controle do crescimento desse tecido está alterado permanentemente permitindo, assim, crescimento progressivo e desordenado (ROESEL, 1991; GOMES-MARCONDES, 1994).

A transformação de células de tecidos normais em células tumorais malignas ocorrem em diferentes processos. Os estágios da carcinogênese incluem metabolismo carcinogênico, iniciação, promoção, diferenciação celular e progressão da célula tumoral. O processo de iniciação celular envolve mutação resultante de reação covalente do carcinógeno com o DNA. Subseqüentemente , quando o processo de promoção ocorre estas não se transformarão em células tumorais sem que haja danos no DNA. Assim, neste processo estão envolvidas mudanças químicas e estruturais das membranas das células e ativação de proteína-quinase C ocorrendo fosforilação de macromoléculas de proteínas reguladoras da função celular. Sequentemente, há indução de enzimas relacionadas à síntese de produtos envolvidos na divisão celular (SLAGA, 1995) e, como consequência, desarranjo e desordem do processo de crescimento e desenvolvimento celular e tecidual.

A morfologia da célula tumoral é bem diferente da característica de células normais do tecido de origem.

São geralmente maiores e a cromatina é mais aparente (hipercromático); encontram-se em intenso processo de divisão celular, muitas vezes anormais, gerando presença de células com variação de tamanho, formato e número (RUDDON, 1987).

Neoplasias podem ocorrer em tecidos normais em fases distintas de crescimento e desenvolvimento. Esses tumores malignos invadem e destroem tecidos adjacentes normais, formam metástases, por vias linfáticas ou por vasos sanguíneos, localizadas em linfonodos ou em outros tecidos do corpo, e continuam a crescer mesmo em estágio de inanição do hospedeiro, interrompendo funções vitais e, conseqüentemente, levando o hospedeiro à caquexia (perda extrema de peso). A caquexia, é muitas vezes, agravada por seqüentes hemorragias e infecções, culminando em morte (RUDDON, 1987, DARLING et al., 1990).

Assim, o câncer difere marcadamente quanto ao tipo, progressão e efeitos danosos de acordo com sua origem, propriedade de crescimento e metástases, refletidas pelo estado fisiopatológico do hospedeiro (SLAGA, 1995). Desta forma, o câncer, assim como outras patologias, pode interferir no processo gestacional (GOMES-MARCONDES, 1994).

Dependendo do estágio do desenvolvimento do câncer e quando há demora no estabelecimento do diagnóstico é difícil prever qual será a duração, evolução e termo da gravidez, pois trata-se de dois pacientes, mãe e feto (ABRÃO, 1988).

O rápido crescimento do tumor de Walker 256 durante a gestação em ratos prejudica o crescimento fetal, mas não há relatos do decréscimo da disponibilidade de nutrientes ao feto. O desenvolvimento tumoral promove elevada porcentagem de reabsorções fetais, bem como alto índice de hemorragia e edema placentário nestas ratas com câncer (TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999). Metástases placentárias são extremamente raras (ELTORKY et al., 1995) e, por conseqüência, são raras as metástases no concepto (FREEDMAN et al., 1960).

O crescimento e as características metabólicas da parte fetal, têm similaridades importantes com o rápido crescimento tumoral. Desta forma a atividade metabólica tecidual fetal e tumoral necessita de quantidades apreciáveis de glicose e de aminoácidos, para a oxidação e síntese, estando, portanto, dependente diretamente das alterações metabólicas maternas (CARBÓ ET AL., 1996).

A associação entre câncer e gravidez está na ordem de 0,01% a 0,1% sendo que 26% destes, são de mama (WEIZS et al., 2001; DUNN et al., 1999); porém, são poucos os estudos relatando alterações fisiopatológicas, tanto maternas quanto fetais. Assim, o estudo particularizando a atividade placentária, frente aos efeitos tumorais, contribuirá, futuramente, para preservar a integridade dos tecidos fetais e, principalmente, da unidade feto-placentária.

APOPTOSE

O desenvolvimento de uma única célula-ovo fertilizada, formando organismo multicelular complexo envolve replicação celular, crescimento e especialização progressiva (diferenciação) para uma grande variedade de funções. A divisão e a diferenciação celular são proporcionais à morte celular, tanto durante o desenvolvimento e o crescimento do organismo imaturo quanto no organismo adulto. Nessas circunstâncias o mecanismo de morte celular ocorre por mecanismo chamado apoptose (YOUNG & HEATH, 2001).

Apoptose é um processo fisiológico de morte celular importante para o desenvolvimento normal e função de múltiplos organismos. Anormalidades em seu controle podem contribuir com uma série de doenças incluindo o câncer, doenças autoimunes e degenerativas (STRASSER, 2000).

As células mortas e as que estão em processo de morte celular são comuns nos tecidos. A morte das células isoladas nos tecidos normais, pode ocorrer como parte da renovação celular e do desenvolvimento embrionário normal ou como parte de modificações cíclicas em tecidos e órgãos.

Morte celular ocorre por dois diferentes fatores: necrose ou apoptose. Apoptose é um mecanismo comum de morte celular com aspecto microscópico característico: encolhimento ou fragmentação das células, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, organelas citoplasmáticas intactas, fagocitose de células mortas ou de seus fragmentos por células adjacentes e ausência de resposta inflamatória (WYLLIE, 1981). Morte celular por necrose, a qual ocorre em condições patológicas, é caracterizada por danos as membranas celulares, perda do equilíbrio osmótico, alterações mitocondriais, desintegração de organelas e resposta inflamatória celular (TRUMP et al., 1981; WYLLIE, 1981)

Tanto em condições normais quanto patológicas, uma grande variedade de disparadores pode iniciar o processo de apoptose dependendo do tipo e da situação celular. Assim, o processo apoptótico desenvolve-se em fases: inicial, onde a presença de genes regulam a ocorrência de apoptose, ativadora, sinais comandados pelo programa genético ou falha de sinalização de mecanismos repressores; progressão, mudanças celulares na cromatina, pinocitose nuclear e fragmentação do DNA (MIHICH & SCHIMKE, 1994, ELLIS, 1991).

O disparador da apoptose pode ser a ligação de uma molécula sinalizadora ao receptor de membrana específico, ou a falta de sinal particular que é necessário para bloquear a apoptose. No interior da célula, certos produtos genéticos inibem (bcl-2) ou estimulam a apoptose (p53) dependendo das interações entre si e de muitos outros reguladores (YOUNG & HEATH, 2001). Portanto, apoptose é um mecanismo especializado de morte celular regulada ao nível molecular e conservada ao longo do período evolutivo. Em muitos instantes do desenvolvimento normal ou mantenedor da homeostase multicelular do organismo, programas intracelulares estratégicos são iniciados assegurando destruição ou controlando a presença de células indesejadas. A interferência deste programa pode estar implícita em muitas patologias, como o câncer e doenças autoimunes (KUMAR, 1998).

Poly(ADP-ribose) polimerase, PARP, é uma enzima nuclear que tem a capacidade de reconhecer e ligação às fitas de DNA e sintetizar poly (ADP-ribose) quantitativamente de acordo com o número de fragmentações gênicas

(MASUTANI et al., 1995). Atua no mecanismo de reparo genômico, modificando a arquitetura de proteínas próximas à região do DNA fragmentado, facilitando a abertura e condensação de cromatina requerida para o recrutamento de processo de reparo celular (CHIARUGI, 2002). PARP 1 é um importante modulador de programa de morte celular programada gerenciada pelo protooncogene p53. Experimentos *in vitro* demonstraram que danos no DNA causam uma excessiva ativação de PARP1 com redução de ATP e disfunção celular (CHIARUGI, 2002). PARP é quebrado em fragmentos de 85 kDa e estes têm sido considerados como marcador de apoptose (KAUFFMAN et al., 1993).

Caspase é um termo recentemente proposto para designar a família cisteínas proteases (ICE/CED-3) (STRASSER, 2000), essenciais para o mecanismo de morte celular em muitas espécies. Toda a sinalização da apoptose converge em maquinaria de destruição celular ativada por essas moléculas que, por sua vez, estão envolvidas no reconhecimento e efetivação do mecanismo de apoptose, não sendo responsáveis pela degradação de substratos celulares durante os estágios finais da apoptose, mas sim por mecanismos reguladores da inicialização do mecanismo de morte celular (STRASSER, 2000). Muitos membros da família das caspases possuem substratos e especificidade similares e parecem ser funcionalmente redundantes (KUMMAR, 1998). Nucleases são comumente encarregadas de serem mediadoras da fragmentação de DNA. LIU e colaboradores (1997) isolaram fator de fragmentação de DNA (DFF em extratos HeLa citosólico e verificaram que caspase 3 é essencial para ativação de DFF que, subsequente induziria fragmentação no DNA. Toda caspase têm capacidade de clivar PARP; a clivagem de PARP, mediada por caspase-3, resulta em separação de 2 dedos de zinco DNA-ligantes expondo domínio C catalítico prosseguindo, assim, a fragmentação e não reparo de DNA (NICHOLSON et al 1995).

Estes estudos estabeleceram o papel crucial da caspase 3 e das caspases na execução do mecanismo de morte celular. Mudanças bioquímicas associadas à apoptose parecem estar envolvidas na amplificação da cascata da ativação das caspases.

Desde que ativadas, as caspases clivam uma série de proteínas celulares, citosólicas e nucleares, resultando em modificações visualizadas durante a apoptose (KUMMAR, 1998).

Mitocôndrias liberam moléculas que participam da ativação das caspases e outros eventos apoptóticos. A disfunção mitocondrial promove a liberação de citocromo c para o citosol, que associa-se ao fator de indução de apoptose (AIF) ativando direta ou indiretamente a fragmentação de DNA (STRASSER, 2000). O citocromo c, por sua vez, associado a fatores indutores de apoptoses, ativa caspase 3, que promove desencadeamento da apoptose de forma indireta por inibição do protooncogene bcl-2 (KUMMAR, 1998).

Em certas condições patológicas, a apoptose pode ser disparada para destruir células anormais, tais como as infectadas por vírus e aquelas com mutações genéticas. Nesses casos, a falha do mecanismo de apoptose pode ser vantajosa para às células tumorais, que crescem de forma desordenada, mediante, falha da apoptose com divisão celular ilimitada (YOUNG & HEATH, 2001). Algumas células são programadas para destruir-se numa certa fase da vida e isso só pode ser evitado se for recebido um sinal externo que detenha o processo. Outras células necessitam de sinais positivos constantes para viver (fatores de crescimento) e se estes forem inibidos, a apoptose prosseguirá (YOUNG & HEATH, 2001).

Apoptose, em placenta humana, é observada em todos os tipos celulares incluindo células trofoblásticas, células endoteliais e células mesenquimais, e ocorre o aumento da taxa de apoptose no decorrer do ciclo gestacional. Contudo, apoptose placentária é um processo normal gestacional; porém, muitos estudos tem demonstrado o aumento da apoptose em placenta de mulheres com retardo de crescimento intrauterino e outras alterações de desenvolvimento fetal (SMITH et al., 1997; KOKAWA et al., 1998; SMITH & BAKER, 1999; EREL et al., 2001).

Em animais de laboratório, apoptose placentária é induzida em placenta por administração de glicocorticóides ou lipopolissacarídeos.

Acredita-se que a placenta seja susceptível a anormalidades endócrinas, citocinas inflamatórias e stress oxidativo; o aumento da apoptose induzido por estas situações pode causar disfunção placentária resultando em deficiência no crescimento e desenvolvimento fetal (KATAYAMA et al., 2002).

Assim, estudos que visam elucidar os mecanismos de alteração da atividade placentária frente aos efeitos neoplásicos, proporcionarão futuras propostas de tratamentos, tanto para o organismo materno, quanto para o organismo fetal.

OBJETIVOS

Dado que no presente modelo experimental de associação entre câncer e gravidez verificamos danos ao feto e também à placenta este trabalho teve como objetivo geral dar continuidade a esta ampla área de pesquisa avaliando às alterações do tecido placentário. Os objetivos específicos foram avaliar os efeitos produzidos pela evolução de neoplasia maligna, carcinossarcoma de Walker 256, durante a prenhez de ratas Wistar adultas, sobre: a) os estoques energéticos placentários (depósitos de glicogênio), b) ativação de precursores apoptóticos (PARP, caspase 3 e citocromo c) e c) sinalização celular através da expressão de proteínas proteossômicas do sistema ubiquitina-proteossomo (subunidades 20S, P42 e ubiquitina E2) no tecido placentário.

I.1 PLACENTAL GLYCOGEN METABOLISM CHANGES DURING WALKER TUMOUR GROWTH.

Trabalho submetido à publicação no periódico *Placenta*.

View Letter

Date: Nov 11, 2003

To: "Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes" cintgoma@unicamp.br

From: The Journal Placenta@uc.edu

Subject: Your PLACENTA Manuscript Submission

Nov 11, 2003

Corresponding Author: Dr Maria Cristina Gomes-Marcondes

Title: PLACENTAL GLYCOGEN METABOLISM CHANGES DURING WALKER TUMOUR GROWTH

Authors: Mercia Tancredo Toledo;

Manuscript No: PL-03-90040R2

Dear Dr Gomes-Marcondes,

Thank you for returning the above manuscript which is now accepted for press. It will be forwarded to the publishers and you will receive proofs from them for your approval.

Yours sincerely

Leslie Myatt
Editor

Close

PLACENTAL GLYCOGEN METABOLISM CHANGES DURING WALKER TUMOUR GROWTH

Mércia Tancredo Toledo & Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes *. Department
Physiology and Biophysics. Biology Institute, UNICAMP Campinas, São Paulo,
Brazil.

Key words: placenta metabolism, glycogen, Walker 256 tumor, pregnancy

Running title: Placental metabolism versus tumor growth.

Address to Correspondence: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.
Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Estadual de Campinas, ZIP
CODE 13083-970. Campinas, Brazil. cintgoma@unicamp.br

Financial support: FAPESP (01/02135-3), CNPq (521048-95-8), CAPES, FAEP-
UNICAMP

SUMARY

The placenta provides the complete requirements for healthy fetal development. The placenta's rat is able to storage glycogen, although the placental cells must therefore mobilize stored glycogen to its own glucose supply whereas maternal glucose or placental lactate provided the fetal growth. Adult female Wistar rats were divided into three groups: Control-C, tumor bearing-W; injected ascitic fluid-A. The rats were sacrificed on the 16th, 19th or 21st day of gestation, analyzing the placenta and fetus weights and placental tissue samples was aliquoted for biochemical assays of glycogen and protein content and alkaline phosphatase activity. Placental sections were morphometrically analyzed and glycogen positive cells were counted. The placental and fetal weight were significantly reduced in both W and A rats from 16th up to 21st day of gestation, which showed high levels of fetal reabsorption sites. Significant reduction in labyrinth zone at day 21 in both tumor bearing and ascitic fluid injected groups was shown, suggesting less substrate exchange at the maternal/fetal surface. The alkaline phosphatase activity as well total protein content were found to be reduced in W and A group. The total placental glycogen and glycogen cells decreased during tumor bearing and ascitic fluid injection, suggesting reduction in its own stored energy. Ascitic fluid injected group, representing an indirect tumor effect, presented similar reduction changes in the placenta to the tumor-bearing group. In conclusion, the tumor growth and, especially, ascitic fluid injection promoted irreversible placental tissue damage altering homeostasis and compromising fetal development.

INTRODUCTION

The placenta is a remarkable organ, which provides the whole needs for fetal growth. The exchange between fetal and maternal blood is the main way to induce healthy fetal development (Rudge et al., 1999; Widdowson 1999). Further, the placental growth is maintained by maternal metabolism and a satisfactory blood supply (Hemberger & Cross, 2001). Metabolites such as pyruvate, lactate, amino acids and, specially, glucose, mainly provided by maternal blood, are necessary even to initiate blastocyte implantation, placentation and embryo and fetal development. The most consistent finding of intrauterine growth restriction (IUGR) is linked to the perturbations in maternal and placental glucose metabolism in several animals, such as rats, and humans (Berkowitz et al., 2000).

The placental glycogen stores in rats are localized in spongy trophoblast zone and these glycogen cells are present up 14th day of gestation. Few glycogen cells are present in labyrinth trophoblast and there is an increase in glycogen content from day 15 to 18 of pregnancy (Lopez et al., 1996). Although it is not well known the placental cells must mobilize stored glycogen, providing glucose to its own metabolism (Barash & Shafrir, 1990). As the fundamental energy substrate used by the fetus is glucose, which is transferred by placenta from mother to the fetus, and knowing that the fetal rat is incapable of gluconeogenesis, any disturbances in maternal and /or placental glucose metabolism could compromise the fetal growth (Redline et al., 1993; Pickard et al., 2003).

Very few studies have reported the real effects of pathological situations, such as cancer development, during pregnancy. Currently there is no evidence to

suggest that tumor burden causes damage or decrease in fetal amino acid availability (Carbó et al., 1996; Carbó et al., 1998). In our previous studies, the pregnant rat bearing Walker tumor showed fetal growth impairment (Gomes-Marcondes et al., 1998) and significant changes in placental weight and protein content. In addition, increased haemorrhagic and edema rates were reported to be associated with high fetal reabsorptions (Gomes-Marcondes et al., 1998; Toledo & Gomes-Marcondes, 1999).

Knowing tumor growth has an exponential growth pattern similar to exponential fetal growth, and that nutrient availability is essential for both cancer and fetal cells, our aim was to investigate whether the placental cell activity and placental glycogen storage were affected as a result of tumor growth.

MATERIALS AND METHODS

ANIMAL

Adult female Wistar rats, n=54, 90 days old, obtained from State University of Campinas - UNICAMP animal's facilities, were maintained in Nutrition and Metabolism Research Laboratory, in a temperature room (22± 2° C) day dark-light cycles 12 hours, and allowed to a semi-synthetic control diet (AIN-93) (Reeves et al., 1993) and water *ad libitum*.

For mating, four females were placed with one male in a cage for 12 hours and females were checked for vaginal smear and counted as day 1 of pregnancy.

All pregnant rats were distributed into three groups: Control-C, tumor bearing-W; injected ascitic fluid-A. The rats were killed on the 16th, 19th or 21st day after breeding.

NEOPLASIC IMPLANT AND ASCITIC FLUID OBTAIN

The Walker 256 carcinosarcoma line, originally obtained from Christ Hospital, Arthur's D Little hospital was maintained in our Laboratory through consecutive subcutaneous or intraperitoneal passages. The Walker cell suspension (approximately 2.5×10^5 cells in 0.5 ml) was injected subcutaneously on 2nd day of pregnancy; control rats were injected with 0.5 ml 0.9% NaCl (w/v) solution. The ascitic fluid obtained from the intraperitoneal cavity of rats bearing an ascitic Walker tumor, was punched and centrifuged at 500 xg for 10 min to remove all neoplastic cells. The ascitic fluid group was injected daily, intraperitoneally, with 2.0 ml of ascitic fluid, beginning at 9th day of gestation. All the experiments took place at 14th, 17th and 19th day after tumor transplantation, and 7th, 10th and 12th day after ascitic fluid injection.

General UKCCR guidelines for animal welfare were followed and the protocols were approved by Ethical Committee number 217-3

HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASSAYS

After cervical dislocation all animals had part of the uterus knotted before dissection and placental and fetal weights obtained. Placental tissue samples was aliquoted and kept at -70°C prior to biochemical analysis of glycogen and protein content and alkaline phosphatase activity. The remaining uterus section was perfused through the heart with a fixative containing 4% paraformaldehyde in PBS buffer, pH 7.2.

