

Mércia Tancredo Toledo

**“ASPECTOS MORFOMÉTRICOS E FUNCIONAIS DA
PLACENTA DE RATAS *WISTAR* JOVENS E ADULTAS
PORTADORAS DO *CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256*”**

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

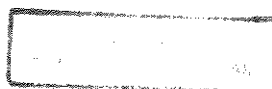
30/03/99 *verônica*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Fisiologia.

ORIENTADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

CAMPINAS-1999



9112205

UNIDADE	70C
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
	37881
	229/99
	0 ☒
PROD.	R 8 11,00
DATA	11/08/99
N.º CPD	

CM-00124092-5

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Toledo, Mércia Tancredo

T575e Estudo de aspectos morfométricos e funcionais da
placenta de ratas Wistar jovens e adultas portadoras do
carcinossarcoma de Walker 256/Mércia Tancredo Toledo
Campinas, SP:[s.n.], 1999.

117f.:ilus.

Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

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

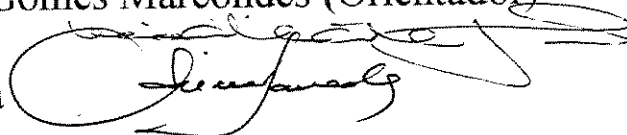
30/03/1999

BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

Prof. Dr.a Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes (Orientador)

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada



Prof. Dr. Maria Alice Roston de Mello



Suplentes:

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof. Dr. Yara Maria Silva De Luca

Dizia Jesus:

“São teus olhos a lâmpada do corpo. Se os teus olhos forem bons, todo o teu corpo será luminoso; se porém, os teus olhos forem maus, todo o teu corpo estará em trevas.”

(Mateus, 6: 22-23)

**“Dedico este trabalho aos meus dois amores, Marcello e
Matheus, e a toda a minha família.”**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de criar e pela saúde necessária para a realização deste trabalho. Por me fazer compreender o verdadeiro sentido da vida .

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Maria Cristina C.G.Marcondes pela amizade, carinho, compreensão e apoio. Por ter aberto as portas da ciência tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada pelo ensino das técnicas histológicas e pelo uso dos laboratórios do Departamento de Morfologia e Histologia IB, Unicamp . A todos os funcionários desse Departamento pelo carinho e apoio e em especial, a Martha Marques de Almeida, Marta Beatriz Leonardo, Maria Israel Prata e Cleusa de Oliveira Franco.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica Josefina S.B. Nogueira, Francisco Leite, Léscio Domingos Teixeira, Davi Santiago Santos e José F.Machado, pelos cuidados dispensados aos animais usados e pelo companheirismo. Ao Ivo S. Moreira, Alexandra M.F.Rosa e Sonia Maria M. de Oliveira pelo apoio. Á Aparecida da Silva Geraldo pelo carinho e amizade.

Aos meus companheiros de trabalho: Samanta G. Feddrizzi, Maria Carolina Meira Villani, Cláudia Magno, Gislaine Ventrucchi, Luciana P.Magri, Wagner de Jesus Pinto, Gustavo Luís Ramos da Silva e Patrícia Donadon Sousa por todos os momentos que passamos juntos, pela amizade e colaboração;

Aos meus pais Manoel Tancredo e Carmen Pimentel Tancredo pela vida, dedicação, amor e incentivo. Ao meu companheiro de jornada Marcello Toledo, pelo respeito, paciência, amor e dedicação e ao nosso filho Matheus Tancredo Toledo, pelas horas ausentes, pelo seu sorriso nas horas de cansaço e pelo amor que nos une. Aos meus irmãos Márcio Roberto Tancredo, Maria Cláudia Tancredo e Manoel Tancredo Júnior; cunhadas Mari Sara Marinheiro Tancredo e Luciana Guarino Tancredo; sobrinhos Manoel Tancredo Neto, Isabella Guarino Tancredo e Ana Luisa Guarino Tancredo pelo carinho. Aos meus sogros Antonio Toledo e Maria José dos Santos Toledo e meus cunhados Maria Amélia Toledo e Marco Eduardo Toledo, que mesmo distantes, estiveram sempre presentes.

Agradeço a todos de meu convívio e aos que , involuntariamente, omiti seus nomes.

Aos animais de laboratório pela vida, que foi usada para a concretização de um sonho ...

Agradecimentos especiais à FAPESP, processos nº 97/010002-2, 96/09463-6 e ao FAEP Unicamp pelo apoio financeiro.

Aos Produtos Roche Química e Farmacêutica S.A pela doação de mistura vitamínica e à Amido Corn Products Brasil Ingredientes Industriais Ltda, pela doação de amido de milho, utilizados por nós na confecção de dietas.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Introdução	1
Objetivos	9
Materiais e Métodos	10
Resultados	
1. Análise do Número de Fetos e Sítios de Reabsorções Fetais dos grupos experimentais.....	20
2. Análise Histológica dos Tecidos Placentários dos grupos experimentais	24
3. Análise Morfométrica da Placenta	
3.1 Análise da espessura das Camadas Teciduais Placentárias	36
3.2 Análise do Perfil Numérico de Células Trofoblásticas Gigantes (CTGs) por campo.....	44
3.3 Análise da Área dos núcleos das Células Trofoblásticas Gigantes (CTGs).....	47
4. Análise da Intensidade de Hemorragia e Edema das Placentas dos Grupos Experimentais	49
5. Discussão.....	53

6. Conclusões.....	63
7. Bibliografia	64
Apêndice	
Trabalho a ser publicado	74

RESUMO

Na gravidez, nutrientes são transportados ao feto via circulação placentária, sua integridade é essencial para manter o desenvolvimento fetal. Neste trabalho, investigamos a influência do crescimento do tumor de Walker 256 na morfologia placentária e sua influência no desenvolvimento fetal em ratas grávidas jovens e adultas. Após acasalamento, fêmeas Wistar jovens (50 dias) e adultas (90 dias) foram distribuídas em 6 grupos: jovens grávidas controle (JG), jovens grávidas com tumor (JW), jovens grávidas injetadas com líquido ascítico (JAs), adultas grávidas controle (AG), adultas grávidas com tumor (AW), adultas grávidas injetadas com líquido ascítico (AAs). Nos grupos JW e AW injetou-se no subcutâneo $2,5 \times 10^6$ células neoplásicas viáveis. Os grupos JAs e AAs receberam inoculação diária de 2.0ml de líquido ascítico. Após sacrifício, no 19º e 21º dias, as placentas foram coletadas e fixadas para análise histológica. Foram comparados os grupos JW e AW e os respectivos controles verificando-se: 1) Verificou-se redução de número de fetos por rata; 2) observou-se elevado índice de reabsorção fetal; 3) hemorragia na decídua e na camada de células trofoblásticas gigantes; 4) desarranjo e compactação do espongio trofoblasto e diminuição do perfil numérico destas células; 5) restrita delimitação dos vasos fetais do labirinto placentário e hemorragia e edema nesta área; 6) redução da espessura da camada labirintica. Resultados similares foram verificados nas placentas dos grupos injetados com líquido ascítico (JAs e AAs). Estas alterações foram verificadas independente da idade da rata. Estes resultados indicam que o desenvolvimento tumoral durante o período gestacional causou efeitos deletérios na placenta e feto. Estas observações confirmam dados prévios de intensa reabsorções fetais verificadas em ratas grávidas portadoras de tumor ou injetadas com líquido ascítico. As modificações na morfologia placentária podem estar relacionadas com a síntese e secreção de fatores, produzidos pelo tumor e/ou pelas células do hospedeiro, com ação direta ou indireta sobre a placenta, com conseqüente prejuízo das trocas materno/fetais ou, ainda, induzindo morte celular placentária e/ou fetal, de forma irreversível.

I. INTRODUÇÃO

A placenta é basicamente um órgão de troca entre o sangue materno e fetal; essas trocas se efetuam através da barreira placentária presente na região labiríntica placentária; a qual apresenta-se muito elaborada nos roedores (LOPES, 1992). Nos mamíferos a placenta proporciona nutrição ao embrião em todos os estágios do seu desenvolvimento, através da difusão de água, gases e nutrientes para o feto, bem como produtos de excreção do feto para a mãe (SMITH et al., 1974). Atuando assim como um filtro seletivo para a transferência de substâncias essenciais para o desenvolvimento do feto (LOPES, 1992). Assim a placenta apresenta funções alimentares, pulmonares, hepáticas, renais e endócrinas para que o desenvolvimento fetal seja adequado (BEACONSFIELD et al., 1980; YEN, 1994). Esta por sua vez é a chave principal para determinar o curso normal do desenvolvimento da gravidez (BENIRSCHKE et al., 1998). A placenta humana produz uma larga variedade de substâncias bioativas com competência endócrina e neuronal, comandando a liberação de hormônios hipotalâmicos e hipofisários, fatores de crescimento, citocinas e neuropeptídeos, os quais modulam o processo gestacional (PETRAGLIA et al., 1995).

Durante a implantação do embrião, o tecido conjuntivo do endométrio sofre uma série de modificações para formar a decídua. As mudanças sofridas assumem grande importância para o estabelecimento das interações funcionais entre o embrião e o endométrio (BEVILACQUA & ABRAHAMSOHN, 1994).

A implantação é definida como um processo que inicia a morfogênese placentária . O termo é mais comumente usado em espécies na qual o processo envolve invasão pelo trofoblasto, acompanhado por degradação do tecido hospedeiro materno. O evento central da implantação é o contato morfológico e funcionalmente especializado entre trofoblasto e o endométrio. Quando a implantação inicia-se, o trofoblasto do blastocisto invade a membrana plasmática apical das células do epitélio uterino (DENKER, 1993).

Estudos comparativos da morfologia do trofoblasto uterino e suas interações com as fases iniciais da implantação demonstram que há diferenças no processo invasivo da implantação. Em ratos e camundongos, um grupo de células epiteliais uterinas desprendem-se de suas membranas basais e de células adjacentes, sofrem degeneração e são fagocitadas pelo trofoblasto expondo a membrana basal posteriormente (DENKER, 1993).

As interações adesivas e invasivas entre o trofoblasto e o epitélio uterino dependem da receptividade do endométrio, a qual é mantida por um período de tempo , sendo definida por janela de implantação. A receptividade do endométrio é regulada não só pela progesterona, como também pelas mudanças na relação estrógeno/progesterona (DENKER, 1993).

No rato, por volta do 6º dia de gestação, o estroma uterino , sofre uma série de alterações complexas e contínuas, conhecida como respostas deciduais, próximas ao sítio de implantação do blastocisto, ou reações que envolvem hipertrofia do estroma uterino (WELSH & ENDERS, 1985). As células deciduais atuam como barreira física para a invasão do trofoblasto prevenindo assim a rejeição do conceito, fornecendo nutrientes e secretando hormônios e outros produtos específicos que mantêm a homeostasia da gestação e o desenvolvimento do embrião (WELSH & ENDERS, 1985)

As células mesometriais decíduais passam por uma série de estágios de desenvolvimento subseqüentemente envolvidos com a formação da placenta (WELSH & ENDERS, 1985). A circulação materna e fetal não sofre anastomoses. A circulação é feita através dos lados da placenta com o objetivo de proporcionar seletividade para hormônios e outras substâncias, funcionando então, como barreira entre o sistema vascular (YEN, 1994).

O útero de rato é bicornes com acesso aos 2 ovários, apresentando capacidade de sustentação de indefinido número de embriões, com quatro a seis sítios de implantação em cada corno uterino. As camadas uterinas são constituídas pelo perimétrio, miométrio e endométrio (RUGH, 1968).

O local de implantação dos embriões, a câmara de implantação, é formado pela região mesometrial e região antimesometrial, o embrião se desenvolverá na cripta uterina da região antimesometrial (BEVILACQUA & ABRAHAMSOHN, 1994).

O período gestacional em ratas tem duração em torno de 21 dias $\pm$ 24 hs e se divide em 3 fases distintas. A primeira fase consiste na pré - implantação, que ocorre do 1º ao 4º e ½ dia; em torno do 4º ou 5º dia, após a fertilização, ocorre a implantação do blastocisto. A segunda fase consiste no período pré-placentário (5º ao 11º dia), onde as células fibroblásticas do estroma uterino em células com arranjo epitelióide, tornam-se globosas e com capacidade de junção umas com as outras. A terceira fase é constituída do período placentário (11º ao 20º dia), que inicia a troca metabólica entre mãe e feto (BEVILACQUA & ABRAHAMSOHN, 1994). A placenta de rato, de acordo com a participação da mucosa uterina na formação da placenta, é do tipo hemocorial.

No rato, o processo de divisão celular placentário se interrompe no 17º dia e a síntese protéica prolonga-se até o término da prenhez (WINICK &

No rato, o processo de divisão celular placentário se interrompe no 17º dia e a síntese protéica prolonga-se até o término da prenhez (WINICK & NOBLE, 1973). A placenta atinge seu tamanho máximo no 16º dia de prenhez (HEBEL & STROMBERG, 1986); entretanto ainda sofre alterações até o final do período gestacional (DAVIES & GLASSER, 1968). Na rata, a placenta constitui-se de camadas decidual (parte materna) e espongio trofoblástica, das células trofoblásticas gigantes (CTGs) e labirinto (parte fetal). Durante os estágios iniciais, a nutrição do embrião é histotrófica, mecanismos de invasão trofoblástica que envolvem fagocitoses e citólises das células endometriais e os produtos destas lises estão disponíveis ao embrião. Duas zonas morfológicamente distintas são determinadas: zona alfa; tem característica de transporte ativo e absorção e zona beta, com organelas relacionadas com síntese celular (MORRIS, 1975).

As trofoblásticas gigantes (50-300µm de diâmetro), apresentam capacidade de promover adesão ao epitélio uterino e possui característica invasiva. Estas células delimitam os espaços com prolongamentos citoplasmáticos, contendo fagossomos, que tem a propriedade de realizar fagocitoses, insinuando-se no ambiente endometrial uterino que faz interface com os tecidos fetais (MORRIS, 1975).

A placenta fetal humana é um órgão provido de vilosidades que revestem-se de epitélio de diferenciação trofoblástica com grande capacidade proteolítica e de reabsorção. A parte materna placentária é representada pela decídua gravídica, ou seja, a mucosa uterina com tecido conjuntivo e rede vascular própria (LORDY, 1947). Em roedores, o trofoblasto adjacente desenvolve-se particularmente como membrana extraembrionária, não estando presentes em outras espécies; esta membrana é conhecida como membrana de Reichert. No rato, a membrana de Reichert aparece inicialmente no 6º dia de

gestação como secreção amorfa no interior de todo o trofoblasto. Esta se situa entre as células trofoblásticas gigantes e as células endodérmicas parietais, envolvendo a cavidade do embrião (TACHI et al., 1970). A placenta hemocorial da rata é formada pelo cone ecto placentário com lacunas de sangue materno, relacionados com o ectoderma coriônico. A vascularização situada no lado embrionário é proveniente do mesênquima do alantóide que se funde com o cório no 9º e 10º dia. Esses vasos invadem o ectoderma coriônico, somente se separando do sangue materno pela delgada camada do cório (STEVEN, 1972).

A manutenção da gravidez em ratos é dependente do hormônio luteinizante (LH). A ação da prolactina do corpo lúteo e da luteotrofina placentária têm a propriedade de conservar a síntese de progesterona em resposta ao LH (ROTHCHILD et al., 1973).

Segundo CERRO & PINTART (1997), o sistema IGF (fator insulínico de crescimento) exerce papel fundamental na regulação do crescimento embrionário e placentário. Componentes mitogênicos do sistema IGF são requeridos para um crescimento normal embrionário e placentário em roedores, proporcionando então, suporte ao crescimento embrionário através do crescimento do útero durante a gravidez, assim como a diferenciação da decídua e assim, influenciando o crescimento do concepto .

O desenvolvimento de um novo ser caracteriza-se por um intenso anabolismo. Durante a gravidez, em humanos, a taxa de crescimento fetal é de 12,5 g por dia, sendo que o zigoto aumenta de peso 6 bilhões de vezes até o final da gestação (WIDDOWSON, 1969). Segundo LEDERMAN & ROSSO (1980), uma agressão nutricional sofrida na gestação traz sérios reflexos sobre o crescimento do feto.

O crescimento do embrião envolve em aumento da síntese protéica ressaltando a importância nutricional dos aminoácidos na vida fetal. O papel dos aminoácidos no metabolismo fetal não é exclusivamente restrito ao processo de acréscimo protéico tecidual (CARBÓ et al.,1996). 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 (BENIRSCHKE et al., 1998).

A competição nutricional ou a carência alimentar da mãe durante a gestação podem alterar o processo de desenvolvimento da placenta (ROSSO,1980). Desta forma, algumas patologias, câncer, por exemplo, podem interferir no processo gestacional (GOMES-MARCONDES,1994).

A neoplasia é um tecido que cresce ativamente devido a proliferação de células derivadas de uma outra que sofreu diferenciação anormal irreversível. O mecanismo normal de controle do crescimento desse tecido está alterado permanentemente permitindo, assim, um crescimento progressivo (GOMES-MARCONDES,1994). O câncer tem como característica a capacidade de destruir tecidos vizinhos, formar metástases e alterar a estrutura dos componentes celulares adjacentes (BERENBLUM, 1970). Por outro lado, os efeitos neoplásicos promovem desequilíbrio dos processos metabólicos através de profundas alterações no organismo como, por exemplo, redução do aporte de nutrientes causados pela anorexia em consequência do elevado consumo de substratos específicos por células neoplásicas; tal fato culmina em competição nutricional entre o hospedeiro e a neoplasia e,

consequentemente, carência nutricional (COSTA, 1977). Esse distúrbio nutricional associado à elevada atividade das vias catabólicas e transformações quantitativa e qualitativa do meio interno (em função da produção de substâncias pelo câncer e/ou hospedeiro) originam o quadro denominado caquexia (COSTA, 1977, RUDDON, 1987).

As características metabólicas da síndrome da caquexia pode ser resultado de várias reações paraneoplásias, como prejuízo nutricional, ativação do sistema imune do hospedeiro ou, então, fatores específicos produzidos pelo tumor. O câncer está intimamente associado ao prejuízo na absorção de nutrientes, baixa resistência à infecções, alteração no balanço hormonal e na atividade fisiológica (LUNDHOLM et al., 1981).

O rápido crescimento do tumor Walker 256 durante a gestação prejudica o crescimento fetal, mas não há relatos do decréscimo da disponibilidade de nutrientes ao feto. O crescimento e as características metabólicas da parte fetal têm similaridades importantes com o rápido crescimento tumoral. Dessa forma a atividade metabólica tecidual necessita de quantidades apreciáveis de glicose e de aminoácidos para a oxidação e síntese, estando, portanto, envolvida com o crescimento progressivo do feto e da massa tumoral (CARBO et al., 1996).

A incidência de câncer na gravidez está estimado em 1:1000 casos, sendo que em 35.7% desses casos ocorrem metástases nos produtos de concepção (JAMA, 1980).

No momento são poucas as pesquisas relacionadas às interações fisiopatológicas que ocorrem entre gravidez e câncer.

Pesquisas recentes relatam elevada porcentagem de reabsorções fetais, bem como baixo peso fetal em ratas grávidas inoculadas com carcinossarcoma

de Walker 256, quando sacrificadas em diversos estágios do período gestacional (GOMES-MARCONDES et al., 1998).

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

II. OBJETIVOS

As alterações fisiológicas ocorridas na gravidez visam o desenvolvimento adequado do feto e as alterações patológicas, durante o crescimento tumoral, visam a mobilização de nutrientes em benefício do desenvolvimento de células neoplásicas em detrimento do hospedeiro. A associação entre esses dois estados, gravidez e câncer, os quais apresentam situações similares quanto a oferta de nutrientes e acelerado crescimento tecidual e neoplásico, provocam efeitos deletérios ao organismo materno e fetal. Desse modo, este trabalho tem por objetivo estudar os efeitos do Carcinossarcoma de Walker 256 ou da inoculação do líquido ascítico nas placentas de ratas jovens e adultas comparando-as com as respectivas controles.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Nesse estudo foram utilizados 72 ratas Wistar fêmeas jovens (45 a 50 dias de idade) e 74 ratas Wistar adultas (90 a 100 dias de idade) provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp, mantidos em temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (12 horas claro/12 horas escuro). Os animais receberam dieta semipurificada AIN-G93 (REEVES, 1993) e água *ad libitum*.

As ratas foram acasaladas com machos Wistar adultos (90 - 100 dias de vida) na proporção de quatro fêmeas para um macho, em gaiolas coletivas durante quatro dias consecutivos de acordo com o método de harém descrito por BAKER, (1991). A detecção do início da gravidez foi feita mediante a análise de esfregaços vaginais obtidos das fêmeas acasaladas; assim, a presença de espermatozóides as fêmeas determinou o início da gravidez. As ratas que não apresentaram espermatozóides no esfregaço vaginal foram descartadas.

2. IMPLANTE NEOPLÁSICO E OBTENÇÃO DO LÍQUIDO ASCÍTICO.

Neste trabalho foram utilizadas células neoplásicas obtidas do Carcinossarcoma de Walker 256, provenientes da linhagem do Banco de Tumores Christ Hospital line, Arthur D. Little, EUA.

As células do Carcinossarcoma foram mantidas *in vivo*, após a inoculação na cavidade abdominal de ratos machos a cada 7 dias.

Para a obtenção de células neoplásicas e do líquido ascítico utilizou-se a metodologia a seguir:

Após período de aproximadamente 6 dias, o líquido ascítico formado pelo desenvolvimento neoplásico foi retirado e centrifugado (2000 rpm). As células que se depositaram após centrifugação foram ressuspensas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e colocadas em gelo sob agitação lenta. O número de células viáveis da suspensão foi avaliado pelo método de exclusão com azul de Tripán para posterior inoculação na região subcutânea do dorso lateral direito. O líquido ascítico (líquido ascítico sem os componentes celulares) foi obtido após centrifugação e separação do sobrenadante do líquido intraperitônio de ratos machos portadores de tumor, sendo este armazenado em freezer (-20°C) para posterior inoculação nas fêmeas não portadoras de tumor.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o cruzamento, no 2º dia experimental, parte dos grupos de ratas grávidas adultas e jovens receberam inoculação de 0,5 ml de suspensão de células neoplásicas (contendo, aproximadamente, 250.000 células viáveis), no tecido subcutâneo da região dorsal lateral (GOMES et al., 1983).

A partir do 9º dia do experimento, a outra parte dos grupos de fêmeas grávidas não portadoras de tumor receberam inoculação diária de 2,0 ml de líquido ascítico , via intraperitoneal, até 20º dia de experimento ou foram distribuídas em grupos controles não submetidas aos tratamentos.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos de acordo com a idade, presença do tumor ou inoculação do líquido ascítico, a saber:

ADULTAS (90 a 100 dias)	JOVENS (45a 50 dias)
grávidas	grávidas
1. Controle (21)	1. Controle (27)
2. Portadora de Walker (31)	2. Portadora de Walker (26)
3. Inoculada com líquido ascítico (22)	3. Inoculada com líquido ascítico (19)
Sacrifício 19º e 21º dia	

O sacrifício foi feito sob campânula com éter e, após a morte, os grupos foram necropsiados e perfundidos com fixador histológico.

4. ANÁLISE FETAL

4.1 Número de Fetos e Sítios de Reabsorções Fetais

Após a perfusão os animais tiveram seus cornos uterinos analisados quanto aos produtos de concepção contando-se o número de fetos presentes nos cornos uterinos das ratas controles, das portadoras de tumor e das inoculadas com líquido ascítico. Avaliou-se, ainda, macroscopicamente, o número de sítios de reabsorção fetal existente nos diferentes grupos experimentais de ratas.

5. PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Para a fixação do tecido placentário dos animais experimentais foi utilizado o fixador paraformaldeído 4%, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2-7,4.

Após o sacrifício, os animais foram perfundidos inicialmente com soro fisiológico por 10 minutos e em seguida com fixador, durante 15 minutos (30ml), através do ventrículo esquerdo e respectiva vazão pelo átrio direito.

Após a análise dos cornos uterinos, foram escolhidos aleatoriamente três unidades de tecido placentário.

A placenta foi retirada e separada do embrião e posteriormente mantidas em fixador para posterior inclusão em parafina. Dos blocos obtidos foram feitos cortes histológicos, de 5 micrômetros, que foram processados e a seguir corados pela hematoxilina e eosina para análise histológica do material.

6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

6.1 Morfologia da placenta

A análise morfológica da placenta foi feita através da coleta de imagens das lâminas das placentas dos grupos experimentais pelo software de aquisição, armazenamento e impressão das imagens microscópicas (IMAGE PRÓ-PLUS).

Tomou-se o cuidado de analisar as imagens sob o mesmo aumento microscópico, verificando-se a integridade dos tecidos placentários, decídua basal, espongiotrofoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto, estavam preservados.

6.2 Morfometria da placenta

Foram feitas as medidas lineares da espessura de cada camada tecidual placentária, decídua basal, espongio trofoblasto + células trofoblásticas gigantes (CTGs) e labirinto de cada placenta (3 placentas por rata) onde foram capturadas aleatoriamente 3 a 6 imagens por lâmina de 9-16 animais por grupo, através de calibração com retícula Leitz Wetzlar, unidade em micrômetros (μm) (Figura A).

Foram feitas avaliações do número e das áreas dos núcleos das CTGs na camada do espongio trofoblasto das placentas dos diferentes grupos experimentais. Para esta análise, também, foram capturadas aleatoriamente e analisadas 3 a 6 imagens por lâmina de 9-16 animais por grupo (Figura B e C).

O software permite a delimitação dos núcleos calculando a área através de calibração com retícula Leitz Wetzlar, unidade em micrômetros² (μm^2).

Foram avaliadas, ainda, a intensidade de edema e de hemorragia nos tecidos placentários. Foram capturadas, aleatoriamente, e analisadas 3 imagens da camada decidual, do espongio trofoblasto + camada de células trofoblásticas gigantes (CTGs) e labirinto de cada lâmina dos 9-16 animais por grupo. Para análise semi-quantitativa da intensidade de edema e de hemorragia dos tecidos placentários, os seguintes parâmetros foram utilizados: 1) Tecido com ausência de edema e hemorragia (N, valor =0.0). 2) Tecido com pouco edema ou hemorragia (S1, valor =1.0). 3) Tecido com presença de edema ou de hemorragia (S2, valor = 2.0). 4) Tecido com elevada incidência de edema e de hemorragia (S3, valor =3.0). A partir desta quantificação foi estabelecida a porcentagem de edema ou de hemorragia das camadas teciduais placentárias por animal.

