

VANESSA TANCON

**QUANTIDADE DE GLICOGÊNIO DECIDUAL E TAXA DE
IMPLANTAÇÃO DO BLASTOCISTO NO ÚTERO DE RATAS
PORTADORAS DO TUMOR DE WALKER 256**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Biologia Celular (BC-013) como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.º Dr. Cláudio P. S. Greca

CURITIBA

2002

TERMO DE APROVAÇÃO

VANESSA TANCON

Quantidade de Glicogênio Decidual e Taxa de Implantação do Blastocisto no Útero de Ratas Portadoras do Tumor de Walker 256

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio de Paula Soares Greca
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Helena Mendonça
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Prof^ª. Cecília Beatriz Helm Niederheitmann
Departamento de Biologia Celular, UFPR

Curitiba, 04 de abril de 2002.

A minha mãe,
que sempre apoiou minha
vocação e me ensinou a lutar
por meus desejos.

Aos meus irmãos,

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Claudio Greca pela confiança e orientação criteriosa, dedicada e profissional, além das sugestões na apresentação da monografia.

Ao Prof. Dr. Claudio da Cunha, por sua compreensão e paciência.

Ao Renato, um grande amigo, sempre solícito e paciente.

À amiga Maria Otávia, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao Nino, pelas lições de profissionalismo e competência.

À Eliane e à D. Rosa, por toda ajuda e companheirismo.

Ao Edson Tanhoffer, pela liberdade de continuar sua pesquisa.

Ao Fábio, pela ajuda quando o trabalho exigia quatro mãos.

À Rô, secretária da coordenação de Ciências Biológicas, pelo auxílio e bom humor em todos os momentos.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER	01
1.2 IMPLANTAÇÃO E DECIDUALIZAÇÃO	02
1.3 CONSEQÜÊNCIAS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE GESTAÇÃO E CÂNCER	04
2. OBJETIVOS	07
3. MATERIAIS E MÉTODOS	08
3.1 ANIMAIS	08
3.2 GRUPOS DE ESTUDO E CRUZAMENTO	08
3.2.1 Grupo I	08
3.2.2 Grupo II	09
3.2.3 Grupo III	09
3.3 ACASALAMENTO	09
3.4 CONTROLE PONDERAL	10
3.5 TUMOR DE WALKER 256	11
3.6 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM DO TUMOR	11
3.7 VIABILIDADE CELULAR	12
3.8 TRANSPLANTE DAS CÉLULAS DO TUMOR	12
3.9 OBTENÇÃO DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E FRAGMENTOS DO FÍGADO	13
1.10 HISTOQUÍMICA COM ÁCIDO PERIÓDICO E REATIVO DE SCHIFF (PAS)	14
1.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS	16

4.1 TAXA DE MORTALIDADE	16
4.2 EVOLUÇÃO PONDERAL	16
4.2.1 Peso da neoplasia	16
4.2.2 Peso da carcaça	16
4.3 NÚMERO DE SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO	19
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA	20
5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	22
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

Estudos sobre a influência do câncer na implantação do blastocisto são pouco comuns na literatura mundial. A gestação promove adaptações metabólicas direcionadas para assegurar a implantação, o crescimento e o desenvolvimento satisfatório do embrião. Entretanto, a presença de um tumor provoca um intenso catabolismo no indivíduo, diminuindo as reservas de glicogênio, proteínas e gordura. Os efeitos do crescimento do tumor de Walker 256 em ratas adultas de sétimo e oitavo dias gestacionais, suas conseqüências na quantidade de glicogênio acumulado na decídua e na implantação fetal foram pesquisadas. Três grupos de ratos fêmeas Wistar, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, foram divididos: grupo controle (grupo I), grupo tratado com tumor ativo (grupo II) e grupo tratado com tumor inativo (grupo III). As ratas do grupo II foram inoculadas, subcutaneamente no flanco direito, com uma suspensão de células do tumor de Walker 256 (2×10^7 cel/ml). O grupo controle recebeu salina e o grupo III foi inoculado com células do tumor previamente aquecidas a 60C e portanto, inativadas por desnaturação. As ratas foram postas em gaiolas coletivas com machos. As ratas prenhes eram separadas e acompanhadas durante sete dias, sendo, ao final desse prazo, sacrificadas para coleta do fígado e sítios de implantação. O grupo portador do tumor sofreu uma redução no número de embriões, no peso da carcaça e na concentração de glicogênio, em comparação aos grupos I e III. Estes dados sugerem que o nível de glicogênio decidual está ligado ao sucesso da implantação fetal.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais sobre o Câncer

Entre as células dos organismos multicelulares não há competição, ao contrário, existe cooperação, sendo uma condição vital à sobrevivência de um organismo complexo. As células neoplásicas não se submetem a esta regra, pois tem o DNA modificado e escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular (LIOTTA, 1992).

Os tumores malignos podem matar o hospedeiro devido à invasão e compressão dos tecidos vizinhos, ou ainda, à intensa espoliação de nutrientes do hospedeiro. Segundo SVANINGER *et al.* (1989), o óbito ocorre habitualmente pela associação destes fatores. Em aproximadamente 70% dos pacientes com câncer, há alteração do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, numa condição de intenso catabolismo resultando em perda de peso, denominada de síndrome de caquexia (MORRISON, 1973).

Em resposta às doenças neoplásicas ou infecciosas, o organismo secreta substâncias bioativas como as citocinas, que alteram o metabolismo. Dentre estas se incluem o gama-inteferon, interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF). Segundo BEUTLER & CERAMI (1990) E LUNDHOLM (1989), este último atua sobre o centro de apetite de forma inibitória, sendo anorexígeno. Estudos realizados em camundongos inoculados com TNF, mostraram uma redução na ingesta alimentar e hídrica, e conseqüentemente importante perda de peso corporal (MAHONY & TISDALE, 1988).