Placental sections (at least $5\mu\text{m}$) were made after paraffin embedding and stained with haematoxylin and eosin for morphological analysis.

The placental histochemical glycogen assay was performed using acid Schiff to analyze placental glycogen cells and stained with Ehrlich haematoxylin (Mc Manus, 1946). The glycogen positive cells were counted using Image Pro Plus software after capturing the image on a Leica microscope, using 100x magnification.

The placental samples were homogenized either in 0.3 mM Tris pH 8.0; 0.1 mM NaCl; 10mM EDTA; 0.2 M sucrose; and followed the alkaline phosphatase assay, using 60 mM P-NPP as substrate with 10mM MgCl₂ (Martins et al., 2001), total protein content following the Bradford assay (Bradford, 1976) and total glycogen content was performed after tissue digestion with KOH (30% w/v) (Lo et al, 1970).

STATISTICAL ANALYSIS

Data were represented as the mean $\pm$ SEM. Intergroup and intragroup differences were assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's multiple comparison tests to establish whether there was a difference between two groups. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$ (Woolson, 1987; Gad & Weil, 1994).

RESULTS

PLACENTA AND FETAL WEIGHTS

The placenta and fetal weights were significantly reduced in both tumor bearing and ascitic fluid injected rats from 16th to 21st day of gestation, as can be seen in Figure 1. Despite of the lower fetal and placental weights, a positive correlation in fetal/placenta weight relation was observed in both the tumor bearing and ascitic fluid injected groups, indicating that the fetus was less growing according to reduced placental weight.

FOETAL REABSORPTIONS

Fetal reabsorption sites are presented in Figure 1. These results show that the effects of tumor growth, with advancing gestational age, induced high level of reabsorption sites, which were similar in the ascitic fluid injected group. The data showed 4.5-fold difference between W and C groups, representing a severe damage in fetal growth in association with cancer.

MORPHOMETRIC ANALYSES

As shown in Figure 2, placental morphometric analysis was made after measuring 6 different areas, with the same size ($632 \mu\text{m}^2$) in 8 different lamina of each placenta per rat ($n=8$ dams per group). The measurement was calibrated with a Zeiss lamina reticule, expressing the values in micrometers. The decidua basalis was thicker in tumor bearing and ascitic fluid groups killed on 16th day of pregnancy ($p<0.05$). There was a reduction of the decidua basalis layer on day 21 of pregnancy associated with tumor growth (Figure 2A, $p<0.05$). Reduction in the spongy trophoblast layer was seen on the 16th day in W group and 16th and 21st days in A group (Figure 2B). A significantly reduction was demonstrated in labyrinth zone at day 21 in both tumor bearing and ascitic fluid injected groups suggesting less maternal/fetal surface of substrate exchanging (Figure 2C).

ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY

The results of placental alkaline phosphatase activity are given in Figure 3. The activity of this enzyme normally decreases with the normal pregnancy evolution. Therefore a slight decrease in placental alkaline phosphatase activity was seen during the pregnancy evolution in control dams, but the statistical test showed no differences among the days analyzed (16, 19, 21) (Figure 3). Alterations in the

alkaline phosphatase activity in the tumor bearing group were verified by intense decrease of this enzyme activity on 16th day. Although in the ascitic injected group this parameter was similar to control dams, the effect of tumor and ascitic fluid produced changes in the placental alkaline phosphatase activity pattern when compared to the control group.

HISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL ASSAY OF PLACENTAL GLYCOGEN CONTENT

Table 1 shows the data of total placenta protein and glycogen content, total placental cells and glycogen positive cells and its relation to total cells during the pregnancy evolution. The cells number analysis was made after counting the total cell numbers in 6 different areas ($632 \mu\text{m}^2$) in each placenta per group (n=8 dams per group). Total placenta protein content was deep decreased in tumor bearing and ascitic fluid injected dams, around 33% and 28% respectively (Table 1). There was no change in total number of cells per area in the control group, although the total placental glycogen content and positive cells changed during the pregnancy evolution (Table 1).

The total placental glycogen and positive cells was greatly reduced in tumor bearing dams in all days analyzed, decreasing by about 30% in comparison with control dams. These data correlated to lower placenta weight and high number of reabsorption sites in this group ($p < 0.05$ W < C on 16th, 19th and 21st day). The glycogen cell profile was reduced in tumor bearing rats compared with the control group (87%, 72% and 38% lower on 16th, 19th and 21st day, respectively; Table 1). The ratio of glycogen positive cell number per total placental cell number was

altered to give a ratio of 30% of glycogen cells to the total cells (Table 1). The indirect effect evoked by tumor was seen in the ascitic fluid injected group, which presented a similar reduction in total placental glycogen content as verified in the tumor bearing group ($p < 0.05$; Table 1). The ascitic fluid injected group showed reduction in glycogen positive cell number, on 16th and 19th day, compared to control placentas (Table 1). This reduction was not as severe in the ascitic fluid injected group when compared with tumor bearing dams, indicating a quantitative fourfold reduction in the number of glycogen cells on 16th day and 1.4 fold on 19th day. No differences were observed on the 21st day. Although there was no variation in the glycogen cell per total cell ratio between control and ascitic fluid injected rats, the ratio was lower in the tumor bearing group on all days analyzed.

Figure 4 shows histochemical analysis of the whole placenta from control, tumor-bearing and ascitic fluid injected groups sacrificed at different gestational time points. The image from control dams showed a high glycogen store in cells from the spongiotrophoblast region, despite observing a decrease in cell number after counting (Figure 4 and Table 1). In contrast the tumor bearing dams presented lower glycogen stores associated with fewer glycogen positive cells. Since the ascitic fluid was obtained from tumor bearing animals, a similar decrease in glycogen store and cell number was observed in this group (Figure 4, head arrows).

Although the glycogen positive cell number was reduced in both tumor bearing and ascitic fluid injected groups, the glycogen positive cells/total cells ratio was only reduced in the tumor bearing dams. The ascitic fluid injected group showed a similar pattern to controls.

DISCUSSION

In this study we investigated whether tumor growth and ascitic fluid injection could alter placental glycogen metabolism inducing fetal impairment. The placenta is responsible for exchange between maternal and fetal blood where the main barrier for all these exchanges occurs in the placental labyrinth region (Rudge et al., 1999). Promoting the ample nutrition, especially glucose, necessary for all stages of fetal development, the placenta tissue is essential for healthy fetal growth. The fetal development and growth occurs at different periods of cellular division, causing differentiation and development of all body tissues (Godfrey & Robinson 1998; Lesage et al., 2002).

Maternal malnutrition, such as cancer growth, has been shown to interfere with normal placental growth as reflected by reduced weight and protein content in the placenta, although a glucose restrictive diet throughout pregnancy does not compromise placental growth (Lesage et al., 2002; Lanoue et al., 1992).

The placenta has a higher metabolic rate per unit weight at term (Battaglia, 1989), a higher rate of glucose utilization, and glycogen deposition, which are related to the abundance of glucose in the maternal circulation (Ne'eman et al, 1987; Barash & Shafrir 1990, for review see Mouzon & Shafrir, 2001). At the same time it is not known the main function of placental glycogen metabolism, serving as an endogenous energy source or represents a regulatory placental storage. BARASH & SHAFRIR (1990) have shown in their studies that placental glycogen is mobilized in response to hormonal stimuli and constitutes a substantial reserve of energetic substrate, as lactate rather than glucose, to fetal blood since the placenta

lacks glucose-6-phosphatase activity (Shafrir & Barash 1991; Mouzon & Shafrir, 2001).

In the present study, the tumor evolution induced significant reduction in the fetal and placental weight, indicating fetal growth impairment. Despite having a positive correlation, suggesting placental less growth causes a proportional damage in fetal growth, the Walker tumor impact in pregnancy led to an increase in fetal reabsorption.

Equally important, the neoplastic and fetal tissues are highly dependent on glucose, and have intensive glucose utilization (Haggarty et al., 2002; Nuutien et al., 1999). During pregnancy, many studies have reported that protein malnutrition, as well as calorie malnutrition produced intrauterine growth reduction (Mello, 1994; Dandrea et al., 2001). Otherwise, the association between cancer and pregnancy could induce a nutritional competition between tumor and fetus. According to our previous results, which have shown that ascitic fluid inoculation causes similar fetal and placental damage in tumor bearing pregnant rats (Gomes-Marcondes et al., 1998), additional effects caused by the tumor could interfere in placental homeostasis. Probably this fact could be related to a significantly reduction in placental layers, a wide reduction of the decidua basalis' in tumor bearing pregnant rats associated with a reduction in the spongy trophoblast and labyrinth layers in both tumor bearing and ascitic fluid injected groups impairing the maternal/fetal surface of substrate exchanging. Correspondingly to our results, although the physiological role of placental alkaline phosphatase is still unknown, probably the reduction in alkaline phosphatase activity verified in tumor bearing animals on 16th day could be related to decreased transport between maternal/fetal interface, since

this enzyme can be associated with transport systems and cellular activity (Calhau et al., 1999; Champion et al., 2003); consequently the placental tissue and subsequent fetal growth would be jeopardized at the beginning of intense tumor development.

During tumor growth, decrease in placental weight and protein content was observed in rats as well in ascitic fluid injected rats. Indeed, placental growth in rats is characterized by modifications in its structure and function (Winick & Noble, 1986), which can be changed by tumor effects, actuating on the transitional period (between 14th and 17th day) when cellular hypertrophy, differentiation and high glycogen deposition occur (Lanoue et al., 1992; Battaglia, 1989). Our previous study has shown that the fast growth of Walker 256 tumor and ascitic fluid inoculation during pregnancy resulted in intense edema and hemorrhage incidence in different placental regions, decidua, spongy trophoblast and labyrinth layer, in both pregnant tumor bearing rats and ascitic fluid injected rats (Toledo MT & Gomes-Marcondes, 1999). Probably this fact could be parallel to decreased exchanging layers and reduction in alkaline phosphatase activity, as verified in tumor and ascitic fluid injected, consequently inducing changes in fetal welfare.

The effects of dietary glucose restriction with advancing gestational age is most severe in dams fed glucose-free diets, resulting in lower fetal to placental weight ratio (Lanoue et al., 1992; Dandrea et al., 2001). Our previous studies showed a decrease in maternal glucose in tumor bearing pregnant rats (Gomes-Marcondes et al., 1998) suggesting the lowered glycogen store in the placenta in the present study was in occurrence with hypoglycaemia. Moreover, some studies have shown that a 24-h fast of non-diabetic rats does not produce an appreciable reduction in

placental glycogen, but does deplete maternal liver glycogen (Holness & Sugden, 1996). In accordance to these reports normoglycaemia was found in ascitic fluid injected rats (Gomes-Marcondes et al., 1998), suggesting a role for the indirect effects present in ascitic fluid produced by the tumor, which promoted the harmed effects in placenta tissue, reducing total placenta protein and glycogen content, and fetal growth impairment and high reabsorptions sites.

During normal and diabetic pregnancy in rats, the placenta reduces the levels of stored glycogen with advancing gestational age (Barash et al, 1983; Barash & Shafrir, 1990; Mouzon & Shafrir, 2001). The neoplasia or ascitic fluid inoculation may alter the nutrient demand for fetal growth possibly harming the homeostasia of placental tissue. The spongy trophoblast, trophoblast giant cell layer and labyrinth showed lower glycogen storage on 16th, 19th and 21st day of pregnancy, as shown by immunohistochemistry in tumor bearing and ascitic fluid injected dams.

In conclusion, the association between pregnancy and cancer promoted irreversible damage to placental tissue altering the glycogen storage, protein content and reduction in placental exchanging surface probably due to factors produced by neoplastic and/or host cells (Gomes-Marcondes et al., 1998). Additional investigations will be necessary to understand the changes in cellular cycle and moreover the real effect of factors produced by tumor or host cells in placental tissue. Investigations are currently underway to address these important questions.

REFERENCES

- Barash V, Gutman A & Shafrir E** (1983) mechanism of placental glycogen deposition in diabetes in the rat. *Diabetologia*, 24, 63-8.
- Barash V & Shafrir E** (1990) Mobilization of placental glycogen in diabetic rats. *Placenta*, 11, 515-521.
- Battaglia FC** (1989) An update on fetal and placental metabolism: carbohydrate and amino acids. *Biol Neonate*, 55, 347-355.
- Berkowitz, RS, Tuncer ZS, Bernstein MR & Goldstein DP** (1998) Management of gestational trophoblastic diseases: subsequent pregnancy experience. *Semin Oncology*, 27(6), 678-85.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Butterstein GM & Leathem JH** (1974) Placental growth modification during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 3, 645-649.
- Calhau C, Hipólito-Reis C & Azevedo I** (1999) Alkaline phosphatase and exchange surfaces. *Clin Biochem*, 32(2), 153-154.
- Carbó N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM** (1998) Tumor necrosis factor-alpha does not cross the rat placenta. *Cancer Lett*, 128(1), 101-4.
- Carbó N, Lopez-Soriano FJ, Fiers W & Argiles JM** (1996) Tumor growth results in changes in placental amino acid transport in the rat: a tumor necrosis factor α -mediated effects. *Biochem J*, 313, 77-82.
- Champion EE, Glazier JD, Greenwood SL, Mann SJ, Rawlings JM, Sibley CP & Jones CJP** (2003) Localization of alkaline phosphatase and Ca^{2+} - ATPase in the cat placenta. *Placenta* 24, 453-61.
- Dandrea J, Wilson V, Gopalakrishnan G, Heasman L, Budge H, Stephenson T & Symonds ME** (2001) Maternal nutritional manipulation of placental growth and

glucose transporter 1 (GLUT-1) abundance in sheep. *Reproduction*, 122(5), 793-800.

Gad SC & Weil CS (1994) Statistical for toxicologist. In: Principles and method off toxicology. 3rd ed Wallace Hayes, Raven Press Ltd NY.

Godfrey K & Robinson S (1998) Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proc Nutr Soc*, 57, 105-11.

Gomes-Marcondes MCC, Cury L & Curi R (1998) Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. *Cancer Res Therap Contr*, 5, 277-283.

Haggarty P, Alltiff S, Hoad G, Ashton J & Abranovich DR (2002) Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. *Placenta*, 23, 86-92.

Hemberger M & Cross JC (2001) Genes governing placental development. *Trends in Endocrinol Metab*, 12(4), 162-168.

Holness MJ & Sugden MC (1996) Suboptimal protein nutrition in early life layer inference insulin action in pregnant rats. *Diabetologia*, 39(1), 12-21.

Lanoue L, Miniaci S & Koski KG (1992) Placental composition does not respond to changes in maternal dietary carbohydrate intake in rats. *J Nutr*, 122, 2374-2382.

Lesage J, Hahn D, Leonhardt M, Blondeau B, Breant B & Dupouy JP (2002) Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT 3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J Endocrinol*, 174(1), 37-43.

Lopez MF, Dikkes P, Zurakowski D & Komaroff LV (1996) Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. *Endocrinology*, 137(5), 2100-2108.

Lo S, Russeu JC & Taylor AW (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28(2), 234-6.

- Martins MJ, Negrão MR, Hipólito-Reis & C Azevedo I** (2001) Arginine and a polyarginine peptide inhibit alkaline phosphatase activity: possible consequences for cellular transport systems. *Clin Biochem*, 34, 435-437.
- Mc Manus JF** (1946) The histochemical demonstrations of mucins ester periodic acid. *Nature*, 158, 202.
- Mello MAR** (1994) Effects of intrauterine and post natal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats. *Braz J Med Biol Res*, 27 (10), 2461-6.
- Ne'eman Z, Barash V, Rosenmann E & Shafrir E** (1987) Localization of glycogen in the placenta of diabetic rats: a light and electron microscopic study. *Placenta*, 8, 201-8.
- Nuutien J, Minn H, Berman J, Haaparanta M, Ruotasalainen V, Laine H & Knweti J** (1999) Uncoupling of fatty acid glucose metabolism in malignant lymphoma: A PET study. *Br J Cancer*, 80(3-4), 513-8.
- Redline R, Chernicky CL, Tan HQ & Ilan J** (1993) Differential expression of insulin-like growth factor II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. *Mol Reprod Dev*, 36, 121-129.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey Jr GC** (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents, final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr*, 123, 1939-1951.
- Rudge MV, Gomes CM, Calderom Ide M, Ramos MD, Abbade JF, de Oliveira MG & da Silva MG** (1999) Study of the evolution of the placenta and fetal pancreas in the pathophysiology of growth retardation intrauterine due to restricted maternal diet. *São Paulo Med J*, 117(2), 49-56.
- Shafrir E & Barash V** (1991) Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy. *Isr J Med Sci*, 27,449-460.
- Soares MJ** (1987) Developmental changes in the intraplacental distribution of placental lactogen and alkaline phosphate in the rat. *J Reprod Fertil*, 79, 93-98.

Toledo MT & Gomes-Marcondes MCC (1999) Morphologic aspects of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. *Oncol Res*, 11(8), 359-366.

Widdowson EM (1999) How fetus is fed. *Fed Proc*, 28, 17-24.

Winick M & Noble (1986) A Quantitative changes in ribonucleic acid and proteins during normal growth of rat placenta. *Nature*, 212, 34-5.

Woolson RF (1987) Comparison of two groups t-test and rank test. In: statistical methods for the analysis of biomedical data. Cap 6p 145-203, John Wiley & Sons, NY.

Figure legends

Figure 1: The fetal and placental weights and fetal reabsorptions sites measured on 16th, 19th and 21st day of pregnancy of control (C), tumor bearing (W) and ascitic fluid injected (A) rats. * $p < 0,05$ statistically difference W and A vs control groups.

Figure 2: Decidua basalis, spongytrophoblast and labyrinth layers (μm) measured on 16th, 19th and 21st day of pregnancy. Legend, control (C), tumor-bearing (W) and ascitic fluid injected (A) groups. The results are shown as means + SEM ($n=8$). Different superscript letters means significantly difference, $p < 0,05$.

Figure 3: Comparisons of alkaline phosphatase activity in the placenta. Legend: control (C), tumor-bearing (W) and ascitic fluid injected (A) groups, sacrificed on 16th, 19th and 21st day of pregnancy. Data are means + SEM ($n=8$) different letters of the results means statistically different groups' values, $p < 0,05$.

Figure 4: Placental spongytrophoblast region reacted with periodic acid-Schiff (PAS-) positive cells and stained with Ehrlich haematoxylin, showing reactivity to stored glycogen in the cytoplasm of trophoblastic cells (head arrows).