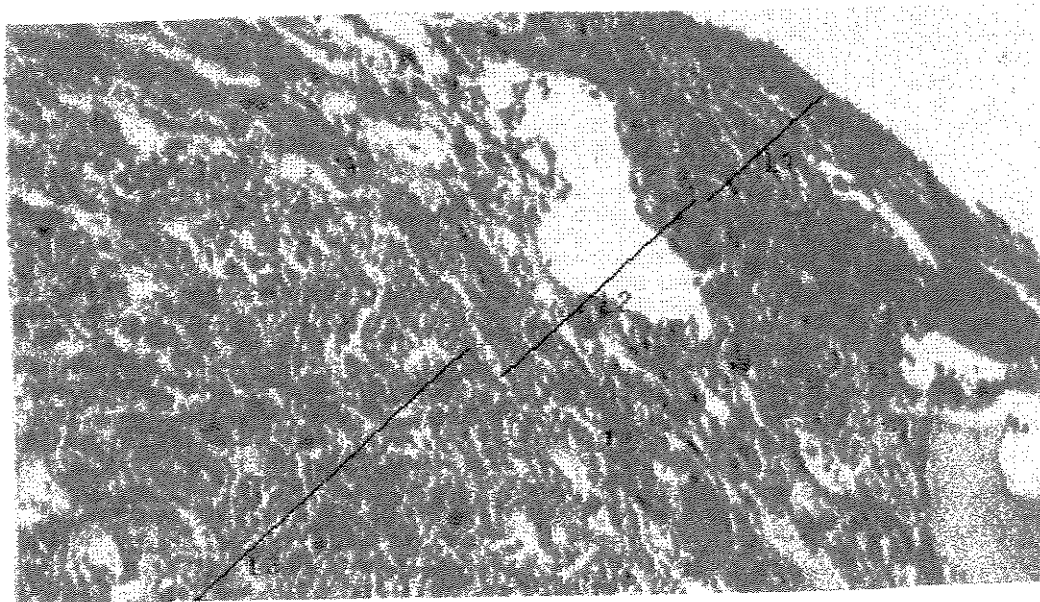


Figura A: Espessura das camadas teciduais decídua (L1), espongio trofoblasto mais células trofoblásticas gigantes (CTGs, L2) e labirinto (L3) em corte histológico (5 μ m) da placenta de ratas em diferentes períodos gestacionais. Placenta de rata adulta controle sacrificada no 19º dia de gestação (200x).

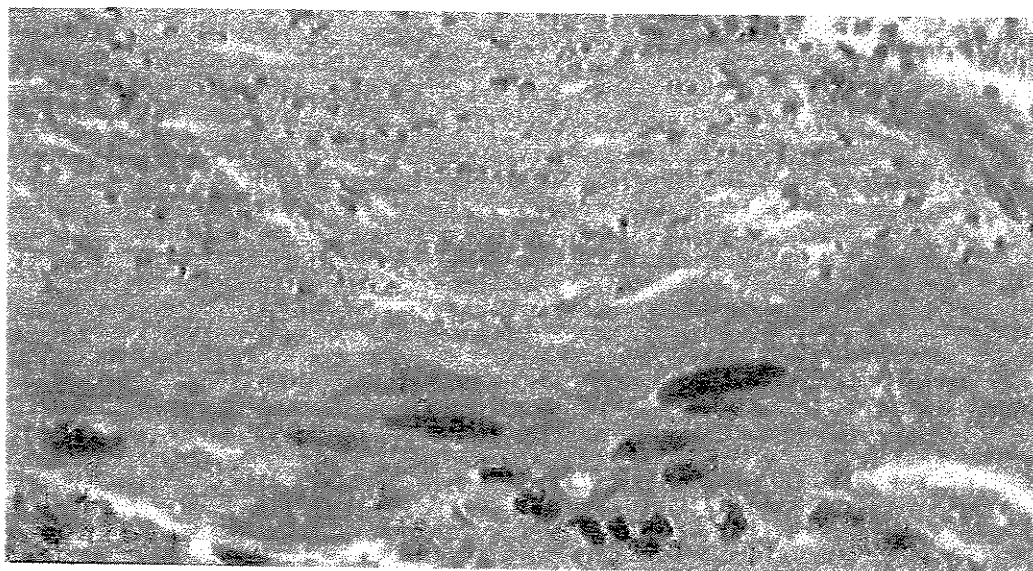


Figura B: Análise do perfil das células trofoblásticas gigantes e das células do espongio trofoblasto por área de campo (corte histológico de 5 μ m, aumento 200x) da placenta de rata jovem com tumor de Walker, sacrificada no 19º dia de gestação. Os núcleos das células trofoblásticas gigantes foram apontados manualmente, utilizando-se software Image-Pro Plus.

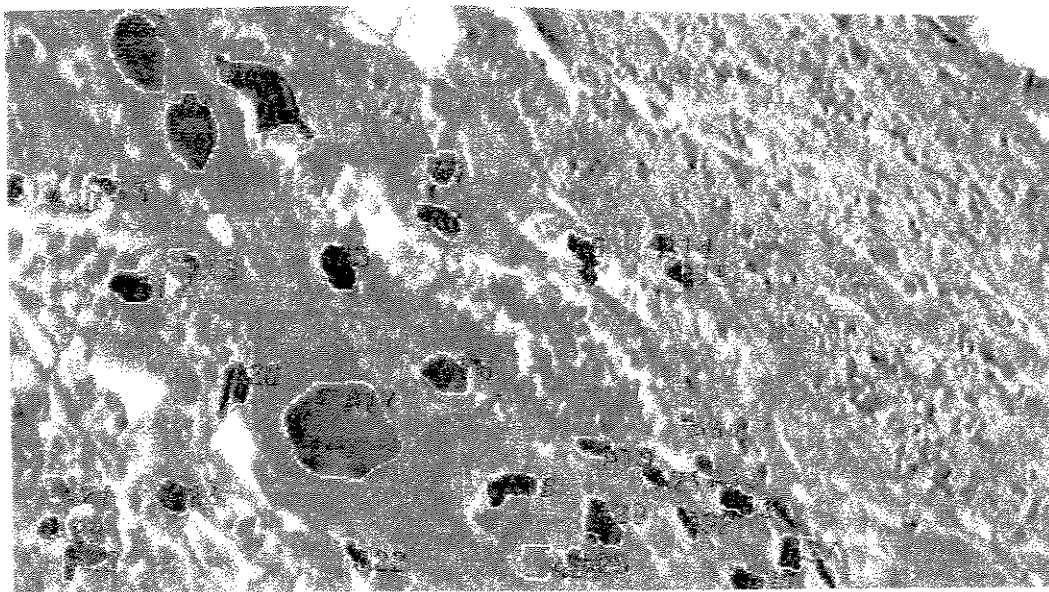


Figura C: Análise do tamanho dos núcleos das células trofoblásticas gigantes (CTGs, corte histológico 5 μ m, aumento 200x) da placenta de rata jovem inoculada com líquido ascítico, sacrificada no 19º dia de gestação. Os núcleos das células trofoblásticas gigantes foram delimitados utilizando-se software Image-Pro Plus.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos dos perfis numéricos das células, área dos núcleos das células trofoblásticas gigantes e das células do espongio trofoblasto, bem como, a análise da intensidade de hemorragia e edema nas camadas teciduais placentárias, número de fetos e de sítios de reabsorção fetal, foram analisados segundo método de análise de variância não paramétrico aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn's de múltiplas comparações utilizando-se software STATISTICA com nível de significância para 5% (WOOLSON, 1987; GAD & WEIL, 1994).

IV RESULTADOS

1. ANÁLISE DO NÚMERO DE FETOS E DOS SÍTIOS DE REABSORÇÕES FETAIS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Nas ratas adultas com tumor de Walker, sacrificadas no 19º dia de gestação (AW19) houve redução significativa no número de fetos em relação ao grupo controle; houve tendência à redução, porém, não estatisticamente significativa, do número de fetos do grupo AW21 e nos grupos de ratas inoculadas com líquido ascítico sacrificadas no 19º dia (AA19) (tabela 1; figura 1).

Nas ratas jovens com tumor de Walker sacrificadas no 19º (JW19) observou-se, também, redução significativa no número de fetos, em relação ao controle (tabela 1; figura 1). Nas ratas jovens com tumor JW21 e nas ratas inoculadas com líquido ascítico JA19 e JA21, houve tendência à redução do número de fetos, mas essa redução não foi significativa (tabela 1; figura 1).

Pode-se constatar, ainda, que houve elevado número de sítios de reabsorções fetais em ratas adultas com tumor de Walker e nas ratas adultas inoculadas com líquido ascítico AA19 em relação aos respectivos grupos controles. Nas ratas adultas com ascite AA21 houve tendência ao aumento do número de sítios de reabsorções fetais em relação às ratas controles, entretanto não significativa (tabela 2; figura 2).

Nas ratas jovens com tumor de Walker JW19 e JW21 e nas inoculadas com líquido ascítico JA19 e JA21 (tabela 2; figura 2) houve aumento na incidência de sítios de reabsorção fetal.

Tabela 2 : Número de Sítios de reabsorções fetais por animal

	Sítios de Reabsorções fetais
AC19 (11)	0,000±0,000
AC21 (10)	0,200±0,046
AW19 (16)	5,312±0,207 *
AW21 (15)	4,600±0,230 *
AA19 (10)	5,000±0,339 *
AA21 (9)	2,333±0,197
JC19 (14)	0,071±0,020
JC21 (13)	0,000±0,000
JW19 (13)	5,846±0,313 *
JW21 (13)	4,615±0,205 *
JA19 (11)	3,090±0,234 *
JA21 (12)	3,000±0,242 *

AC: Adulta Controle; AW: Adulta com tumor de Walker AA: Adulta com Ascite ; JC : Jovem Controle; JW: Jovem com tumor de Walker; J A: Jovem com ascite. Sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação () número de animais por grupo *p<0,05 em relação aos controles

NÚMERO DE REABSORÇÕES FETAIS

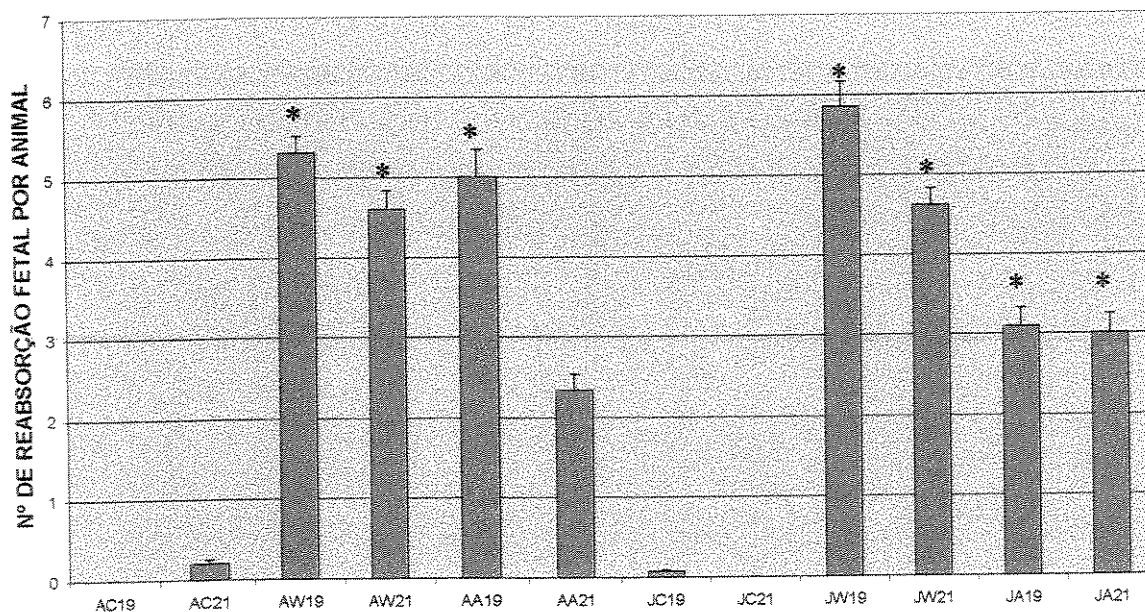


Figura 2 : Análise do número reabsorções fetais em ratas Jovens e Adultas controle, portadoras de tumor de Walker com líquido ascítico sacrificadas no 19º e 21º de gestação. * p<0,05 comparado com os respectivos controles.

Tabela 1 : Número de fetos por rata dos diferentes grupos experimentais

	NºFETOS
AC19 (11)	7,000±0,431
AC21 (10)	8,500±0,120
AW19 (16)	4,000±0,200 *
AW21 (15)	5,866±0,300
AA19 (10)	5,300±0,405
AA21 (9)	8,666±0,165
JC19 (14)	8,785±0,091
JC21 (13)	7,923±0,146
JW19 (13)	3,461±0,337 *
JW21 (13)	5,384±0,224
JA19 (11)	5,727±0,272
JA21 (12)	6,000±0,242

AC: adulta controle; AW: adulta com tumor de Walker AA: adulta com ascite ; JC : jovem controle; JW: jovem com tumor de Walker; J A: jovem com ascite. Sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação () número de animais por grupo. Resultados expressos em médias ± erro padrão da média; *p<0,05 em relação aos controles

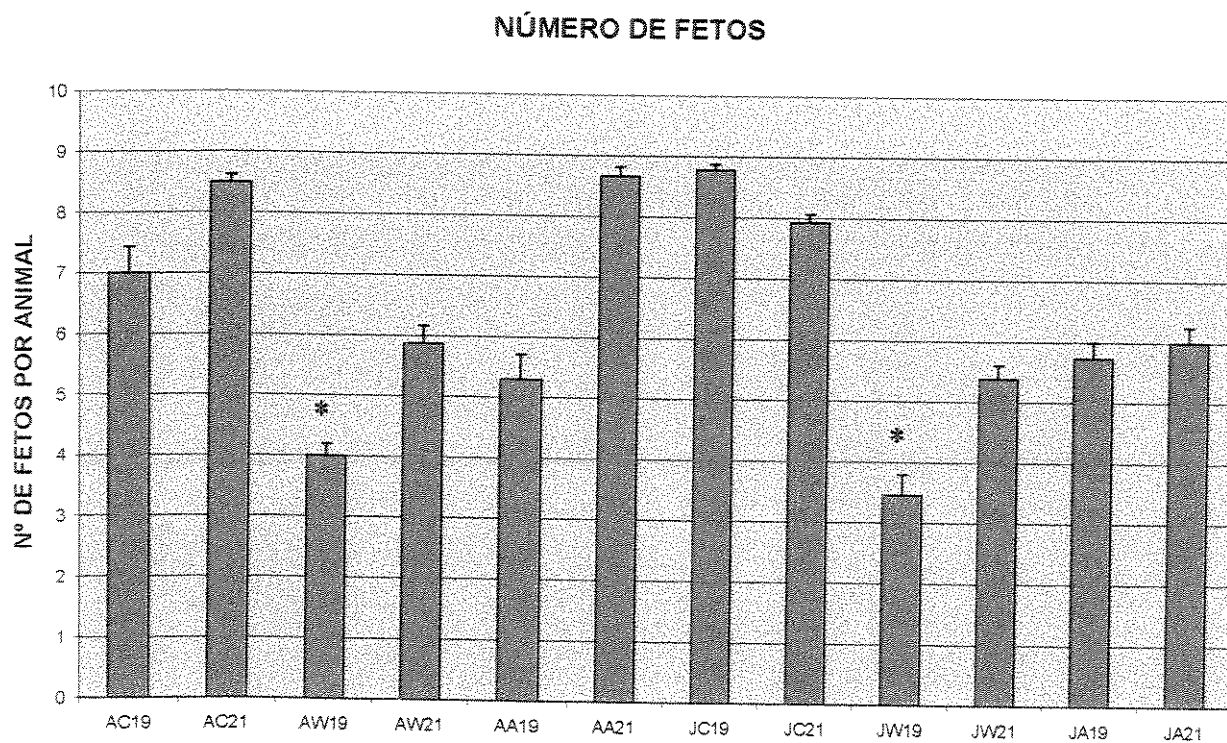


Figura 1 : Análise do número de fetos de ratas Jovens e Adultas controle, portadoras de tumor de Walker com líquido ascítico sacrificadas no 19º e 21º de gestação. * p<0,05 comparado com os respectivos controles.

2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TECIDOS PLACENTÁRIOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

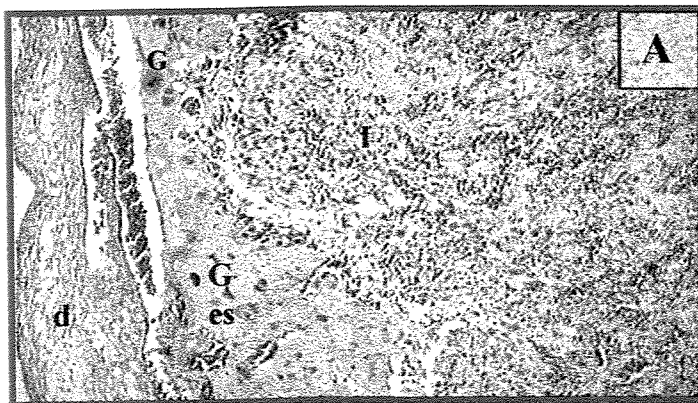
As descrições morfológicas das placentas dos grupos experimentais foram obtidas da análise de cortes histológicos de 5µm de placentas processadas e incluídas em parafina. Esses cortes foram analisados em microscopia de luz em aumento de 200x (figuras 3 e 4) e 400x (figuras 5 a 10).

Nas ratas adultas controles AC19 e AC21 verificou-se integridade dos tecidos placentários com presença de decídua basalis (d), espongio trofoblasto (es), células trofoblásticas gigantes (G) e labirinto (l) (figuras 3A e B). Na figura 4 observam-se detalhes quanto a camada decidual das ratas adultas controles AC19 e AC21, (figura 4A e B). As camadas do espongio (figura 5 A e B) bem como a camada das células trofoblásticas gigantes das placentas, de ratas adultas AC19 e AC21 apresentam disposição regular presença de espaços vacuolares possivelmente referentes à deposição de glicogênio (dado não analisado). A análise da figura 6 (A e B) mostrou que a região do labirinto, nas placentas das ratas adultas AC19 e AC21, apresentou arranjo tecidual de lacunas maternas e vasos fetais bem definidos.

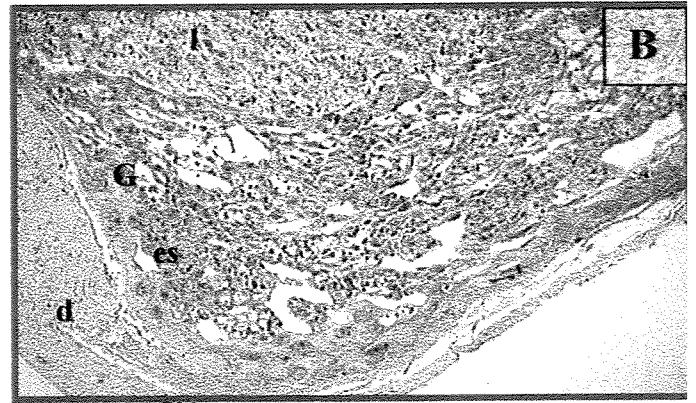
Nas placentas de ratas adultas com tumor de Walker, AW19 e AW21, observadas na figura 3 (C e D), observou-se desarranjo de estrutura placentária quando comparadas às ratas controles. Em maior aumento, verificou-se que nas AW19 e AW21, a decídua basalis apresentou intenso processo de edema e, também, presença de focos hemorrágicos (figura 4C e D), o mesmo pôde ser notado na região do espongio trofoblasto e das células trofoblásticas gigantes

(CTGs) (figura 5C e D); a região do labirinto apresentou limites vasculares fetais pouco definidos e, também, edema nesta estrutura labiríntica (figuras 6C e D).

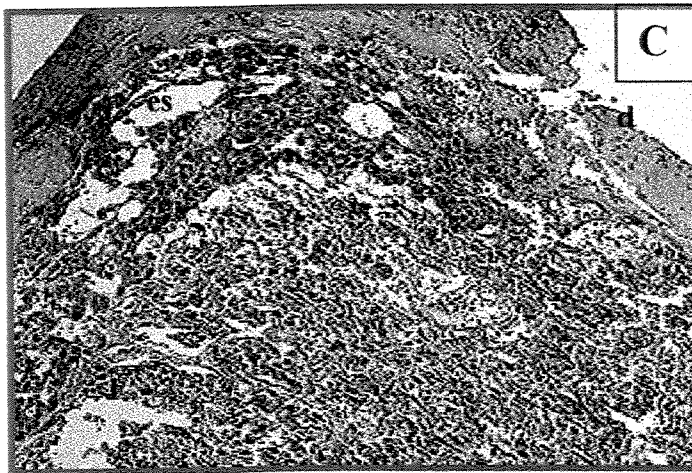
Nas ratas adultas inoculadas com líquido ascítico AA19 e AA21 notou-se que as placentas destes grupos apresentaram hemorragia na decídua basalis juntamente com alterações no espongio e nas células trofoblásticas gigantes e alterações no labirinto; algumas regiões do labirinto apresentam pontos hemorrágicos (figuras 3E e F), processos semelhantes aos verificados nas ratas com tumor alterações como edema e hemorragia na decídua basalis, foram observados nas ratas inoculadas com líquido ascítico, vistos em detalhe nas figuras 4 E e F. Na região do espongio trofoblasto e células trofoblásticas gigantes (CTGs) (figura 5 E e F) verificou-se presença de hemorragia e edema. A região do labirinto, nas placentas das ratas inoculadas com líquido ascítico apresentou alterações similares às ratas com câncer; intenso processo hemorrágico, edema e pouca delimitação dos vasos fetais (figura 6 E e F).



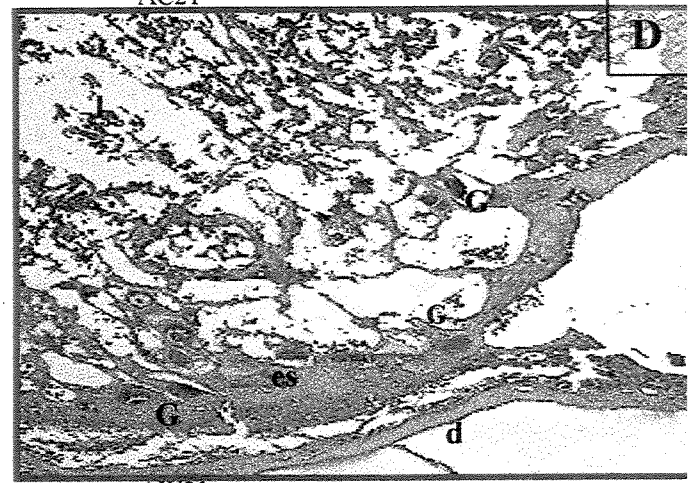
AC19



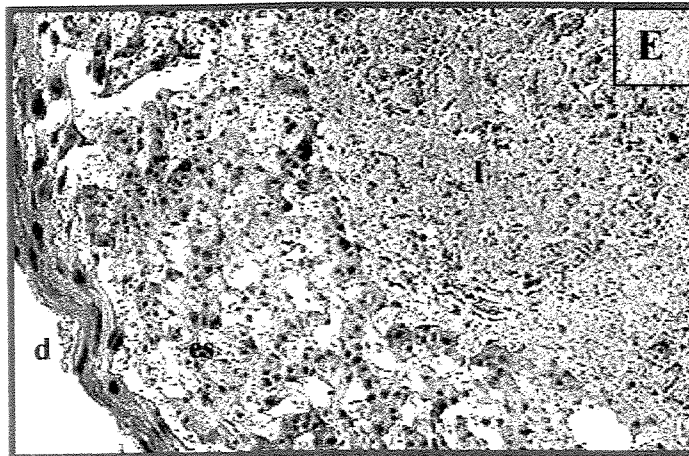
AC21



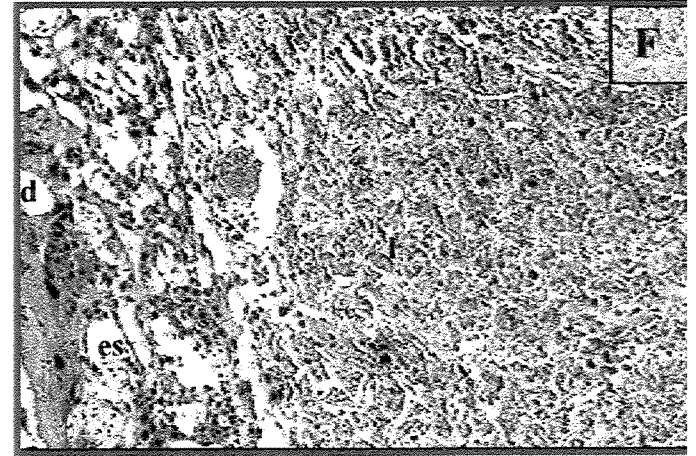
AW19



AW21



AA19



AA21

Figura 3: Análise morfológica das placentas dos grupos experimentais de ratas adultas (aumento 200x). **A e B** cortes de 5µm das placentas de ratas controles adultas (AC) no 19º e 21º dia de experimento apresentaram estrutura similar à descrita por DAVIES & GLASSER (1968); decídua basalis (d) seguida de camada de células trofoblásticas gigantes (G), espongio trofoblasto (es) e área do labirinto (l). **C e D**, cortes (5µm) das placentas de ratas com carcinossarcoma (AW), no 19º e 21º dia de experimento, apresentaram alterações como desarranjo estrutural na decídua basalis (d), região das células trofoblásticas gigantes (G) pouco definida, espongio trofoblasto (es) e área do labirinto (l) com aspecto hemorrágico distintos das observações verificadas nas AC. **E e F**, cortes (5µm) das placentas de ratas inoculadas com líquido ascítico (AA), no 19º e 21º dia de experimento, apresentaram decídua basalis (d) bastante delgada, região das células trofoblásticas gigantes (G) visível, espongio trofoblasto (es) apresentou-se bem visível com células vacuoladas, labirinto (l) com aspecto hemorrágico bastante distinto do observado nas AC (Aumento 200x).