Vários autores, dentre os quais LEVIN & GEVERS (1981a; 1981b); SAUER *et al.* (1983); LUQUE *et al.* (1990); FERNANDES *et al.* (1991) e FERNANDES (1989; 1995), afirmam que as células cancerosas apresentam grande

capacidade de utilização de glicose, sendo este o substrato para sua demanda energética. O carcinosarcoma de Walker 256, modelo utilizado neste trabalho, é incapaz de utilizar ácidos graxos como substrato energético (TISDALE & BRENNAN, 1986).

1.2 Implantação e Decidualização

De acordo com PEDERSEM (1988), a implantação do embrião está longe de ser uma condição patológica, mas também é uma condição especial, que envolve divisão e diferenciação celular, além de modificações hormonais e metabólicas no endométrio.

Considerando o ponto de vista metabólico e de reservas fisiológicas e energéticas, a gestação normal apresenta duas fases distintas, tanto em mulheres quanto em ratas (HERRERAS *et al.*, 1991). Do início até a metade da gestação, observa-se um acúmulo de gordura no tecido adiposo, deposição de glicogênio no fígado e músculos e incremento de massa magra, caracterizando uma fase de anabolismo. Na segunda metade da gestação ocorre a mobilização destas reservas, caracterizando uma fase catabólica, em decorrência de grandes gastos energéticos com o crescimento do concepto (FREINKEL & METZGER, 1992; HERRERAS *et al.*, 1991).

O mecanismo da implantação é uma seqüência complexa de eventos, iniciada com o posicionamento do embrião no útero e sua ligação com o epitélio luminal. Após um curto período em que o blastocisto é transportado pelo oviduto, ocorre à implantação e permanência na cavidade uterina (BOVING, 1971). Este curto período, delimitado entre o instante da fecundação e a implantação, possui tempo definido para cada espécie, sendo conhecido pelo termo Janela de

Implantação (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). Segundo SNELL (1941), nos camundongos a implantação se estabelece no quinto dia após a detecção de espermatozóides em lâminas de esfregaço vaginal, enquanto que em ratas o processo se estabelece no sexto dia (ENDERS & SCHLAFKE, 1967).

Para o sucesso deste primeiro passo do desenvolvimento embrionário, são essenciais condições estruturais, bioquímicas e hormonais adequadas (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). Nos roedores, nos primeiros dias de gestação, ocorrem modificações celulares e vasculares no endométrio ((PSYCHOYOS, 1960, 1961, FINN & McLAREN, 1967), proliferação de fibroblastos (FINN, 1977), remodelação do colágeno endometrial (ZORN *et al.*, 1986, 1989). ABRAHAMSOHN (1983) mostrou que tais alterações eram típicas de segmentos uterinos onde o blastocisto interage com o endométrio, os sítios de implantação, não ocorrendo nas regiões intermediárias, os chamados sítios de interimplantação.

Todo o conjunto destas alterações endometriais origina um novo tecido com tempo de existência relativamente curto, denominado decídua (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). A decidualização do endométrio tem início na mucosa uterina antimesometrial que circunda a câmara de implantação, local onde se aloja o blastocisto (MOSSMAN, 1987). As células deciduais se originam da diferenciação de fibroblastos endometriais, com aumento do volume celular e marcante diminuição dos espaços extracelulares (LUNDKISVIST, 1978).

As células deciduais contêm níveis elevados de glicogênio, lipídios e filamentos intermediários, sendo a presença de Desmina considerada um marcador da decidualização (GLASSER & JULIAN, 1986). Em ratas, o auge da decidualização antimesometrial é atingido no décimo dia de gestação (PARR & PARR, 1989). Segundo GREGOIRE & RICHARDSON (1970), o glicogênio contido no útero dos mamíferos durante o início da gestação, é uma importante

fonte nutricional fornecida pelo endométrio ao embrião.

Vários autores como KOSTYO, (1957); DEMERS *et al.* (1972); PARVEZ & PARVEZ, (1974); CHEW & RINARD, (1979); (VASILENKO, 1981), em estudos realizados em ratas, afirmam que ao longo da gestação, a quantidade de glicogênio uterino tende a cair a níveis inferiores às quantidades encontradas em fases iniciais da gestação. Entretanto, estes valores elevam-se bruscamente a partir do 6º dia, especialmente devido ao aparecimento das células decíduais. Estes mesmos autores também inferem que, a partir do 5º dia de gestação, já é possível mensurar a quantidade de glicogênio especificamente nos sítios de implantação.

1.3 Conseqüências da associação entre gestação e câncer

O comportamento do embrião no organismo materno apresenta semelhanças com o câncer, pois ambos provocam mudanças hormonais e metabólicas no organismo hospedeiro. Além disso, os tecidos do embrião e do tumor possuem um crescimento exponencial e são dependentes de uma fonte adequada de glicose e aminoácidos (STRICKLAND & RICHARDS, 1992). Segundo LENTZ (1990), a gravidez e o câncer são as duas únicas circunstâncias biológicas em que o tecido antígeno é tolerado por um sistema imune aparentemente intacto.

O tumor de Walker 256 produz efeitos prejudiciais especiais durante a gestação (CINTRA-GOMES *et al.*, 1990), como redução da quantidade protéica e do peso placentar, hemorragias intensas e edema, além de diminuição no número e peso dos fetos. (TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999). Esta diminuição é conseqüência das mortes e reabsorções fetais, que ocorrem em 25% dos animais durante a evolução tumoral (MARCONDES *et al.*, 1998). Entretanto, a inoculação

em ratas prenhes da ascite do hepatoma Yoshida AH-130, outro tumor usado em modelos experimentais, provoca importante diminuição no peso corpóreo materno e nenhuma modificação no peso fetal (CARBÓ *et al.*, 1998).