Legend: control (C), tumor-bearing (W) and ascitic fluid injected (A) groups
sacrificed on 16th, 19th and 21st day of pregnancy. Black bars=10 μ m.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study is part of M T Toledo's PhD work. The authors are grateful to Dr Joanne C Cooper for suggestions and English text review and to Dr Juvenal Marcondes Neto for computing assistance, and to Ajinomoto Interamericana Ind & Com Ltda, Corn Products Brazil Ingredients and Roche Industrial & Quimica AS for providing diet ingredients. Financial support: FAPESP (01/02135-3), CNPq (521048-95-8), CAPES, FAEP-UNICAMP

FIGURE 1

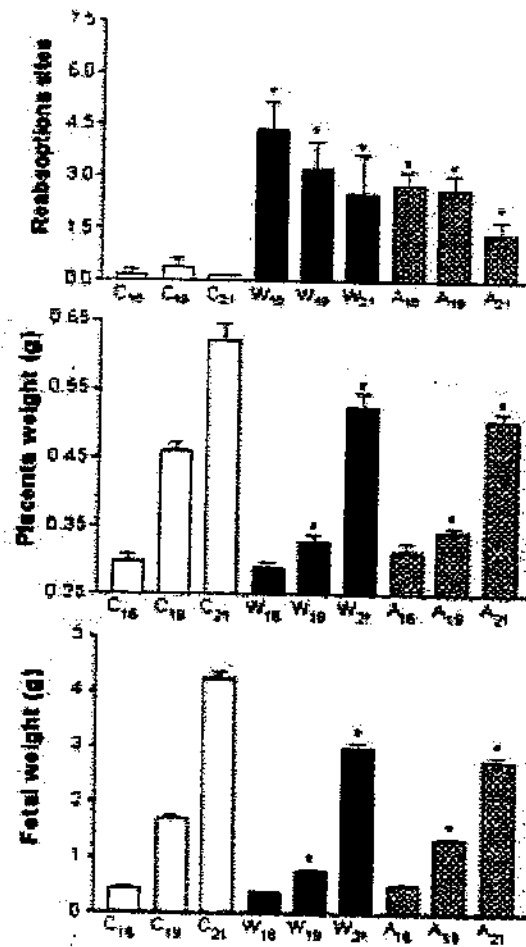


FIGURE 2

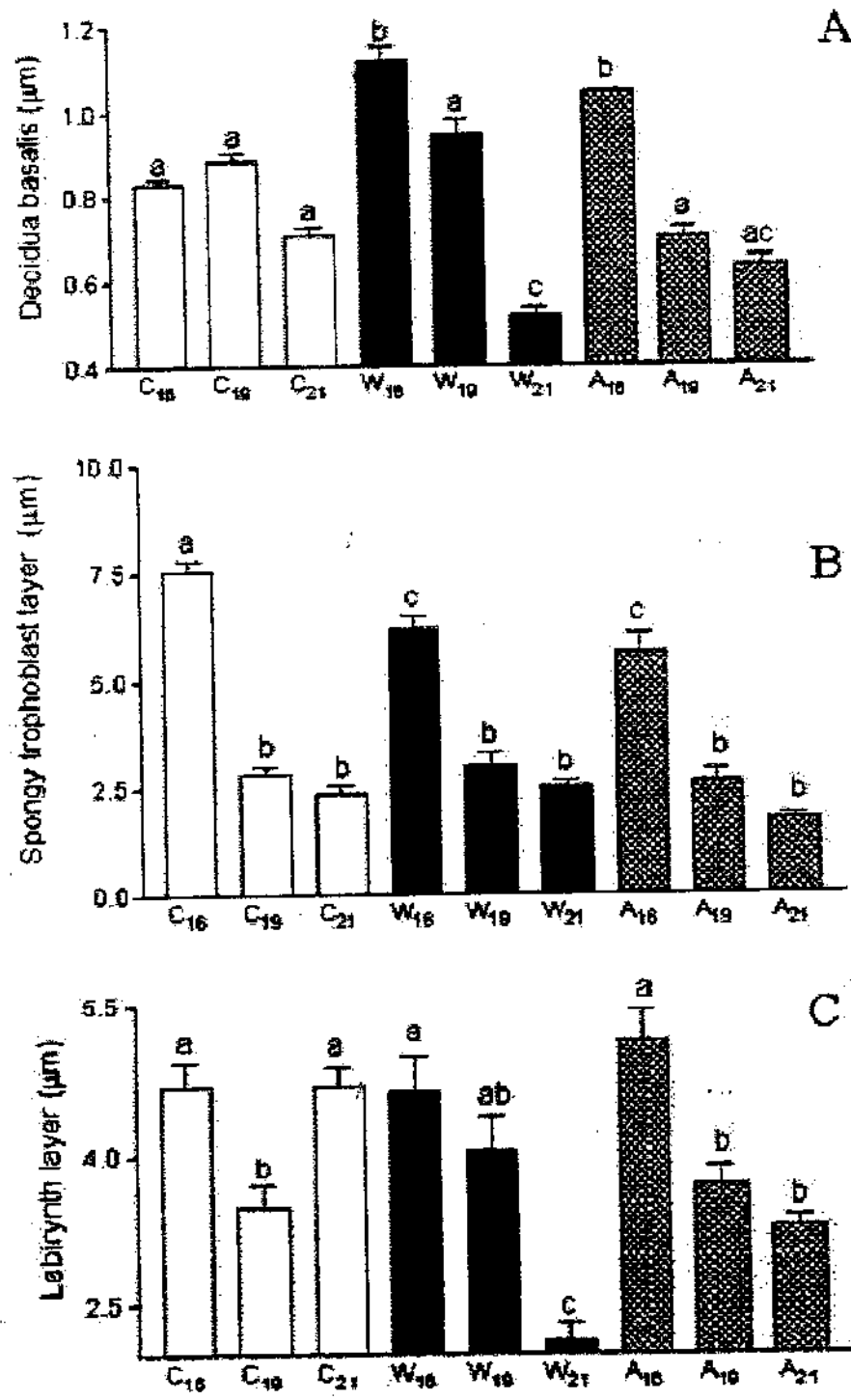


FIGURE 3

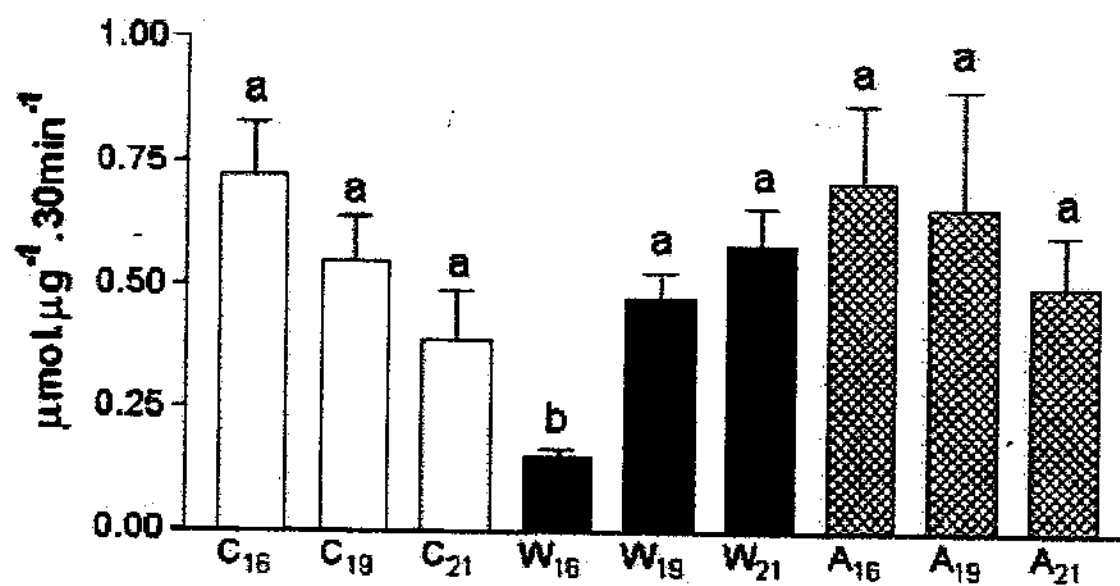


FIGURE 4

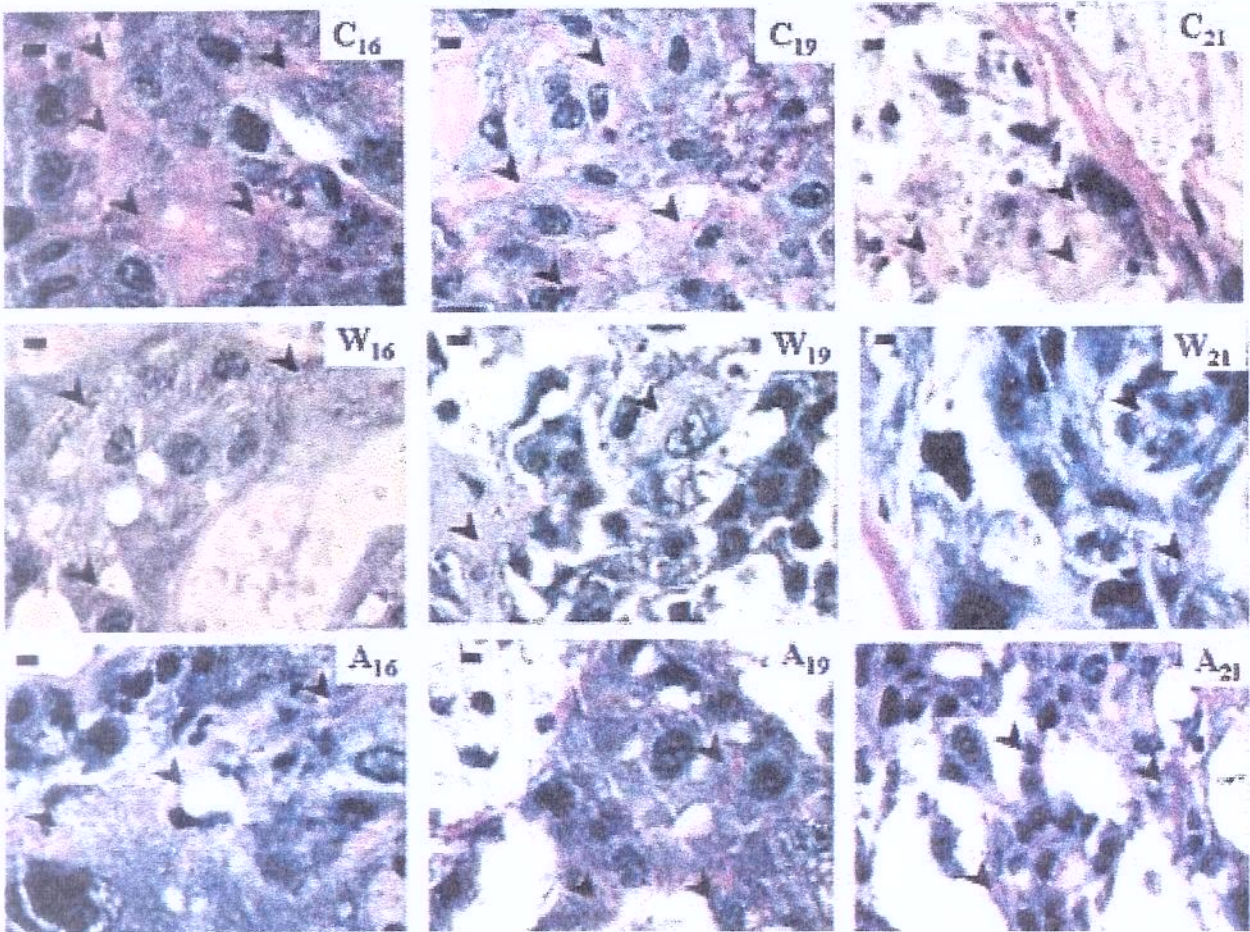


Table 1: Comparative analyses of glycogen positive cells in the spongy trophoblast and Trophoblast Giant Cell layers on 16th, 19th and 21st day of pregnancy.

	Total Placenta protein content (mg/g)	Total Placenta Glycogen content (mg/g)	Total Cells per area (632 μ m ²)	Glycogen Positive Cells	Glycogen Positive Cells/ Total Cells
C ₁₆	2.330 $\pm$ 0.055 ^a	4.078 $\pm$ 0.293 ^a	61.41 $\pm$ 3.54 ^a	48.02 $\pm$ 2.97 ^a	0.78 $\pm$ 0.008 ^a
C ₁₉	2.326 $\pm$ 0.077 ^a	4.096 $\pm$ 0.298 ^a	43.22 $\pm$ 3.96 ^b	36.81 $\pm$ 3.62 ^b	0.85 $\pm$ 0.028 ^a
C ₂₁	2.193 $\pm$ 0.069 ^a	3.980 $\pm$ 0.243 ^a	51.71 $\pm$ 5.09 ^b	29.19 $\pm$ 3.65 ^{bc}	0.58 $\pm$ 0.081 ^b
W ₁₆	1.969 $\pm$ 0.135 ^b	3.552 $\pm$ 0.172 ^b	33.96 $\pm$ 1.16 ^c	6.07 $\pm$ 0.88 ^d	0.17 $\pm$ 0.021 ^c
W ₁₉	2.148 $\pm$ 0.040 ^a	2.878 $\pm$ 0.152 ^c	38.96 $\pm$ 3.76 ^{bc}	10.3 $\pm$ 2.49 ^e	0.24 $\pm$ 0.039 ^c
W ₂₁	1.459 $\pm$ 0.086 ^c	2.577 $\pm$ 0.123 ^c	36.13 $\pm$ 2.10 ^c	11.08 $\pm$ 1.08 ^e	0.30 $\pm$ 0.030 ^c
A ₁₆	1.378 $\pm$ 0.068 ^c	3.369 $\pm$ 0.305 ^a	18.72 $\pm$ 2.48 ^d	11.74 $\pm$ 1.07 ^e	0.65 $\pm$ 0.090 ^b
A ₁₉	1.588 $\pm$ 0.065 ^c	3.689 $\pm$ 0.130 ^b	34.29 $\pm$ 6.99 ^c	25.27 $\pm$ 5.87 ^c	0.72 $\pm$ 0.039 ^a
A ₂₁	1.584 $\pm$ 0.058 ^c	3.138 $\pm$ 0.075 ^{bc}	53.83 $\pm$ 2.19 ^b	38.03 $\pm$ 1.69 ^b	0.70 $\pm$ 0.026 ^a

Legend: Control (C), tumor-bearing (W) and ascitic fluid injected (A) groups, and sacrificed on 16th, 19th and 21st day of pregnancy. Data are means + SEM (n=8). Different superscripts letters means statistically difference among groups' values, p<0,05.

I.2 CANCER IN PREGNANCY ENHANCE QUANTITY OF PARP AND CASPASE-3 EXPRESSION AND CYTOCHROME C RELEASE IN RAT PLACENTA

Trabalho submetido à publicação no periódico *Biology of Reproduction*

Under Review - Check Status

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

BIOLREPROD/2003/024562

CANCER IN PREGNANCY ENHANCES THE EXPRESSION OF PARP AND CASPASE 3 AND CYTOCHROME C RELEASE IN RAT PLACENTA

Mercia Tancredo Toledo and Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes

Status: Under Review (waiting for reviewers to accept)

Date Received: 30 Oct 2003

TOC Category: Pregnancy

Corresponding Author: Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes

Keywords: Pregnancy; Apoptosis; Developmental biology; Placenta; Syncytiotrophoblast

Supplemental Files: 0

[\[Contact Editorial Staff\]](#) [\[PDF version of your paper\]](#) [\[HTML References\]](#)

MARIA CRISTINA GOMES-MARCONDES, UNICAMP - State University of Campinas, Depto Fisiologia e Biofisica, Instituto Campinas, SP 13803970 Brazil
Tel: (55-19) 37886194, Fax: (55-19) 37886185, Email: cintgoma@unicamp.br

Biology of Reproduction

Office of the Managing Editor, 1619 Monroe Street, Madison, WI 53711-2063 USA
Tel: 608-256-2777; Fax: 608-256-4610; Email: bor2@ssr.org

Office of the Editor-in-Chief, Department of Physiology and Endocrinology,
Medical College of Georgia, 1120 15th Street, Augusta, GA 30912-6274 USA
Tel: 706-721-6274; Fax: 706-721-6267; Email: biorepro@mail.mcg.edu
Copyright © 2003 by Society for the Study of Reproduction

CANCER IN PREGNANCY ENHANCES THE EXPRESSION OF PARP AND CASPASE 3 AND CYTOCHROME C RELEASE IN RAT PLACENTA

Mércia Tancredo Toledo & Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes Department Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Short title: Placental apoptosis and tumour growth

Key words: apoptosis, caspase 3, cytochrome c, PARP, Walker 256 tumour, placenta, pregnancy

Address for correspondence: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Po Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. cintgoma@unicamp.br

ABSTRACT

The presence of cancer makes it difficult to predict the evolution of pregnancy and can be deleterious to the maternal-fetal relationship. Apoptosis may affect a range of placental functions resulting in the retardation of fetal growth. In this work, we investigated the alterations in the expression of apoptotic precursors in placenta tissue from rats with Walker 256 carcinoma. Adult female Wistar rats (90 days old, n=54), were distributed into control (C), tumour-bearing (W), and ascitic fluid injected groups (A) and were killed on 16th, 19th or 21st day of pregnancy after breeding. Placental tissues were fixed for PARP, caspase 3 and cytochrome c histochemistry and were analysed for protein content and glutathione-S-transferase activity. PARP, caspase 3 and cytochrome c expression was also analysed by western blotting after SDS-PAGE. The placental protein content and GST activity decreased in groups W and A. The number of cells positive for PARP, caspase 3 and cytochrome c increased in groups W and A indicating that tumour growth clearly damaged placental tissue and affected the levels of apoptotic precursors. These results were confirmed by western blotting. Since trophoblastic cells are responsible for maintaining a normal placental function, the uncontrolled death of these cells in response to tumour cell growth or ascitic fluid substances could have a negative impact on fetal development. Further knowledge of these events may help to preserve the fetus and placenta during development.

INTRODUCTION

Cancer is the second most common cause of death during the reproductive years (1) and complicates 0.02-0.1% of all pregnancies (2-4). The development of cancer during pregnancy is difficult to predict (5). Indeed, some studies have suggested that pregnancy does not favour the development of cancer and may protect the organism against tumour growth (6;7). Fast tumour growth during pregnancy may result in damage to the fetus and lead to fetal reabsorption and death (7;9). Since fetal and tumour growth requires increased protein synthesis, the importance of amino acids in fetal life has been emphasized (10).

The fetal nutrient supply depends on the mother's reserves and food intake, as well as on the placental function. Placental growth increases during gestation, concomitant with or ahead of fetal growth (11), and a failure in placental function can adversely affect fetal growth or welfare (10). The physiological changes that occur during pregnancy can only be

sustained if there is an appropriate nutrient supply to ensure placental and fetal development (5). To guarantee the supply of nutrients essential to fetal survival, the placenta continuously undergoes changes in weight, structure, shape and function during gestation (12;13).

The placenta-fetal metabolic relationships are complex, dynamic processes that control many aspects of fetal development. The exchange between maternal and fetal blood occurs across in the labyrinth layers of the placental barrier (14). In rats, the placenta, which consists of three trophoblast layers in the labyrinth zone, is the rate limiting permeability barrier to substrate exchange between the maternal and fetal compartments (15).

Programmed cell death has been implicated in normal and pathological process in several humans tissues and diseases, including cancer (16;19). Placental apoptosis occurs during normal pregnancy (20, 21), especially in trophoblast cells, whereas excessive apoptosis of the syncytiotrophoblast and cytotrophoblast, including the extravillous population, has been observed in pre-eclampsia pregnancies (22, 24). Recently, a number of studies have suggested that apoptosis plays a role in the normal development, remodeling, and ageing of the placenta (25-27), particularly in the second half of pregnancy (25).