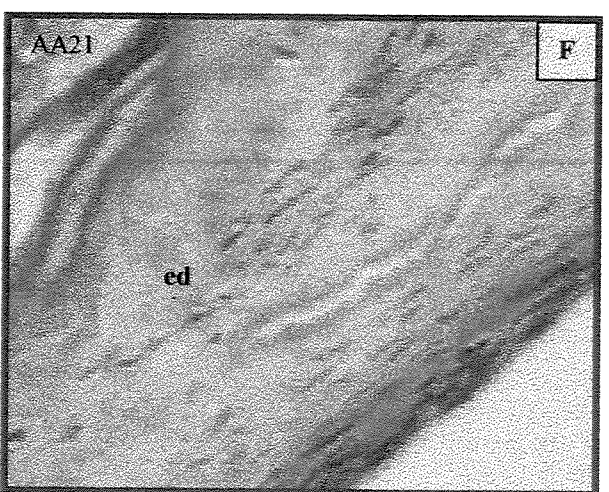
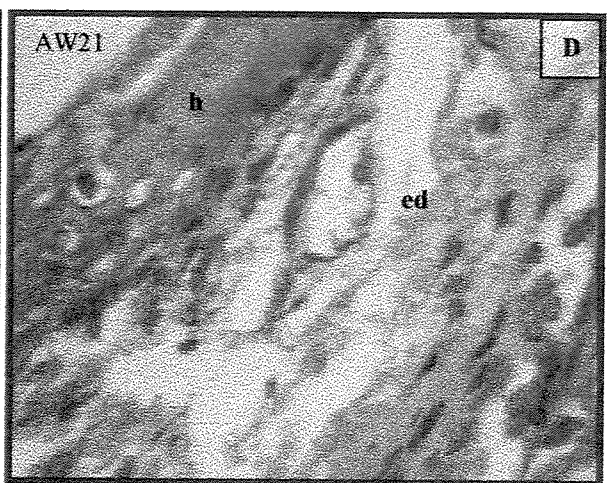
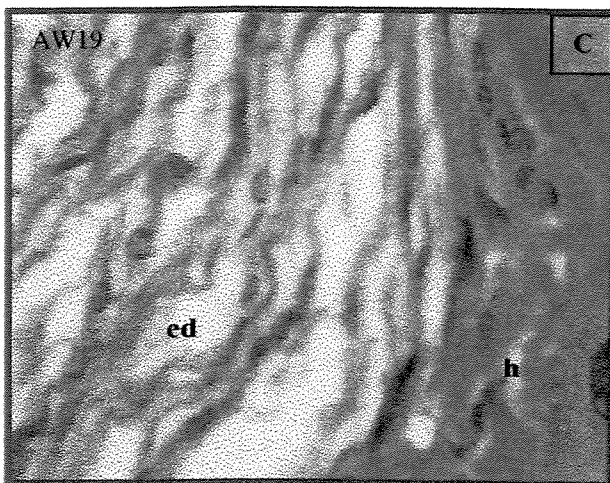
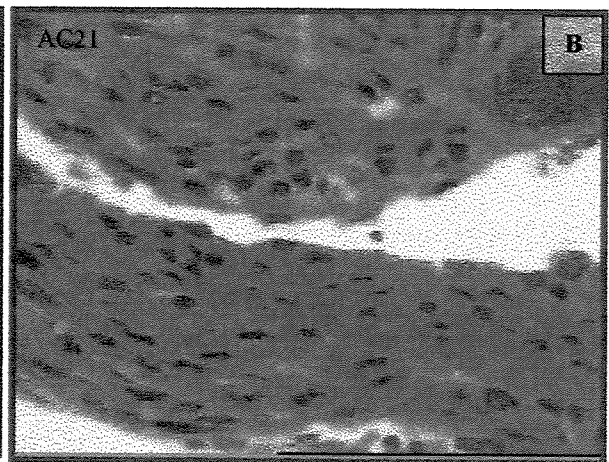
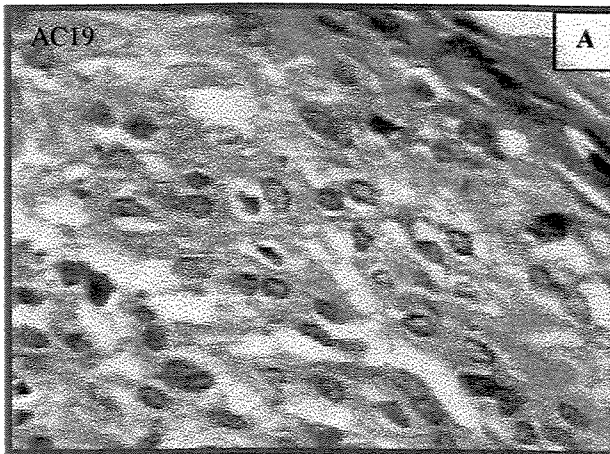


Figura 4: Análise da estrutura da decidua basalis de ratas adultas no 19º e 21º dia do período gestacional. (Aumento 400x). AC: adultas controles; AW: adultas com tumor de Walker ; AA: adultas com líquido ascítico. **A e B**, detalhes da decidua basalis de ratas controles (AC); **C e D** decidua basalis das ratas com câncer (AW) apresentou regiões edemaciadas (e) e hemorrágicas (h); **E e F**, decidua basalis das ratas inoculadas com líquido ascítico (AA) com pontos hemorrágicos (h) e edema.

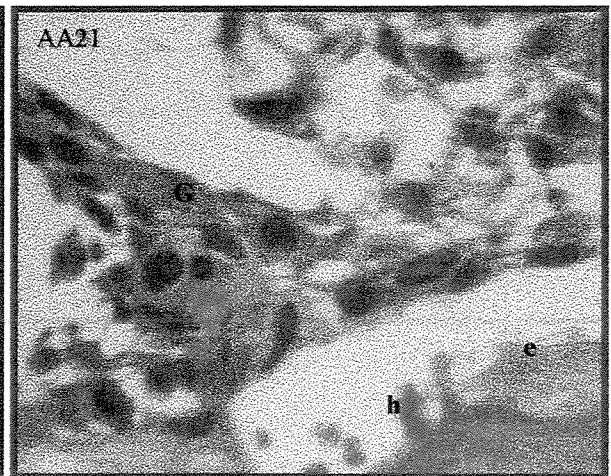
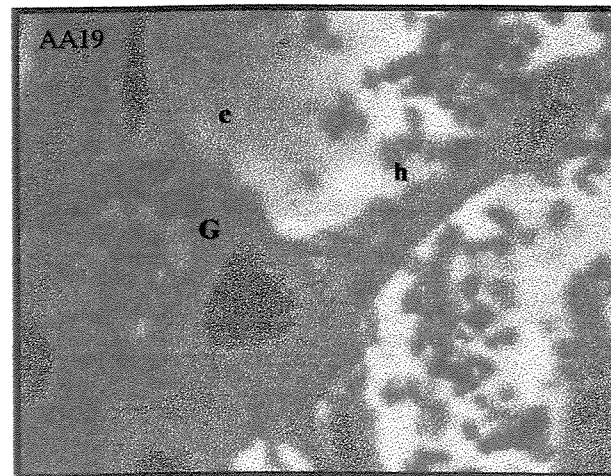
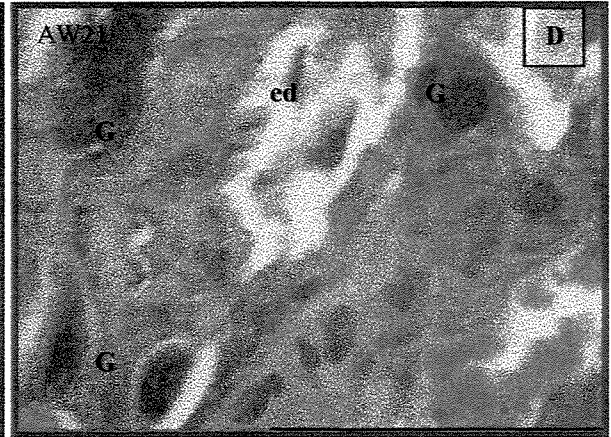
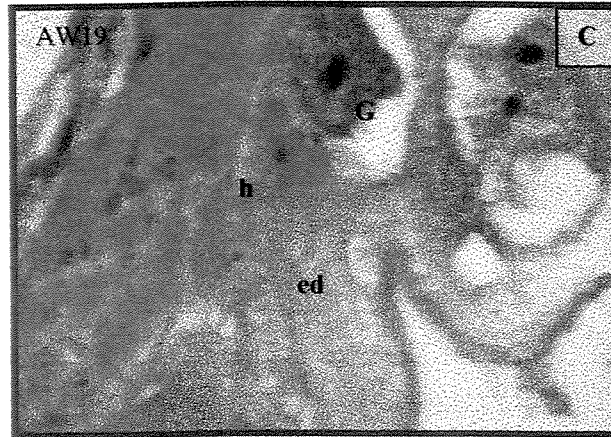
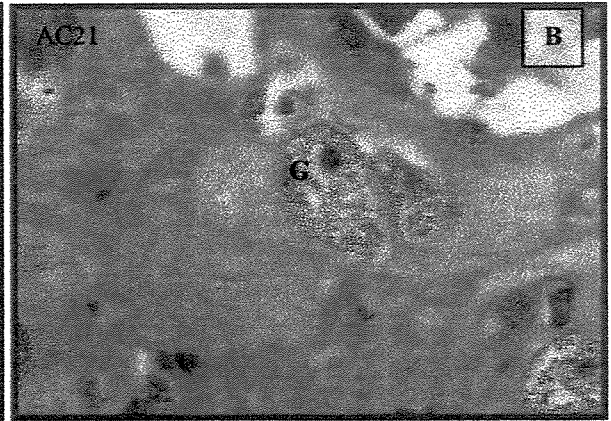


Figura 5: Análise da estrutura do espongio trofoblasto e das células trofoblásticas gigantes (G) de ratas adultas no 19º e 21º dia do período gestacional (Aumento 400x). Em **A e B** verifica-se presença de células trofoblásticas gigantes (G) bem como de células vacuoladas (v) nas placentas de ratas controles (AC); em **C e D**, região do espongio trofoblasto com pontos hemorrágicos (h) e edemaciados (e), limite de células trofoblásticas gigantes (G) bem visível, nas placentas de ratas com tumor (AW); **E e F** região do espongio trofoblasto com pontos hemorrágicos e edemaciados, células trofoblásticas gigantes CTGs presentes. Nas placentas de ratas inoculadas com líquidos ascítico (AA).

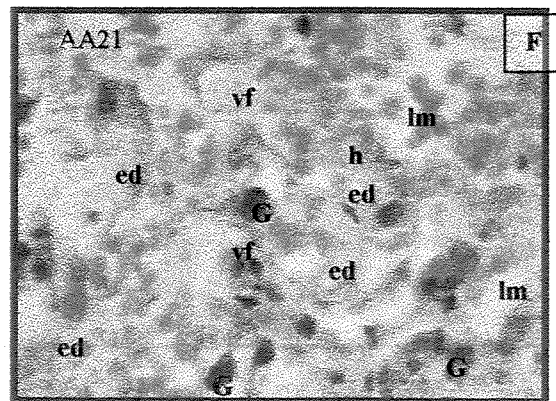
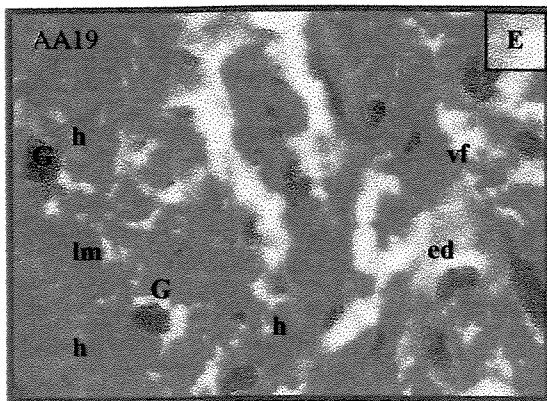
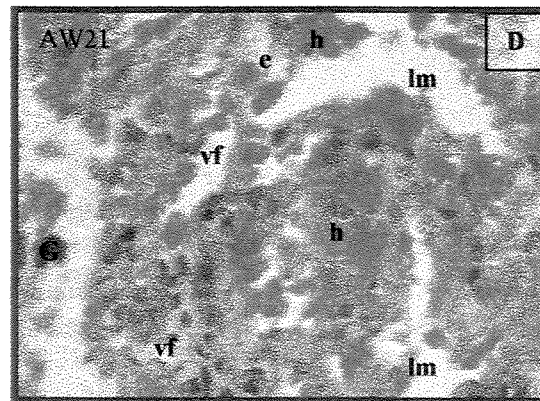
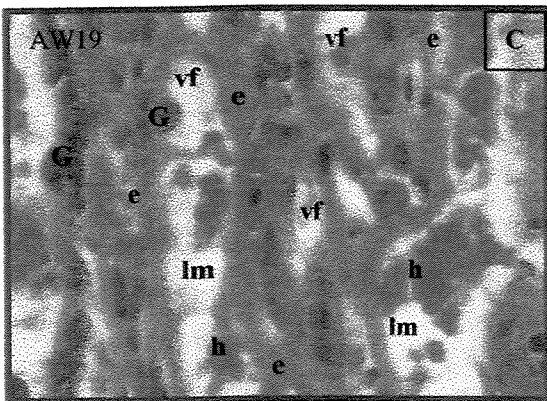
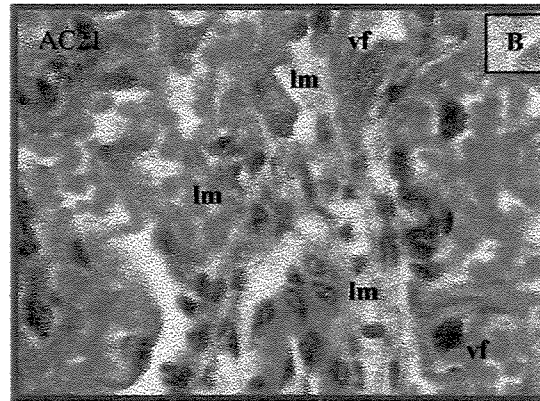
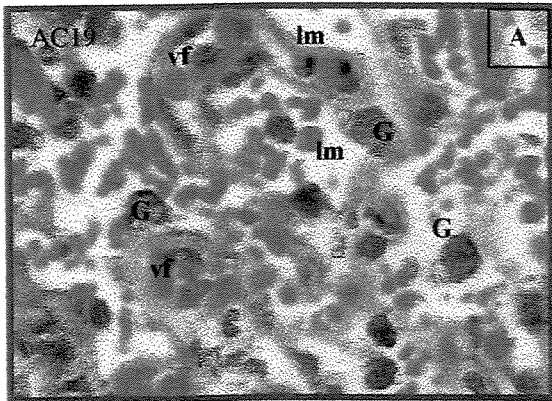


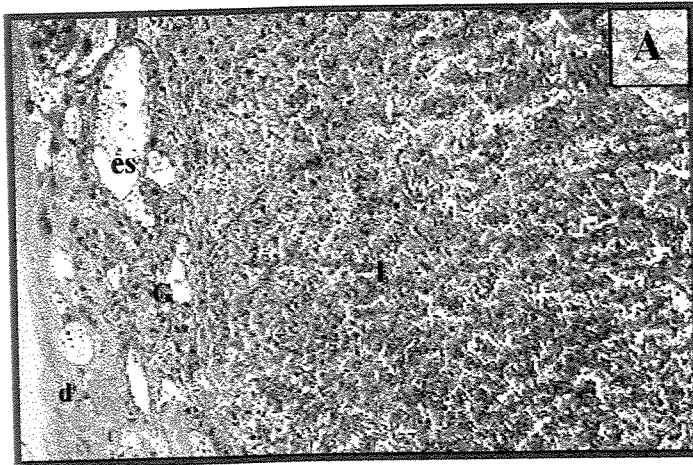
Figura 6: Análise da estrutura do labirinto de ratas adultas no 19º e 21º dia do período gestacional (Aumento 400x). Detalhes em **A e B** mostram placentas de ratas controles (AC) sacrificadas no 19º e 21º dia, visualizam-se lacunas maternas (lm) bem como vasos fetais (vf) bem definidos, células trofoblásticas gigantes (G) em tamanhos variados; Em **C e D** verificou-se lacunas maternas (lm), vasos fetais (vf) encontraram-se pouco definidos, também, com pontos edemaciados no endotélio vascular, encontrou-se extravasamento de sangue entre espaços lacunares e vasos fetais nas ratas com câncer (AW); Em **E e F** mostra vasos fetais pouco definidos com pontos hemorrágicos e edemaciados, células trofoblásticas de tamanhos variados encontrados nas placentas de ratas inoculadas com líquido ascítico (AA).

A figura 7 (A e B) mostra as imagens de microscopia fotônica das placentas de ratas jovens controles JC19 e JC21; observou-se integridade de todas as camadas decídua basal (d), espongio trofoblasto e células trofoblásticas gigantes (CTGs) (es) e labirinto (l). Foram analisadas 3 a 6 imagens por lâmina (foram feitas 3 lâminas de cada placenta) de 3 placentas escolhidas aleatoriamente de cada animal. No detalhe maior aumento das placentas das ratas JC19 e JC21 (figura 8 A e B) a decídua apresentou estrutura mantida, juntamente com as camadas espongio trofoblasto e células trofoblásticas gigantes (CTGs) apresentou-se bem arranjada nas placentas das ratas JC19 e JC21 (figura 9 A e B). O mesmo foi verificado no labirinto trofoblasto mostrado na figura 10 (A e B).

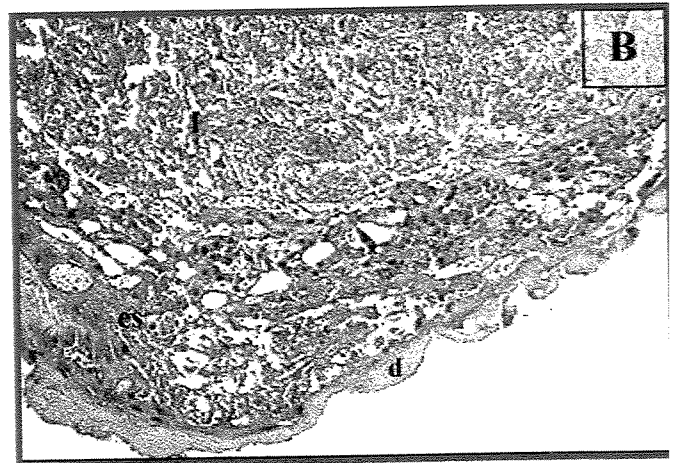
Na análise das imagens placentárias das ratas jovens com tumor de Walker, JW19 e JW 21, notou-se presença de edema (ed) e hemorragia (h) no espongio trofoblasto e labirinto trofoblasto, limites vasculares pouco definidos e edemaciados (figura 7C e D). Em maior aumento (figura B e C) analisou-se que nos grupos com tumor (JW19 e JW21) a camada decídua basalis apresentou-se edemaciada e com pontos hemorrágico contrastando das imagens analisadas nos grupos controles (Figura 8C e D). O espongio trofoblasto mostrou-se edemaciado e hemorrágico, e onde as células trofoblásticas gigantes (CTGs) apresentaram núcleo com cromatina condensada (figura 9C e D). As imagens do labirinto trofoblasto das placentas de ratas com câncer, mostraram pouca definição nos limites dos vasos fetais bem como edema e pontos hemorrágicos por todo tecido (figura 10 C e D).

As imagens das placentas das ratas jovens inoculadas com líquido ascítico apresentadas na figura 7 (E e F), mostraram alterações teciduais semelhantes às verificadas nas ratas com câncer. Alterações similares na decídua, como edema e pontos hemorrágicos foram observadas nas ratas jovens com ascite quando

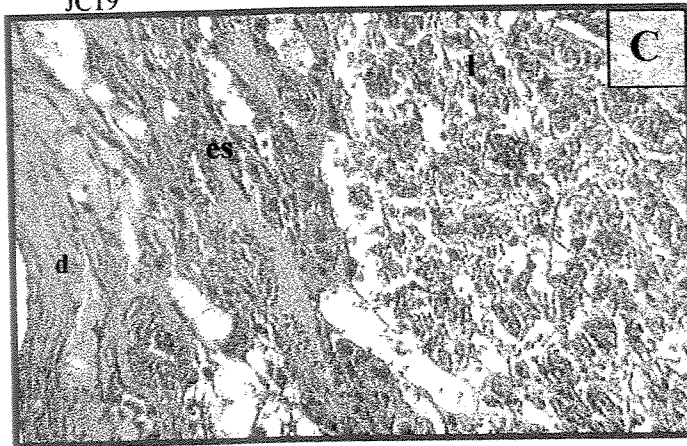
comparadas as ratas com câncer (figura 8 E e F). Tanto espongio trofoblasto (figura 9 E e F) quanto labirinto trofoblasto (figura 10E e F) edemaciados e com presença de pontos hemorrágicos foram verificados nas ratas jovens com ascite. Analisando-se comparativamente as placentas de ratas jovens controles JC19 e JC21 verificou-se estruturas placentárias semelhantes às respectivas adultas controles. Alterações estruturais semelhantes foram observadas tanto nas jovens quanto nas adultas portadoras de tumor ou inoculadas com líquido ascítico.



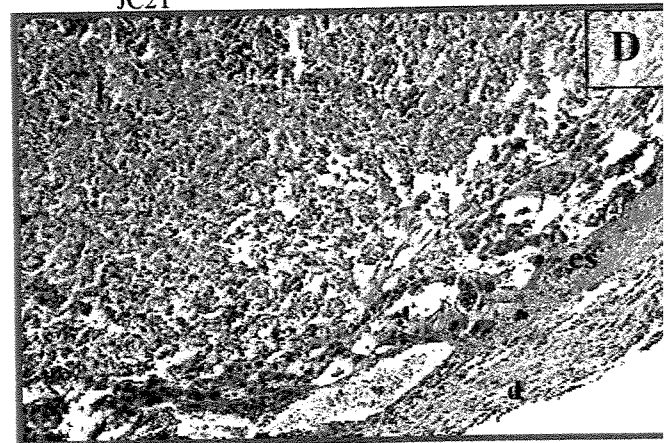
JC19



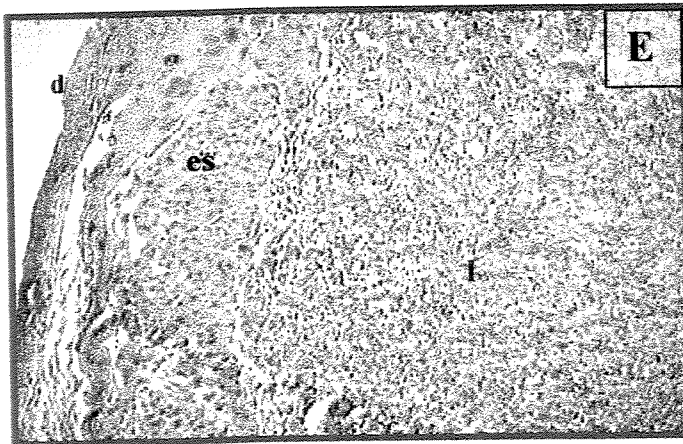
JC21



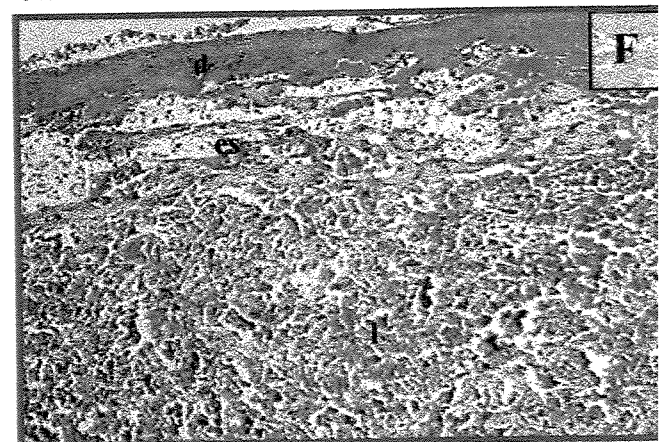
JW19



JW21



JA19



JA21

Figura 7: Análise morfológica das placentas dos grupos experimentais de ratas jovens (aumento 200x). **A e B** cortes de 5µm das placentas de ratas controles jovens (JC) no 19º e 21º dia de experimento, apresentaram estrutura similar à descrita por DAVIES & GLASSER (1968); decídua basalis (d) seguida de camada de células trofoblásticas gigantes (G), espongio trofoblasto (es) e área do labirinto (l). **C e D**, cortes (5µm) das placentas de ratas com carcinossarcoma (JW), no 19º e 21º dia de experimento, apresentaram alterações como desarranjo estrutural na decídua basalis (d) região das células trofoblásticas gigantes (G) pouco definida, espongio trofoblasto (es) e área do labirinto (l) com aspecto hemorrágico distintos das observações nas JC,. **E e F**, cortes (5µm) das placentas de ratas inoculadas com líquido ascítico (JA) no 19º e 21º dia de experimento apresentaram decídua basalis (d) bastante delgada, região das células trofoblásticas gigantes (G) visível, espongio trofoblasto (es) apresentou-se bem visível com células vacuoladas, labirinto (l) com aspecto hemorrágico bastante distinto do observado nas JC (Aumento 200x).