Recentes pesquisas mostram que a associação entre câncer e gravidez apresenta uma incidência de 0,3% dos casos da doença em mulheres (NACIONAL CANCER INSTITUTE, 2000). Dentre os vários tipos de câncer, o de mama é a neoplasia maligna mais comum associada à gestação. FIORICA (1994) indica que uma a cada 10000 gestantes sofrerá de carcinoma mamário. Segundo o The Mid-Atlantic Breast Cancer Information Exchange (2000) os resultados são mais sombrios, indicando que um em cada 1000 – 1500 nascimentos vivos teve complicações causadas por um câncer materno. Trabalhos realizados por KING *et al.* (1985) em pacientes com câncer de mama, mostram que 40% das gestações foram interrompidas, sendo 12% por abortamento espontâneo e o restante provocado após confirmação de inviabilidade do feto após o nascimento. As demais foram acompanhadas até o fim, 45% com parto natural, ou por via alta, com recém-natos normais; 48% de óbito fetal e 7% de morte perinatal. PETTER & SCHOENEMAN (1970) quantificaram que 24% das pacientes oncológicas grávidas desenvolveram metástases em anexos embrionários ou fetais.

Mulheres portadoras de mutação nos genes BRCA 1 e BRCA 2 formam um grupo de alto risco em desenvolver câncer de mama. Médicos britânicos investigaram a alta incidência de gravidez associada a câncer nessas mulheres e concluíram que a gestação aumenta o risco de câncer de mama nas portadoras de mutações BRCA 1 e BRCA 2 e que cada gestação subsequente aumenta o risco de associá-la a um câncer (JERNSTROM *et al.*, 1999).

Estudos clínicos apontam que o prognóstico materno mantém-se inalterado (GARBE, 1993). Vários pesquisadores afirmam que o prognóstico do câncer de mama em mulheres grávidas é pior do que na população não grávida. Isto porque,

normalmente, há um atraso médio de 10 semanas entre o início dos sintomas e o diagnóstico, contribuindo para o avanço da doença (AVISAR *et al.*, 2000; AJARIM *et al.*, 2000). Entretanto, de estágio para estágio, o prognóstico é similar (GEMIGNANI *et al.*, 1999; MOORE & FOSTER, 2000).

A incidência de neoplasias durante a gestação tende a aumentar, visto que as mulheres estão retardando a natalidade por motivos sociais e profissionais (GEMIGNANI & PETREK, 2000). Muitos tipos de câncer, em especial o carcinoma mamário, são idade dependente. Aos 40 anos de idade, a possibilidade de desenvolver câncer de mama é seis vezes maior que aos vinte (PETREK, 1994).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista as informações fornecidas pela literatura pertinente, a presente monografia procurou avaliar qualitativamente os níveis de glicogênio deciduais no sétimo e oitavo dias de gestação em ratas, sob a vigência de um modelo de câncer, o tumor de Walker 256, associando a queda dos níveis de glicogênio como consequência da caquexia cancerosa, com a redução da taxa de implantação.

Considerando a carência de estudos que correlacionam o evento de implantação do blastocisto com o câncer, os objetivos desta pesquisa foram:

1. Analisar os efeitos do crescimento neoplásico na quantidade dos grânulos de glicogênio decidual.
2. Relacionar a alteração da quantidade de glicogênio decidual com o número de embriões implantados.
3. Analisar sob o ponto de vista qualitativo cortes histológicos de sítios de implantação de ratas nos dias 7 e 8 de gestação, aplicando-se colorações de rotina (Hematoxilina) e colorações histoquímicas (Ácido Periódico e Reativo de Schiff).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente monografia foi desenvolvida no Laboratório de Matriz Extracelular - Biologia Tecidual do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

3.1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizadas 36 ratas da linhagem Wistar, com idade entre 90 e 120 dias, obtidas do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde permaneceram em regime controlado de iluminação (ciclos de 12 horas claro/escuro) e temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e alimento *ad libidum*.

Todos os animais eram alimentados com a ração Nuvital Nutrientes Ltda. tipo Nuvilab CR1.

3.2 Grupos de Estudo e Cruzamento

3.2.1 Grupo I

Doze ratas grávidas controle foram divididas aleatoriamente em 2 subgrupos (IA e IB) de 6 animais cada. Os animais dos subgrupos IA e IB receberam injeção de placebo (1mL de salina a 0,9%), via subcutânea, no flanco direito, sempre oito dias antes da análise dos dados.

- 1) Subgrupo IA – ratas grávidas avaliadas no 7° dia de gestação (7° DG);
- 2) Subgrupo IB – ratas grávidas avaliadas no 8° DG.

3.2.2 Grupo II

Doze ratas grávidas tratadas com tumor ativo divididas aleatoriamente em 2 subgrupos (IIA e IIB) de 6 animais cada. Os animais dos subgrupos IIA e IIB foram inoculados com 1 mL de solução contendo 2×10^7 células vivas de tumor de Walker 256, via subcutânea, no flanco direito, sempre oito dias antes do momento da análise.

3) Subgrupo IIA – ratas grávidas avaliadas no 7º DG;

4) Subgrupo IIB – ratas grávidas avaliadas no 8º DG.

3.2.3 Grupo III

Doze ratas grávidas tratadas com tumor inativado, divididas aleatoriamente em dois subgrupos (IIIA e IIIB) cada um 6 animais. Os animais dos subgrupos IIIA e IIIB foram inoculados com 1 mL de solução contendo 2×10^7 células inativadas de tumor de Walker 256, via subcutânea, no flanco direito, sempre oito dias antes do momento da análise.

5) Subgrupo IIIA – ratas grávidas avaliadas no 7º DG;

6) Subgrupo IIIB – ratas grávidas avaliadas no 8º DG.