During apoptosis, the activation of caspases by nuclear, metabolic, or externally stimuli occurs in a cascade fashion, leading to nuclear engulfment and cell death (28, 29). Since apoptosis may affect a range of placental functions, and since an increase in this process may be associated with fetal growth retardation, we investigated the effects of apoptotic precursors produced in response to Walker 256 carcinosarcoma on the organization of the placenta in rats.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS AND DIETS

Adult female Wistar rats (90 days old, n=54) were obtained from the animal facilities of the State University of Campinas (UNICAMP). The female rats were housed with adults males (4 females: 1 male) for 12 hours (30). Matting was confirmed by analysing vaginal smears, with a positive result being considered as the first day of pregnancy. All of the rats were housed in collective cages under standard conditions (22±2° C, 12/12 h light/dark cycle) with free access to a semi-synthetic control diet (AIN-93 G)

(31). The pregnant rats were distributed into three groups: C-control, W-tumour-bearing, and A- injected with ascitic fluid.

70 NEOPLASIC IMPLANTS AND COLLECTION OF ASCITIC FLUID

Walker 256 carcinosarcoma cells (2.5×10^5 in approximately 0.5mL), originally obtained from Christ Hospital, were injected subcutaneously on the second day of pregnancy. Control rats received 0.5mL of 0.9% NaCl (w/v) solution. Ascitic fluid was collected from the intraperitoneal cavity of Walker tumour-bearing rats and was centrifuged at 500xg for 10 min to remove all neoplastic cells. On the 9th day of pregnancy, 2 ml of ascitic fluid was daily injected intraperitoneally into each rat. The rats were killed 16, 19 or 21 days after mating, which corresponded to the 14th, 17th and 19th day after tumour transplantation on the 7th, 10th, and 12th day after ascitic fluid injection, respectively. The general UKCCR (United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research) guidelines for animal welfare (UKCCR, 1988) were followed and the protocols were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (protocol 217-3).

HISTOCHEMICAL ANALYSES

A portion of the uterus from all groups was removed to provide placental tissue. Placental samples were aliquoted and stored at -70°C until analysis. The remaining portion of the uterus was perfused via the heart with a fixative containing 4% paraformaldehyde in PBS buffer, pH 7.2. The tissues were subsequently fixed in paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (at least 5 μm thick) were obtained for the immunohistochemical detection of PARP, caspase 3 and cytochrome c.

Apoptotic cells were detected immunohistochemically using anti-PARP (poly ADP ribose polymerase) goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz; diluted 1:1000) followed by staining of the nuclei with DAB (diaminobenzidine) and fast green; anti-caspase-3 (goat polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology; 1:250 dilution) and anti-cytochrome c (goat polyclonal antibody Santa Cruz Biotechnology; 1:100 dilution) with detection using anti-goat biotinylated secondary antibody. The reactions were development with DAB and the cytoplasm was stained with Harris' hematoxylin and lithium carbonate.

100 BIOCHEMICAL ASSAYS AND WESTERN BLOTTING

Placental samples (100 mg) were homogenized in buffer (0.3 M Tris pH 8, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.2 M sucrose and 0.01% SDS) and centrifuged at 10,000xg for 15 min at 4°C. The total protein content was determined colorimetrically (32). The homogenizate was used to assay glutathione-S-transferase activity (33). Changes in the expression of PARP, caspase 3 and cytochrome c were assessed by western blotting after SDS-PAGE in 12% gels. The proteins were transferred to nitrocellulose 0.45µm Hybond membranes (Amersham) and were then detected using chemiluminescence (ECL reagent, Amersham). Densitometry of the protein images was done using Gel Pro- Plus analyser software (Media Cybernetics, 1993-97).

STATISTICAL ANALYSIS

The results were expressed as the mean±SEM. Inter- and intragroup comparisons were done using one-way analysis of variance (ANOVA) (34) followed by Dunn's multiple comparison test to determine the significance of the differences among the groups. All statistical comparisons were done with GraphPad Prism software (v 3.0, GraphPad - Incorporated, San Diego, CA, USA), with a value of $p < 0.05$ indicating significance.

RESULTS

BIOCHEMICAL ASSAYS

PROTEIN CONTENT

Placental protein content of the control groups was 2.23 ± 0.11 , 2.22 ± 0.12 , 2.19 ± 0.10 µg/µL for C16, C19 and C21 respectively. The protein content in the tumor groups was significantly lower ($p < 0.05$) than in the control only for W21 ($W16 = 2.12 \pm 0.16$; $W19 = 2.15 \pm 0.06$ and $W21 = 1.64 \pm 0.18$ µg/µL; $n=8$). A significant decrease (around 27%; $p < 0.05$) was seen in all groups receiving ascitic fluid ($A16 = 1.38 \pm 0.09$; $A19 = 1.59 \pm 0.09$ and $A21 = 1.58 \pm 0.08$ µg/µL).

PLACENTAL GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ACTIVITY

Glutathione-S-transferase activity is associated with the cell cycle and is responsible for the conjugation and detoxification of intermediates produced by oxidative stress in rat placenta (35). Pregnancy generally decreased GST activity in the control groups (C16 = 23.94 ± 1.83 ; C19 = 31.71 ± 4.28 ; and C21 = 14.89 ± 1.31 nmol/µg protein, $n=8$); the high GST activity seen on the 19th day may be related to the maximal placental function, as reported previously (36). Tumour-bearing rats showed a decrease in GST activity on days

19 and 21 when compared to the control group ($W16 = 21.23 \pm 2.15$, $W19 = 20.47 \pm 1.94$ and $W21 = 9.23 \pm 1.84$ nmol/ μ g protein; $n=8$; $p<0.05$). These results suggest a reduction in the cellular protective mechanisms during tumour growth which could possibly compromise placental function and affect fetal development, as previously demonstrated (7, 37).

Similar data were obtained in the ascitic fluid group, which showed decreased GST activity on the 19th and 21st days ($A16 = 17.73 \pm 2.65$; $A19 = 13.94 \pm 1.50$ and $A21 = 11.15 \pm 1.17$ nmol/ μ g protein, $n=8$; $p<0.05$) in relation to the control group.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

PARP

PARP positive cells were significantly more numerous in tumour bearing rats (Table 1 and Figure 1 D, E and F) compared to the control group. The ratio of positive cells in the W and C groups showed that PARP expression increased up to the 21st day of pregnancy to around 4-fold higher in the W group (Table 1). Similar results were obtained in the ascitic fluid group, in which PARP positive cells increased around 3-fold by the 19th day compared to the controls (Table 1, Figure 1 G, H and I).

The expression of PARP in placental tissue was also examined by western blotting, and was 2-5-fold higher in the W and A groups (Figure 4, Table 2).

CASPASE 3

Immunohistochemistry showed that, compared to the control rats, caspase-3 positive cells were significantly increased ($p<0.05$) in both tumour bearing and ascitic fluid injected rats (Figure 2, letters D, E and F for tumor group, and G, H and I for ascitic injected group, Table 1). The ratio of positive cells in the W and A groups was higher (2-7 fold) than in the control rats (Table 1).

Western blotting showed that caspase 3 expression increased around 2-fold in tumour-bearing and ascitic fluid injected rats (Figure 4). The ratio of this increase in the expression relative to control dams was around 2-fold in the W and A groups (Table 2).

CYTOCHROME C

The presence of tumors and ascitic fluid during pregnancy enhanced cytochrome c expression in the trophoblast cytoplasm (Figure 3D, E and F, and 3G, H and I). Since cytochrome c released from mitochondria into the cytosol activates apoptotic initiators

followed by the activation of apoptotic effectors such as caspase-3, cytochrome-c positive cells were more numerous in the W and A groups, especially on the 16th and 19th days in rats with tumour and also on the 21st day in rats given ascitic fluid (Tables 1 and 2).

Elevated cytochrome c expression was clearly seen by western blotting; ascitic fluid rats but not in rats with tumors (Figure 4).

DISCUSSION

As shown here, tumour growth clearly damaged the placental tissue by altering the levels of apoptotic precursors. Tumors can damage fetuses (high fetal reabsorption, fetal death or a decrease in fetal growth) not only through nutritional competition but also by harming the fetus and placenta indirectly through substances synthesised by tumour or host cells (7).

Ered and colleagues (38) reported a higher apoptotic incidence in the placenta of pregnancies complicated with intra-uterine growth retardation (IUGR) than in placentas of normal pregnancies, although an increase in apoptosis was observed during normal pregnancy which is characteristic of a normal placental processes (25).

The nutritional demand of tumour cells is extremely high (39); and may produce metabolic alterations that can compromise the availability amino acids and other nutrients to fetal tissues (40). In previous work, we observed that not only nutritional effects, but also products present in ascitic fluid caused placental changes such as an increase in edema and hemorrhage in placenta from pregnant rats injected with ascitic fluid (41), and a decrease in the placental glycogen stores in tumour-bearing rats (37).

There is some evidence for the occurrence of distinctive apoptotic pathways in the placenta of tumour-bearing and ascitic fluid injected rats. At least two major mechanisms by which a caspase cascade may be initiated have been suggested: one involves death receptors that activate initiator caspases (42) and the other involves cytochrome release (43).

In the present study, we observed increased caspase 3 levels in the W and A groups. This increase may have been initiated by the release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol (44) to activate caspase 3 (45) which then damaged PARP, one of many caspase substrates, thereby preventing this enzyme from repairing damaged DNA (46) and causing apoptosis.

Western blotting showed an increase in PARP and caspase 3 expression in these groups W and A, but no change in the cytochrome c levels. These results may indicate

that other placental layers may undergo higher apoptosis mediated by cytochrome c release and by other caspases, such as caspase-8, which is activated by several death
205 receptors (42). Such activation could be related to the decrease in GST activity seen in groups W and A. This would allow formation of reactive oxygen species (47) which could, in turn, activate other apoptotic pathways (48).

Various studies have shown increased apoptosis following B19 infection of villous trophoblast cells (49), an elevation in caspase 3 activity and cytochrome c release in
210 chorionic villi after exposure to ultrasound (50), and higher apoptotic rates in placentas from pregnancies complicated with IUGR (38). Since trophoblastic cells are responsible for maintaining a normal placental function, the uncontrolled death of these cells could have a negative impact on fetal development. Further work is required to improve our understanding of the events that occur at the maternal-fetal interface in the presence of
215 tumours. Such knowledge may help to improve the welfare of the fetus and placenta during development.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Maria Alice Rostom de Mello for discussion suggestions during this
220 work, Dr. Juvenal Marcondes Neto for computational assistance and Dr. Stefen Hyslop for editing the English. The dietary ingredients were kindly provided by Ajinomoto, Roche, and Com Products. M.T.T was supported by a doctoral fellowship from CAPES This work was supported by FAPESP (01-02135-3, 1996/09463-6), CNPQ (521048/95-8; 350047/03-0), FAEP/UNICAMP and CAPES.

REFERENCES

1. Murphey GP. Cancer statistics. *CA*1999; 49: 20-21.
2. Kennedy S, Yudikin P, Greenall M. Cancer in pregnancy. *Eur J Surg Oncol* 1993; 19: 405-407.
3. Petrek JA. Breast cancer during pregnancy. *Cancer* 1994; 74: 518-527.
4. Weisz B, Eyal S, Lishner M. Cancer in pregnancy: maternal and fetal implications. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 384-393.
5. Baird JP. Some aspects of the metabolic and hormonal adaptation to pregnancy. *Acta Endocrinol* 1986; 277(Suppl 4): 11-18.
6. Russo IH, Koszalka M, Russo J. Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis. *Br J Cancer* 1991; 64: 481-484.
7. Gomes-Marcondes MCC, Cury L, Curi R. Consequences of Walker tumor growth for the placental/fetal development in rats. *Cancer Res Ther Con* 1998; 5: 277-283.
8. 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* 1990; 23: 909-913.
9. Williamson DH, Wood S, Evans RD. Tumor growth and lipid metabolism during lactation in the rat. *Adv Enzyme Regul* 1988; 27: 93-104.
10. Gluckman PG, Harding JE. Nutritional and hormonal regulation of fetal growth-involving concepts. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 1994; 399: 60-63.
11. Hay SM, Hamies DN, Antipatis C, Rees WD. Growth sensitive genes expressed in the placenta. *Biochem Soc Trans* 1998; 26: S100.
12. Teasdale F. Gestational changes in the functional structure of the human placenta in relation to fetal growth: a morphometric study. *Am J Obst Gynecol* 1980; 137: 560-568.
13. Bjelogric N, Peng R, Park SS, Gelboin HV, Honkakoshi P, Pelkonen O, Vahakangas K. Involvement of P450 1A in benzo(a) pyrene but not in benzo(a) pyrene-7,8-dihydrodiol activation by 3-methylcholanthrene induced mouse liver microsomes. *Pharmacol Toxicol* 1993; 73: 319-24.
14. Lopes CMD. Efeito da desnutrição protéico calórica (DPC) sobre o labirinto placentário de ratas jovens. Observações morfológicas ultraestruturais. Doctoral Thesis. Instituto de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, 1992.

15. Sibley CP. Mechanisms of ion transfer by the rat placenta: a model for the human placenta? *Placenta* 1994; 15: 675-691.
16. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267:1445-1449.
17. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
18. Wylie AH. Apoptosis. *Br J Cancer* 1993; 67: 205-208.
19. Sayill J. Review. Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 715-723.
20. Halperin K, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50: 84-87.
21. Thiet MP, Suwanvanischkij V, Hasselblatt K, Yeh J. Apoptosis in human term placenta: a morphological and gene expression study. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50: 88-91.
22. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis and proliferative activity in first trimester placental. *Placenta* 1999; 20: 223-227.
23. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandes JB, Samamoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or uterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 158-166.
24. Dash PR, Cartwright JE, Baker PN, Johnstone AP, Whitley G St. J. Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation. *Experimental Cell Research* 2003; 287: 314-324.
25. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1395-1401.
26. Axt R, Meyberg R, Mink D, Wasemann C, Reitnauer K, Schmidt W. Immunohistochemical detection of apoptosis in the human term and post term placenta. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1999; 26: 56-59.
27. Lea RG, Riley SC, Antipatis C, Hannah L, Ashworth CJ, Clark DA, Critchley HOD. Cytokines and the regulation of apoptosis in reproductive tissues: a review. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42: 100-109.
28. Thornberry NA, Lazebnick, Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.

29. Marti A, Jaggi R, Vallan C, Ritter PM, Baltzer A, Srinivassan A, Dharmarajan AM, Friss RR. Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1190-1200.
30. Baker HL. Reproduction and breeding. In: Baker, HL, Lindsey JR, Weisbroth SH (eds), *The laboratory rat*, v.I. New York, Academic Press 1991; 7:153-168.
31. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey J. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
33. Habig WH, Michael JP, Jakoby J . Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 1974; 249, 22(25): 7130-7139.
34. Gad SC , Weil CS. Statistic for toxicologists. In: Wallace H (editor). *Principles and methos of toxicology*. Raven Press, New York, 221-274, 1994.
35. Cervello I, Lafuente A, Giralt M, Mallol J. Enhanced glutathione-S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a) pyrene. *Placenta* 1992; 13: 273-280.
36. Lanoue L, Miniaci S, Koski KG. Placental composition does not respond to changes in maternal dietary carbohydrate intake in rats. *J Nutr* 1992; 122: 2374-2382.
37. Toledo MT, Gomes-Marcondes MCC. Placental glycogen metabolism changes during Walker tumor growth. *Placenta* 2003, submitted.
- on 2003.
38. Erel CT, Dane B, Calay Z, Raleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 73: 229-235.
39. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 862-871.
40. Carbó N, Lopez-Soriano FJ, Fiers W, Argiles JM. Tumor growth results in changes in placental amino acid transport in the rat: tumor necrosis factor example char mapping – mediated effect. *Biochem J* 1996; 313: 77-82.
41. Toledo MT, Gomes-Marcondes MCC. Morphologic aspects of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. *Oncol Res* 1999; 11: 359-366.

42. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Loo M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signalling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439-459.
43. Heiskamen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma JJ, Nieminen AL. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 5654-5658.
44. Kroemer G, Dellaporta B, Resche-Rison M. Mitochondrial death life regulation in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-642.
45. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 533-573.
46. Chiarugi, A. Cell biology. PARP-1 a perpetrator of apoptotic cell death? *Science* 2002; 297: 200-201.
47. Kolesnick RN, Krönke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 643-645.
48. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 601-17.
49. Jordan JA, Butchko AR. Apoptotic activity in villous trophoblast cells during B19 infection correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 Cytodeath antibody. *Placenta* 2002; 23: 547-553.
50. Zhang J, Chan EK. Autoantibodies to IGF-II mRNA binding protein p62 and overexpression of p62 in human hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 146-153.

Figure Legends

Figure 1. Immunohistochemistry of PARP in placental tissue at different stages of pregnancy days (16, 19 and 21). PARP was detected using a polyclonal antibody (Santa Cruz) diluted 1:100 followed by incubation with biotinylated streptavidin antibody (1:1000) and reaction with DAB. Twenty areas (300 μm^2 each) were examined in each of six rats. The cytoplasm of trophoblast cells was labelled with DAB. The analyses was made count 20 Areas 300 μm^2 by lens n=6. The cell count was performed in Image Pro Plus software. C-control (A-16th, B-19th and C-21st), W-tumour-bearing (D- 16th, E- 19th and F- 21st) and A-ascitic fluid injected rats (G- 16th, H- 19th and I- 21st). The results are expressed as the mean $\pm$ SEM of at least 6 per group.

Figure 2 Immunohistochemical of caspase-3 in placental tissue in different pregnancy ages (16th, 19th and 21st) Polyclonal antibody against caspase-3 from Santa Cruz Biotechnology, Inc, at 1:100 dilution reactive with biotinylated streptavidin antibody at 1:1000 dilution, reacted with DAB. The cytoplasm of trophoblast cells was labelled with DAB. The analyses was made count 20 Areas 300 μm^2 by lens n=6. The cell count was performed in Image Pro Plus software. C-control (A-16th, B-19th and C-21st), W-tumour-bearing (D- 16th, E- 19th and F- 21st) and A-ascitic fluid injected rats (G- 16th, H- 19th and I- 21st). The results are expressed as means $\pm$ SEM. Minimal 6 animal per group.

Figure 3 Immunohistochemical of cytochrome c in placental tissue in different pregnancy ages (16th, 19th and 21st) Polyclonal antibody against cytochrome c from Santa Cruz Biotechnology, Inc, at 1:100 dilution reactive with biotinylated streptavidin antibody at 1:1000 dilution, reacted with DAB image. The cytoplasm of trophoblast cells was labelled with DAB. The analyses was made count 20 Areas 300 μm^2 by lens n=6. The cell count was performed in Image Pro Plus software. C-control (A-16th, B-19th and C-21st), W-tumour-bearing (D- 16th, E- 19th and F- 21st) and A-ascitic fluid injected rats (G- 16th, H- 19th and I- 21st). The results are expressed as means $\pm$ SEM. Minimal 6 animal per group.