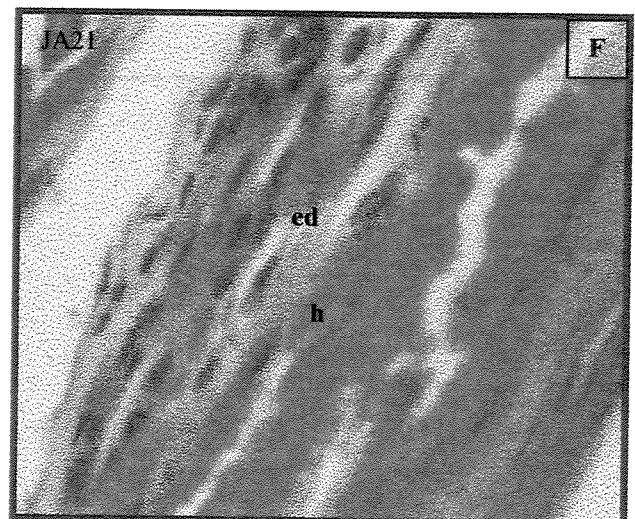
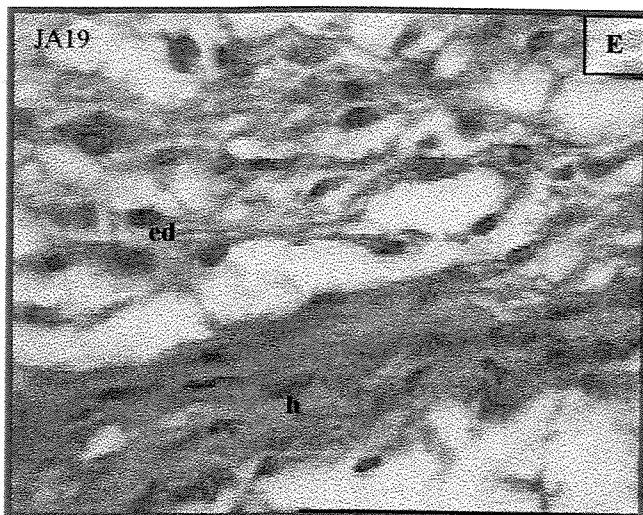
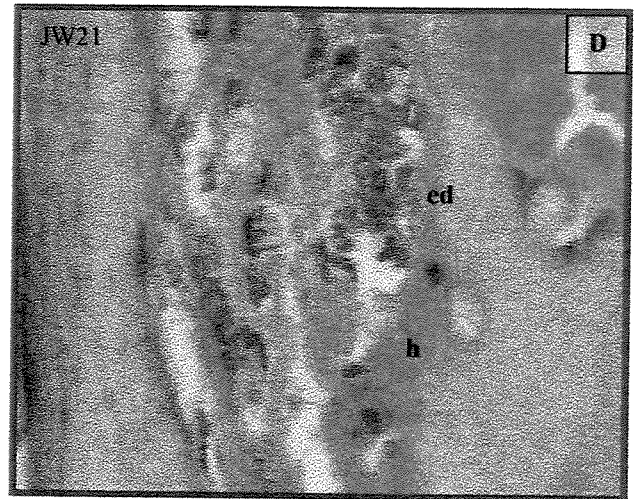
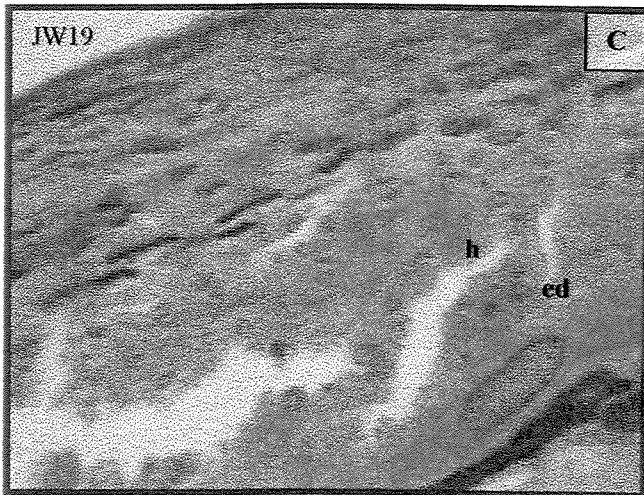
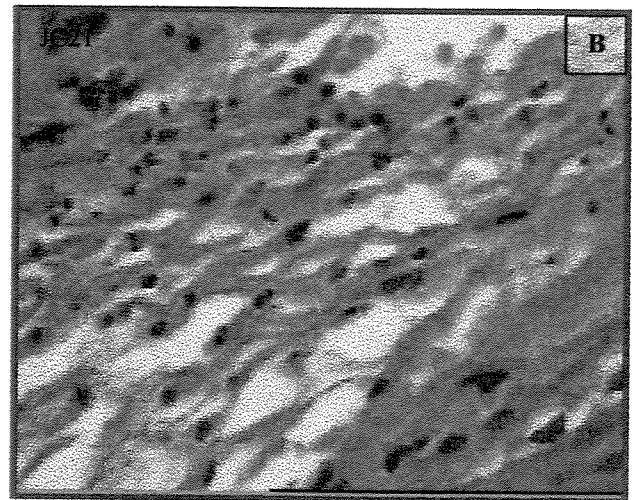
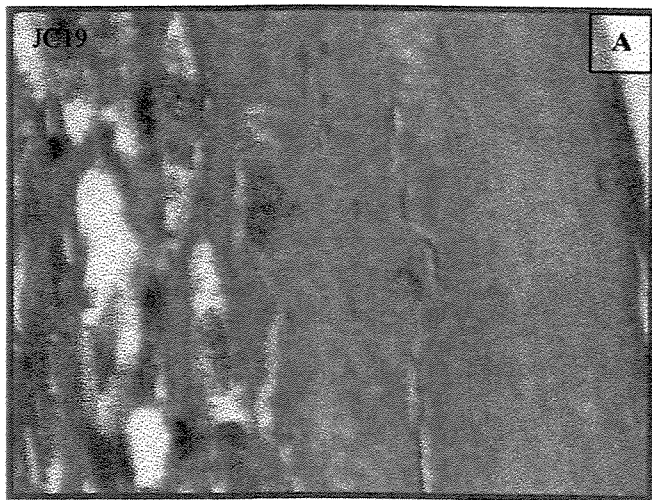


Figura 8: Análise da estrutura da decidua basalis de ratas jovens no 19º e 21º dia do período gestacional. (Aumento 400x). JC: adultas controles; JW: adultas com tumor de Walker ; JA: adultas com líquido ascítico.

A e B, detalhes da decídua basalis de ratas controles (JC); **C e D** decídua basalis das ratas com câncer (JW) apresentou regiões edemaciadas (e) e hemorrágicas (h); **E e F**, decídua basalis das ratas inoculadas com líquido ascítico (JA) com pontos hemorrágicos (h) e edema.

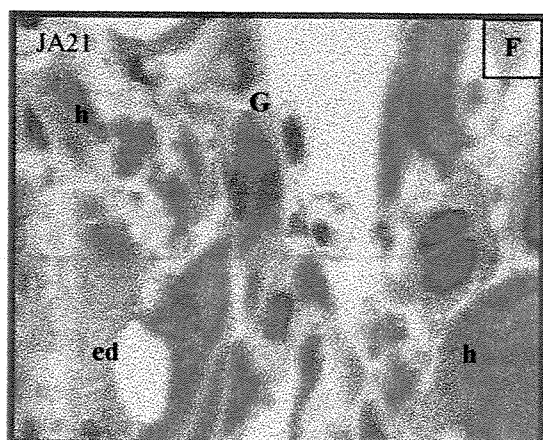
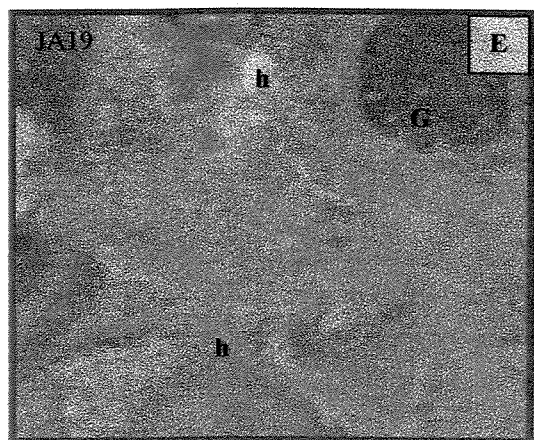
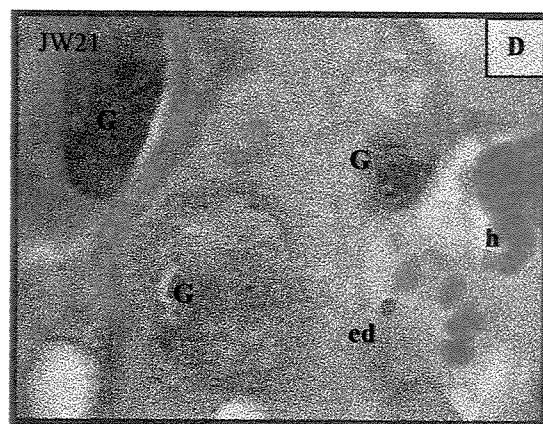
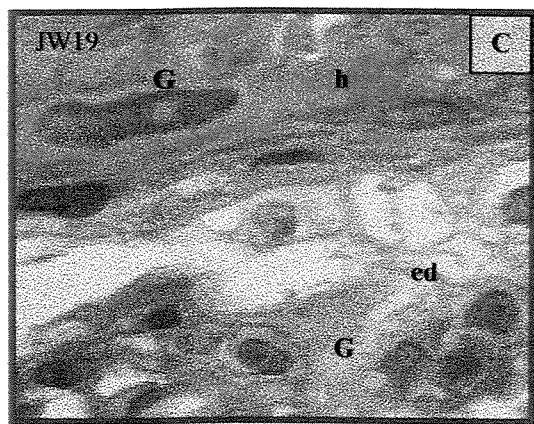
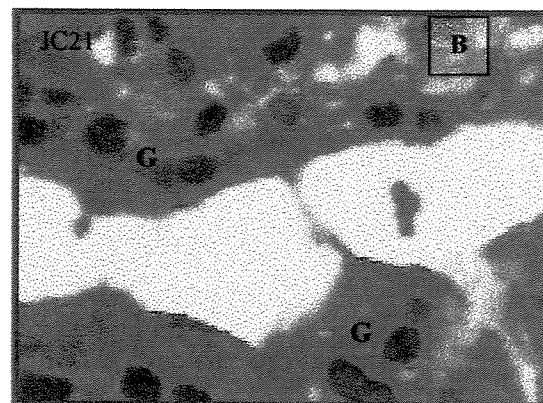
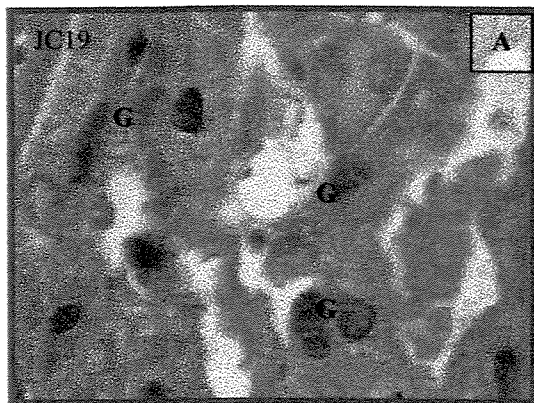


Figura 9: Análise da estrutura do espongio trofoblasto e das células trofoblásticas gigantes (G) de ratas jovens no 19º e 21º dia do período gestacional (Aumento 400x). Em **A e B** verifica-se presença de células trofoblásticas gigantes (G) bem como de células vacuoladas (v) nas placentas de ratas controles (JC); em **C e D**, região do espongio trofoblasto com pontos hemorrágicos (h) e edemaciados (ed), limites de células trofoblásticas gigantes bem visível, nas placentas de ratas com tumor (JW); **E e F** região do espongio trofoblasto com pontos hemorrágicos e edemaciados, células trofoblásticas gigantes (CTGs) presentes nas placentas de ratas inoculadas com líquido ascítico (J A).

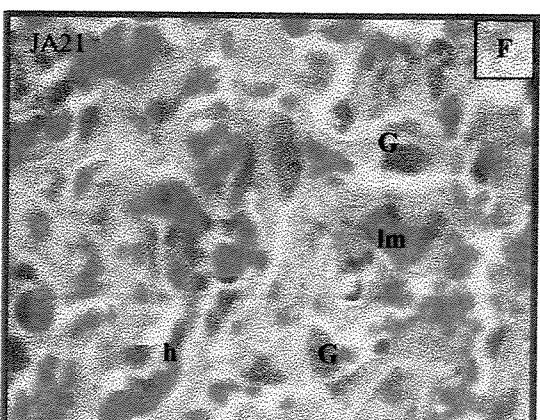
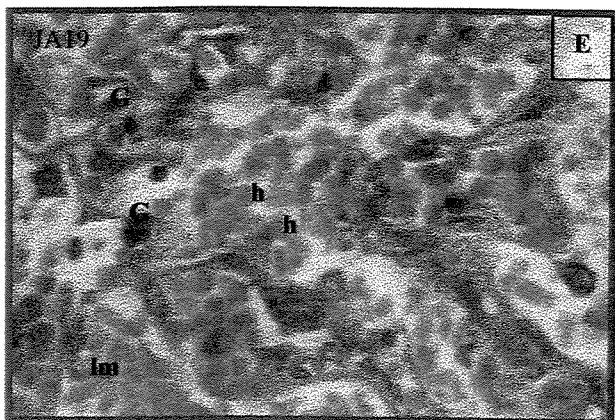
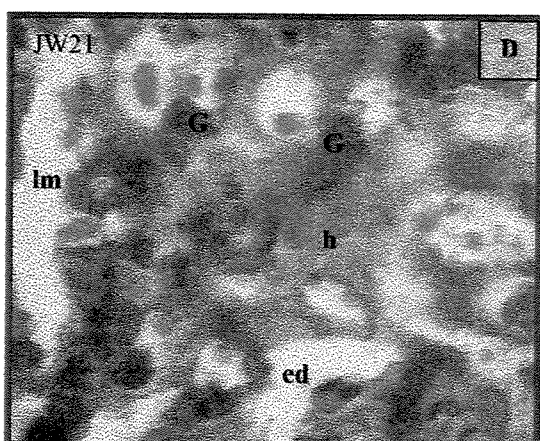
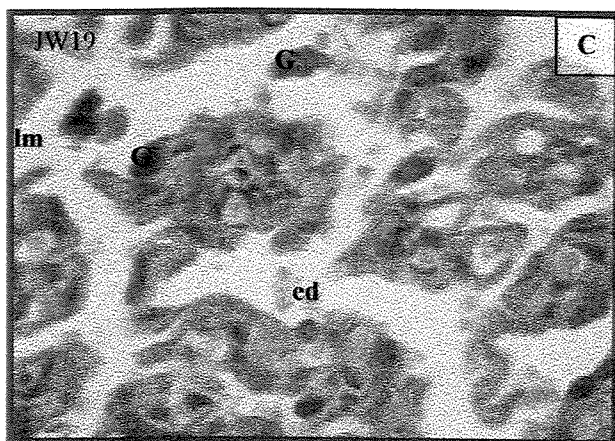
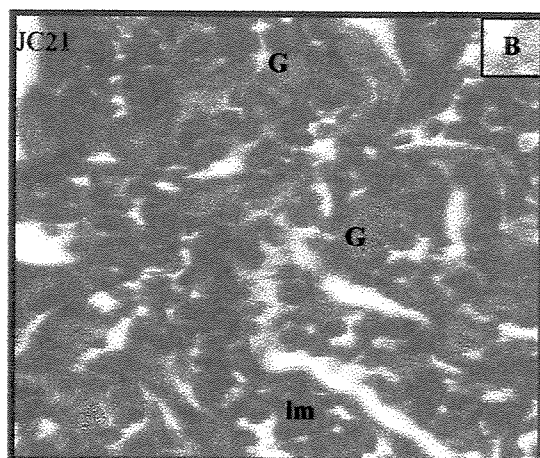
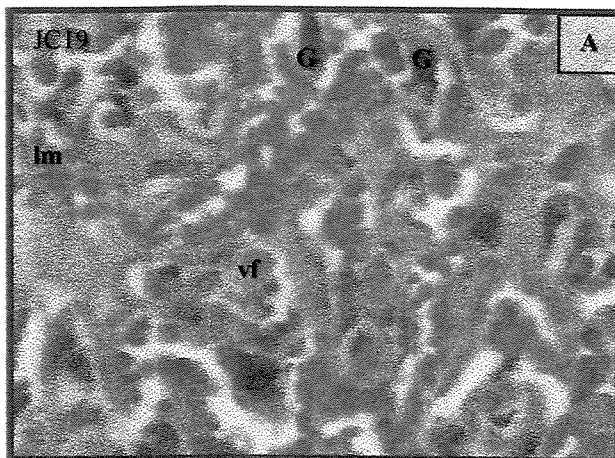


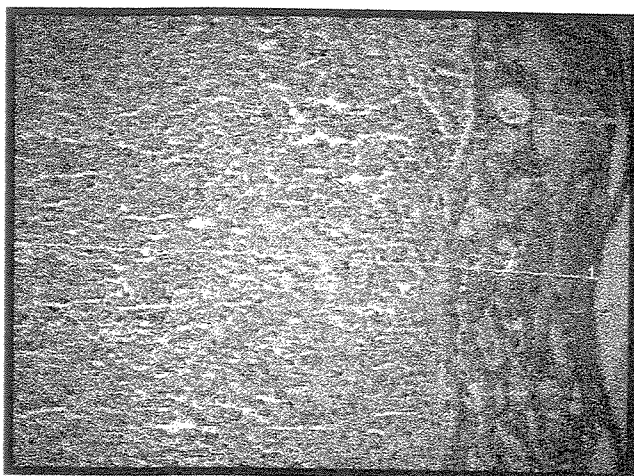
Figura 10: Análise da estrutura do labirinto de ratas jovens no 19º e 21º dia do período gestacional (Aumento 400x). Detalhes em A e B mostram placentas de ratas controles (JC) sacrificadas no 19º e 21º dia, visualizam-se lacunas maternas (lm) bem como vasos fetais (vf) bem definidos, células trofoblásticas gigantes (G) em tamanhos variados; em C e D verificou-se lacunas maternas (lm), vasos fetais encontraram-se pouco definidos, também com pontos edemaciados no endotélio vascular, encontrou-se extravasamento de sangue entre espaços lacunares e vasos fetais nas ratas com câncer (JW); em E e F mostra vasos fetais pouco definidos com pontos hemorrágicos e edemaciados, células trofoblásticas de tamanhos variados encontrados nas placentas de ratas inoculadas com líquido ascítico (JA).

3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS PLACENTAS

3.1 ANÁLISE DA ESPESSURA DAS DIFERENTES CAMADAS TECIDUAIS PLACENTÁRIAS

A Tabela 3 mostra análise comparativa da espessura das camadas placentárias dos grupos experimentais de ratas controles, portadoras de tumor ou inoculadas com líquido ascítico. A figura 11 mostra a metodologia da medida das diferentes camadas teciduais da placenta.

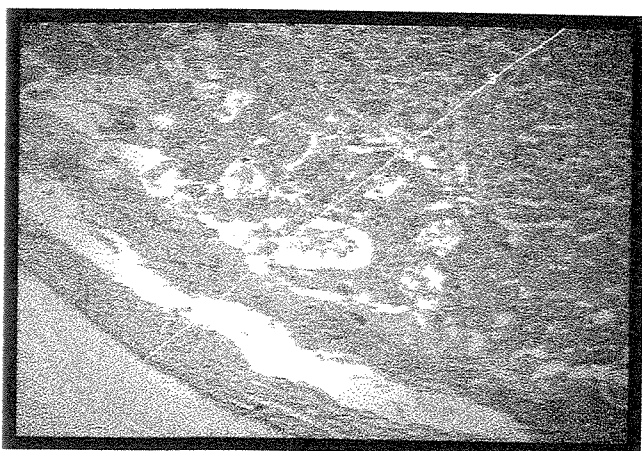
A camada da decídua basalis apresentou redução significativa da sua espessura nas ratas AW21, em relação às respectivas controles (Figura 12). A camada decidual das ratas inoculadas com ascite (AA19 e AA21) tendeu à redução de sua espessura, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa, em relação às respectivas controles. A espessura da camada do espongio trofoblasto e das células trofoblásticas gigantes (CTGs), nas ratas inoculadas com líquido ascítico (AA21) apresentou-se reduzida, em relação às ratas controles (figura 13). Na figura 14, observou-se redução ($p < 0,05$) na espessura da região do labirinto nas ratas com tumor de Walker, no 21º dia; verificou-se tendência à redução do labirinto nas AA21, porém esta diferença não foi significativa. A figura 15 mostra analisando-se comparativamente as diferentes espessuras das camadas, redução do conjunto tecidual nos grupos AW21 e AA21, em relação aos controles.



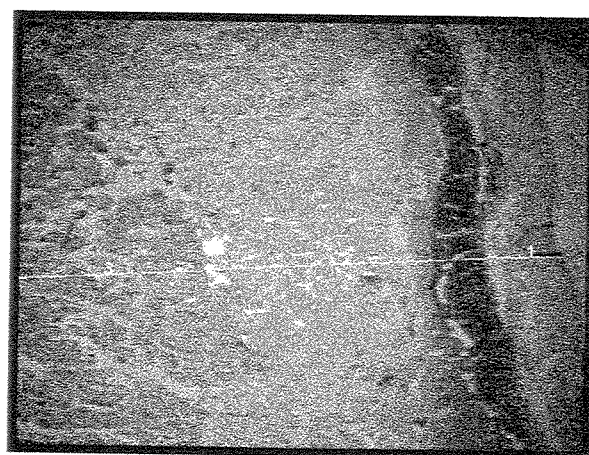
AGC21



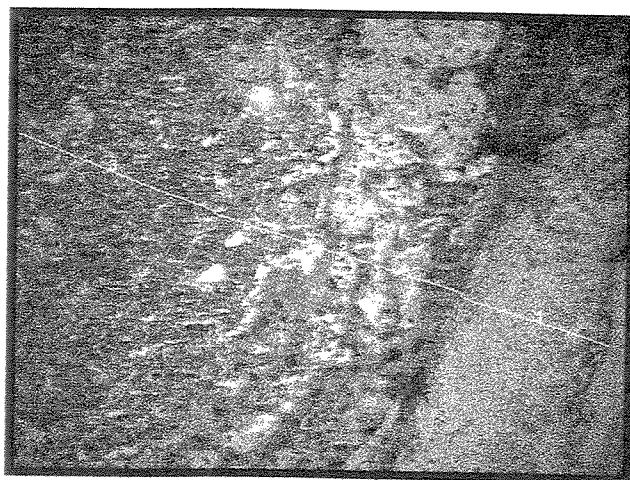
AGC19



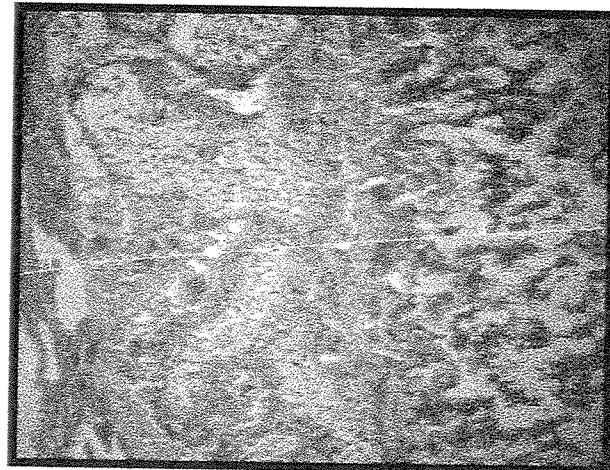
AGW21



AGW19



AGA21



AGA19

FIGURA 11: Imagens das camadas teciduais placentárias dos diferentes grupos de ratas adultas, nos 19º e 21º dias de gestação. 1) medida da decídua; 2) medida do espongiotrofoblasto; 3) medida do labirinto trofoblasto (em micrômetros) .

TABELA 3 : Análise comparativa da espessura das camadas teciduais (micrômetros) decídua basal, espongiotrofoblasto e labirinto de ratas adultas controle, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico, sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação.

	DECIDUA		ESPONGIO		LABIRINTO	
Ac19 (60)	0,883	+0,056	2,816	+0,145	3,478	+0,220
Ac21 (36)	0,705	+0,057	2,339	+0,209	4,673	+0,192**
Aw19 (64)	0,942	+0,103	2,966	+0,384	4,030	+0,346**
Aw21 (40)	0,518	+0,053**	2,517	+0,160	2,128	+0,177*
Aa19 (60)	0,697	+0,072	2,639	+0,248	3,692	+0,1881
Aa21 (60)	0,628	+0,072	1,772	+0,092*	3,267	+0,103

Ac : Ratas adultas controles; Aw : Ratas adultas com Walker; Aa : Ratas adultas com Ascite –sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação ; () quantidade de análises feitas. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média* $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle, ** $p < 0,05$ significância intra grupo.

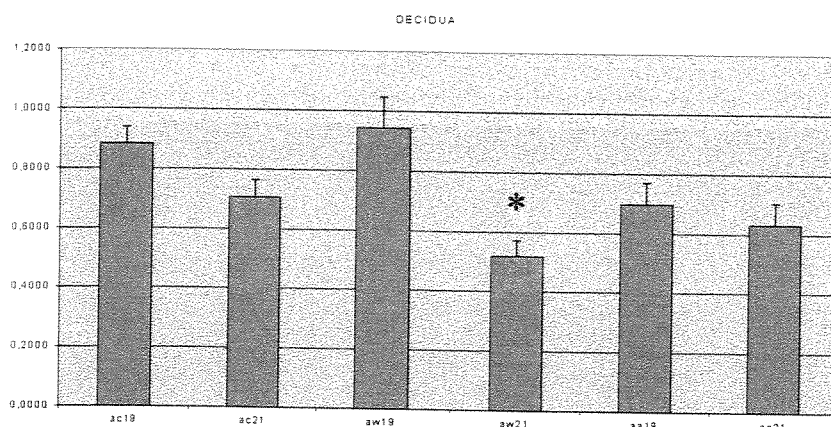


Figura 12 : Análise comparativa da espessura da decídua basal dos diferentes grupos experimentais de adultas nos 19º e 21º dias de gestação. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

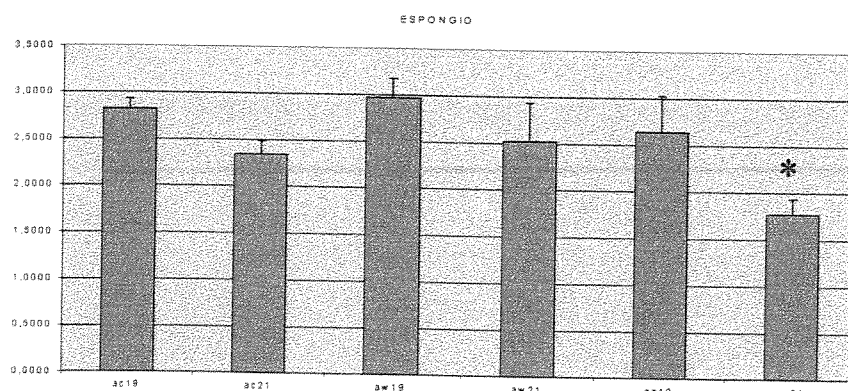


Figura 13 : Análise comparativa da camada espongiotrofoblasto e CTGs dos diferentes grupos experimentais de adultas nos 19º e 21º dias de gestação. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle.