3.3 Acasalamento

Para gerenciamento dos grupos de acasalamento foi adotada a seguinte metodologia: 48 ratas foram divididas aleatoriamente nos 3 grupos anteriormente descritos.

Para formar o grupo I, 16 ratas receberam 1mL de cloreto de sódio 0,9%, via subcutânea, no flanco direito. O grupo II foi formado por 16 ratas que receberam, via subcutânea no flanco direito, 1 mL contendo 2×10^7 células vivas do

tumor de Walker 256. No grupo III, 16 ratas foram inoculadas com 1 mL de solução contendo 2×10^7 células inativadas do tumor de Walker 256, via subcutânea no flanco direito.

No mesmo dia, todas foram colocadas com machos adultos (90 – 100 dias de idade), na proporção de quatro fêmeas para um macho em gaiolas coletivas de acordo com o método de harém descrito por BACKER (1991) e assim mantidas por 48 horas. Na manhã seguinte e subsequente, foi realizada metodologia de detecção de espermatozoides no lúmen vaginal. As ratas que apresentaram resultado positivo, foram consideradas prenhes e separadas do grupo. Segundo ENDER & SCHALFKE (1967), este é considerado o 1º dia gestacional (1ºDG).

As ratas que apresentaram confirmação no primeiro dia, formaram os subgrupos IB, IIB e IIIB, conforme inoculado prévio, sendo sacrificadas no oitavo dia gestacional.

Por outro lado, as fêmeas que tiveram a prenhez positivada no segundo dia, formaram os subgrupos IA, IIA e IIIA, conforme solução inoculada, sendo sacrificadas no sétimo dia gestacional.

As ratas que não engravidaram foram excluídas da pesquisa.

Com esta metodologia, todas as ratas foram inoculadas e sacrificadas juntas, o que garantiu o mesmo tempo de evolução tumoral em idades gestacionais diferentes.

A detecção dos espermatozoides foi realizada através de esfregados vaginais, que obedecem aos padrões descritos por ALLEN (1922).

3.4 Controle ponderal

Durante o período experimental as variações do peso corporal foram controladas, nos dias 0, 3, 7 e 8, por medição direta em balança.

Os pesos dos tumores foram avaliados no dia 8, por medida direta em balança e nos dias 3 e 7, utilizando-se a regressão linear $MT = -0,079768 + 0,000456 \times \text{compr.} \times \text{larg.} \times \text{esp.}$, que é baseada na mensuração “in situ” de três medidas ortogonais da massa tumoral (GOMES, 1983).

O peso do tumor foi subtraído do peso corporal nas ratas portadoras de carcinosarcoma, obtendo-se assim o peso da carcaça. Nos grupos controles, os pesos das carcaças eram iguais aos pesos corporais.

3.5 O Tumor de Walker 256

O tumor de Walker 256, descrito por George Walker em 1928, no John Hopkins University School of Medicine, é um carcinoma mamário espontâneo. Apresenta-se infiltrativo e do tamanho de uma noz. Regreda durante a lactação, porém, ao término desta, cresce rapidamente (STEWART, 1959).

As amostras do tumor foram cedidas pelo Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFPR.

Observou-se previamente que o tumor de Walker, da forma que é manipulado no Laboratório de Metabolismo Celular, torna-se palpável no 2º dia de experimento. A partir do 9º dia, exulcera e freqüentemente apresenta contaminação secundária por bactérias. Contudo, por volta do 7º dia de desenvolvimento, os animais já apresentam uma perda ponderal em torno de 8 a 10% do seu peso inicial.

Com isso, decidiu-se que os animais seriam sacrificados e avaliados no oitavo dia de desenvolvimento tumoral. Todo animal que apresentava exulceração ou infecção secundária era descartado da pesquisa.

3.6 Manutenção de Linhagem do Tumor

Os animais portadores do tumor de Walker 256 eram sacrificados por deslocamento cervical sem anestesia, o tecido tumoral retirado e colocado em placa de petri com salina a 0,9% a 4°C. Com auxílio de uma tesoura de ponta fina, todas as porções necrosadas e de tecido não tumoral foram retiradas. Em seguida, fragmentou-se o tumor em partes menores, transferindo-as para um becker contendo salina 0,9% a 4°C. Triturava-se suavemente o material em liquidificador para evitar a lise celular. A seguir, filtrava-se o material em gaze e coletava-se o líquido em um cálice, tomando cuidado em efetuar todo o procedimento em gelo. O filtrado era transferido para tubos plásticos de 50 mL e centrifugado a baixa temperatura por 10 minutos em 1500 rpm. Terminada a centrifugação, desprezava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o precipitado em solução salina 0,9% a 4°C. A contagem do número de células foi realizada com uma alíquota da ressuspensão em câmara de Neubauer. Após contagem, preparava-se 100 mL de solução contendo 2×10^7 células/ml e injetava-se 1ml subcutaneamente no flanco direito dos animais. Estes eram mantidos no biotério até que a massa tumoral representasse 10 a 15% do peso corporal.

3.7 Viabilidade Celular

As células da solução do precipitado foram ressuspensas e diluídas numa proporção de 1:100 em salina a 0,9%, seguida de uma diluição 1:2, ou seja, 100 µl da amostra para 100 µl do corante Azul de Tripan. Coletava-se uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Contava-se, apenas, as células brilhantes e refringentes a luz. As demais coradas em azul eram consideradas inviáveis.