Figure 4: PARP (85 Mr.10⁻³), caspase 3 (32 Mr.10⁻³) and cytochrome c (34 Mr.10⁻³) expression in WB SDS-PAGE (12%) in rat placenta sacrificed on 16th, 19th and

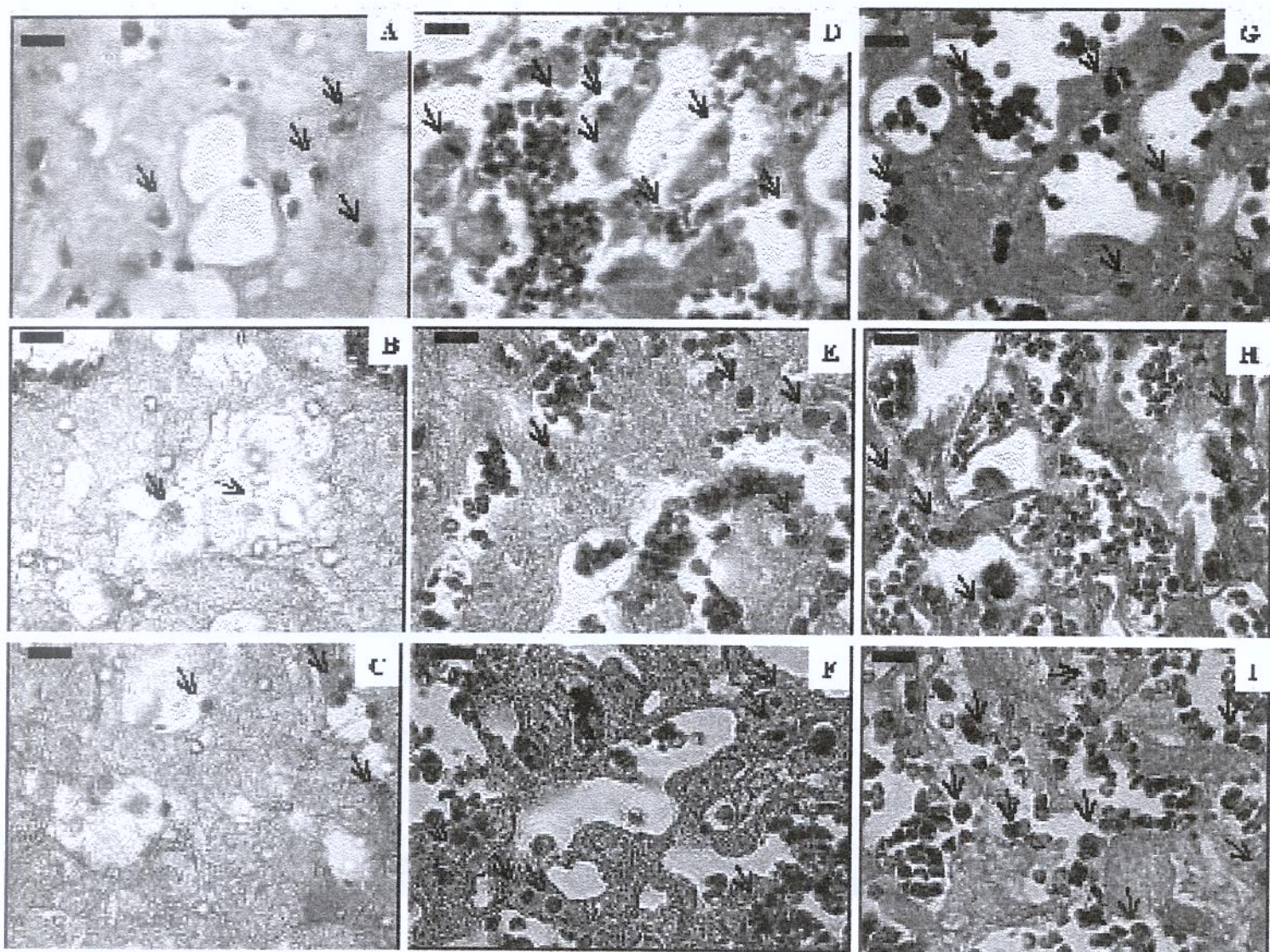
21st day of pregnancy. Groups: C-control, W-walker tumor bearing rats, A-ascitic fluid injected rats. The blot is representative of minimal 8 placenta samples per group.

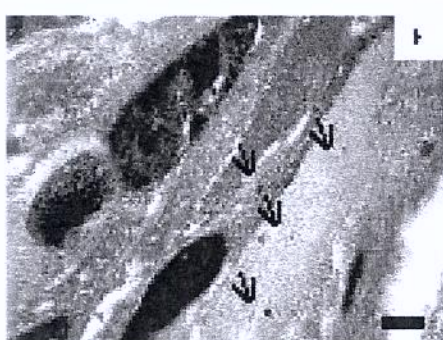
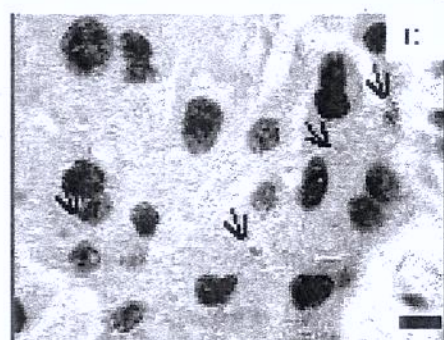
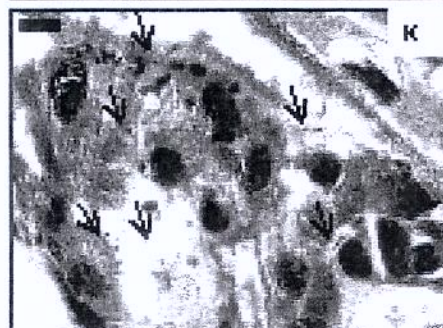
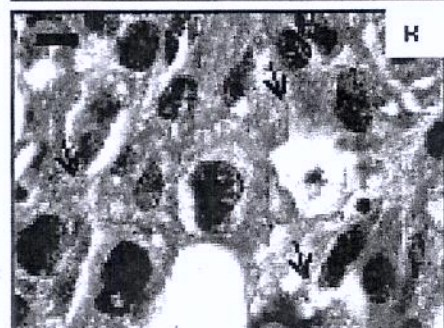
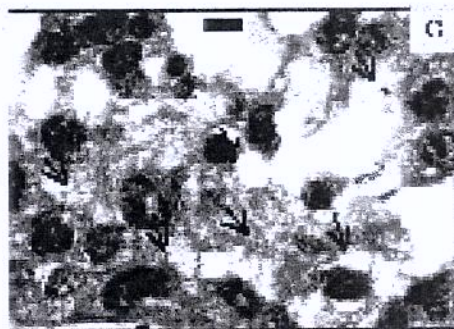
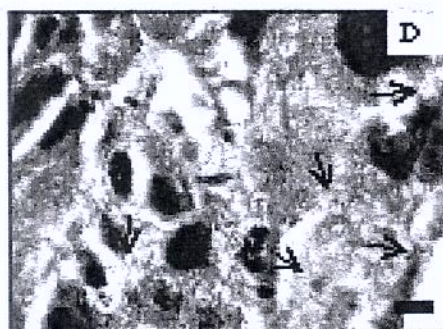
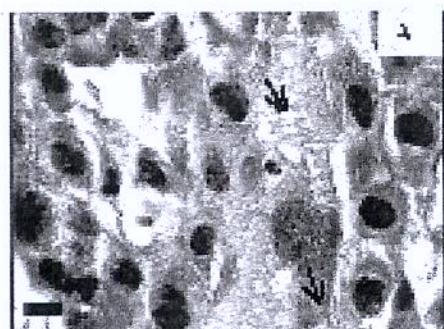
Immunohistochemical analysis				Positive cells in the spongy trophoblast layer of placenta					
	Control groups			Walker tumour Groups			Ascitic fluid injected groups		
	C16	C19	C21	W16	W19	W21	A16	A19	A21
PARP	43.1±7.1	48.0±5.9	54.8±7.6	136.7±12.2*	149.2±20.9*	148.0±16.9*	71.7±9.2*	115.9±9.5*	73.4±11.7*
Caspase-3	3.7±0.4	1.3±0.2	2.5±0.3	16.0±1.4*	9.3±0.7*	7.3±0.7*	7.9±0.4*	4.6±0.2*	7.2±0.4*
Cytochrome c	3.4±0.3	4.9±0.3	4.8±0.3	4.7±0.3	13.3±0.7*	12.7±0.6*	6.7±0.4*	15.4±0.4*	10.2±0.6*
Western blotting analysis									
	Control groups			Walker tumour groups			Ascitic fluid injected groups		
	C16	C19	C21	W16	W19	W21	A16	A19	A21
PARP (85Mr.10 ⁻³)	0.164±0.029	0.192±0.033	0.194±0.033	0.220±0.024	0.221±0.022	0.243±0.021	0.292±0.050	0.331±0.040	0.350±0.040
Caspase-3 (32Mr.10 ⁻³)	0.072±0.016	0.091±0.021	0.086±0.016	0.073±0.015	0.076±0.015	0.084±0.014	0.086±0.013	0.090±0.020	0.090±0.020
Cytochrome c (34Mr.10 ⁻³)	0.042±0.079	0.053±0.070	0.058±0.057	0.058±0.010	0.052±0.005	0.059±0.005	0.056±0.070	0.054±0.011	0.055±0.014

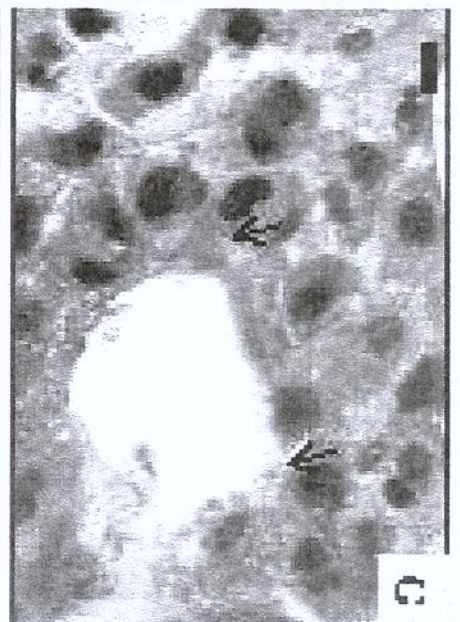
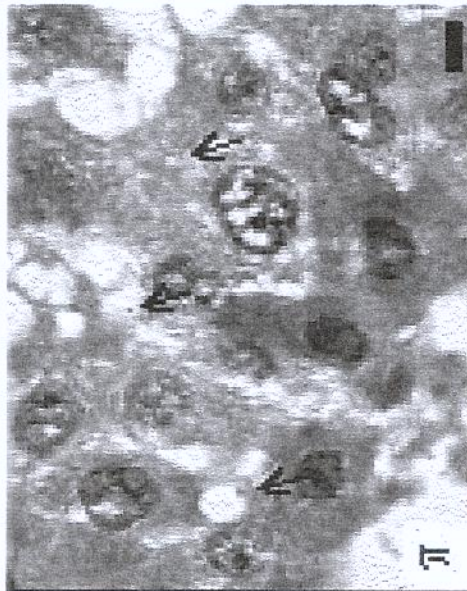
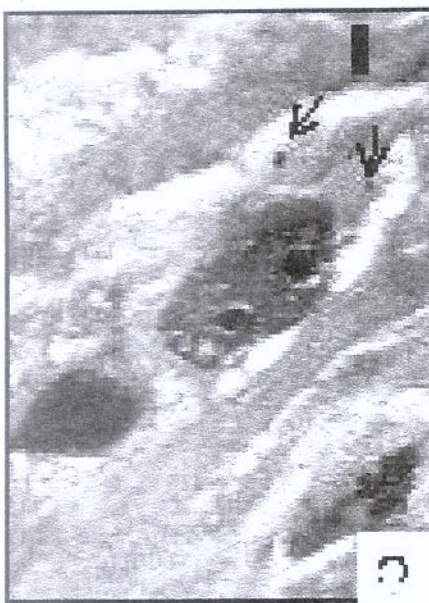
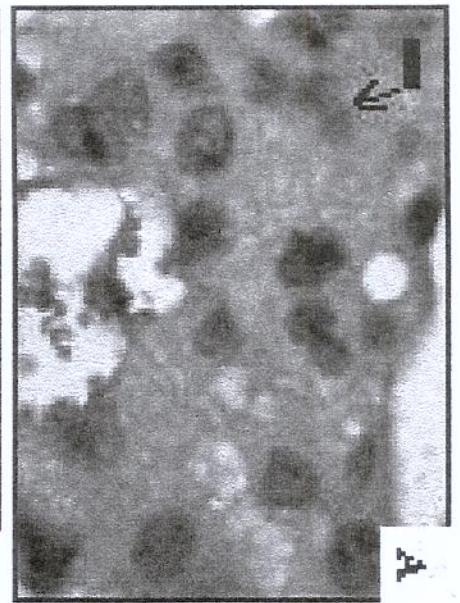
Table1: Immunohistochemical analysis of PARP, caspase-3 and cytochrome c (number of positive cells counted) in placental tissue at different stages of pregnancy (16th, 19th and 21st days). Polyclonal antibodies against PARP, caspase-3 and cytochrome c (all from Santa Cruz Biotechnology diluted 1:100) were detected with a biotinylated streptavidin antibody (diluted 1:1000) and reacted with DAB. The cells were counted using Image ProPlus software. Western blotting (arbitrary densitometric units) of PARP (85 Mr.10⁻³), caspase 3 (32 Mr.10⁻³) and cytochrome c (34 Mr.10⁻³) was done using placental homogenates (16th, 19th and 21st days of pregnancy). Groups: control (C), tumour-bearing (W) and ascitic fluid injected (A) rats. The results are expressed as the mean ± SEM for at least 6 rats per group.

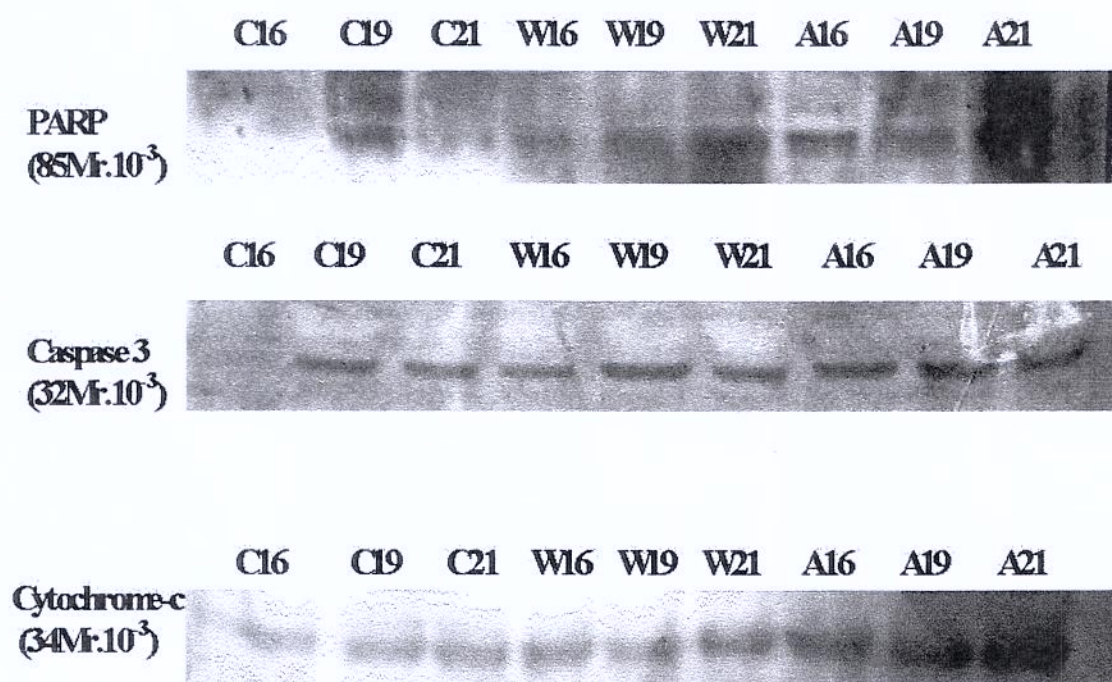
Relation	Ratio of positive cells in the spongy trophoblast layer of placenta					
	16 th day		19 th day		21 st day	
Immunohisto chemistry	W16/C16	A16/C16	W19/C19	A19/C19	W21/C21	A21/C21
PARP	2.40±0.30	1.41±0.13	3.40±0.230	3.00±0.30	3.99±0.54	1.67± 0.36
Caspase-3	3.02±0.37	2.90±0.35	7.56±0.74	3.84±0.34	4.50±0.70	4.30±0.50
Cytochrome c	1.52±0.11	2.54±0.25	3.03±0.20	3.35±0.21	3.00±0.22	2.78±0.29
Western blot	W16/C16	A16/C16	W19/C19	A19/C19	W21/C21	A21/C21
PARP	3.79±0.41	5.06±0.80	2.59±0.27	3.21±0.45	2.15±0.30	3.09±0.61
Caspase-3	1.87±0.33	1.76±0.40	1.7±0.64	2.24±0.08	1.09±0.11	1.18±0.30
Cytochrome c	1.66±0.64	3.63±1.04	1.68±0.64	2.86±0.51	0.88±0.16	3.91±1.08

Table 2. The ratios of PARP, caspase-3 and cytochrome c positive cells in spongy trophoblast of tumour-bearing or ascitic fluid injected rats compared to control rats. PARP, caspase-3 and cytochrome c expression was assessed by western blotting. Groups: C- control , W- tumour-bearing and A-ascitic fluid group. The results are expressed are the mean ± SEM of at least 6 rats per group.









I.3 AVALIAÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSSOMO EM PLACENTA DE RATAS WISTARS PORTADORAS DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256

Trabalho a ser submetido para a publicação no periódico *Oncology Research*

**“AVALIAÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSSOMO EM
PLACENTA DE RATAS WISTARS PORTADORAS DO
CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256”**

Mércia Tancredo Toledo & Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes. UNICAMP, Campinas, Brasil. Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Biologia CEP 13083-970. cintgoma@unicamp.br

Running Title: Placental ubiquitin-proteasome vs tumour growth

Adress to correspondence: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Universidade Estadual de Campinas, ZIP CODE 13083-970. Campinas, Brazil.

Financial support: FAPESP (01/02135-3), CNPq (521048-95-8, 350047/03-0), CAPES, FAEP-UNICAMP

RESUMO

O envolvimento do sistema ubiquitina-proteossomo no processo de seleção de proteínas placentárias foi avaliado em ratas prenhes implantadas com carcinossarcoma de Walker 256. Em estudos prévios, verificamos que a associação gravidez e câncer causou prejuízos à unidade materno-fetal. A placenta de ratas implantadas com tumor de Walker ou inoculadas com líquido ascítico, proveniente da proliferação de células tumorais, apresentou alterações bioquímicas e morfológicas. Ratas Wistar prenhes (n=54) foram distribuídas em grupos: Controle (C), implantadas com tumor de Walker (n=54) e inoculadas com líquido ascítico (A), sacrificadas no 16º, 19º e 21º dias de prenhez. Após o sacrifício, a placenta foi pesada e o tecido placentário homogenizado para a avaliação do conteúdo protéico. Amostras de placenta contendo 100µg de proteínas foram separadas em SDS-PAGE (gel 12%) e ubiquitina E2, subunidade 20S e P42 foram quantificados por *Western blotting*. Soro de ratas prenhes e não prenhes foi coletado para análise de expressão de TNF α por eletroforese no 19º e 21º dias de prenhez. As imagens dos respectivos géis foram analisadas por *software* Gel Pro Analyser. Nossos resultados indicam que o conteúdo de ubiquitina não apresentou diferença tanto no implante tumoral quanto na inoculação do líquido ascítico independente da data de sacrifício. Houve aumento significativo da expressão das subunidades 20S e P42, em ambos os tratamentos, sugerindo que o sistema ubiquitina-proteossomo pode estar envolvido no tecido placentário relacionado ao processo de reorganização e seleção de proteínas placentárias e nucleares. Verificamos que houve aumento significativo da expressão de TNF α no soro de ratas grávidas controles, implantadas com tumor de Walker e nas inoculadas com líquido ascítico quando comparadas às respectivas controles não prenhes. A presença de tumor ou a inoculação de líquido ascítico possivelmente promoveu alterações no sistema ubiquitina-proteossomo comprometendo a viabilidade e a integridade do tecido placentário.