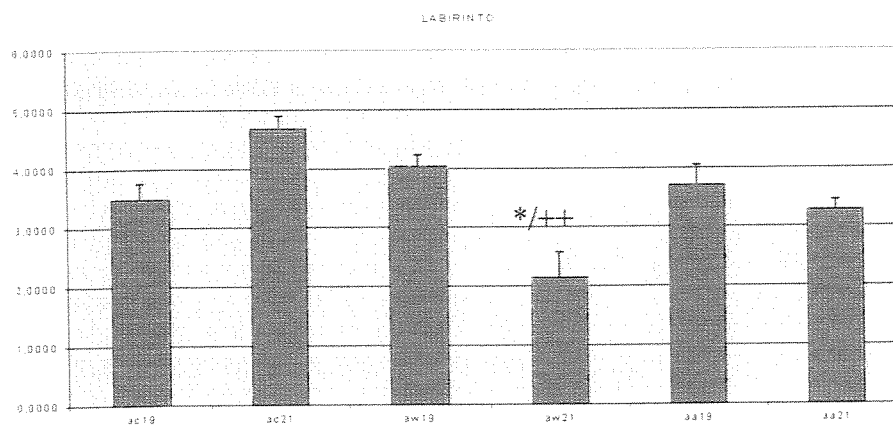


Figura 14 : Análise da camada labirinto dos diferentes grupos de adultas sacrificados no 19º e 21º dia de gestação* $p < 0.05$ significância em relação ao grupo controle. ++ $p < 0.05$ significância intra grupo

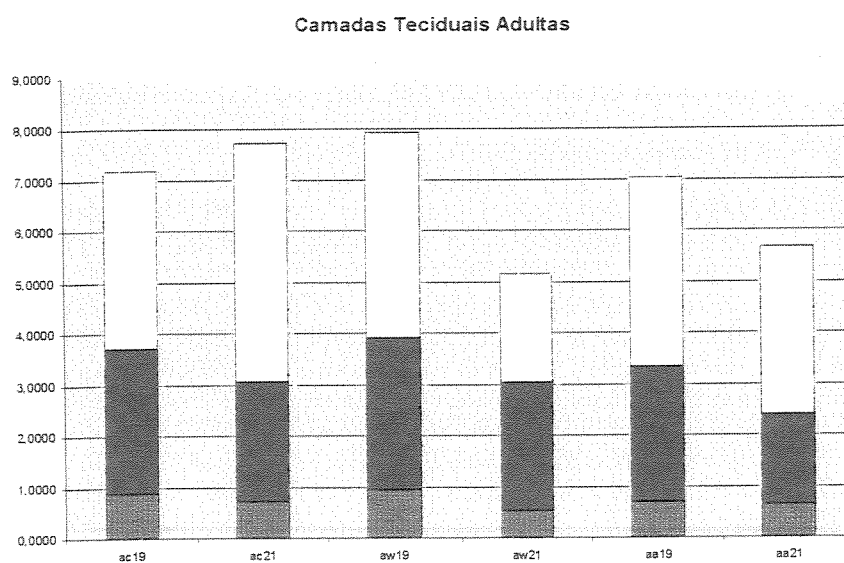


Figura 15 : Análise comparativas das diferentes camadas teciduais dos grupos de ratas adultas controle, com tumor de Walker e inoculadas com líquido ascítico, sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação.

A figura 16 mostra imagem das placentas microscopia fotônica dos grupos de ratas jovens sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação.

A análise das camadas placentárias nas ratas jovens demonstra que houve redução da espessura da camada decídua nas ratas com tumor de Walker nas JW21 e JA21 (tabela 4 e figura 17). Entretanto observou-se que as ratas sacrificadas no 19º dia houve aumento de sua espessura (figura 17).

A espessura da camada espongio trofoblástica e das células trofoblásticas gigantes (CTGs) apresentou redução significativa nas ratas JW21 e JA21 em relação aos grupos sacrificados no 19º dia (tabela 4 e figura 18).

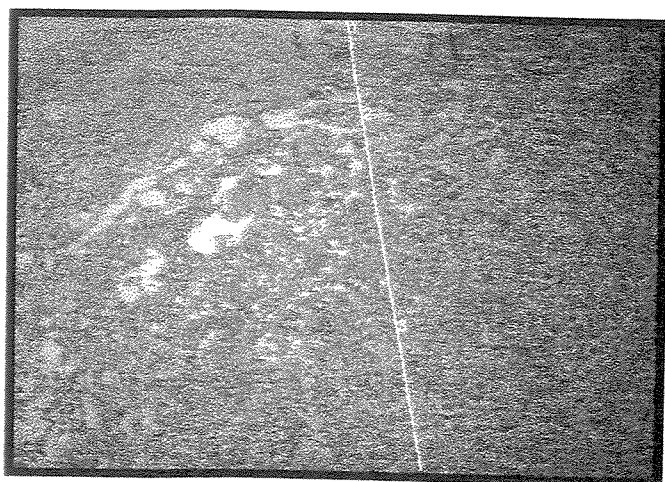
Quanto a análise do labirinto, verificou-se redução da espessura apenas nas JW21 (tabela 4 e figura 19).

A análise comparativa entre os grupos experimentais, mostrada na figura 20, chamou a atenção para a redução da espessura das camadas nas jovens com tumor de Walker sacrificadas no 21º dia.

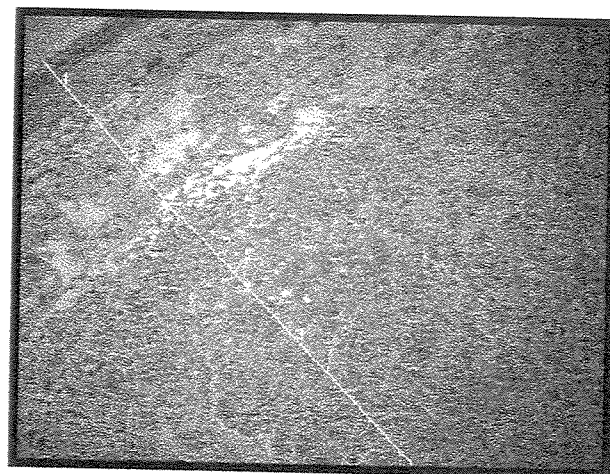
Tabela 4 : Análise comparativa da espessura das camadas teciduais decídua, espongio trofoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto de ratas jovens controles, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico no 19º e 21º dia de gestação.

	DECIDUA	EP	ESPONGIO	EP	LABIRINTO	EP
JC19 (9)	0,485	$\pm 0,141$	1,991	$\pm 0,376$	3,318	$\pm 0,436$
JC21(10)	0,543	$\pm 0,091$	1,530	$\pm 0,114$	3,225	$\pm 0,178$
JW19(11)	0,816	$\pm 0,071^*$	2,470	$\pm 0,217^*$	4,359	$\pm 0,212^*$
JW21(16)	0,369	$\pm 0,036^*/++$	1,043	$\pm 0,123++$	1,646	$\pm 0,233^*/++$
JA19 (15)	0,884	$\pm 0,067^*$	2,991	$\pm 0,173^*$	3,459	$\pm 0,173$
JA21 (14)	0,585	$\pm 0,034++$	1,629	$\pm 0,091++$	3,000	$\pm 0,113$

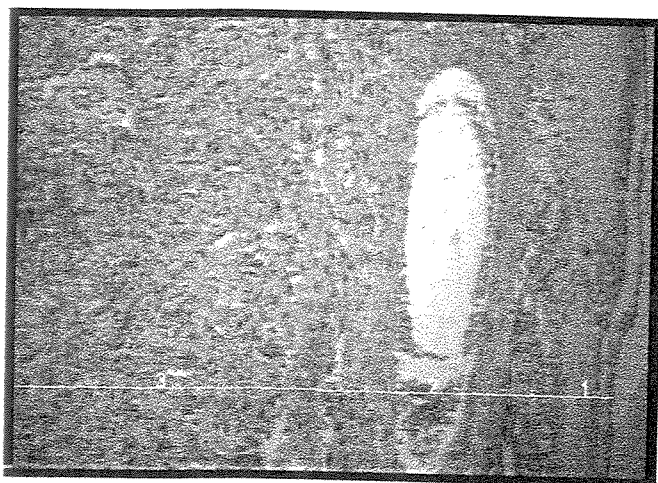
JC –jovens controle; JW- jovens com tumor de Walker; J A – jovens com ascite sacrificados no 19º e 21º dia de gestação ; () número de animais. * $p < 0.05$ em relação ao respectivo controle, ++ $p < 0.05$ significância intra grupo.



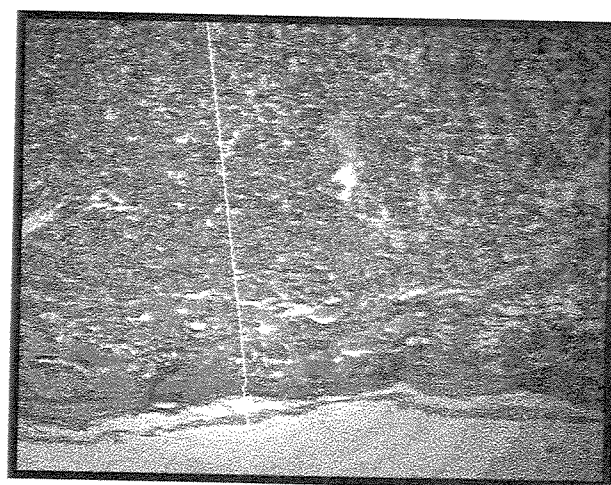
JGC21



JGC19



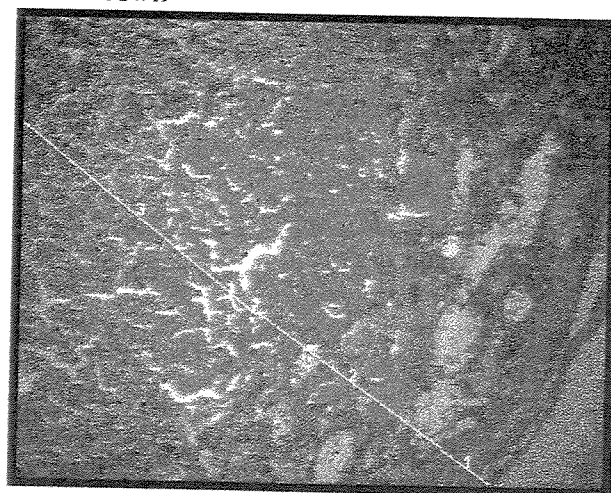
JGW21



JGW19



JGA21



JGA19

FIGURA 16: Imagens das camadas teciduais placentárias dos diferentes grupos de ratas jovens, nos 19º e 21º dias de gestação. 1) medida da decídua; 2) medida do espongiotrofoblasto; 3) medida do labirinto trofoblasto (em micrômetros).

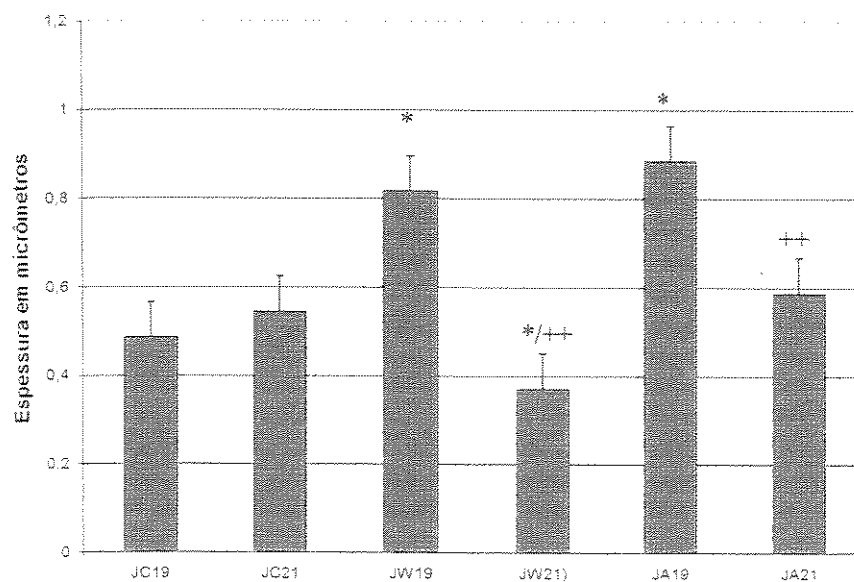


Figura 17: Análise da camada decidual da placenta de ratas jovens controle no 19º e 21º dias de gestação. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média * $p < 0.05$ diferença em relação ao controle. ++ $p < 0.05$ significância intra grupo (Aumento 10x).

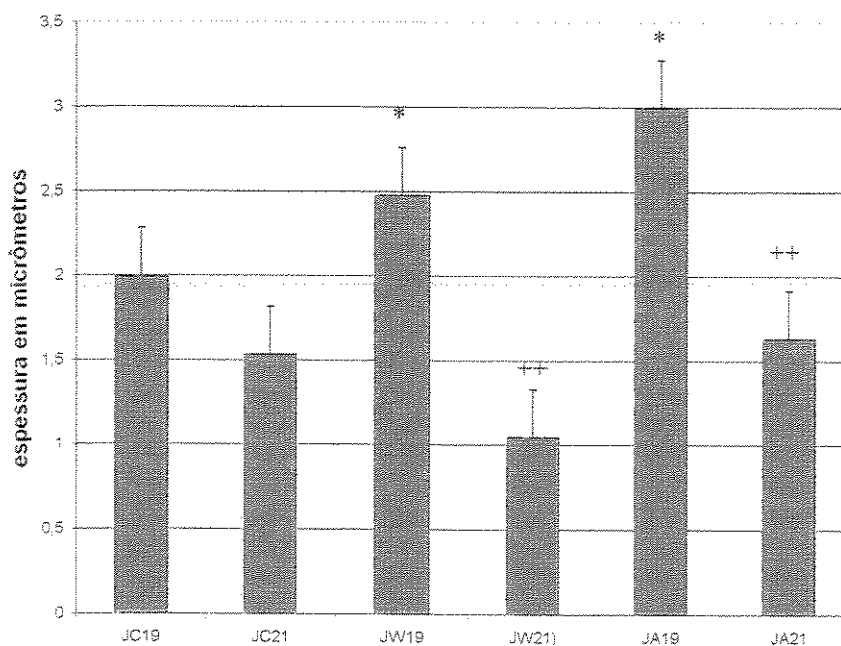


Figura 18: Análise da camada tecidual espongio trofoblasto e das células trofoblásticas gigantes da placenta de ratas jovens controle no 19º e 21º dias de gestação. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média * $p < 0.05$ diferença em relação ao controle. ++ $p < 0.05$ significância intra grupo (Aumento 10x).

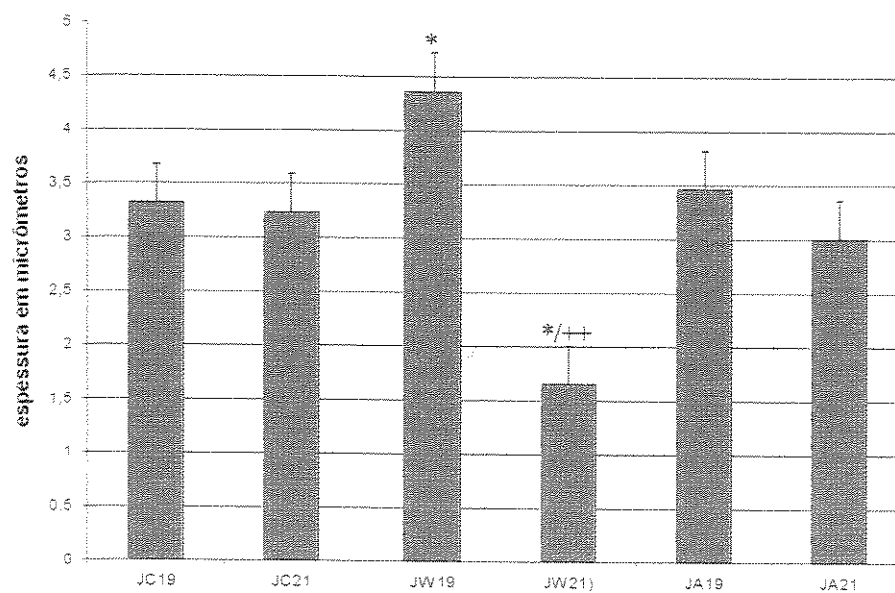


Figura 19: Análise da camada tecidual do labirinto da placenta de ratas jovens controle no 19º e 21º dias de gestação. Resultados expressos em médias + erro padrão da média. * $p < 0.05$ diferença em relação ao controle ++ $p < 0.05$ significância intra grupo (Aumento 10x).

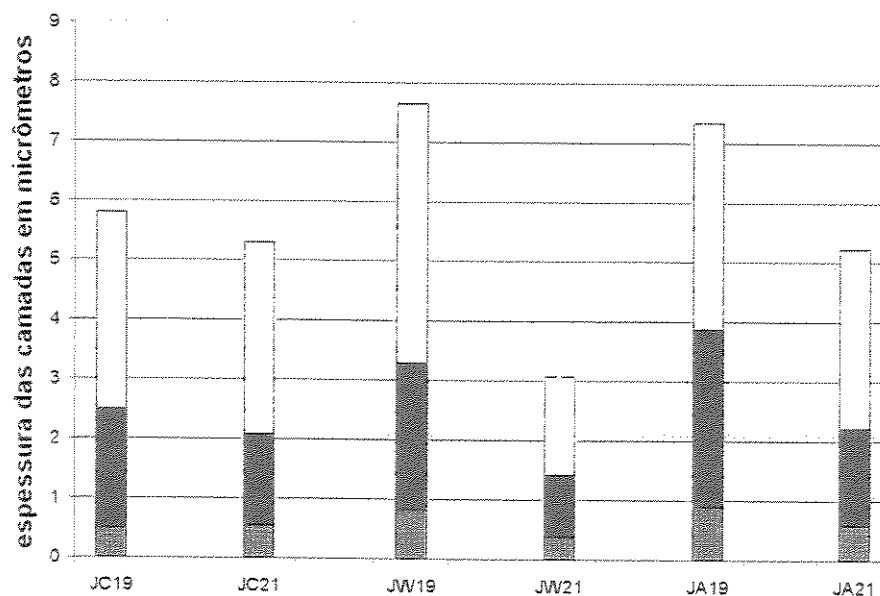


Figura 20: Análise comparativa das camadas teciduais, decidua, espongiotrofoblasto e labirinto trofoblasto da placenta de ratas jovens controle, com tumor de Walker e com ascite no 19º e 21º dia de gestação (Aumento 10x).

3.2 ANÁLISE DO PERFIL NUMÉRICO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS GIGANTES (CTGs) POR CAMPO.

Verificou-se, tabela 5 e figura 21, que as ratas adultas AW19 e AW21 apresentaram redução no perfil de células trofoblásticas gigantes (CTGs) por campo em relação às respectivas controles. Quanto às AA19 e AA21, o perfil de células tendeu a ser menor, mas essa diferença não foi significativa em relação às controles.

Nas ratas jovens apenas nas JW19 (tabela 6 e figura 22), o perfil de células trofoblásticas gigantes (CTGs) apresentou-se reduzido, de modo significativo, em relação às controles.

Análise comparativa mostrou que os grupos de jovens controles e inoculadas com líquido ascítico (JC19 e JC21, JA19 e JA21) apresentaram redução significativa no perfil de CTGs em relação aos respectivos grupos de ratas adultas (Tabela 5 e 6).

TABELA 5: Perfil de Células Trofoblásticas Gigantes (CTGs) por campo das placentas de Ratas Adultas

Animais	AC19	AC21	AW19	AW21	AA19	AA20
MEDIA	161,444	136,333	55,200	63,285	113,222	107,640
EP	$\pm 19,982$	$\pm 11,404$	$\pm 6,972^*$	$\pm 10,529^*$	$\pm 24,941$	$\pm 12,499$

AC- adultas Controle; AW- adultas com tumor de Walker; AA- adulta com Ascite. Total de análises 155. Resultado expresso em médias $\pm$ erro padrão da média * $p < 0.05$ em relação ao respectivo grupo controle.

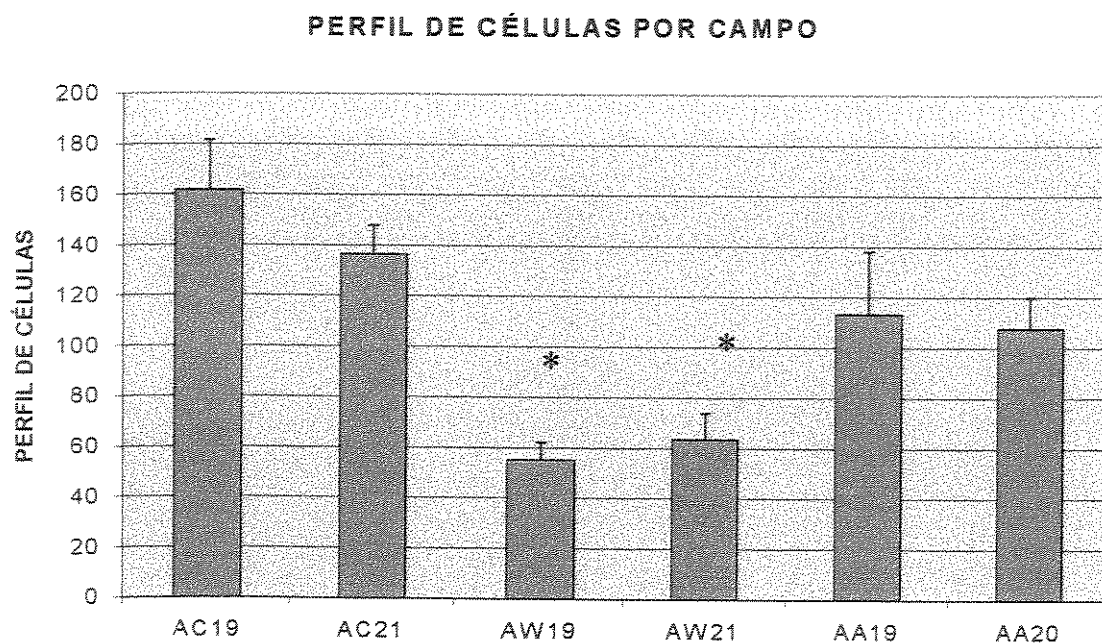


Figura 21 : Análise perfil de células trofoblásticas gigantes (CTGs) por campo das placentas de ratas adultas controle, com ascite e com tumor de Walker no 19º e 21º dias de gestação. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média* $p < 0.05$ em relação ao respectivo grupo controle.

TABELA 6 : Perfil de Células Trofoblásticas Gigantes (CTGs) por campo das placentas de Ratas Jovens

Animais	JC19	JC21	JW19	JW21	JA19	JA21
MEDIA	93,000	73,285	60,200	74,571	75,588	84,785
EP	<u>+16,509</u>	<u>+10,540</u>	<u>+8,672*</u>	<u>+8,382</u>	<u>+6,861</u>	<u>+12,763</u>

JC: Jovens Controle; JW: Jovens com tumor de Walker; JA: Jovens com Ascite. Total de análises 160
Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média * $p < 0.05$ em relação ao respectivo grupo controle.

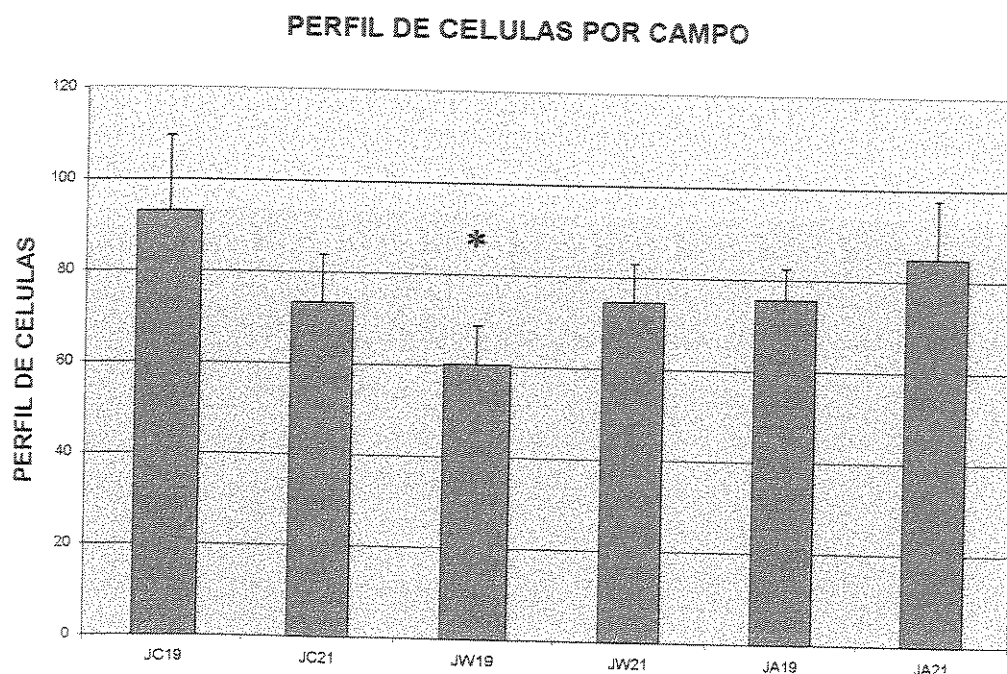


Figura 22 : Análise do número de células trofoblásticas gigantes (CTGs) das ratas jovens controle, com ascite e com tumor de Walker no 19º e 21º dias de gestação. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média * $P < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle.