3.8 Transplantes das Células do Tumor

A inoculação do tumor nas ratas dos grupos II e III, seguiram de forma idêntica as etapas descritas anteriormente, para coleta e preparação da solução infectante. Porém, o último repique, antes da inoculação nos animais experimentais, as células tumorais foram inoculadas intraperitonealmente. Nesta situação, formava-se uma volumosa ascite, muito rica em células neoplásicas livres, facilmente retiradas por punção. O líquido ascítico era quantificado e, se necessário, diluído em salina para obtenção de 2×10^7 células/ml. Foi retirado 1 mL desta solução e injetado via subcutânea no flanco direito, no período entre 14 e 16 h, das ratas do grupo II. Este dia era convencionado como dia zero de desenvolvimento do carcinosarcoma.

Nos animais do grupo III, que receberam o tumor inativado, todo o processo foi repetido, com a diferença que as alíquotas de tumor foram aquecidas por 20 minutos a 60°C, com o objetivo de lisar e inviabilizar as células tumorais.

As ratas do grupo I (controle) receberam injeções de solução salina 0,9% via subcutânea no flanco direito, seguindo o mesmo roteiro.

3.9 Obtenção dos Sítios de Implantação e Fragmentos de Fígado

As ratas, no período de 24 horas que antecede o sacrifício, foram submetidas a jejum alimentar. Imediatamente após o sacrifício das fêmeas, por deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta, sendo o útero localizado, removido e dissecado. Em uma placa de petri com fundo de parafina, os sítios de implantação eram localizados macroscopicamente e removidos com lâmina de bisturi.

Três sítios de cada rata, foram armazenados em nitrogênio líquido e os

restantes fixados em Metacan (metanol, ácido acético e clorofôrmio em 1:1:1). O material congelado teve seu conteúdo de glicogênio avaliado bioquimicamente e o fixado seguiu a rotina de citoquímica para detecção de glicogênio.

Em seguida, o fígado era removido e fragmentado em porções de aproximadamente 0,5g, sendo um fragmento mantido em nitrogênio líquido e outro fixado em Metacan.

3.10 Histoquímica com Ácido Periódico e Reativo de Schiff

As amostras foram fixadas em Metacan por 3h a temperatura ambiente, desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina histológica. Os cortes de 4 μ m eram desparafinizados em xilol e reidratados em grade de concentração decrescente de etanol. Em seguida, procedeu-se a citoquímica de acordo com o seguinte protocolo:

1. Imersão por 5 minutos no ácido periódico a 0,5% para a oxidação;
2. Lavagem em água destilada;
3. Imersão no reativo de Schiff por 20 minutos;
4. Dois banhos de 3 minutos em água sulfurosa;
5. Desidratar, diafanizar e montar.

Esta reação citoquímica é utilizada na observação de polissacarídeos, os quais são oxidados pelo ácido periódico formando aldeídos. Estes são evidenciados pelo reativo de Schiff. O material PAS-positivo cora-se em vermelho-púrpura. Os cortes controle tiveram o material tratado com amilase.

A observação das lâminas foi realizada em microscopia de luz e as fotomicrografias obtidas no fotomicroscópio Zeiss – Axiophot do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob a orientação do biólogo

Herculano Salviano dos Reis.

3.11 Análise Estatística

Foram calculados o desvio padrão e a média de todos os dados obtidos e comparados pelo teste “ANOVA” ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

As ratas inoculadas, com o carcinoma da Walker 256 e com o líquido ascítico inativado, foram mantidas por 8 dias para observação dos efeitos da neoplasia sobre a evolução ponderal das ratas grávidas, o sucesso da implantação do embrião no útero e a taxa de mortalidade.

4.1 Taxa de Mortalidade

Durante o experimento não houve mortes em nenhum dos grupos animais. Também não foi observada infecção secundária nas ratas e, portanto, nenhuma foi excluída da experimentação.

4.2 Evolução Ponderal

4.2.1 Peso da Neoplasia

Todas as ratas inoculadas com o tumor de Walker 256 (grupo II) apresentaram, a partir do terceiro dia, massas tumorais palpáveis. Ao oitavo dia de desenvolvimento tumoral, estas massas pesavam aproximadamente 6 gramas.

4.2.2 Peso da Carcaça

Todas as ratas foram pesadas nos dias 0, 3, 7 e 8 do experimento. O peso do dia 8 (dia do sacrifício) é menor em todos os grupos, porque as ratas foram

colocadas em jejum alimentar de 24h antes do sacrifício.

Os dados da evolução do peso da carcaça dos subgrupos de ratas inoculadas com solução salina, com o carcinosarcoma e com o líquido ascítico inativado, no sétimo e oitavo dias gestacionais, encontra-se na **figura 1**.

Nos grupos I e III, os pesos das carcaças aumentaram progressivamente durante todo o experimento, como mostram as **figuras 1, 2 e 3**. O ganho ponderal, entre os grupos I e III foi semelhante.

Entretanto, no grupo II, após a pequena elevação normal do peso nos três primeiros dias de gestação, ocorreu uma queda contínua até o final do experimento. O peso da carcaça desse grupo, que é resultado do peso do indivíduo subtraído do peso do tumor, se apresentou significativamente reduzido quando comparado com os grupos I e III.