INTRODUÇÃO

Gravidez é um estado fisiológico caracterizado pelo aumento da ingestão de alimento e mudanças importantes no metabolismo envolvendo carboidratos, lipídeos e proteínas. Essas adaptações são essenciais para manter o crescimento exponencial fetal até o final da gestação. Ocorrem modificações associadas ao aumento da degradação proteica da musculatura esquelética e decréscimo da capacidade urogênica em ratas grávidas, ambas necessárias para sustentar a alta demanda de nitrogênio essencial ao crescimento fetal (CARBÓ et al., 1996).

A placenta separa o sangue materno e fetal juntamente com o sistema linfático (WEETMAN, 1999). A placenta não é apenas um órgão de troca através do labirinto trofoblasto entre o sangue materno e fetal (HEMBERGER & CROSS, 2001) mas também um órgão notável, abastecedor de todas as necessidades fetais, bem como o único caminho para a eliminação de excretas, podendo atuar como seletivo de substâncias essenciais com funções complexas para garantir o desenvolvimento do feto.

Câncer é a segunda *causa-mortis* de mulheres em idade reprodutiva. A associação entre câncer e gravidez está na ordem de 0,01 a 0,03, sendo que 26% destes, são de mama (WEIZS et al., 2001; DUNN et al., 1999). Metástases placentárias são extremamente raras, apesar da sua intensa vascularização e características fisiológicas de intenso crescimento, caracterizando-a como sítio ideal para formação de metástases (ELTORKY et al., 1995; FREEDMAN et al., 1960; DUNN et al., 1999). Carcinomas cervicais e mamários são os cânceres mais comuns durante a gestação. O mecanismo normal de controle do crescimento desse tecido está alterado permanentemente, permitindo assim um crescimento progressivo (GOMES-MARCONDES, 1994).

O tumor modifica a harmonia dos processos metabólicos através de profundas alterações no organismo como: redução do aporte de nutrientes causados pela anorexia, consumo de substratos específicos pelas células neoplásicas, estimulação das vias catabólicas, transformação quantitativa e qualitativa do meio interno, em função da produção de substâncias pelas células

tumorais e/ou hospedeiro, originando o quadro denominado caquexia (COSTA, 1977; RUDDON, 1987; DARLING et al., 1990).

O rápido crescimento do tumor Walker 256 durante a gestação resulta em prejuízo ao crescimento fetal. GOMES-MARCONDES et al. (1998) demonstraram que o implante tumoral em ratas prenhes causa mudanças significativas na placenta e fetos. O crescimento tumor provoca a redução do peso (38%) e proteína placentária (22%), bem como peso fetal (20%). A inoculação do líquido ascítico reduz o peso (13%) e proteína placentário (32%) e peso fetal (23%).

O complexo proteossômico 26S exerce fundamental papel no processo de proteólise da musculatura esquelética durante a caquexia (HASSELGREN et al., 2001). Proteossomos são proteases não lisossomais. Este complexo proteolítico é responsável por executar, de muitas maneiras, o que é chamado de processo de modificação protéica pós translacional não reversível denominado proteólise (GACZYNSKA et al., 2000). *In vivo*, a degradação de proteínas é um processo de obtenção de energia. Em eucariotos, a degradação protéica é dependente de um complexo denominado proteossomo 26S, que atua em conjugação com a ubiquitina, mas pode degradar certas proteínas não ubiquitinadas na presença de ATP (BERNAROUJ et al., 2001). Por outro lado, o proteossomo 26 S, também, é responsável por sinais de transdução, respostas ao stress, reparo de DNA e progressão do ciclo celular (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998). Existem três diferentes enzimas E1, E2 e E3 que estão envolvidas no processo de conjugação. Esta atividade culmina na ligação de múltiplas ubiquitinas aos resíduos de lisinas de muitas proteínas a serem degradadas (HIRSCH & PLOEGH, 2000).

O TNF, citocina pró inflamatória (HUNT et al., 1996), foi detectado no fluido amniótico, soro materno, secreção vaginal e no sobrenadante de células placentárias e deciduais (LAHAN et al., 1999; VINCE et al., 1992), não ultrapassando a placenta de ratos, mas pode ser detectado na circulação fetal, sendo também sintetizado no próprio tecido placentário (HOLCBERG et al., 2001). O TNF age inibindo a proliferação de células trofoblásticas de camundongos e ratos, promovendo, também, apoptose em células trofoblásticas humanas. O controle do crescimento e diferenciação do trofoblasto exercido pelo TNF limita a

invasão uterina (HUNT et al., 1996). Em humanos, TNF em fluido amniótico durante o segundo trimestre está associado ao prejuízo no crescimento intra-uterino fetal. Assim, como outras citocinas, o TNF pode interferir na função normal placentária causando hemorragia placentária e aborto em animais experimentais por seus efeitos citotóxicos para células endoteliais e causar danos à vasculatura decidual (CARBÓ et al., 1995). A placenta contém receptores para TNF localizados no trofoblasto que inibem seu crescimento medido por proliferação celular e quantificação e fragmentação do DNA (CARBÓ et al., 1995; ASHWORTH et al., 1999, DAHER et al., 1999, TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999).

O crescimento neoplásico e fetal tem similaridades quanto a necessidade nutricional; entretanto, a associação entre os dois estados, gravidez e câncer, demonstra prejuízos ao desenvolvimento fetal.

Neste trabalho temos por objetivos determinar possíveis alterações placentárias na presença de neoplasia ou inoculação do líquido ascítico em ratas adultas Wistar, durante o 16º, 19º e 21º dias de gestação, avaliando-se o envolvimento do sistema ubiquitina-proteossomo, no processo seletivo de proteínas placentárias bem possíveis efeitos de citotoxicidade de TNF em ratas podendo assim comprometer o desenvolvimento e crescimento do conceito.

MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizadas 54 fêmeas Wistar adultas (90 a 100 dias de idade) provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp, mantidas sob controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (12 horas claro/12 horas escuro). Os animais receberam dieta semipurificada 18% de proteína e água *ad libitum*.

As fêmeas foram colocadas com machos adultos (90 - 100 dias de vida) na proporção de quatro fêmeas para um macho; as fêmeas, em que se detectou espermatozóides, foram separadas e consideradas prenhes (dia zero de gravidez).

de acordo com o método de harém descrito por BAKER, (1991) . As ratas que não apresentaram espermatozoides no canal vaginal foram consideradas não grávidas e foram parte delas foram subdividas em grupos controles (V, n=18) e parte delas foram implantadas com tumor de Walker (VW, n=18).

As fêmeas prenhes foram distribuídas em três grupos de acordo com implante neoplásico, inoculação de líquido ascítico tumoral e data de sacrifício. Classificou-se como grupo controle, C, portadoras de tumor de Walker, W, e inoculadas com líquido ascítico, A, sacrificadas no 16º, 19º e 21º dias de gestação. As fêmeas não prenhes foram sacrificadas no 19º e 21º dia experimental.

IMPLANTE NEOPLÁSICO E OBTENÇÃO DO LÍQUIDO ASCÍTICO

Neste trabalho foram utilizadas células do Carcinossarcoma de Walker 256 (Banco de Tumores Christ Hospital line, Arthur D. Little, EUA), mantidas *in vivo*, a cada 7 dias, após a inoculação na cavidade abdominal de ratos machos.

Após o cruzamento, parte dos grupos de ratas grávidas portadoras de tumor foram inoculadas com 0,3 ml de suspensão celular no 2º dia experimental pós gravidez contendo aproximadamente 250.000 células neoplásicas viáveis, no tecido subcutâneo da região do flanco direito (GOMES et al., 1983).

A partir do 9º dia de gravidez, as ratas do grupo A receberam inoculação de 2,0 ml de líquido ascítico tumoral diariamente. O líquido ascítico foi obtido do líquido, após punção de cavidade abdominal, produzido pela presença do tumor, sem os componentes celulares. O sacrifício foi feito por deslocamento cervical. Foram coletados para análise soro e placenta que foram armazenados em freezer -70° C .

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

WESTERN BLOT

Após o sacrifício, placentas foram pesadas e separadas dos respectivos fetos. O tecido placentário foi homogeneizado em tampão de homogenização (0.3M Tris pH 8, 0.1m NaCl, 10mM EDTA, 0.2M sacarose e 0.01% SDS). Os extratos de placenta tiveram seu conteúdo protéico quantificado pelo método de BRADFORD (1976). Cerca de 30µg/µl de proteína/amostra foram separadas por eletroforese gel SDS-PAGE 12% e transferidas em membrana de nitrocelulose 0,45µm (Hybond, Amersham). As membranas de análise das placentas foram expostas a anticorpo primário Proteossomo subunidade 20S (1:1000), P42 (1:1000), e Ubiquitina E2 (1:1500) e TNF (1:1500) para soro e foram revelados com exposição com anticorpo secundário anti-mouse (1: 1500) associado a peroxidase e reação de quimioluminescência (ECL reagente, Amersham). A expressão das bandas foram analisadas quanto a intensidade densitométrica utilizando software Gel Pro- Plus (Media Cybernetics, 1993-97).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram analisados segundo método de análise de variância one-way (ANOVA) seguido de múltiplas comparações Dunn's utilizando-se software Prisma (v 3.0 for Windows 98, incorporated Copyright 1994-1999, San Diego USA) , com nível de significância para 5%.

RESULTADOS

A) Expressão Proteossomo subunidade 20S, P42 e ubiquitina E2 no tecido Placentário

As análises de Western Blot, referente a expressão de proteossomo subunidade 20S, proteossomo P42 e ubiquitina E2, em extrato placentário de ratas adultas controles, implantadas com tumor de Walker e inoculadas com líquido ascítico, sacrificadas no 16º, 19º e 21º dias de gestação, estão apresentados nas figuras 1, 2 e 3.

Na placenta de ratas implantadas com tumor de Walker sacrificadas no 19º e nas placentas de ratas inoculadas com líquido ascítico sacrificadas no 16º, 19º, e 21º dia de gestação houve aumento significativo da expressão de proteossomo subunidade 20S, diferentemente dos respectivos controles ($p < 0,05$) (Figura 1). Porém, observa-se que nos grupos W o perfil de expressão do proteossomo subunidade 20S tende a diferir dos respectivos controles. A avaliação da expressão de proteossomo P42 (Figura 2) demonstra que houve aumento significativo nos grupos implantados com tumor de Walker e nos inoculados com líquido ascítico, sacrificados no 16º dia, com relação ao respectivo controle, apresentando tendência ao aumento de expressão nos grupos W e A em relação ao grupo controle.

A expressão de ubiquitina E2 apresentou-se similar em todos os grupos tratados com relação aos controles independente da idade gestacional (Figura 3).

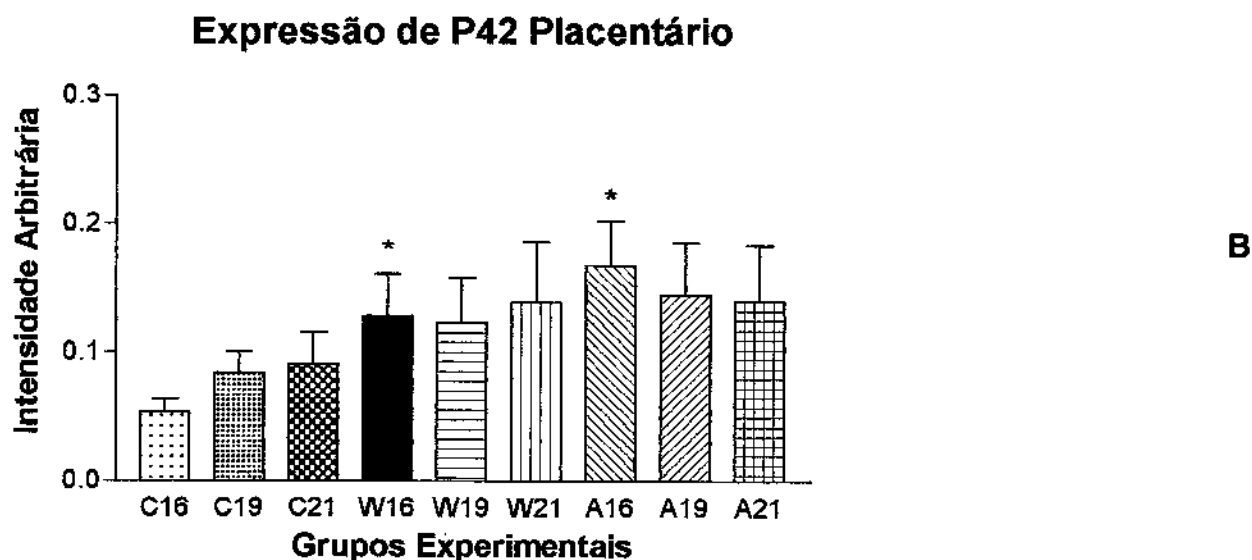
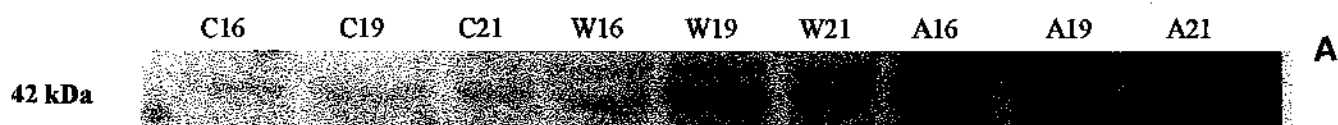


Figura 1: Análise quantitativa da expressão de proteossomo P42 em placentas de ratas controles, C; portadoras de tumor de Walker, W e inoculadas com líquido ascítico, A, sacrificadas no 16º, 19º e 21º dia de gestação. A) Gel representativo (n=6) da expressão de proteossomo P42 (40 kDa) por WB SDS-PAGE (12%) em extrato placentário. B) Análise densitométrica das bandas de expressão de proteossomo 42 S nos diferentes grupos experimentais. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média * significância em relação ao controle para $p < 0,05$.

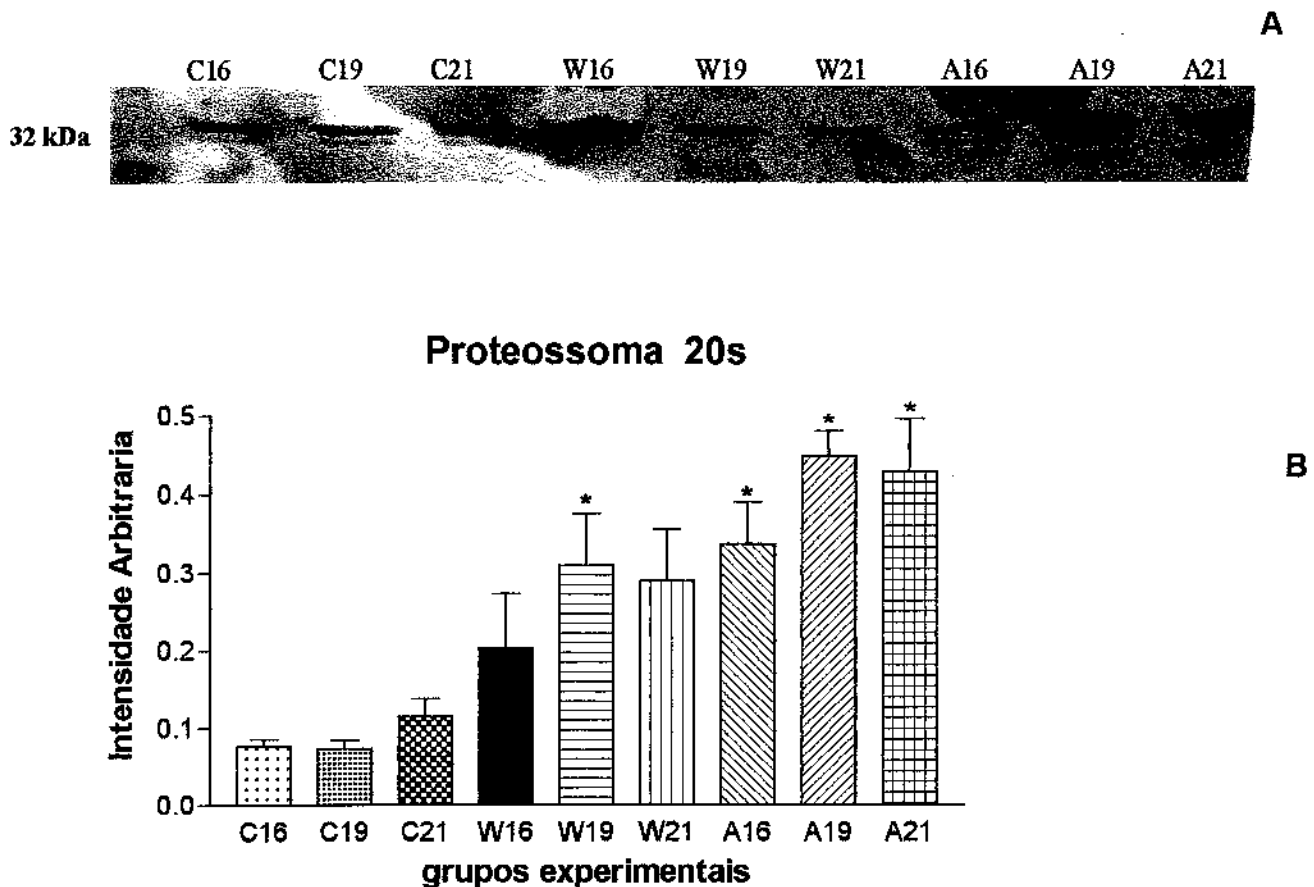


Figura 2: Análise quantitativa da expressão de proteossomo subunidade 20S de extrato placentário de ratas controle, C; portadoras do tumor de Walker, W e inoculadas com líquido ascítico, A, sacrificadas no 16º, 19º e 21º dia de gravidez. A) Gel representativo da análise de mínimo de 6 amostras por grupo (n=6) da expressão de subunidade 20S (32 kDa) por Western blotting em gel SDS-PAGE (12%) de extrato placentário dos diferentes grupos experimentais B) Análise densitométrica comparativa da expressão de proteossomo subunidade 20S na placenta dos grupos C, W e A. Resultados expressos em média ± erro padrão da média. n= mínimo de 6 animais por grupo *significância em relação ao controle para $p < 0,05$.