3.3 ANÁLISE DA ÁREA DOS NÚCLEOS DAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS GIGANTES (CTGs).

No 19º dia, as adultas com câncer apresentaram elevada área dos núcleos das CTGs em relação aos demais grupos (tabela 7 e figura 23). A análise da área nuclear das células trofoblásticas gigantes das placentas de ratas sacrificadas no 21º dia não apresentou diferenças entre os diferentes grupos (tabela 7 e figura 23).

A área dos núcleos de CTGs das placentas das jovens controles foi significativamente maior no 19º dia de gravidez (tabela 7 e figura 24).

Análise dos núcleos das células trofoblásticas gigantes das placentas das ratas JGA21 mostrou área aumentada em relação aos demais grupos sacrificados no 21º dia. A área dos núcleos das ratas jovens com câncer foi semelhante independente do dia de sacrificio destas ratas.

TABELA 7 : Áreas dos núcleos das CTGs (μm^2) dos diferentes grupos experimentais.

Animais	Área das células gigantes (CTGs) em μm^2	Animais	Área das células gigantes (CTGs) em μm^2
JGC19 (9)	378,73 $\pm$ 50,29 *	AGC19	172,40 $\pm$ 35,68
JGW19 (11)	65,33 $\pm$ 4,07#	AGW19	637,92 $\pm$ 118,28 # *
JGA19 (15)	64,89 $\pm$ 4,05#	AGA19	281,52 $\pm$ 59,93*
JGC21 (10)	53,57 $\pm$ 3,50	AGC21	115,40 $\pm$ 8,03
JGW21 (16)	84,28 $\pm$ 7,62 #	AGW21	140,17 $\pm$ 18,35
JGA21 (14)	158,44 $\pm$ 25,71#	AGA21	99,13 $\pm$ 13,91

Grupos experimentais de ratas grávidas jovens (J) e adultas (A) controle (C), portadoras de tumor (W) ou inoculadas com líquido ascítico (A) no 19º e 21º dia de gestação. N = 6 a 8 animais por grupo. Resultado expresso em médias $\pm$ erro padrão da média *P< 0.05 em relação aos demais grupos. #P< 0.05 em relação ao respectivo controle.

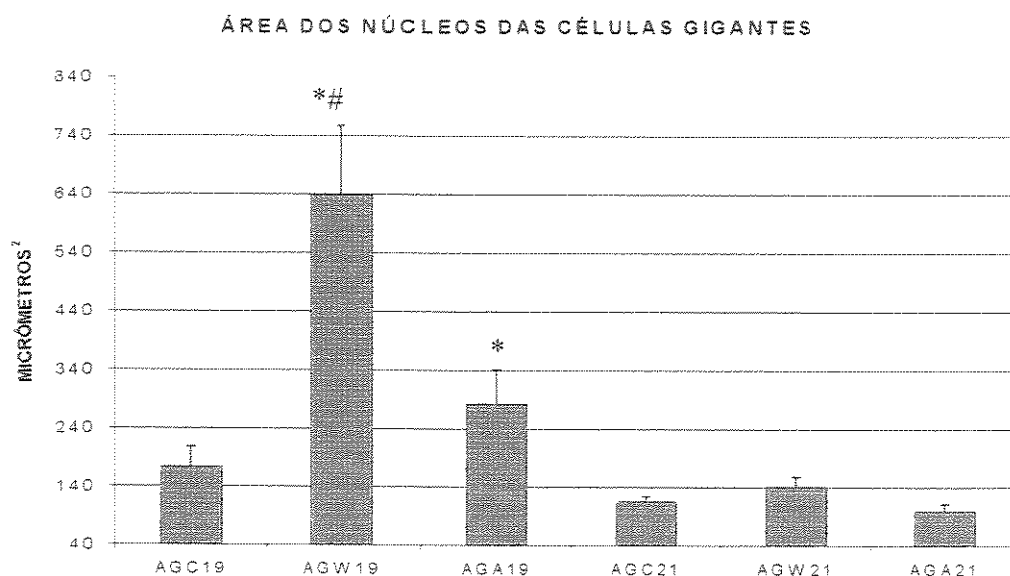


Figura 23: Áreas dos núcleos das células trofoblásticas gigantes (CTGs) das placentas de ratas adultas. * $p < 0.05$ diferença entre 19º e 21º dia. # $p < 0.05$ diferença em relação aos demais grupos.

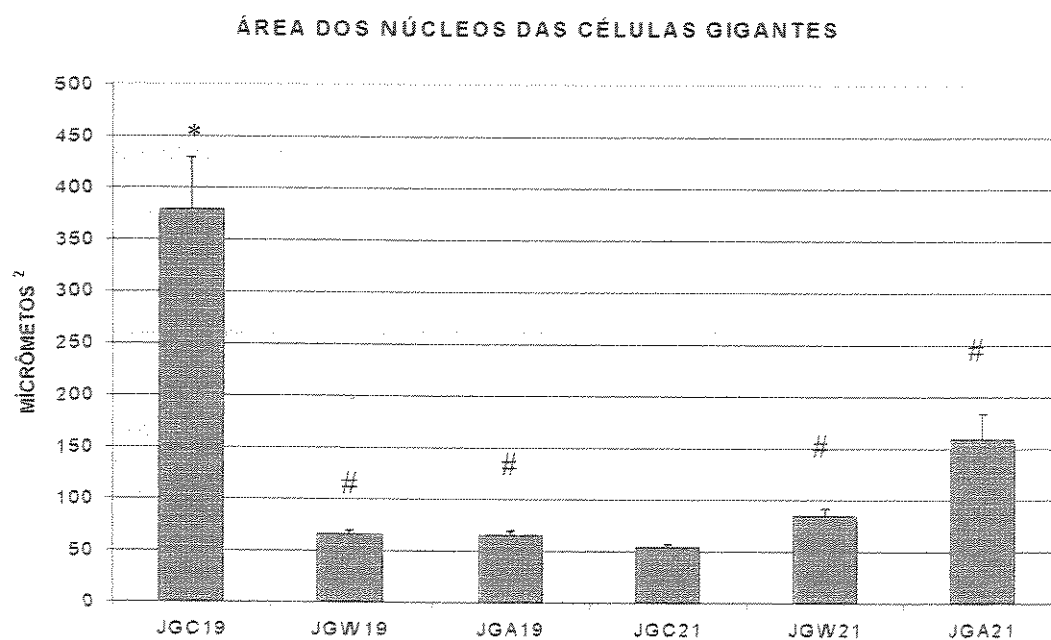


Figura 24: Áreas dos núcleos das células trofoblásticas gigantes (CTGs) das placentas dos diferentes grupos de jovens. * $p < 0.05$ diferença entre 19º dia e 21º dia; # $p < 0.05$ diferença relação ao respectivo controle.

4. ANÁLISE DA INTENSIDADE DE HEMORRAGIA E EDEMA DAS PLACENTAS DAS RATAS CONTROLES, PORTADORAS DO CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256 OU INOCULADAS COM LÍQUIDO ASCÍTICO.

As ratas adultas com câncer apresentaram edema na decídua basal (tabela 9 e figura 25), verificou-se cerca de 85% (S3+ e S2+); cerca de 72% das fêmeas inoculadas com líquido ascítico apresentaram edema (S2+) nesta camada. Processo hemorrágico, na camada decidual foi observado em cerca de 71% das fêmeas com câncer, e em igual porcentagem, nas fêmeas inoculadas com líquido ascítico.

O espongio trofoblasto das fêmeas adultas apresentou-se edemaciado, em cerca de 84% nas adultas com tumor (AW) e em 63% nas inoculadas com líquido ascítico. Processos hemorrágicos do espongio trofoblasto foram encontrados em cerca de 56% das adultas com tumor (S3+ e S2+) e em 54% das adultas inoculadas com líquido ascítico (S3+ e S2+) (tabela 9 e figura 25).

A presença do tumor ou a inoculação de líquido ascítico promoveram aparecimento de edema e hemorragia em 100% das adultas com tumor (S3+) e cerca de 90% das adultas inoculadas com líquido ascítico (S3+ e S2+) na região do labirinto (tabela 9).

Analisando-se as placentas das ratas jovens, (tabela 9 e figura 25), verificou-se que cerca de 50% do grupo JW e 71% do grupo JA apresentaram edema na camada decidual; processos hemorrágicos, nesta camada, ocorreram em cerca de 58% de jovens com câncer e 100% de jovens inoculadas com ascite (S3+ e S2+).

A camada espongio trofoblasto apresentou-se edemaciada em cerca de 75% de fêmeas jovens com tumor (S2+) e em 100% de jovens inoculadas com líquido ascítico (S3+ e S2+, tabela 9 e figura 25). Verificou-se 100% de hemorragia no espongio trofoblasto das ratas com câncer, apenas 14% das jovens com ascite apresentaram elevada intensidade de hemorragia no espôgio trofoblasto (S3+).

Quanto ao labirinto (tabela 9 e figura 25) verificou-se cerca de 25% de edema nas jovens com tumor (S2+) e em 100% nas jovens com ascite (S3+ e S2+); processos hemorrágicos foram verificados em ambos os grupos experimentais (100% nas JW e nas J A).

Analisando-se comparativamente os grupos de jovens e adultas, verificou-se resultados semelhantes entre as alterações placentárias, quanto a presença de edema e hemorragia nas diferentes camadas placentárias (figura 25).

Tabela 9 : Análise da intensidade de edema e de hemorragia nas camadas teciduais da placenta : decidua basalis, espongiotrotoblasto, células trofoblásticas gigantes e labirinto dos grupos de ratas jovens e adultas sacrificadas no 21º dia de gestação

	decidua	edema		++	+	n	decidua	hemorragia		++	+	n
		+++		++	+	n		+++		++	+	n
AC21	0%	0%	0%	0%	100%	AC21	0%	14,29%	28,57%	57,14%		
AW21	28,58%	57,14%	14,28%	0%	0%	AW21	42,86%	28,58%	14,28%	14,28%		
AA21	0%	72,72%	18,18%	0%	0%	AA21	42,86%	28,58%	14,28%	14,28%		
JC21	0%	0%	66,66%	33,33%	16,66%	JC21	0%	0%	66,66%	33,33%		
JW21	16,66%	33,34%	33,34%	0%	28,57%	JW21	25,00%	33,33%	16,67%	25%		
JA21	57,14%	14,28%	0%			JA21	85,71%	14,29%	0%	0%		0%
espongio	edema	+++	++	+	n	espongio	hemorragia	+++	++	+	n	
AC21	0%	0%	0%	100%	AC21	0%	0%	28,57%	42,85%	9,09%		
AW21	42,85%	42,86%	14,29%	0%	0%	AW21	28,58%	28,57%	42,85%	9,09%		
AA21	0%	63,63%	27,27%	9,09%	0%	AA21	9,09%	45,45%	36,36%	9,09%		
JC21	0%	0%	100%	0%	0%	JC21	0%	0%	33,33%	66,66%		
JW21	0%	75,00%	16,67%	8,33%	0%	JW21	50%	50%	0%	0%		
JA21	85,71%	14,29%	0%	0%	0%	JA21	14,29%	0%	71,43%	14,28%		
labirinto	edema	+++	++	+	n	labirinto	hemorragia	+++	++	+	n	
AC21	0%	0%	68,4%	21,1%	AC21	0%	0%	14,28%	0%	79 %		
AW21	100%	0%	0%	0%	0%	AW21	85,72%	14,28%	0%	0%		
AA21	63,63%	27,27%	9,09%	0%	0%	AA21	45,45%	45,45%	9,09%	0%		
JC21	0%	0%	100%	0%	0%	JC21	0%	0%	0%	100%		
JW21	0%	25%	25%	50%	0%	JW21	33,34%	66,66%	0%	0%		
JA21	71,43%	28,57%	0%	0%	0%	JA21	71,43%	28,57%	0%	0%		

AC e JC: adultas e jovens controle; AW e JW: Adultas e jovens com tumor de Walker; AA e J A: Adultas e Jovens inoculadas com líquido ascítico, sacrificadas no 21º dia de gestação; +++: muito intenso; ++: intenso; +: presente; n: ausente.

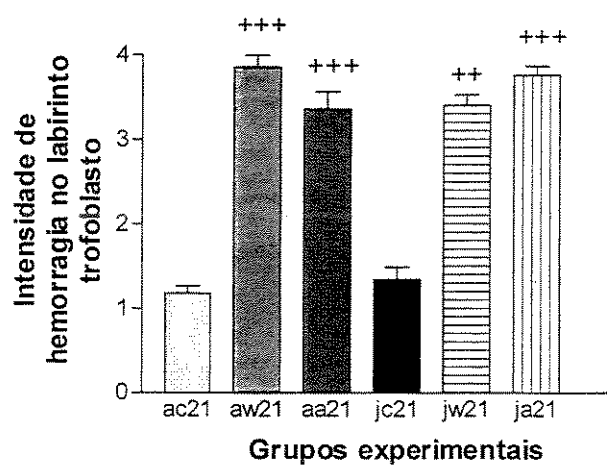
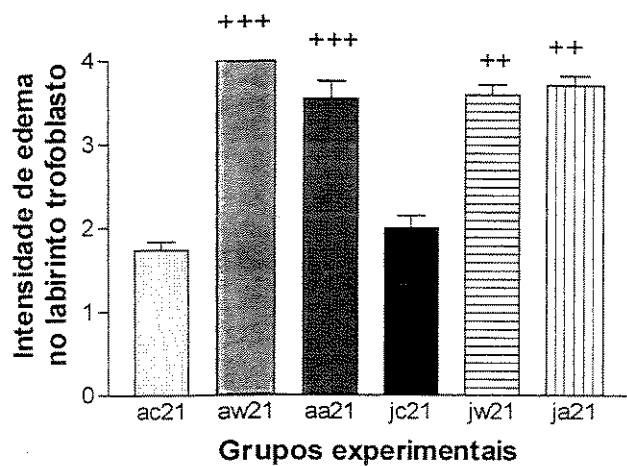
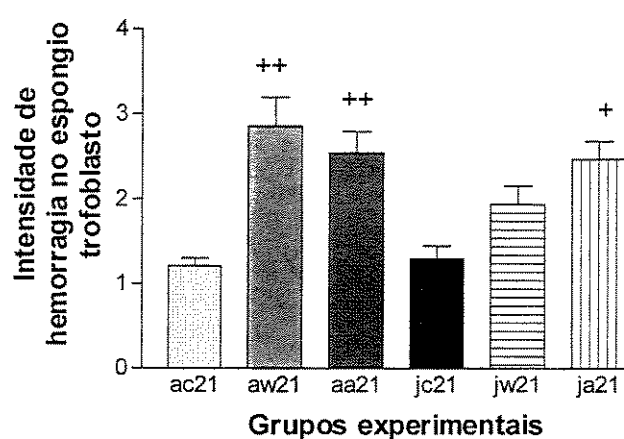
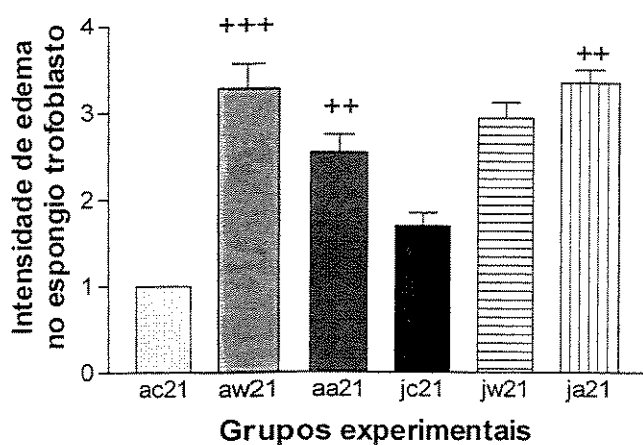
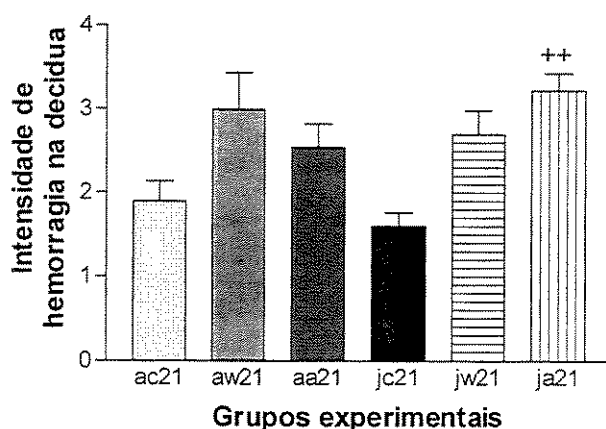
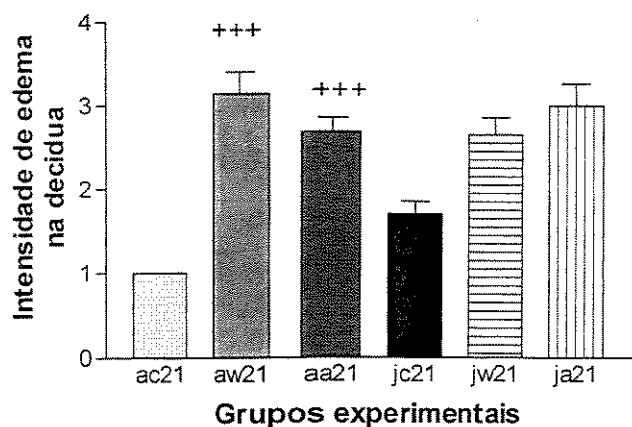


Figura 25 : Intensidade de edema e hemorragia em diferentes camadas teciduais das placentas de ratas jovens e adultas. AC: adultas controle; AW: adultas com tumor de Walker; AA: adultas inoculadas com líquido ascítico. += $p < 0.05$; ++ = $p < 0.01$; +++ = $p < 0.001$. Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn's, comparativo aos grupos controles. Medida dos índices de intensidade de edema e hemorragia $\pm$ erro padrão da média dos diferentes grupos

V. DISCUSSÃO

O crescimento de neoplasia maligna, objeto de estudo deste trabalho, promoveu diminuição significativa no número de fetos e alto índice de reabsorções fetais. Provavelmente, a perda da homeostasia metabólica durante a gravidez promoveu mudanças significativas, como prejuízo no crescimento fetal e comprometimento de sua sobrevivência.

Variações na nutrição, como a desnutrição, durante o último trimestre gestacional, exerce efeitos nos fetos e alterações na trajetória de seu crescimento. Fetos simetricamente pequenos e com baixo peso são originados de desnutrição em diferentes estágios da gestação e tem predisposições a desordens na vida pós natal (GODFREY & ROBINSON, 1998).

Na gravidez, as alterações hormonais e metabólicas estão relacionadas ao suprimento de nutrientes ao feto. O organismo materno necessita adaptar-se e o faz, através de controle neuroendócrino, para acumular nutrientes exógenos, antes do período de maior consumo pelo feto. O aumento do anabolismo materno, durante o primeira metade da gestação, assegura o estoque de nutrientes, que será intensamente mobilizado na segunda metade da gravidez, garantindo, nessas condições, o desenvolvimento fetal bem como a sobrevivência materna (HERRERA et al., 1991).

GOMES-MARCONDES (1994), estudando a associação da gravidez com o crescimento do carcinossarcoma de Walker 256, verificou que as grávidas (cerca de 50%) sobreviveram até o 21º dia de gestação, e o restante das ratas morreram ao longo dos 5 dias subsequentes. Em nosso trabalho, apesar de não ser objeto principal deste estudo, também, verificamos que a

maioria das ratas sobreviveram entre o 19º e 21º dia de experimento.

Neste trabalho, verificamos que mediante o tratamento com tumor de Walker 256 animais houve diminuição da ingesta alimentar, dados semelhantes aos encontrados por GOMES-MARCONDES (1994), onde a queda de peso das ratas grávidas com câncer foi, principalmente, devida a redução da ingesta alimentar e eficiência alimentar e do balanço nitrogenado negativo, no final da gestação. Com o crescimento de neoplasia houve marcada redução do peso e da porcentagem de proteína muscular nas grávidas com câncer, no final do período gestacional, em relação aos controles com ou sem gravidez.

No organismo dos portadores de câncer, há intenso catabolismo que, em geral, culmina com as espoliações dos tecidos. O desenvolvimento das metástases e/ou de infecções exacerbam este processo e provocam a morte do hospedeiro.

Secreção de citocinas ou fatores humorais produzidos pelas células tumorais e/ou hospedeiro e o desequilíbrio hormonal, observados em organismos que albergam neoplasias malignas, contribuem para reduzir o apetite e a ingestão de nutrientes. Na síndrome da caquexia ocorre perda da proteína da musculatura, principalmente esquelética, e decréscimo da concentração de glutamina plasmática (BILLINGS et al., 1991).

Estudos efetuados em pacientes com câncer mostram que a taxa de catabolismo protéico é duas vezes maior, do que em indivíduos desnutridos; esta espoliação da massa protéica corporal indica incapacidade destes pacientes em conservar proteína corporal (SHAW et al., 1988; HYLTANDER et al., 1991). A intensa proteólise na musculatura esquelética visa fornecer quantidades consideráveis de glutamina para o desenvolvimento do tumor (FERNANDES et al., 1996).

A glutamina e a glicose são utilizadas em grandes quantidades pelas células tumorais sendo essenciais para o seu crescimento.

A placenta exerce papel central na manutenção de substratos maternos ao feto. A glicose é o substrato primário do catabolismo energético fetal, e o transporte placentário constitui a única fonte de suprimento embrionário. A glutamina, sendo um aminoácido não essencial, exerce um importante papel no metabolismo placentário e fetal (HAY, 1991).

A concentração de nutrientes na circulação materna é o fator determinante da composição do ambiente nutricional fetal ao longo do período gestacional (SCIULLO et al., 1997). O controle metabólico durante o período gestacional pode ser dividido em intrínseco e extrínseco. A maior característica do controle metabólico intrínseco é a conversão de piruvato à glicose como substrato energético essencial disponível durante a pré-implantação em camundongos. Nutrientes exógenos como piruvato, glicose, lactato e aminoácidos são necessários para a pré-implantação do embrião no útero pelo oviduto (LEESE, 1995). Por outro lado, o trofoblasto placentário tem a capacidade de extrair 90% de glutamato circulante e metabolizá-lo por descarboxilação e oxidação, pela ação da glutamina sintetase, convertendo-o à glutamina e direcionando 6% desta produção ao feto. Esta síntese de glutamina, absorvida da circulação materna e direcionada à circulação fetal, é utilizada pelo fígado e outros tecidos fetais como fonte de nitrogênio (MATTHEWS et al., 1998).

Provavelmente, o crescimento do tumor causou intensa utilização de nutrientes promovendo diminuição do aporte nutricional também à placenta e consequentemente prejuízo ao desenvolvimento fetal.

A concentração de glicose sérica encontrou-se bastante reduzida nas

ratas grávidas portadoras do carcinossarcoma em relação às controles, quando verificadas no final do período gestacional (fase catabólica) (GOMES-MARCONDES et al., 1998). O aporte de glicose fetal é medido pela concentração deste substrato no sangue materno, que banha os espaços lacunares no labirinto da placenta, e transportado por proteínas carreadoras de glicose. Duas isoformas de transportadores de glicose foram identificadas no tecido placentário de grávidas com diabetes mellitus (Glut 1 e Glut 3) (SCIULLO et al., 1997). Glut 3 parece ser capaz de direcionar a glicose materna para o uso da placenta e feto, sugerindo que este transportador exerça papel na proteção ao feto durante a hipoglicemia materna. Diabetes materna durante a gestação está associada com anormalidades placentárias, morfológicas e funcionais, as quais possivelmente estão relacionadas ao prejuízo fetal (SCIULLO et al., 1997).

Provavelmente a redução da glicemia que ocorre normalmente na rata grávida sadia foram exacerbados pela intensa utilização de glicose pelos tecidos placentários, fetal e principalmente pelas células neoplásicas. Desse modo, os mecanismos de adaptação, do organismo materno à situações adversas foram abolidos pelo crescimento tumoral.

Segundo GLUCKMAN (1989) o retardo do crescimento fetal frequentemente está associado à diminuição do aporte de oxigênio, ou de substratos ao feto, em geral, decorrente de alterações do fluxo sanguíneo uterino, ou mesmo modificações no crescimento e nas funções placentárias. Este fato corroboram com os dados encontrados neste trabalho de menor número de fetos e elevado número de sítios de reabsorções fetal, que pela menor disponibilidade de nutrientes estaria sendo causada pela intensa utilização desse substratos pelo câncer (KALKHOLFF, 1991; LANGSTEIN &

NORTON, 1991).

A competição nutricional que, provavelmente ocorreu entre dois tecidos metabolicamente muito ativos, como células neoplásicas e fetais, culminou em prejuízo para o desenvolvimento do feto. Dados da literatura enfatizaram que a carência nutricional, promove diminuição da disponibilidade de nutrientes provocando alterações no metabolismo placentário e fetal (LOPES, 1992; PAU & MILNER, 1981). Em mulheres grávidas foi demonstrado que a baixa absorção de carboidratos associada à baixa oferta de proteínas, no início da gravidez, alteram de forma significativa, o peso fetal e placentário (GODFREY et al., 1994).