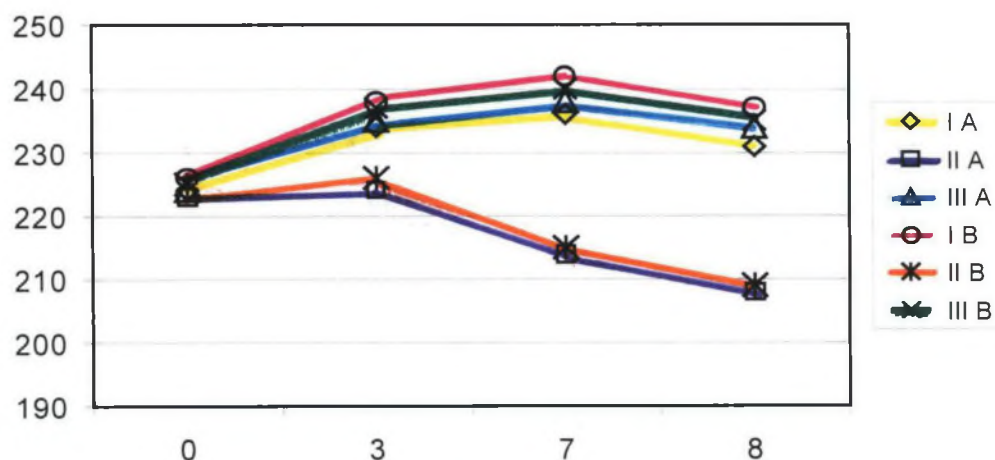


Figura 1: Variação média do peso nos seis grupos experimentais, sendo no eixo das ordenadas, o peso da carcaça e no eixo das abscissas, os dias de controle do peso.

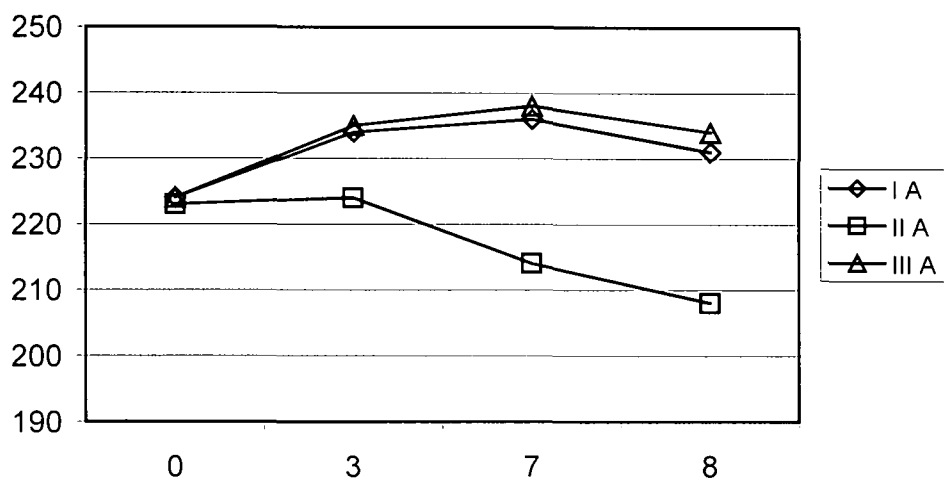


Figura 2: Comparação das médias dos pesos nos três subgrupos do sétimo dia gestacional, sendo IA o grupo controle, $n = 6$; IIA o grupo tumor, $n = 6$; e IIIA o grupo tumor inativo, $n = 6$.

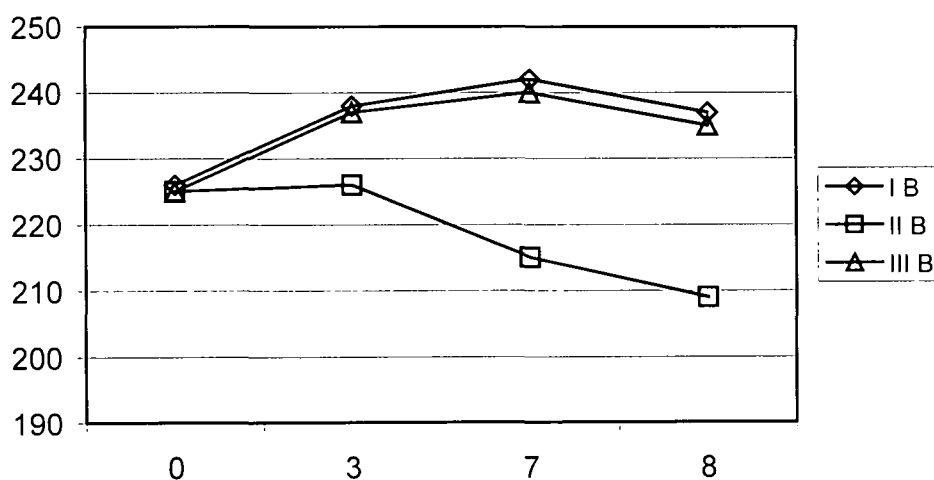


Figura 3: Comparação das médias dos pesos nos três subgrupos do oitavo dia gestacional, sendo IB o grupo controle, $n = 6$; IIB o grupo tumor, $n = 6$; e IIIB o grupo tumor inativo, $n = 6$.

4.3 Número de sítios de implantação de embriões

Os animais do grupo controle apresentam $13,0 \pm 1,7$ embriões no subgrupo IA (7º DG) e de $13,3 \pm 0,6$ embriões no subgrupo IB (8º DG), em média.

Nos subgrupos portadores de carcinoma observou-se uma média de $6,3 \pm 1,5$ embriões de 7º dia gestacional (subgrupo IIA) e $6,0 \pm 1,0$ embriões de 8º dia gestacional (subgrupo IIB), indicando uma queda no sucesso de implantação.

As ratas pertencentes ao grupo III, inoculadas com células tumorais inativas, contabilizaram médias de $11 \pm 1,7$ embriões no subgrupo IIIA e $11,7 \pm 1,2$ embriões no subgrupo IIIB.

Observando-se a figura 4, que apresenta a média e o desvio padrão do número de embriões nos grupos e subgrupos experimentados, esses resultados podem ser verificados.