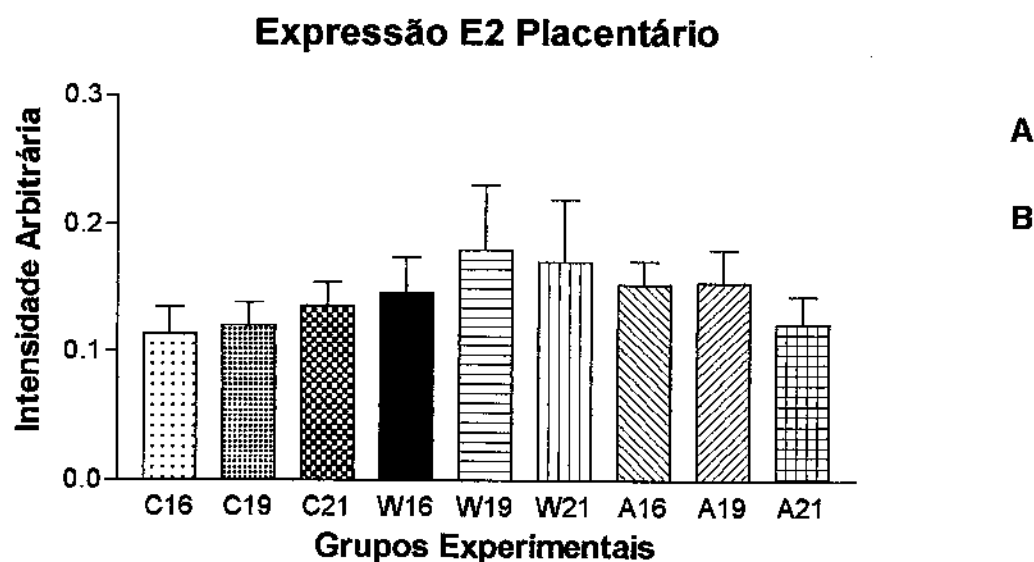
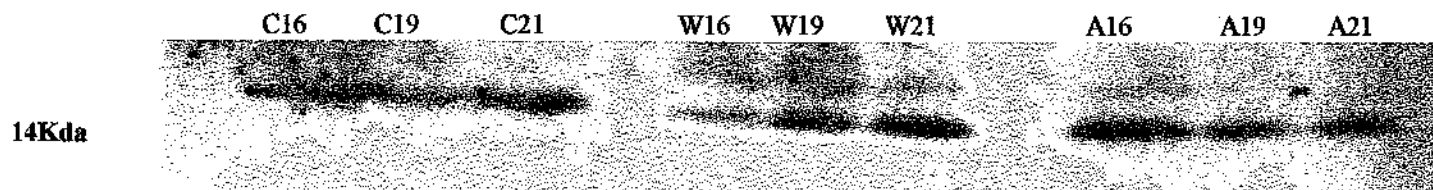


Figura 3: Análise quantitativa da expressão de ubiquitina E2 de extrato placentário de ratas controle, C, portadoras do tumor de Walker, W e inoculadas com líquido ascítico, A, sacrificadas no 16º, 19º e 21º dia de gravidez. A) Gel representativo da análise de mínimo de 6 amostras por grupo (n=6) da expressão de ubiquitina E2 (14 kDa) por Western Blotting em gel SDS-PAGE (12%) em extrato placentário dos diferentes grupos experimentais B) Análise densitométrica comparativa da expressão de ubiquitina E2 na placenta dos grupos C, W e A. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. n= mínimo de 6 animais por grupo *significância em relação ao controle para $p < 0,05$.

Nossos resultados indicam que houve alteração do sistema ubiquitina-proteossomo, verificado pelo aumento da expressão de 20S, e P42 placentário nas ratas implantadas com tumor e inoculadas com líquido ascítico, principalmente, no 16º e 19º dia de gestação.

Este sistema é responsável pelo processo de reorganização e seleção de proteínas citoplasmáticas ou mesmo nucleares no tecido, que está atuante.

B) Expressão de TNF em soro por WESTERN BLOT

Na tabela 1 foi verificada a quantificação densitométrica de TNF em soro materno de ratas grávidas adultas sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. Os soros foram comparados com ratas não grávidas controle (V) e não grávidas implantadas com tumor de Walker (VW).

	19º	21º
V	0,154±0,150	0,180±0,012
VW	0,267±0,014*	0,254±0,015**
C	0,261±0,008**	0,261±0,012**
W	0,264±0,017**	0,284±0,015**
A	0,281±0,011**	0,286±0,016

Tabela 1: Análise quantitativa da expressão de TNF(14 kDa) por Western Blotting em gel SDS-PAGE (12%) em soro ratas controle não grávidas, V, portadoras do tumor de Walker não grávidas, VW, grávidas controle C, implantadas com tumor de walker W e inoculadas com líquido ascítico, A, sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. Resultados expressos em média ± erro padrão da média. n= mínimo de 6 animais por grupo *significância em relação ao controle para p<0,05.

Pudemos observar que não houve diferença significativa nos padrões de TNF no soro de ratas grávidas implantadas com tumor de Walker ou inoculadas com líquido ascítico independente da data de sacrifício. Porém quando avaliamos a quantificação de TNF dos grupos tratados com os grupos controles não grávidas (V) pudemos observar que houve aumento expressivo de TNF durante a gestação em todos os animais independentemente do tratamento (C=W=A) e da data de sacrifício.

DISCUSSÃO

Para garantir crescimento e desenvolvimento fetais há necessidade e dependência do fornecimento adequado de nutrientes trazidos pela circulação materna. A carência nutricional, por exemplo, promove diminuição de quantidade de nutrientes causando alterações no metabolismo placentário e por consequência prejuízos ao feto (LOPES, 1992; PAU & MILNER, 1981).

O crescimento e desenvolvimento fetal ocorre em diferentes períodos de rápidas divisões celulares originando os vários tecidos do organismo (GODFREY & ROBINSON, 1998). Para que isto ocorra, é necessário o aumento gradativo das camadas teciduais para aumentar a superfície de troca metabólica entre mãe e feto, atendendo ao alto consumo de metabólitos energéticos requeridos pelo embrião, de acordo com a evolução do período gestacional (BERNISCHKE et al., 1998).

Em trabalhos prévios, verificamos que o aumento de expressão de poli ADP ribose polimerase (PARP) em placentas de ratas portadoras de tumor de Walker e, também, naquelas inoculadas com líquido ascítico estava, possivelmente, associado ao acelerado mecanismo apoptótico, modificando a organização do tecido placentário, conseqüentemente prejudicando a atividade placentária na associação gravidez e câncer (TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 2003).

Trabalhos recentes tem demonstrado que proteossomo, ou sistema ubiquitina-proteossomo, compreende um complexo multienzimático envolvido em vários processos celulares importantes como ciclo celular, apoptose, regulação metabólica, sinalização de transdução, controle de qualidade protéica e resposta imune (COUX et al., 1996; TANAKA, 1998). O sistema proteossomo 26S catalisa ATP e degrada proteínas dependente de ubiquitinização nas células eucariotas (COUX et al., 1996). Este complexo controla a degradação programada de muitas proteínas críticas do ciclo celular, como por exemplo ciclina (GLOTZER et al., 1991), fator promotor de maturação (HOLLOWAY et al., 1993) e inibidor de ciclina dependente de cinase (PAJANO et al., 1995). Estes processos são fundamentais para o ciclo e, conseqüentemente, para divisão celular.

A degradação de ciclina é peça chave para organizar o processo de mitose e progressão do ciclo celular. Quando a região N terminal da ciclina se funde com proteína há formação de proteína híbrida susceptível a proteólise na mitose, durante o qual no curso de degradação, ambas ciclina e forma híbrida protéica, conjugam com ubiquitina e esta conjugação proporciona proteólise. Na fase anáfase, este processo pode ser desencadeado pelo reconhecimento da ciclina ao sistema ubiquitina-proteossomo (GLOTZER, et al., 1991).

Na associação câncer e gravidez há intenso processo de espoliação tecidual, principalmente muscular, proporcionando aumento de disponibilidade de nutrientes aos tecidos hospedeiros, principalmente maternos, fetais e tumoral. Assim a degradação de proteína, mediada por ubiquitina, exerce importante papel no controle de inúmeros processos, principalmente processos envolvidos na morte celular programada (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998). Anormalidades nos processos mediados por ubiquitina-proteossomo estão relacionados com causas patológicas, como no caso do câncer e, também, na situação de elevado prejuízo ao desenvolvimento fetal e ao tecido placentário (TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999; VENTRUCCI et al., 2001).

O aumento da expressão de proteossomo subunidades 20S e P42 no tecido placentário, na presença de tumor ou na inoculação do líquido ascítico, provavelmente, indica que ocorreu modificações no mecanismo de disponibilidade

e rearranjo das proteínas placentárias, nucleares e citoplasmáticas, com possível modificação da arquitetura placentária ao longo da gestação, como já verificada histologicamente em estudo prévio (TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999), deste modo, podemos aventar a hipótese de que houve alterações no mecanismo de seleção, oferta e rearranjo protéico nas placentas de ratas implantadas com tumor de Walker e inoculadas com líquido ascítico.

Este fato por si só pode interferir no mecanismo de troca metabólica materno-fetal, causando, assim, prejuízos no desenvolvimento e viabilidade da placenta, comprometendo a gestação.

BIBLIOGRAFIA

ASHWORTH A, BERTWISTLE D: The pathology of familial breast cancer. How do the functions of BRCA / BRCA2 related to breast tumour pathology? Breast Cancer Research 1(11) 41-47, 1999.

BAKER HL. Reproduction and breeding In. Baker, HL; Lindsey L JR, Weisbroth SH. The laboratory rat. New York. Academic Press, v.i. cap7 p.153-168, 1991.

BERNAROU DJ N, TARCSA E, CASCIO P, GOLDBERG LA: The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. Biochimic 83: 311-318, 2001.

BERNIRSCHKE, K: Remarkable placenta. Clinical Anatomy 11: 194-205, 1998.

BRADFORD, MM: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem, 72:248-254, 1976.

CARBÓ N, LOPES-SORIANO J, ARGILÉS JM: Administration of tumor necrosis factor alpha results in a decrease placental transfer of amino acids in the rats . Endocrinology 136 (8) : 3579-3584, 1995.

CARBÓ N, LÓPEZ-SORIANO FJ, FIERIS W, ARGILÉS M: Tumour growth results in changes in placental Amino acid transport in the rat: a tumour necrosis factor α -mediated effect. Biochem. J 313:61-66, 1996.

COSTA,G: Cachexia. The metabolic component of neoplastic diseases. Cancer Res. 37: 2327-35, 1977.

COUX O, TANAKA K, GOLDBERG AL. Structure and functions of the 20S and 26S Proteasomes. Annu Rev Biochem 65: 801-847, 1996.

DAHER S, FONSECA F, RIBEIRO OG, MUSATTI CC, GERBASE-DE LIMA M: Tumor necrosis factor during pregnancy and at the onset of labor and spontaneous abortion. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 83 (1999) 77-79.

DARLING G, FRAKER LD, JENSEN JC, GORSCHBOTH CM, NORTON JA: Cachetic effects of recombinant human tumor necrosis factor in rats .Cancer Research 50: 4008-4013, 1990.

DUNN JS, ANDERSON CD, BROST BC: Breast carcinoma metastatic to the placenta. Obstetrics & Gynecology , 94(5 pt 2): 846, 1999.

ELTORKY M, KHASE VK, OSBORNE P, SHANKLIN DR: Placental metastasis from maternal carcinoma. A report of three cases. J Reprod Med 40: 339-403, 1995.

FREEDMAN WL, MC MAHON FJ: Placental Metastasis: Review of the literature and report of a case of metastatic melanoma. *Obstet Gynecol* 15: 550-60, 1960.

GACZYNSKA M, OSMULSKI PA. Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20S proteasome from fission yeast. *J Biol Chem* 2000; 275(18): 13171-4, 2000.

GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW: Ciclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138, 1991.

GODFREY K, ROBINSON S: Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proceedings of the Nutrition Society* 57: 105-11, 1998.

GOMES MCC, BEVILACQUA RG, LIMA-GONSALVES E, RESENDE L: Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. *Cienc 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 carcinossarcoma de Walker 256 (Dissertação de Mestrado, Inst. De Cienc Biom Univer S.P), 1994.

GOMES-MARCONDES, MCC, CURY L, CURI R: Consequences of walker 256 tumour for the placental/fetal development in rats. *Cancer Research Therapy and Control* 5: 277-283, 1998.

HASSELGREN, PO, FISCHER JE: Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg* 233 (1), 9-17.2001.

HEMBERGER M, CROSS JC: Genes governing placental development. *Trend in Endocrinology & Metabolism* 12(4): 162-168, 2001.

HERSHKO A, CIECHANOVER A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479, 1998.

HIRSCH C, PLOEGH HL: Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol* 10(7): 268-72, 2000.

HOLCBERG G, HULEIHEL M , SAPIR O, KATZ M, TSADKIN M, FURMAN B, MAZOR M , MYATT L: Increased production of tumour necrosis factor- α TNF- α by IURG human placentae. *Europ J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94 (1): 69-72, 2001.

HOLLOWAY SL, GLOTZER M, KING RW, MURRAY AW: Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell*. 2; 73(7): 1393-402, 1993.

HUNT JS, CHEN HL, MILLER L: Tumor necrosis factor pivotal production was detected between women with or without a component of pregnancies. *Biol Reprod* 54: 554-62, 1996.

LAHAN N, BRENNECKE SP, RICE GE: Tumour necrosis factor α during human pregnancy and labor: maternal plasma and amniotic fluid concentration and release from intrauterine tissues. *Eur J Endocrinol* 131:607-14, 1994.

LOPES,CMD: Efeito da desnutrição protéico calórica (dpc) sobre o labirinto placentário de ratas jovens : observações morfológicas ultraestruturais. Tese Apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências (histologia). São Paulo, 1992.

PAJANO M, TAM SW, THEODORAS AM, BEER-ROMERO P, DEL SAL G, CHAU V, YEW PR, DRAETTA GF, ROLFE M: Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. Aug 4;269(5224):682-5, 1995.

PAU MY, MILNER JA: Archive deficiency during gestation and lactation in the rat. *J Nutr* 111: 184-193, 1981.

RUDDON, RW : Nature of malignant tumors. In: *Cancer Biology*, New York, Oxford University Press. Cap I, 1987.

TANAKA K, PRACYK JB, TAKEDA K, YU ZX, FERRANS VJ, DESHPANDE SS, OZAKI M, HWANG PM, LOWENSTEIN CJ, IRANI K, FINKEL T: Expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redox-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2;273(40):25922-8, 1998.

TOLEDO MT, GOMES-MARCONDES MCC: Morphologic aspects of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. *Oncol Res* 11(8): 359-366, 1999 .

TOLEDO MT, GOMES-MARCONDES MCC. Placental glycogen metabolism changes during walker tumour growth. Submitting for publication in *Placenta*, 2003.

VENTRUCI G, MELLO MA, GOMES-MARCONDES MC: Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res*. 2001 Mar;34(3):333-8.

VINCE G, SHORTER S, STARKEY P: Localization of TNF production in cells and materno/fetal interface in human pregnancy. *Clin Exp Immunol*: 88: 174-80, 1992.

WEETMAN EM: How foetus is fed . *Fed. Proc*, 28: 17-24,1999.

WEIZN B, SCHIFF E, LISHNER M: Cancer in pregnancy: maternal and fetal implication. Hum Reprod Update 7(4): 384-93, 2001.

III) CONCLUSÃO

No presente trabalho, estudou-se os efeitos do crescimento do carcinossarcoma de Walker 256 sobre a atividade placentária de ratas, concluindo-se que:

- 1) Os efeitos tumorais sobre a placenta são observados tanto diretamente pelo crescimento do tumor *in situ*, como indiretamente pelos produtos do tumor e/ou de células do hospedeiro, verificados nos experimentos com inoculação do líquido ascítico.
- 2) Os efeitos diretos ou indiretos do carcinossarcoma de Walker causam prejuízo à placenta reduzindo peso tecidual, decréscimo dos estoques de glicogênio e do conteúdo protéico placentário, como também, diminuição da atividade das enzimas placentárias fosfatase alcalina e glutathione-S-transferase.
- 3) Fatores relacionados ao mecanismo apoptótico (PARP, caspase-3 e citocromo c) estão aumentados nas placentas dos grupos portadores de tumor e, também, inoculadas com líquido ascítico, intensificando o processo que normalmente ocorre com a evolução da gestação.
- 4) A ativação do sistema ubiquitina-proteossomo está aumentada (aumento da expressão das subunidades proteossomais 20S e P42) nas placentas dos grupos com tumor ou inoculados com líquido ascítico.
- 5) Verificamos que nos grupos inoculados com líquido ascítico não há redução significativa da ingesta alimentar e perda de peso corpóreo, bem como de parâmetros bioquímicos como normoglicemia e

normoproteinemia. Sendo assim, os efeitos da presença do tumor, direta ou indiretamente, sobre a gravidez não estão relacionados à competição nutricional entre tecido fetal e tumoral, mas sim provavelmente por efeitos que atuam sobre o metabolismo e/ou atividade celular, principalmente relacionados a unidade feto-placentária.

IV) PERSPECTIVAS FUTURAS

Verificamos através do modelo experimental de associação entre gravidez e câncer que tanto o crescimento tumoral, quanto os efeitos diretos e indiretos do crescimento das células neoplásicas, alteram o metabolismo e a integridade de comunicação entre placenta e feto. Verificamos, também, que o crescimento tumoral promove alterações da expressão de precursores apoptóticos envolvidos no mecanismo de morte celular programada no tecido placentário. Desde que as células trofoblásticas são responsáveis pela manutenção da função normal placentária, o mecanismo incontrolado de morte celular programada exerce impacto negativo ao trofoblasto. Pudemos verificar que o crescimento tumoral causa danos ao feto (alto índices de reabsorções fetais, morte fetal ou decréscimo no crescimento fetal) juntamente com a ativação do sistema ubiquitina-proteossomo que promove rearranjo de proteínas citoplasmáticas e nucleares.

Sendo assim pretendemos dar continuidade em nossa linha de pesquisa, visto que investigações adicionais são necessárias para a compreensão das alterações no ciclo celular e o real efeito dos fatores produzidos pelo tumor ou células do hospedeiro no tecido placentário.

Pretendemos avaliar mais profundamente a associação da expressão de citocinas, como $TNF\alpha$, e a relação deste quanto a ativação do sistema ubiquitina-proteossomo. Pretendemos avaliar os efeitos da associação gravidez e câncer quanto ao stress oxidativo da placenta, síntese e degradação protéica placentária.

em ratas implantadas com tumor de Walker ou inoculadas com líquido ascítico sobre diferentes estágios de desenvolvimento da prenhez.

BIBLIOGRAFIA

ABRAÃO A: Cancer of the breast associated with pregnancy and lactation. Rev Assoc Med Bras 34(5):180-2, 1988.

CARBÓ N, LÓPEZ-SORIANO FJ, FIERIS W, ARGILÉS M: Tumor growth results in changes in placental Amino acid transport in the rat: a tumor necrosis factor α -mediated effect. Biochem. J 313:61-66, 1996.

CHIARUGI A: Cell biology. PARP-1 a perpetrator of apoptotic cell death? Science 297(5579):200-1, 2002.

DARLING G, FRAKER LD, JENSEN JC, GORSCHBOTH CM, NORTON JA: Cachetic effects of recombinant human tumor necroses factor in rats .Cancer Research 50: 4008-4013, 1990.