LARGA et al. (1972) analisando a influência nutricional sobre o estado gestacional, mediram morfometricamente placenta de mulheres originárias da Guatemala e de Boston e encontraram, que nas guatemaltecas, o peso das placentas era 14% menor que nas mulheres de Boston. Os autores observaram, também, redução de cerca de 25% da massa trofoblástica, 20% de área de superfície dos vilos e 31% dos capilares fetais dos vilos, sugerindo prejuízo na absorção da unidade materno fetal (LARGA et al., 1972). A desnutrição protéico calórica e pouca idade gestacional acarretam em diminuição do peso e do conteúdo protéico placentário (GOMES-MARCONDES, 1997), porém estes dois fatores não interferem na formação e desenvolvimento do labirinto trofoblasto de ratas desnutridas (LOPES, 1992).

Neste trabalho, verificou-se que a possível influência do crescimento do tumor promoveu alterações morfológicas nas placentas, tanto nas ratas adultas quanto das ratas jovens. As funções da placenta são moduladas por sinais oriundos do feto e as maiores mudanças ocorridas no útero, com o desenvolvimento da placentação são vistas entre o 11º e 16º dia de gestação. A

integridade da comunicação entre placenta e feto é essencialmente crítica para o crescimento intra uterino (GODFREY & ROBINSON, 1998; WELSH & ENDERS, 1993).

A placenta sofre consideráveis mudanças ao longo da gestação como parte do processo natural de maturação e muitas vezes como resultado de desordens. No curso normal de seu desenvolvimento há combinação de aumento da área da superfície placentária de acordo com o crescimento fetal para a melhoria da demanda nutricional e suprimento de energia (GODFREY & ROBINSON, 1998).

Com a evolução da gravidez, segundo DAVIES & GLASSER (1968), a placenta de rata, entre o 18º e 21º dia de prenhez, sofre alterações na espessura das camadas placentárias, aumentando, principalmente, a camada do labirinto (neste período o labirinto representa cerca de 60% do total em relação às outras camadas, decídua basalis, espongio trofoblasto e células trofoblásticas gigantes). Estes dados sugerem que, em função da redução da espessura das camadas placentárias, principalmente labirinto, verificada nas ratas adultas e jovens, com câncer, possivelmente ocorreu diminuição das trocas materno/fetais, culminando, deste modo, em deficiência do aporte de nutrientes aos fetos, destes grupos experimentais.

Assim, na gravidez, a presença do tumor promoveu prejuízo materno fetal, como foi observado neste trabalho, aventando-se a hipótese de que estes danos foram decorrentes da competição nutricional.

No tratamento com líquido ascítico, o qual é composto de substâncias bioativas, principalmente proteínas, secretadas tanto pelo tumor como pelo hospedeiro, verificou-se redução no número de fetos bem como elevado índice de reabsorção fetal. Neste tratamento com líquido ascítico não houve alteração

do consumo de nutrientes; a ingesta de alimentos foi mantida, bem como normoglicemia e proteinemia semelhantes às grávidas controles verificados por GOMES-MARCONDES (1994). Entretanto dados da literatura mostraram que animais portadores de câncer, que secretam caquetina TNF, ou interleucina 1 apresentaram declínio progressivo do hematócrito, da concentração sérica de glicose e de triglicerídeos, e elevação de proteína total plasmática quando comparado aos controles (MOLDAWER et al., 1988). Segundo GOMES-MARCONDES et al. (1998) a associação entre câncer e gravidez causou redução do conteúdo protéico placentário e fetal em relação às controles, e estas alterações foram reproduzidas quando se inoculou líquido ascítico nas ratas grávidas. Os autores sugerem que houve possível influência indireta do câncer sobre os produtos de concepção (GOMES-MARCONDES, 1998).

Sabe-se que o carcinossarcoma produz várias substâncias peptídicas, algumas delas secretadas, também, por macrófagos do hospedeiro. Estas substâncias são caquetina, interleucinas, transforming growth factor, insuline growth factor e prostaglandinas, que acarretam alterações no hospedeiro, tais como caquexia (BEUTLER & CERAMI, 1986; FLORES et al., 1989). Por outro lado, MALLMNANN et al. (1990) observaram que em mulheres com abortos recorrentes havia aumento da concentração sérica de TNF associado ao decréscimo de interleucina 2. Abortos espontâneos em mulheres com câncer mamário foram relacionados à baixa razão entre o número de receptores de estrógenos e progesterona, sugerindo que, nestas pacientes, este padrão hormonal afetou o miométrio, proporcionando ambiente inadequado para a implantação e crescimento do embrião (LEHRER et al., 1992).

Neste trabalho, a hipótese de influência direta e indireta do tumor, pode ser confirmada pela utilização do líquido ascítico o qual reproduziu danos

similares a estrutura placentária causando, provavelmente, prejuízo das trocas materno-fetais. A morfologia das camadas teciduais decídua basalis, espongio trofoblasto, células trofoblásticas gigantes (CTGs) e labirinto mostrou-se em desarranjo pela presença de hemorragia e edema nas camadas teciduais mediante este tratamento. Observou-se ainda alterações nas populações de células trofoblásticas gigantes (CTGs) provavelmente pela presença de substâncias secretadas pelo hospedeiro, e consequente perda do feedback entre placenta/feto interferindo na função intrínseca placentária, visto que em ausência de células neoplásicas, pela inoculação do líquido ascítico, não houve competição nutricional. Pesquisas anteriores verificaram que há presença de focos hemorrágicos nos vilos fetais, com consequente destruição destes, em infecções congênitas promovidos por citomegalovírus ou trombose; nos estados finais de trombozes foram verificados a presença de destruição inflamatória e aumento marcante de células nucleadas sanguíneas nos vasos fetais (BENIRSCCHKE, 1998). A circulação dos vilos é prejudicada no estado de pré-eclâmpsia, com menor transferências de fluidos para a circulação, provocando retardo no crescimento fetal (BENIRSCHKE, 1998). Determinadas drogas induzem insuficiência crônica placentária, que é acompanhada por prejuízos no crescimento fetal (GARLAND, 1998). Sendo assim a perda da homeostasia metabólica durante a gravidez promove mudanças irreparáveis ao crescimento fetal e comprometimento de sua sobrevivência.

A presença do tumor e de líquido ascítico, estimularam direta ou indiretamente o sistema imunológico a produzir citocinas, que por sua vez, atuaram no tecido placentário. Este fato está relacionado aos achados de infiltrados linfocitários nas camadas placentárias, principalmente nas regiões do espongio trofoblasto e labirinto, parte fetal. Possivelmente interferiram no

mecanismo de morte celular verificados pela incidência de núcleos picnóticos nas células decíduais (TOLEDO & GOMES-MARCONDES,1999). Alterações na decídua podem causar problemas no desenvolvimento fetal, pois, a camada decidual representa o limite entre a interação materna com a parte placentária de origem fetal.

O TNF (Tumor Necrosis Factor), causa hemorragia e reabsorção fetal em animais experimentais, pois o TNF age de forma citotóxica para células endoteliais e causa danos ao sistema vascular da decídua. A placenta contém receptores de TNF localizados no trofoblasto. A administração crônica de TNF em ratas grávidas, resulta em mudanças na cinética do transporte de aminoácidos, como alanina e leucina, através da barreira placentária; estudos sugerem que citocinas podem mediar alterações metabólicas do hospedeiro em função do crescimento tumoral (CARBÓ et al.,1996). Segundo ARGILÉS et al. (1997) apesar do TNF ser originalmente descrito como molécula citotóxica produzida por macrófagos em resposta a determinado estímulo, há evidências de que o TNF pode ser sintetizado pelo endométrio, placenta e pelo próprio feto.

Neste trabalho, podemos aventar a hipótese de que a perda da capacidade de trocas metabólicas, entre mãe e feto ocasionadas pelas alterações morfológicas observadas na placenta, provavelmente foi decorrente da produção de substâncias bioativas pelo hospedeiro e/ou células neoplásicas que atuaram no tecido placentário.

Desse modo este trabalho abre uma ampla linha de pesquisa, ressaltando-se a importância de estudos voltados à atividade celular e o mecanismo de atuação dessas possíveis substâncias nos processos de lesão placentária pois, a manutenção da integridade do tecido placentário é

fundamental à homeostasia da unidade materno-fetal durante todo o período gestacional.

6. CONCLUSÕES

- O crescimento tumoral e a inoculação do líquido ascítico causaram alterações na estrutura placentária e fetal. As alterações verificadas não estão relacionadas a idade do animal.
- A neoplasia produziu, nas ratas jovens e adultas, redução do número de fetos e elevado índice de sítios de reabsorções fetal, provavelmente, foram decorrentes das alterações fisiopatológicas que dificultaram aporte adequado de nutrientes à placenta e/ou feto.
- O desenvolvimento do tumor e inoculação do líquido ascítico promoveram alterações no meio placentário como edema e hemorragia, nas diferentes camadas placentárias que provavelmente modificaram os processos de trocas metabólicas entre mãe e feto, prejudicando o desenvolvimento fetal.
- As modificações na morfologia dos tecidos placentários maternos e fetais, tanto nas ratas jovens ou adultas portadoras de tumor, quanto nas ratas inoculadas com líquido ascítico, podem estar relacionadas com a síntese e secreção de fatores produzidos pelas células neoplásicas e/ou pelas células do hospedeiro, que atuariam de forma direta ou indireta induzindo a morte celular placentária e/ou fetal de forma irreversível.

VI. BIBLIOGRAFIA

ABRÃO, A . Câncer de mama associado à gravidez e lactação. *Rev. Associação Medica Brasileira* **34**: 180-2, 1988.

ARGILÉS, JM, CARBO N, LOPEZ-SORIANO, FJ. TNF and pregnancy: the paradigm of a complex interaction. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**: 181-8, 1997.

BAKER, HL. Reproduction and breeding. *In. BAKER, HL. ; LINDSEYL, JR ;WEISBROTH, SH.* The laboratory rat. New York, Academic Press, v. I cap.7, p. 153-168,1991.

BEACONSFIELD, P ; BIRDWOOD, G ; BEACONSFIELD, R. The placenta . *Scientific American*, **243**: 80-9, 1980.

BERENBLUM, I. The nature of tumor growth. *In: FLORY,L., W.B.* Ed. General Pathology. Philadelphia, Saunders, cap.21,1970.

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

BEUTLER, B & CERAMI, A. Cachetin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*, **320**:584-8, 1986.

BEVILACQUA, E ; ABRAHANSON, PA. Invasiveness of mouse trophoblastic cells in connective tissue . **Acta Anatomica 150:** 246-252,1994.

BILLINGS, MP; LEIGHTON, B; DIMITRIADIS, GD; CURI, R; BOND, J; BEVAN, S; COLQUHOUN, A and NEWSHOLME, EA. The effect of tumor bearing on skeletal muscle glutamine metabolism. **International Journal Biochemistry 23 (9):** 933-937, 1991.

CARBÓ, N; LOPEZ-SORIANO, FJ; FIERST, W; ARGILES, JM. Tumor growth results in changes in placental amino acid transport in the rat: a tumor necrosis factor α -mediated effects. **Biochemical Journal 313:** 77-82,1996.

CERRO, JA and PINTART JE. Insulin growth factor binding protein gene expression in the pregnant rats uterus and placenta. **Developmental Biology, 184:** 278-295, 1997.

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

DAVIES J, GLASSER, SR. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta Anatomica (Basel) 69(4):**542-608,1968.

DENKER, HW. Implantation : A cell biological paradox. **The Journal of Experimental Zoology** 266: 541-558, 1993.

FERNANDES, LC; COSTA ROSA, LFBP; MACHADO, UF and CURI, R. Insulin treatment inhibits glucose and glutamine metabolism in tumor cells from Walker 256 tumor-bearing. **Cancer Research, Therapy and Control** 5: 35-40, 1996.

FLORES, EA; BISTRAN, BR; POMPOSELLI, JJ; DINARELLO, CA; BLACKBURN, GL; ISTFAN, NW. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. **Journal Clinical Investigation** ,83: 1614-22,1989.

GAD, SC; WEIL, CS. Statistics for toxicologists. **In** : Principles and Method of Toxicology. 3th ed. Wallace Hayes, Raven Press. Ltd. N.Y., 1994.

GARLAND, M. Pharmacology of drug transfer across the placenta. **Substance Abuse in Pregnancy** 25 (1):889-8545, 1998.

GARNICA, AD; CHAN, WY. The role of the placenta in fetal nutrition and grower. **Journal American College Nutrition.** 15 (3): 206-222,1996.

GODFREY, K; ROBINSON, S. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. **Proceedings of the Nutrition Society** 57: 105-111, 1998.

GOMES -MARCONDES, M.C.C. 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 Doutorado, Inst. de Cienc. Biom. Univer. S.P.**), 1994.

GOMES, M.C.C; BEVILACQUA, R.G.; LIMA-GONALVES, E.;RESENDE,L. Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. **Ciencia Cultura 35 (7) : 736**, 1983.

GOMES-MARCONDES, M.C.C. Correlação entre câncer, gravidez e desnutrição protéico calórica. estudo experimental em ratos jovens. Projeto Auxílio FAEP-UNICAMP, 1997, Laboratório de Nutrição e Fisiologia Digestiva, IB, Unicamp., São Paulo.

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

GLUCKMAN, PD. Fetal growth and endocrine perspective. **Acta Paediatric Scandinavia. 349 (Suppl): 21-5**, 1989.

HAY JR, WW. Not just a conduit for maternal fuels. **Diabetes 40(suppl 2): 44-50**, 1991.

HEBEL, R & STROMBERG. Anatomy and embryology of the laboratory rat. In : Worthsee, Bromed Verlag,. P. 244-8,1986.

HERRERAS, E; LASUNCIÓN, MA; PALACÍN, M; ZORZANO,A; BONET,B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freikel Era. **Diabetes, 40 (Suppl 2): 83-8, 1991.**

HYLTANDER, A; WARNOLD,I; EDEN, E; LUDNHOLM,K. Effect on whole-body protein synthesis after instituion of intravenous nutrition in cancer and non-cancer patients who lose weight. **European Journal Cancer, 27: 16-21, 1991.**

JAMA, RS; COWAN, PH. Amelanotic melanoma metastatic to the placenta. **American Journal Obstetric Gynecology 124: 431-432, 1980.**

KARKHOFF, RK. Impact of maternal fuel and nutritional state on fetal growth. **Diabetes, 40 (Suppl.2): 61-5, 1991.**

KULAY JR, L; NAZARETH, HRS; ANDRADE, JAD; DELASCIO, D. Report on the variation of mitosis in placental cells of rats during the functional period and its relation to placental aging. **Maternidade Infância 26: 287-8,1967.**

LANGSTEIN,HN & NORTON,J A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematology Oncology Clinical North American 5: 103-23, 1991.**

LARGA, EM ; DUSCOOL, SC & MUNRO, HN. Comparison of placenta from two socioeconomic groups I. Morphometry. **Pediatrics** 50 : 24-33, 1972.

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

LEESE, HJ. Metabolic control during preimplantation mammalian development. **Human Reproduction Update** 1(1): 63-72, 1995.

LEHLER,S; LEVINE,E; SAVORETTI,P; CROPLEY,J; DALTON,J; SONG,HK; THUNG,SN; RABINOWITZ,J; MANDELL,L. Diminished ratio of strogen receptors to progesterone receptors in breast carcinomas o women who have had multiple miscarrigies. **Mt.Sinai. J. Med.** 59: 28-31, 1992.

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.

LUNDHOLM, SE; EKMAN,L; KARBER, GI and SCHERSTEH, T. Metabolism in peripheral tissues in cancer patients. **Cancer Treatment and Report 65 (Suppl 5):** 79-83, 1981.

MALLMANN,P; WERNER,A; KREBS,D. Serum levels of interleukin-2 and tumor necroses factor alpha in women with recurrent abortion. **American Journal Obstetric Gynecology 163(4Pt1):** 1367,1990.

MATHEWS, JC; BEVERIDGE, MJ; MALANDRO, MS; KILBERG, MS. Response of placental amino acid transport to gestacional age and intrauterine growth retardation. **Proceedings of the Nutrition Society 57:** 257-263, 1998.

MORRIS, G.M. Placental evolution and embrionic nutrition. in: comparative placentation. **In Essays in Structure and Funcion . STEVEN, D.H.;** Academic Press, London, C4 p. 87-107,1975.

PAU, M.Y. & MILNER, J.A . Arquive deficiency during gestation and lactation in the rat. **Journal Nutrition 111:** 184-193, 1981.

PETRAGLIA, F; MICHEROUX, A A; FLORIO, P; SALVATORI, M; GALLINELLI, A; CELAL,V ; PALUMBO, MA and GENNAZZANI,A R. Steroid protein in human placenta. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology 53 (1 –6):**227-31, 1995.

REEVES,PG; NIELSEN FH and FAHEY JR GC. 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 A rodent diet. **American Institute of Nutrition 11(1):** 1939-1951, 1993.

ROSSO, P. Placental growth, development and function in relation to maternal nutrition. **Federal Procceding 39:** 250-4,1980.

ROTHCHILD, I; BILLIAR, RB.; KLINE, IT and PEPE, G. The persistence of progesterone secretion in pregnant rats after hypophisectomy and hysterectomy: a comparison with pseudo pregnant, deciduomata bearing pseudopregnant, and lactating rats . **Journal of Endocrinology 57:**63-74, 1973.

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

RUGH, R. The mouse . **In** Its Reproduction and Development .Burgess Publishing Company, 1968.

SCIULLO, E ; CARDELLINI,G; BARONI, M; TORRESI, P; MAZZIOTTI, F; POZZILLI, P; FALLUCCA,F. Glucose transporters (Glut 1, Glut 3) mRNA in human placenta of diabetic and non-diabetic pregnancies. **Ann. Inst. Super. Sanita 33(3):**361-365, 1997.

SHAW, JHF; HUMBERSTONE,DA; HOLDAWAY,C. Weight loss in patients with head and neck cancer: malnutrition or tumor effect? **Surgery Research (1):** 12-7, 1988.

SMITH, NC; BRUSH, M G & LUCKETT, S. Preparation of human placental villous surface membrane . **Nature 252:** 302-303, 1974.

STEVEN, D. H. Comparative placentation. **In:** Essay in Structure and Function. Academic Press, 1975.

STEVEN, DH . placental separtion in the ewe. **Journal Physiology, London 233 (1) :** 10-12 p., 1973.

TACHI, S; TACHI, C; LINDNER, HR. Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in the rat. **Journal Reproduction Fertility 21(1):**37-56 1970.

TOLEDO, M & GOMES-MARCONDES, MCC. Morphologic aspect of the placenta in young and adults rats bearing Walker 256 carcinoma. **Placenta, 1999** (sumetido à publicação).

WELSH, A O; ENDERS, A C. Penetration of the basal lamina of the uterine luminal epithelium during implantation in the rat . **The Anatomical Record, 212:** 47-56, 1985.

WELSH, A O; ENDERS, A C. Strutural interation of trofoblast and uterus during hemochorial placenta formation. **The Journal of Experimental Zoology**, **266**: 578-587, 1993.

WIDDOWSON EM. How fetous is fed . **Federation Procceding** **28**: 17-24,1969.

WINICK, M & NOBLE, A . Effects of prenatal nutrition upon pregnancy risk. **Clinical Obstetric Gynecology** **16 (1)**: 187-198,1973.

WINICK, M. & NOBLE, A . Quantitative changes in ribonucleic acids and proteins during normal growth of rat placenta. **Nature** **212**: 34-5, 1986.

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

YEN, SSC. The placenta as the third brain. **Journal Reproduction Medicine** **39(4)**: 277-280, 1994.

TRABALHO A SER PUBLICADO

Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma.

MÉRCIA TANCREDO TOLEDO AND MARIA CRISTINA CINTRA GOMES MARCONDES.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, Brazil.

Acknowledgment:

Research supported by FAPESP and FAEP-UNICAMP

All correspondence should be addressed to: MCC Gomes-Marcondes, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Unicamp, 13083-970, Brasil.

Key words: Walker 256 tumor, pregnancy, placenta

Running title: Placenta morphometry in tumor bearing rats.

Abstract

In the present study we investigated the influence of Walker 256 tumor growth on the modification of placental morphometry and on fetal development in young and adult pregnant rats. After mating, female rats were divided into six groups: Young control pregnant (YP), young pregnant with tumor (YW), young pregnant injected with ascitic fluid (YAs), adult control pregnant (AP), adult pregnant with tumor (AW) and adult pregnant injected with ascitic fluid (AAs). Rats from tumor-bearing groups (YW and AW) were injected with 2.5×10^6 viable tumor cells into the right flank. Rats from Ya and Aa groups received daily inoculations of ascitic fluid (2.0 mL, ip) obtained from tumor-bearing rats without tumor cells. After 21 days, all animals were killed and the placentas were weighed and fixed with paraformaldehyde for histological analysis. Compared with control groups (YP and AP), both tumor-bearing groups (YW and AW) presented the following changes: i) hemorrhage in the decidua and in the trophoblast giant cell layer; ii) disarrangement of the spongy zone, iii) restricted delimitation of the maternal and fetal blood vessels in the placental labyrinth; iv) hemorrhage and edema in the placental labyrinth. Similar results were observed in the placenta of groups injected with ascitic fluid (YAs and AAs). These results indicate that tumor development during pregnancy can have deleterious effects on placenta and fetus. These observations extend our previous data of extensive fetal reabsorption in both pregnant tumor-bearing and ascitic fluid-injected animals. These changes in placental morphology may be related to the synthesis and release of some factors

by the tumor and the host cells, which could act directly or indirectly on placental tissue.

INTRODUCTION

The placenta is responsible for the endocrine action and for the adaptation to large nutrient reserves. The placenta is an exchange organ between the maternal and fetal blood and these changes occur in the barrier present in the placental labyrinth (LOPES, 1992). Its own vascular and cellular arrangement can support the biochemical and nutritional flow, responsible for the link between mother and fetal development (YEN, 1994; BEVILACQUA & ABRAHAMSOHN, 1994).

The fast growth of Walker 256 tumor during pregnancy results in damage to the fetal growth (Gomes-Marcondes et al., 1990; Williamson et al., 1988). Fetal growth involves an increase of protein demand, emphasizing the importance of amino acids as nutrients in fetal life (Gill, 1984). The amount of available amino acids to the fetus highly exceeds the increment in tissue protein (CARBO et al., 1996). The growth and metabolic characteristics of the fetus are strongly similar to those of the rapidly growing tumor. The tissue metabolic activity needs appreciable amounts of glucose and amino acids for the oxidation and protein synthesis involved in the continuous growth of the fetus and of the tumor mass (CARBO et al., 1996).

Injury, trauma and tumor growth induce to an overproduction of cytokines in the mother that is subjected to these pathological states. In humans, TNF in midtrimester amniotic fluid is associated with impaired intrauterine fetal growth (Heyhorne et al., 1992). In addition, the cytokine may interfere with normal placental function. Silen et al. (1989) demonstrated that the administration of TNF

and interleukin-1 cause hemorrhage and abortion in experimental animals. Additionally, Hunt et al. (1990) showed that the placenta contains TNF receptors localized in the trophoblast and TNF inhibits the growth of the trophoblast, as measured by DNA metabolism and cellular proliferation.

Recent reports have shown a high percentage of fetal reabsorption, as well as low fetal weight in pregnant female rats inoculated with Walker 256 carcinoma and ascitic fluid, when sacrificed during different periods of pregnancy (GOMES-MARCONDES, 1998).

The present study was undertaken to investigate the possible modifications in the morphologic structure of the placenta on the 21st day of pregnancy in young and adult female rats bearing Walker 256 carcinoma or inoculated with ascitic fluid.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Housing

Virgin female albino Wistar rats were obtained from the animal house of UNICAMP. The animals were maintained in the Research Nutrition and Metabolism Laboratory of the Department of Physiology and Biophysics of UNICAMP. All rats were housed in cages in a temperature-controlled room (22±2°C) with 12 hour dark-light cycles and allowed to eat a semi-synthetic control diet (AIN-93) (Reeves et al., 1993).

Young (50-day-old, N=40) and adult (90-day-old, N = 34) rats were mated overnight with males of the same strain at the ratio of one male:four females

per cage (Baker, 1991). The first day of pregnancy was defined when sperm plug and motile sperms were detected in the vaginal smear.

Six groups of rats were studied for 21 days: 1) young pregnant (n=10, Y), 2) young tumor-bearing pregnant (n=16, YW), 3) young pregnant injected with ascitic fluid (n=14, Ya), 4) adult pregnant (n=9, A), 5) adult tumor-bearing pregnant (n=10, AW) and 6) adult injected with ascitic fluid (n=15, Aa).

Tumor and Ascitic fluid inoculation

The Walker 256 carcinoma, originally obtained from Christ Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge, Mass., USA, is maintained in our Laboratory under liquid nitrogen and through consecutive subcutaneous or intraperitoneal (ip) passages. Groups 2 and 5 were subcutaneously implanted with approximately 0.25×10^6 viable cells in 0.5 mL saline (determined by Trypan Blue dye exclusion), after the detection of pregnancy.

The ascitic fluid obtained from the intraperitoneal cavity of rats bearing an ascitic Walker 256 tumor for 5 days was centrifuged at 500 g for 10 min. for removal of the neoplastic cells. Groups 3 and 6 were injected daily ip with 2.0 mL of the ascitic fluid. General UKCCR guidelines for animal welfare were followed.

Experimental Procedures

Changes in body and tumor weights were recorded every two days. The tumor weight was calculated from 3 orthogonal linear measurements and compared with the data from a weight dimension curve (Gomes et al. 1983). After 21 days, all animals were killed by cervical dislocation. After killing, all animals

were perfused with saline (0.5% NaCl) for 10 min. following paraformaldehyde solution (4% in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) for 15 min. through the left ventricle and flushing through the right atrium. After this procedure, samples of the placentas and of reabsorbed fetuses were excised for histological analysis. Placenta and fetal reabsorption were embedded in paraffin, serially cut into at 5 μ m sections and stained with Hematoxylin and Eosin for morphologic analysis of the material with acquisition software, storage and printing of the microscopic images (Image-Pro Plus). Fetal reabsorption was detected by macroscopic and microscopic analysis. Percentage of hemorrhagic and edema zones were analyzed in all light microscopic images from the different experimental groups.

Statistical Analysis

Intergroup differences were assessed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (Woolson, 1976). The level of $P < 0.05$ was considered as statistical significant.

RESULTS

Figures 1 and 2 show comparative analyses of the images of the placentas of young and adult rats bearing Walker 256 carcinoma and inoculated with ascitic fluid, after 21 days of pregnancy, with their respective controls.