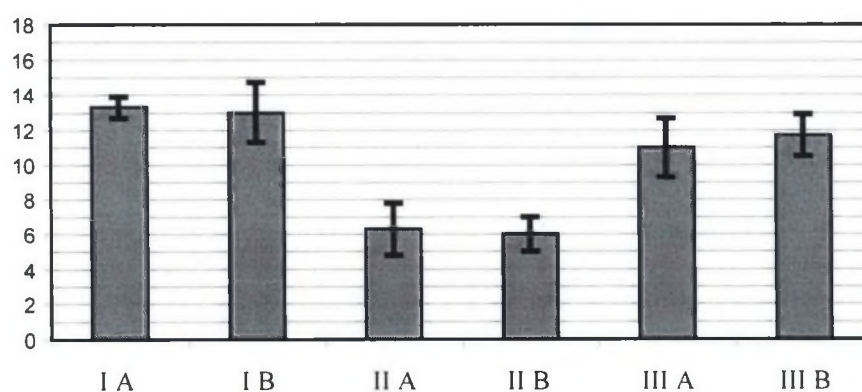


Figura 4: Número de embriões encontrados nos cornos uterinos, sendo IA controle de 7º dia gestacional; IB controle de 8º dia gestacional; IIA tumor de 7º dia gestacional; IIB tumor de 8º dia gestacional; IIIA tumor inativo de 7º dia gestacional; IIIB tumor inativo de 8º dia gestacional.

A contagem do número de sítios de implantação, conseqüentemente o número de embriões, apontou três resultados. A ausência de diferença significativa na média do número de embriões em subgrupos de um mesmo grupo. A diferença das médias nos grupos I e III não é significativa. O grupo II apresenta diferenças, na média do número de embriões, significativas, tanto quando comparado com o grupo controle, como quando confrontado com o grupo tumor inativo.

4.4 Análise Morfológica

O útero que apresenta a olho desarmado o aspecto de colar de contas, é considerado grávido e decidualizado, pois esta forma normalmente fica nítida a partir do sexto dia, dia que ocorre a implantação e início da decidualização.

Os cortes histológicos da secção do útero com o embrião, corados com PAS, evidenciaram uma maior concentração de grânulos de glicogênio nas células deciduais da porção antimesometrial do que nas células da porção mesometrial do endométrio.

Tanto no grupo controle quanto no grupo tumor inativo (grupos I e III, respectivamente), a marcação do polissacarídeo evidencia uma predominância de glicogênio nas proximidades dos embriões (**figuras 05, 07, 13 e 15**). Os cortes do material proveniente do grupo II apresentaram menor quantidade do polissacarídeo, sem áreas de concentração (**figuras 09 e 11**). Não foi observada diferença entre subgrupos do mesmo grupo experimental.

O tecido hepático, se comparado ao decidual, apresentou uma distribuição mais abundante de glicogênio em todos os grupos estudados. Os grânulos do polissacarídeo ficaram mais concentrados nas células distantes do Sistema Porta, sendo quanto menor à distância, menor a concentração. Ao microscópio, foi possível observar diferença na concentração de glicogênio entre os três grupos. A

marcação mais acentuada ocorreu nas células do grupo III (**figuras 14 e 16**) e a menos no grupo II (**figuras 10 e 12**), em relação ao grupo I (**figura 6 e 8**).

Além de corados com PAS, os cortes foram contra-corados com hematoxilina, tornando nítida a observação das células decíduais e hepáticas. O endométrio estava constituído predominantemente por células decíduais maduras, poligonais, alongadas e com citoplasma abundante. O espaço extracelular reduzido era ocupado por veias e capilares. As células do embrião, localizadas na luz do útero, em intensa divisão apresentavam núcleos grandes e acentuada basifilia. Os hepatócitos poliédricos mostravam um núcleo (muitas vezes dois) central, arredondado, com um ou dois nucléolos proeminentes.

Para padronizar e minimizar as possibilidades de variação de coloração, foram adotados os seguintes cuidados. Todas as lâminas histológicas, tanto do útero quanto do fígado, foram coradas no mesmo dia, na mesma bateria de coloração e posteriormente, fotografados com mesmo filme; e todas as reproduções fotográficas foram reveladas pelo mesmo processo.

5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

FIGURA 5 – Endométrio decidualizado de sétimo dia gestacional, obtido de rata normal (subgrupo IA), mostrando distribuição de polissacarídeos. Coloração PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 6 – Distribuição de glicogênio no fígado de rata controle no sétimo dia gestacional (subgrupo IA). Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 7 – Endométrio decidualizado de oitavo dia gestacional, obtido de rata controle (subgrupo IB), mostrando distribuição de polissacarídeos. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 8 – Distribuição de glicogênio no fígado de rata normal no oitavo dia gestacional (subgrupo IB). Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