DUNN JS, ANDERSON CD, BROST BC: Breast carcinoma metastatic to the placenta. Obstetrics & Gynecology , 94(5 pt 2): 846, 1999.

ELLIS RE, YUAN J , HORVITZ HK: Mechanism and function of death. Am Rev Cell Biol 7: 663-698, 1991.

ELTORKY M, KHASE VK, OSBORNE P, SHANKLIN DR: Placental metastasis from maternal carcinoma. A report of three cases. J Reprod Med 40: 339-403, 1995.

EREL CT, DANE B, CALAY Z, KALELI S, AYDINKI K: Apoptosis in the placenta of pregnancy complicated with IURG. Int J Gynecol Obstet 63: 1913-1917, 2001.

FREEDMAN WL, Mc MAHON FJ: Placental Metastasis: Review of the literature and report of a case of metastatic melanoma. Obstet. Gynecol 15: 550-60, 1960.

- FREINKEL N, METZGER BE, HARRIS E, ROBINSON S, MAGER M: The hypothermia of hypoglycemia. Studies with 2-deoxy-D-glucose in normal human subjects and mice. *N Engl J Med.* 26;287(17):841-5, 1972.
- GARCIA I, VIZOSO F, ANDICOECHEA A, FERNANDEZ P, SUAREZ C, GARCIA-MUNZ JL, ALLENDE MT: C-erbB-2 oncoprotein content in gastric cancer and in adjacent mucosa. *Int J Biol Markers* 15(3):231-4, 2001.
- GOMES-MARCONDES MCC, CURY L , CURI R: Consequences of walker 256 tumour for the placental/fetal development in rats. *Cancer Research Therapy and Control* 5: 277-283, 1998.
- 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 carcinossarcoma de walker 256 (Dissertação de Mestrado, Inst. De Cienc. Biom. Univer. S.P), 1994.
- HAY SM, HARRIES DN, ANTIPATIS C, REES WD: Growth sensitive genes expressed in the placenta. *Biochem Soc Trans* 26(2): S100, 1998.
- HEBEL R, STROMBER G: Anatomy and embryology of the laboratory rat. In: Woethsee, Bromed Verlag p. 244-8, 1986.
- KATAYAMA K: Ethylnitrosourea-induced apoptosis in primordial germ cells of the rat fetus. *Exp Toxicol Pathol* 54(3):193-6, 2002.
- KAUFFMAN W, HUDSON MM, GREENWALD C, THOMPSON E, WILIMAS J, MARINA N, FAIRCLOUGH D, , BOZEMAN P, MACKERT PW, ABROMOWITCH M: Efficacy and toxicity of multiagent chemotherapy and low-dose involved-field radiotherapy in children and adolescents with Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* Jan;11(1):100-8, 1993.

KNOPP RH: Metabolic adjustments in normal and diabetic pregnancy. Clin Obstet Gynecol (Philadelphia, PA) v. 24, p-21-49, 1981.

KOKAWA K, SHIKONE T, NAKANO K: Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. Placenta 19: 21-26, 1998.

KUMMAR S: Apoptosis: Mechanisms and Role in Disease- Results and Problems in cell differentiation. Ed Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998.

LEDERMAN SA , ROSSO P: Effects of food restriction on fetal and placental growth and maternal body composition. Growth 44: 77-88, 1980.

LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase 3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell 89: 175-184, 1997.

LOPEZ MF, DIKKIES P, ZURAKOWSKI, D , VILLA-KOMAROFF L: Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cell in the murine placenta. Endocrinology 137(5): 2100-2108, 1995.

MASUTANI M, NOZAKI T, WAKABAYASHI K, SUGIMURA T: Role of poly (ADP-ribose) polymerase in cell-cycle checkpoint mechanisms following gamma-irradiation. Biochimie.77(6):462-5,1995.

MATTHEWS JC, BEVERIDGE MJ, MALANDRO MS, KILBERG MS: Response of placental amino acid transport to gestacional age and intrauterine growth retardation. Proceeding of the nutrition society 57: 257-263, 1998.

MILTHICH E , SCHINKE RT: Apoptosis. Vol 4, Plenum Press, New York, 1994.

NICHOLSON RI, MCCLELLAND RA, GEE IM: Steroid hormone receptors and their clinical significance in cancer. J Clin Pathol. 48(10):890-5, 1995.

ROESEL, K: Imunologia In Reações Imunológicas Relacionadas com Crescimento e Destruição do Tumor. Cap.10. Ed Mc Graw Hill, p 216-230. 1991.

RUDDON, RW: Cancer Biology 2ªed. Oxford University Press, 1981. Cap 3 pp 3-7.

SLAGA TJ, DIGIOVANI J, WINBERG LD, BUDUNOVA IV: Skin carcinogenesis characteristics, mechanisms and prevention. Prg Clin Biol Res, 1-20, 1995.

SMITH SC, BAKER PN, SYMONDS EM,. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. Am J Obst Gynecol 177:1395-1401, 1997.

SMITH SC, BAKER PN: Placental apoptosis is increased in post-term pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 106: 861-862, 1999.

STRASSER A, O'CONNO RL, DIXIT VM: Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem. 69:217-45, 2000.

TOLEDO MT, GOMES-MARCONDES MCC: Morphologic aspects of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. Oncol Res 11(8): 359-366, 1999.

TRUMP DL: Serious hyponatremia in patients with cancer: management with demeclocycline. Cancer 47(12):2908-12, 1981.

WEIZS B, SCHIFF E, LISHNER M: Cancer in pregnancy: maternal and fetal implication. Hum Reprod Update 7(4): 384-93, 2001.

WHEATER. Histologia funcional. 4ª ed. Texto e Atlas em Cores. Barbara Young, Jonh W. Heath. Rio de janeiro, Guababara Koogan pg 42-43, 2001.

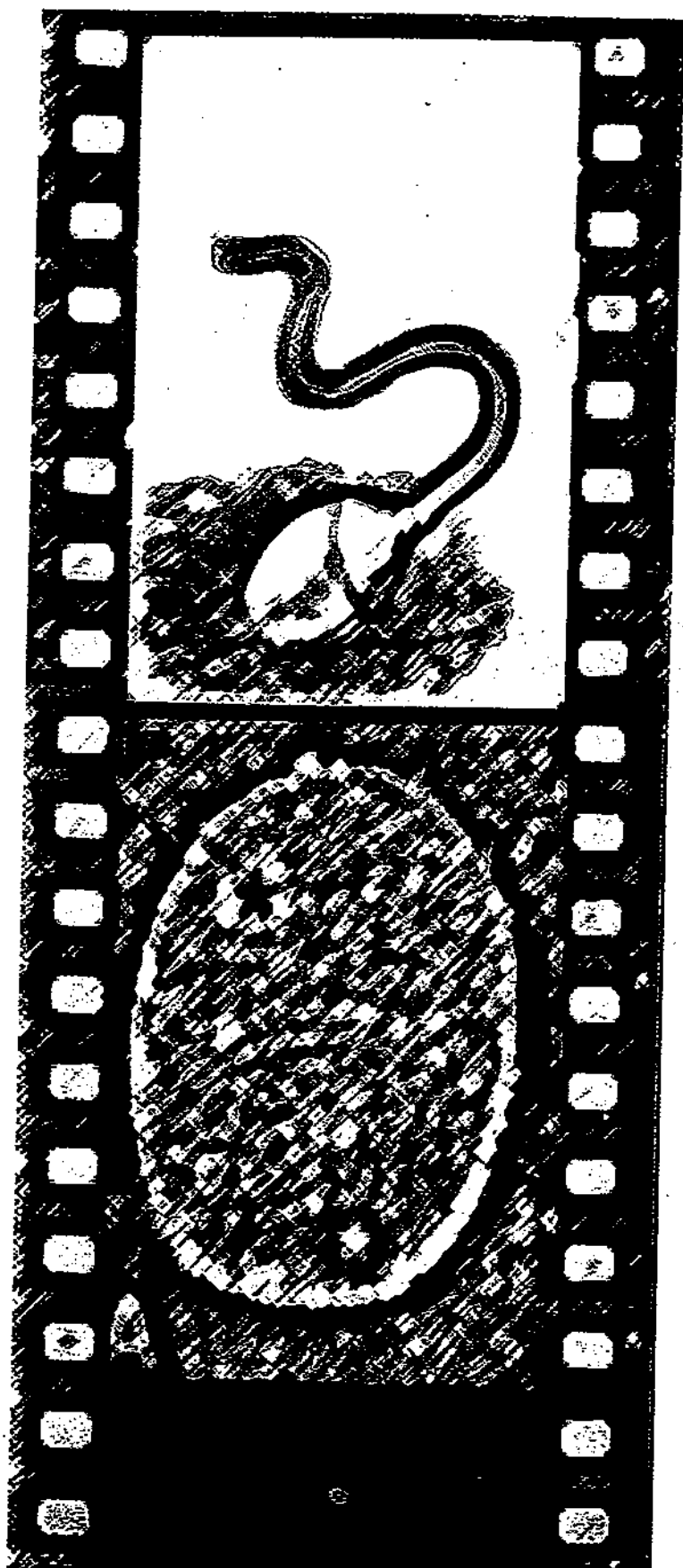
WYLLIE AH: Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 13(4):681-92, 1981.

YOUNG B , HEATH JW: Wheather- *Histologia Funcional* 4ª ed - Texto e atlas em cores. Guanabara Koogan 42-43, 2001.

ANEXOS

Trabalhos apresentados em congressos

Congresso de Integração em Biologia da Reprodução



Resumos Abstracts

19 a 23 de Setembro de 2001
Ribeirão Preto - S. Paulo - Brasil



34. "PREGNANCY AND CANCER. MORPHOMETRIC STUDY OF THE PLACENTA IN YOUNG AND ADULT RATS BEARING WALKER 256 TUMOR"

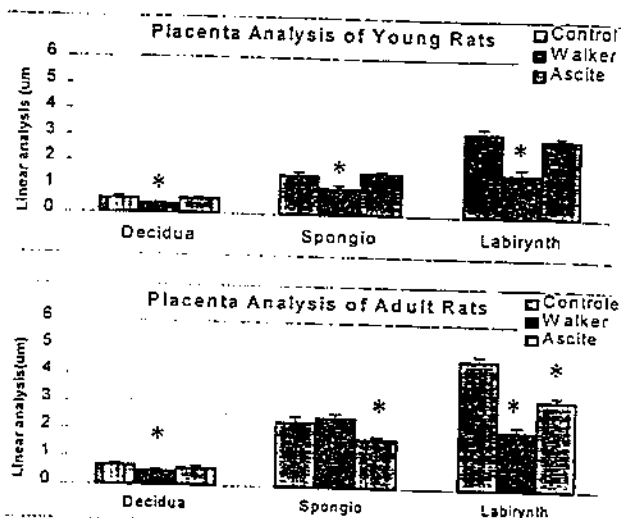
Toledo MT*, Ventrucchi G, Gomes-Marcondes MCC. UNICAMP, Campinas, Brazil. Department of Physiology and Biophysics - Institute of Biology ZIP CODE 13083-970. mtttoledo@unicamp.br

The placenta is an organ which leads the blood exchange providing the essential substances between mother and fetus, guaranteeing the normal fetal development and pregnancy course. In cancer, probably the nutritional competition or alimentary lack can alter the placental development interfering in the pregnancy progress (1). Depending on which stage is the cancer development it is difficult to predict the pregnancy duration, or evolution, because there are two patients: mother and fetus (2).

The objective of the present study was to evaluate the morphometric profile of the placenta layers: decidua basalis, spongiotrophoblastic area (trophoblastic giant cells; spongio) and the labyrinth layer in young (Y) and adult rats (A) implanted with Walker 256 tumor (W) or inoculated with ascitic fluid (a). Wistar female rats (N=40) were distributed as control (C), tumor-bearing (W) and inoculated ascitic fluid (a) groups. After 21 days, placenta samples were analyzed by optical histologic analysis. The morphometric study was done obtaining linear measures and thickness analysis of each placental layer was done using Image Pro Plus software. The linear measurements were compared through non parametric variance Kruskal-Wallis analysis followed by Dun's test, $p < 0,05$.

The placenta morphometric profile in young and adult rats, submitted to tumor implantation or ascitic inoculation differed from normal tissue compared to the respective controls. The decidua basalis layer decreased in YW (32%), AW (26%), Aa (11%) groups; spongiotrophoblastic layer reduction was also observed in the young tumor-bearing (YW 32%) and adult ascitic inoculated (24%). The labyrinth trophoblastic thickness was reduced in the young (YW, 49%) and adult groups (AW, 54%; 30% Aa).

Our previous data showed an intense hemorrhagic and edema incidence in the



spongiotrophoblastic and labyrinth layers in tumor-bearing and ascitic inoculated rats (2). The neoplastic effects promote desbalance in the host metabolic processes such as nutrients reduction caused by the anorexia in consequence of the huge specific substrates consumption by neoplastic cells; this fact presupposes a nutritional competition between cancer and fetus. However, we have verified the Walker bearing groups had had alterations in the placenta layers indicating decrease of the metabolic exchange surface between mother and fetus, this fact was equally reproduced by the ascitic fluid inoculation, suggesting that substances, produced by the host and/or tumor cells, as cytokines, would cause such damages to the fetus development during the pregnancy progress.

- (1) Gomes-Marcondes, M.C.C. Cancer Res. Ther. and Cont. 5: 277-283, 1998;
- (2) Toledo & Gomes-Marcondes. Oncology Res. (11): 359-366, 1999

FINANCIAL SUPPORT: CAPES and FAPESP (no. 97/01002-2; 96/09463-6; 01/02135-3).

FESBE 2002

Certificamos que

o resumo número 35.036 intitulado AVALIAÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSSOMA EM PLACENTA DE RATAS PORTADORAS DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256. de autoria Toledo, M. T.; Ventrucchi, G.; Marcondes, M. C. C. G. foi apresentado sob a forma de painel na

XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções do Carlton Bahia Hotel, Salvador - Bahia, de 28 a 31 de agosto de 2002.


Comissão Organizadora

FeSBE2002 - Oncologia Experimental

35.036

AVALIAÇÃO DO SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSSOMA EM PLACENT. CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256. Toledo, M. T." ; Ventrucci, G." ;

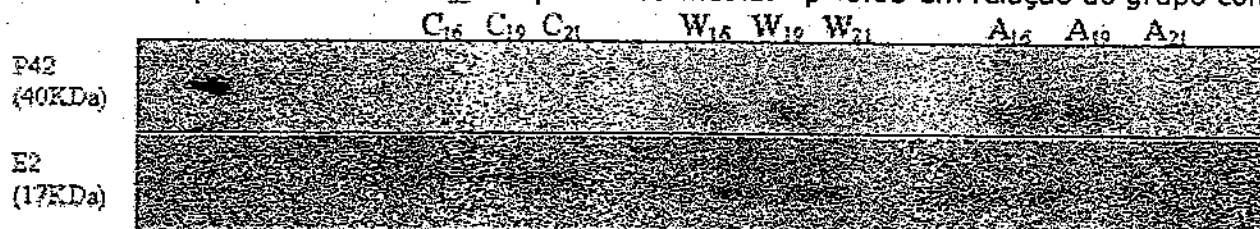
Biofísica, UNICAMP; Fisiologia e Biofísica - IB, UNICAMP .

Objetivo: Neste trabalho verificou-se o envolvimento do sistema ubiquitina proteossoma, no pl ratas portadoras do tumor de Walker 256 ou inoculadas com líquido ascítico. Trabalhos anteriores materno-fetal devido a alterações morfológicas e bioquímicas placentárias associadas á neoplasia (1).

Métodos e Resultados: 36 ratas Wistar grávidas foram distribuídas em grupos: controle (C), inoculadas com líquido ascítico (A) e sacrificados no 16º, 19º e 21º dia de gestação. Após o homogenizado para dosagem de proteína e quantificação das enzimas ubiquitina E2 e proteossoma de imagem, foi feita análise da intensidade arbitrária da expressão dessas proteínas em se implantadas com tumor de Walker e inoculadas com líquido ascítico, a expressão de E2 não f expressão de P42, nos grupos W19, A19 e A16, diferiu do grupo controle.

Grupos	C16	C19	C21	W16	W19	W21
E2	0.15±0.03	0.14±0.01	0.15±0.02	0.14±0.02	0.19±0.03	0.17±0.03
P42	0.08±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01	0.23±0.05	0.14±0.01*	0.17±0.05

Resultados expressos em Média ± erro padrão da média.* p<0.05 em relação ao grupo controle



Conclusões: Nossos resultados indicam que, apesar de não haver diferença na expressão da ub P42 sugerindo alteração do sistema ubiquitina proteossoma, responsável pelo processo citoplasmáticas ou mesmo nucleares teciduais placentárias. A presença do tumor ou a inoculação alteração neste sistema que pode ter prejudicado o desenvolvimento e a viabilidade da placent Res. (11):359-366,1999.

Apoio Financeiro: CAPES, FAPESP, CNPq

CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256 E SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO DE GLICOGÊNIO PLACENTÁRIO

Toledo, M. T. ; Ventrucchi, G. ;

Marcondes, M. C. C. G. ; Fisiologia e Biofísica - IB, UNICAMP .

Objetivo: Avaliar a influência do tumor sobre as reservas de glicogênio placentário analisando o perfil de células glicogênio positivas, e o conteúdo de glicogênio placentário total. Em estudos prévios verificou-se alterações morfológicas e bioquímicas placentárias associadas ao crescimento tumoral (1).

Métodos e Resultados: Ratas grávidas (n=54, 90 dias) foram agrupadas em: controle (C), implantadas com tumor de Walker 256 (W) e inoculadas com líquido ascítico (A). Após o sacrifício no 16º, 19º e 21º dias de gestação as placentas foram analisadas por histoquímica para glicogênio (reação de PAS) e quantificação de glicogênio total (método enzimático). Imagens das células glicogênio positivas da região do espongio trofoblasto foram quantificadas. Os resultados mostraram redução significativa no número de células glicogênio positivas das grávidas implantadas com tumor de Walker ao longo do período gestacional. Nas ratas inoculadas com líquido ascítico houve redução no número de células glicogênio no 16º e 19º e elevação no 21º dia, comparado aos controles. Houve diferenças nos estoques de glicogênio em todos os grupos experimentais.

Grupos	Células Glicogênio Positivas	[glicogênio placentário μ g/ml
C16	48.02±2.97 *	0,95 ± 0,075 *
C19	36.81±3.62 *	0,54 ± 0,048 *
C21	29.19±3.65 *	0,38 ± 0,026 *
W16	6.07±0.88 *	1,20 ± 0,065 *
W19	10.3±2.49 *	0,59 ± 0,071
W21	11.08±1.08*	0,43 ± 0,040 *
A16	11.74±1.07 *	0,64 ± 0,029*
A19	25.27±5.87 *	0,41 ± 0,039
A21	38.03±1.69 *	0,39 ± 0,047 *

Resultados expressos em Média ± erro padrão da média.* p<0.05 em relação ao grupo controle

Conclusões: A presença do tumor ou a inoculação do líquido ascítico promoveram alterações na mobilização e armazenamento de nutrientes em consequência à alteração da atividade celular placentária acarretando prejuízo no desenvolvimento e viabilidade desta, comprometendo a gestação. (1) Oncology Res. (11):359-366,1999.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPESP

CLIQUE AQUI PARA COMEÇAR A IMPRESSÃO