At the end of gestation (21st day), the placental tissue from adult control female rats was well structured and arranged (Figure 1, A and B), with few giant trophoblastic cells (GTC) in the spongy layer. Only a few giant cells were observed

in the central area, some of them exhibiting large cytoplasmic vacuoles. In the spongiotrophoblast tissue there were many lacunae in the labyrinth layer. The blood vessels contained blood often corresponding to still nucleate fetal erythrocytes.

The placentas of pregnant tumor-bearing rats presented a compact decidua (figure 1, C and D). The spongiotrophoblast layer showed a reduction in the number of giant trophoblast cells, intense hemorrhage, and presence of wide lacunae and edema sites. There were edema sites in the trophoblast labyrinth.

The inoculation of ascitic fluid promoted placental changes similar to those of the pregnant tumor-bearing rats (Figure 1, E and F), such as reduction of the number of TGC, edema sites and hemorrhage in the spongy and labyrinth trophoblast layers.

The placentas of young female rats were similar to their respective adult controls Figure 2 (A and B). Placental tissue was well arranged, with few giant cells in the spongy layer and the labyrinth layer was well structured with clear delimitation in blood vessels.

Figure 2 (C and D) shows that the placenta tissues of young tumor-bearing rats presented alterations similar to those found in adult rats, such as reduction in the number of giant trophoblastic cells, hemorrhage, lacunae and edema sites.. The inoculation of ascitic fluid promoted damage to the placental tissue similar to that observed in tumor-bearing rats (Figure 2, E and F).

The intensity of edema and hemorrhage incidence in the different tissue layers of the placenta were shown in Figure 3. There was high incidence of edema in decidua, spongiotrophoblast and labyrinth layer in pregnant tumor bearing rats (80 - 100% in adult group; 70-100% in young rats; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis test, comparing to control group). These results were similar in ascitic groups. The hemorrhage incidence was higher, around 70% and 60% in the decidua, in both pregnant adult and young tumor-bearing rats, respectively; there was 60% and 100% in spongiotrophoblast; and 100% in the labyrinth layer in both pregnant tumor bearing rats ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test, comparing to control group). No difference was found between cancer and ascitic fluid injected rats (Figure 3).

DISCUSSION

The tumor growth and ascitic fluid injection induced hemorrhage and edema in the placental tissue from all experimental groups with accompanying fetal demise (high percentage of fetal reabsorption).

This study shows that young and adult tumor-bearing rats presented hemorrhage and edema of greater intensity compared to control female rats. In the young female rats inoculated with ascitic fluid there was high infiltration of lymphocytes and granulocytes, which was not observed in the tumor-bearing rats. The tissue layers were also altered in the presence of the cancer, mainly the spongy layer, both in young female and adult rats. A lower maternal/fetal nutrient exchange occurred probably due to the edema and hemorrhage.

The formation of the chorioallantoic placenta in rats takes place in specialized regions of the endometrium, defined as implantation chambers (Abrahamsohn & Zorn, 1993; Steven, 1975; Welsh & Enders, 1991). During the first days after implantation (5-10 days) the embryo is located in the antimesometrial part of the implantation chamber and does not reach the mesometrial part of the chamber until day 10. In order to obtain access to the maternal blood supply, the conceptus induces the disruption of several maternal tissues and starts to invade the extracellular matrix beneath the uterine epithelium. When the trophoblast has established (after day 8) the definitive connection with the maternal blood supply and the conceptus starts to occupy the implantation chamber (Abrahamsohn & Zorn, 1993; Steven, 1975; Welsh & Enders, 1991).

The function of the placenta is to promote ample nutrition to guarantee all the stages of fetal development, and consequently this organ is essential to the growth of a healthy fetus. It seems that signals originating from the fetus modulate placental activities. The integrity of the communication between placenta and fetus is of critical importance for intrauterine growth. The interaction of factors such as insulin like growth factor and epidermal growth factor and their respective effects begin to become clear (Garnica et. al., 1996). Malnutrition, for example, reduces the amount of nutrients causing alterations in placental metabolism and reducing the fetal growth and development (Lopes, 1992;Gomes-Marcondes, 1997). However, these factors do not interfere with the formation and development of the placental labyrinth (Lopes, 1992).

The extremely rapid growth rate of the fetus accounts for a significant fraction of fetal nutrient requirements throughout gestation (Aldoretta & Hay, 1994). Placental transfer of glucose to the fetus is directly related to maternal plasma glucose concentration, uterine growth uptake and the gradient of maternal/fetal plasma glucose concentration (Aldoretta & Hay, 1994). Although maternal blood glucose level was normal in ascitic pregnant rats (previous results, Gomes-Marcondes, 1998) there was a reduction in fetal weight and number of pups and a high fetal reabsorption rate. The active transport of glucose through the placenta, as well as the modification of the composition of some nutrients through its own metabolic activity, could be changed due to factors produced by the neoplastic and/or host cells. They probably harmed or stopped normal fetal development, acting directly or indirectly on placental tissue.

Cervello et al (1993) showed that the administration of benzo(a)pyrene to pregnant rats significantly increase glutathione S-transferase (GST) activity in placental tissue extract. This GST system can be induced in the placenta and also in the fetus in rats challenged by the administration of benzo(a)pyrene. These authors suggested a protective role of this enzyme during exposure to carcinogens. However, at the doses used in that investigation, this protection is not sufficient to prevent the appearance of toxic effects on the reproductive status (Cervello et al 1993). In the study by Kliman et al. (1995), which analyzed human placentas, villous edema was associated with antenatal hypoxia, and its early appearance after the initiation of chorioamnionitis may be associated with significant fetal hypoxia (Kliman et al., 1995).

Studies on the relationships between cytokines and their potent effects on placental tissues were currently available. These studies proposed that some cytokines may promote implantation and early development (e.g. CSFs) while others could be deleterious (TNF), and at an appropriate balance between the two was therefore essential (Chard, 1995). Some studies report that increased levels of IL-1, IL-6 and TNF- α are all associated with pregnancy termination due to infection (Romero et al. 1989; Hillier et al. 1993) and that administration of these cytokines can cause feto-placental damage in rats (Silen et al. 1989).

The observed edema and hemorrhage of the labyrinthine placenta, with evidence of poorly organized layers in tumor-bearing rats which were similar in the ascitic fluid injected, suggested that there were many factors acting in the different layers inducing these injury. It has been suggested previously that the trophoblasts

of the labyrinthine placenta are the primary site of injury after LPS administration (Silen et al. 1989). Alternatively, IL-1 and TNF have been shown to induce the expression of specific leukocyte-binding proteins by cultured vascular endothelial cells (Pober, 1988). The trophoblasts are the cells lining the blood space of the placenta, it is conceivable that these cytokines have a similar effect on trophoblasts, and that local leukocyte-mediated injury occurs after binding.

Recent studies have identified IL-1 and TNF in the amniotic fluid obtained from human pregnancies complicated by infection and preterm labor (Romero et al, 1989). These same investigators demonstrated that LPS induces the production of IL-1 and TNF by human decidua *in vitro*. In addition, both of these cytokines were shown to stimulate prostaglandin production by human amnion *in vitro* and were related to premature labor and abortion (Clark & Chaudhri, 1988).

Another group, however, has measured significant quantities of TNF α in the amniotic fluid of normal second and third trimester human pregnancies, suggesting that cytokines may serve a normal regulatory function during human pregnancy without prompting premature labor or abortion (Jäättelä et al. 1988). It is noteworthy that several factors such as transforming growth factor β (TGF β), tumor necrosis factor α (TNF α) and prostaglandin, which have been shown to induce apoptosis in other tissues (Rotello et al. 1991). The high concentration of these cytokines near the embryo could also induce apoptosis in maternal immune competent cells. Thus programmed death of the stromal cells not only produces additional space for the conceptus, but also could represent a continuous

protective barrier between the fetal and maternal tissue (Piacentini &Auturoi, 1994).

Additional investigation will be necessary to further understand the precise role of cytokines in human and animal pregnancies, especially in placental tissue, and experiments to further investigate this point are currently being developed.

References

- Abrahamsohn, P. A. & Zorn, TMT.** (1993) Implantation and decidualization in rodents. *The Journal of Experimental Zoology* **266**, 603-628.
- Aldoretta, PW & Hay, WW.** (1994) Fetal nutrition. *Nutrition Research* **14(6)**: 929-965.
- Baker, H.L.:** (1991) Reproduction and breeding. In. BAKER, H.L.; LINDSEYL, J.R.; WEISBROTH, S.H.: The laboratory rat. New York, Academic Press, v. I, cap. 7, p. 153- 168.
- Bevilacqua, E.; Abrahansohn, P.A.** (1994) Invasiveness of Mouse Trophoblastic Cells in Connective Tissue. *Acta Anatomica* **150**: 246-252.
- Carbo, N.; Lopez-Soriano, F.J.; Fiers, W.; Argiles, J.M.** (1996) Tumor Growth Results in Changes in Placental Amino Acid Transport in The Rat: A tumor Necrosis Factor α -mediated Effects. *Biochemical Journal* **313**: 77-82.
- Cervello, I, Lafuente, A, Giralt, M, Mallol, J.** (1992) Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. *Placenta* **13**, 273-280
- Chard, T.** Cytokines in implantation. (1995) *Human Reproduction Update* **1(4)**, 385-396.
- Clark, IA & Chaudhri, G.** (1988) Tumor Necrosis factor in Malaria-induced abortion. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **39**: 296-298.
- Garnica, A.D. & Chan, W.Y.** (1996) The Role of the Placenta in Fetal Nutrition and Growth. *Journal American College Nutrition* **15 (3)**: 206-222.

Gill, T. J. (1984) The borderland of embryogenesis and carcinogenesis. Major histocompatibility complex-linked genes affecting development and their possible relationship to the development of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **738**, 93-102.

Gomes -Marcondes, M.C.C.- (1994) 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 (**Doctoral Thesis**, Biomedical Institute at University of São Paulo).

Gomes, M.C.C; Bevilacqua, R.G.; Lima-Gonçalves, E.; Resende, L. (1983) Modelo Experimental de Avaliação do Desenvolvimento do Tumor Maligno. – *Ciência & Cultura*, **35 (7)**: 736.

Gomes-Marcondes, M.C.C.- (1997) “Correlação entre Câncer, Gravidez e Desnutrição Protéico Calórica. Estudo Experimental em Ratos Jovens”. Projeto Auxílio FAEP-UNICAMP, Laboratório de Nutrição e Fisiologia Digestiva, IB, Unicamp, São Paulo.

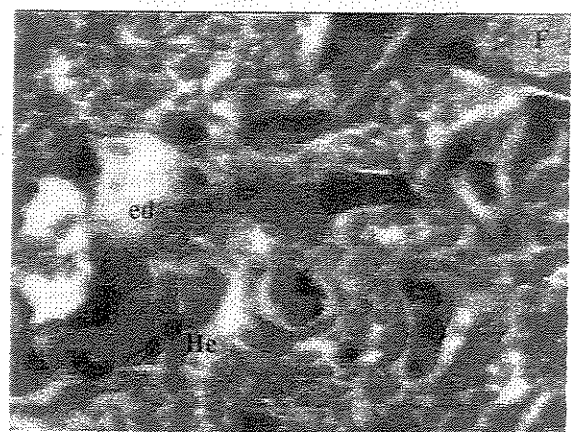
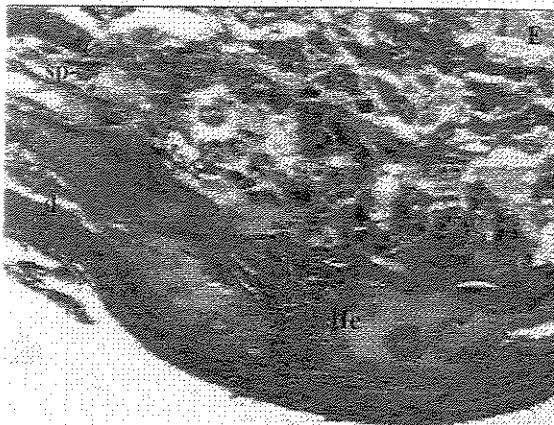
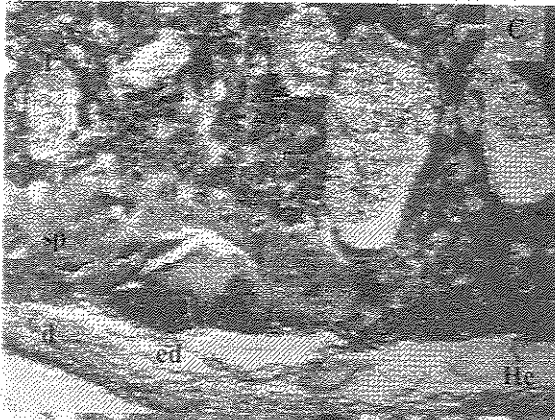
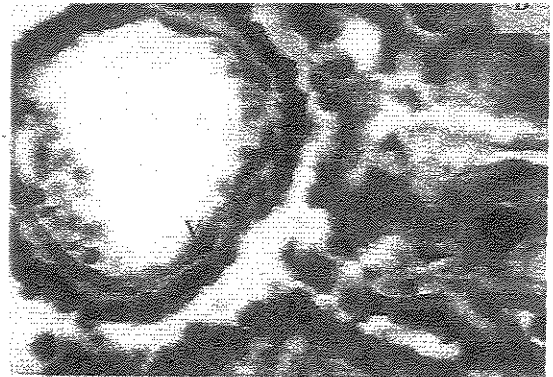
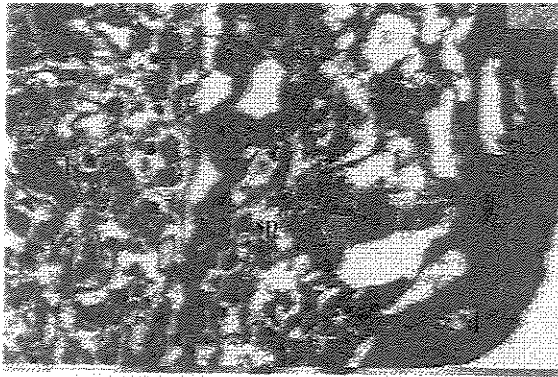
Gomes-Marcondes, M.C.C.; Cury, L.; Curi, R. (1998) Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. *Cancer Research Therapy and Control* **5**: 277-283.

Gomes-Marcondes, M.C.C.; Cury, L.; Parreira MR, Elias, CF. (1990) Effects of Walker 256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy. *Brazilian Journal Medical Biology Research* **23**: 909-913.

- Heyhorne KD, Within SS, Mc Gregor JA** (1992) Tumor necrosis factor-alpha in midtrimester amniotic fluid associated with impaired intrauterine fetal growth. *American Journal Obstetric Gynecology* **167** (4Pt 1): 920-925.
- Hillier, S.L., Witkin, S.S., Krohn, M.A., Watts, D.H., Kiviat, N.B., & Eschenbach, D.A.** (1993) The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis and chorioamnion infection. *Obstetric Gynecology* **81**, 841-948.
- Hunt, JS, Atherton, RA & Pace, JL.** (1990) Differential responses of rat trophoblast cells and embryonic fibroblasts to cytokines that regulate proliferation and class I MHC antigen expression. *Journal Immunology* **145**: 184-190.
- Jäättelä M, Kunsela, P, Saksela, E.** (1998) Demonstration of tumour necrosis factor in human amniotic fluids and supernatants of placental and decidual tissues. *Laboratory Investigation* **58**: 48-52.
- Kliman, H.J., Perrota, PL, Jones, DC.** (1995) The efficacy of the placental biopsy. *American Journal Obstetric Gynecology* **173**, 1084-1088.
- Lopes, C.M.D.** (1992)- Efeito da desnutrição protéico calórica (DPC) sobre o labirinto placentário de ratas jovens: observações morfológicas ultraestruturais – **Doctoral Thesis**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- Morris, G.** (1975) Placental evolution and embryonic nutrition. In Comparative Placentation. Essays in structure and function. Steven, DH. Ac. Press. NY. C.4, p87-107.

- Pau, M.Y. & Milner, J.A** – (1981) Arquire deficiency during gestation and lactation in the rat. - *Journal Nutrition* **111**: 184-193.
- Piacentini, M & Autuori, F.** (1994) Immunohistochemical localisation of tissue transglutaminase and Bcl-2 in rat uterine tissues during embryo implantation and post-partum involution. *Differentiation* **57**: 51-61.
- Pober, J.S.** (1988) Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: Physiology and pathology. *American Journal Pathological* **133**, 426-433.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, JJr. G.C.** (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 AIN-76 rodent diet. *Journal Nutrition*, **123**, 1939-1951.
- Romero, R., Manogue, K.R., Mitchell, M.D., Wu, Y.K. Oyarzun, E., Hobbins, J.C. & Cerami, A.** (1989) Infection and labor. IV. Cachetin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *American Journal Obstetric Gynecology* **161**, 336-341.
- Rotello,RJ, Lieberman ,RC, Purchio, AF & Gerschenson LE.** (1991)
Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor β 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proceedings National Academic Science USA* **88**, 3412-3415.
- Silen, ML, Firpo, A, Morgello, S, Lowry, SF, Francus, T.** (1989) Interleukin-1- α and tumor necrosis factor- α cause placental injury in the rat. *American Journal of Pathology* **135**: 239-244.

- Steven, DH.** (1975) Placental Separation in the Ewe. *Journal Physiology*, London, **233(1)**: 10-12.
- UKCCR:** (1988) United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Laboratory Animals* , **22**, 195-201.
- Welsh , AO & Enders , AC.** (1991) Chorioallantoic Placenta Formation in the Rat II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *The American Journal of Anatomy* **192**: 347-365.
- Williansom, DH, Wood, S, Evans, RD.** (1988) Tumor growth and lipid metabolism during lactation in the rat. *Advents Enzyme Regulation* **27**: 93-104.
- Woolson, R.F.** (1975) In: Statistical methods for the analysis of biomedical data. USA, John Wiley & Sons, c. 11, pp. 364-383.
- Yen, SSC.** (1994) The placenta as the third Brain. *Journal of Reproduction Medicine* **39(4)**:277-280.



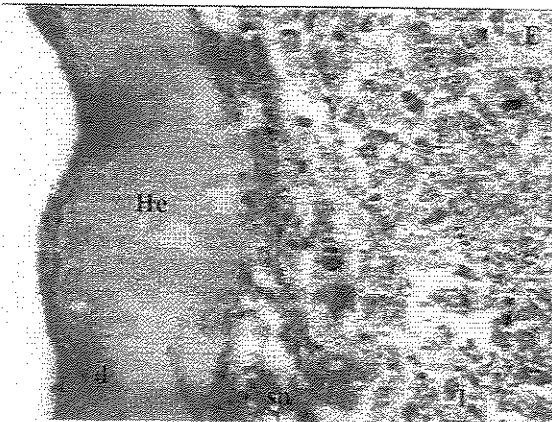
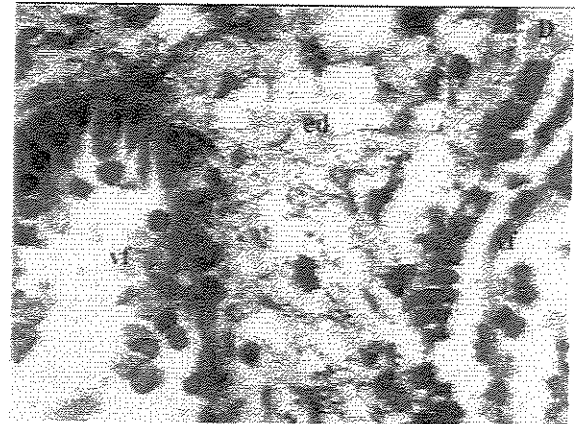
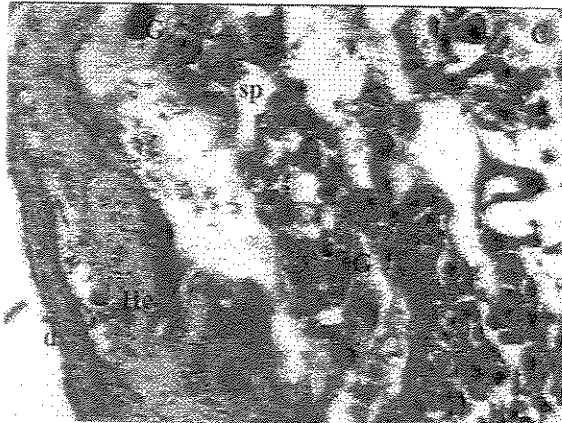
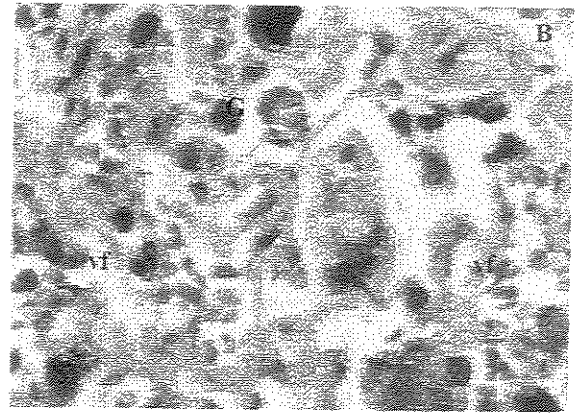


Figure 1: Light microscopy of placental tissue from adults rats. A,B normal arrangement of tissue layers in control placenta group; C,D edema and hemorrhagic regions in placenta tissue in tumor-bearing groups; E,F edema and hemorrhagic regions in injected ascitic fluid rats. (d) Decidua, (sp) spongy trophoblastic, (l) labyrinth layers; (ed) edema and (He) hemorrhagic regions; (v) chorionic villous. A,C,E 40x. B,D,F 100x.

Figure 2: Light microscopy of placental tissue from young rats. A,B normal arrangement of placenta layers in control group, chorionic villous limit is well done; C,D edema and hemorrhagic regions in placenta tissue in tumor-bearing groups; E,F edema and hemorrhagic regions in injected ascitic fluid rats. (d) Decidua, (sp) spongy trophoblastic, (l) labyrinth layers; (ed) edema and (He) hemorrhagic regions; (v) chorionic villous. A,C,E 40x. B,D,F 100x.

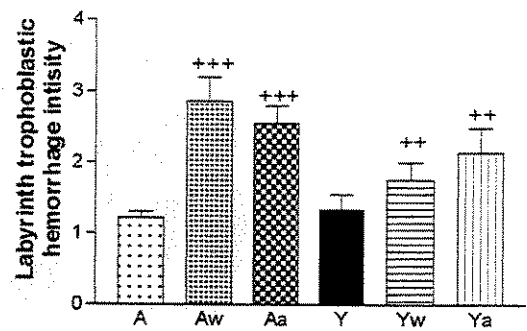
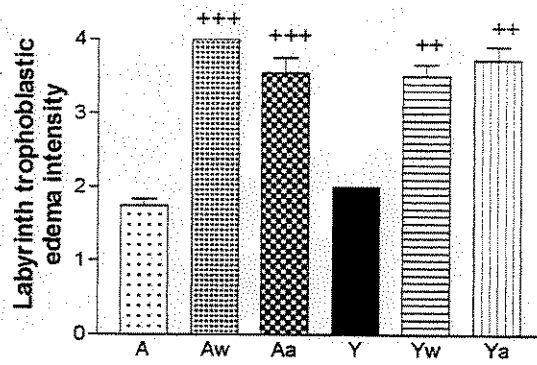
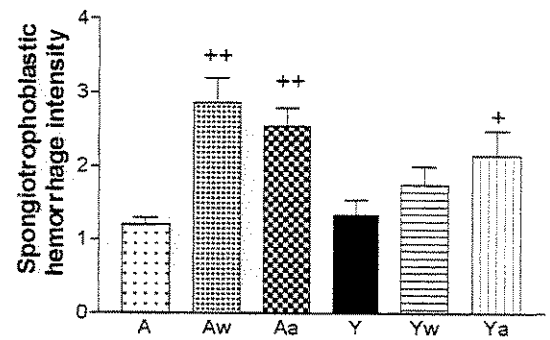
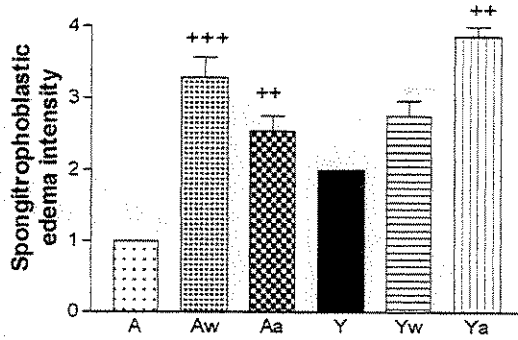
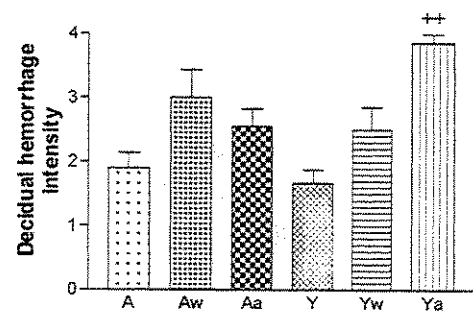
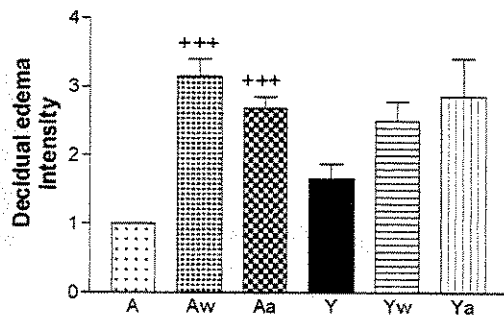


Figure 3 : Intensity of edema and hemorrhage in the different tissues layers of the young and adults' placenta.

A= adult; Aw=adult tumor bearing; Aa= adult injected with ascitic fluid. Y= young; Yw= young tumor bearing; Ya= young injected with ascitic fluid.

+ = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$; +++ = $p < 0,001$. Kruskal-Wallis followed Dunn's test compared to controls groups.