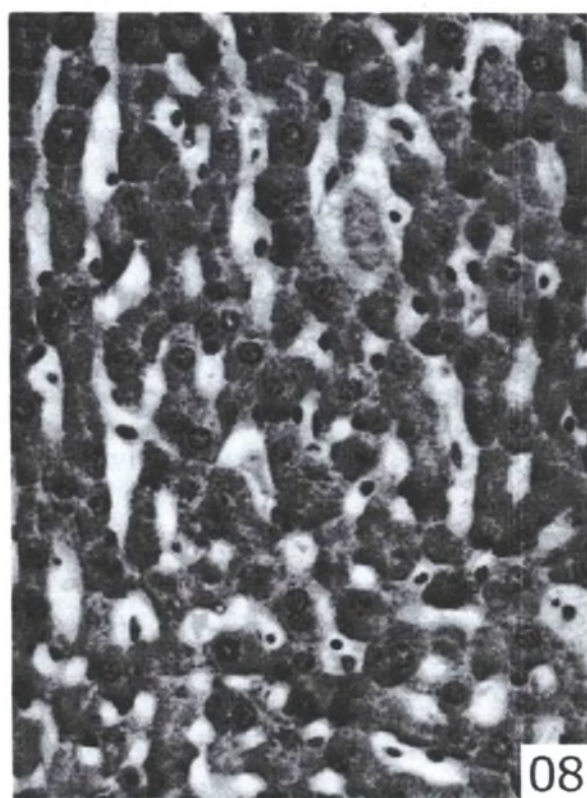
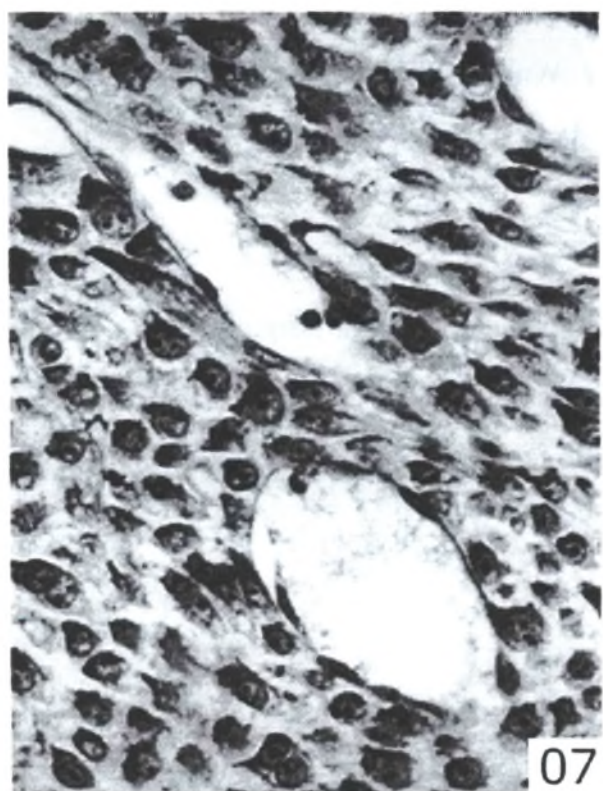
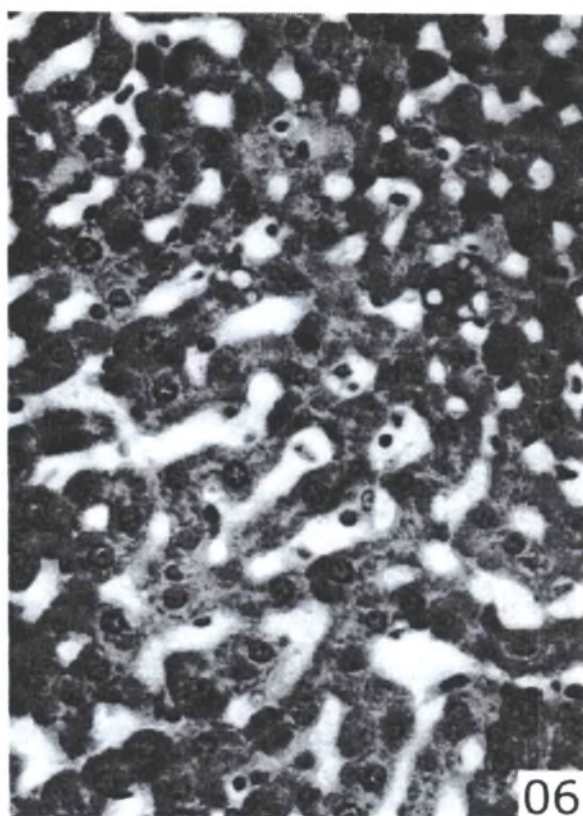


FIGURA 9 - Endométrio decidualizado de sétimo dia gestacional, obtido de rata portadora de tumor de Walker 256 (subgrupo IIA), mostrando distribuição de polissacarídeos. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 10 – Distribuição de glicogênio no fígado de rata inoculada com carcinosarcoma de Walker 256 de sétimo dia gestacional (subgrupo IIA). Notar a redução na positividade. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 11 – Endométrio decidualizado de oitavo dia gestacional, obtido de rata inoculada com tumor de Walker 256 (subgrupo IIB), mostrando distribuição de polissacarídeos. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 12 – Distribuição de glicogênio no fígado de rata portadora de carcinosarcoma de Walker 256 no oitavo dia gestacional (subgrupo IIB). Notar a redução na positividade. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

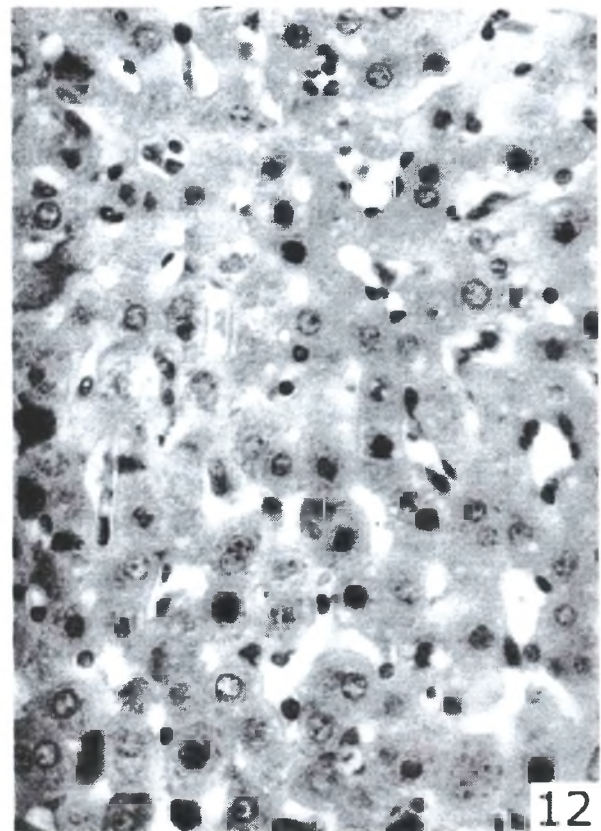
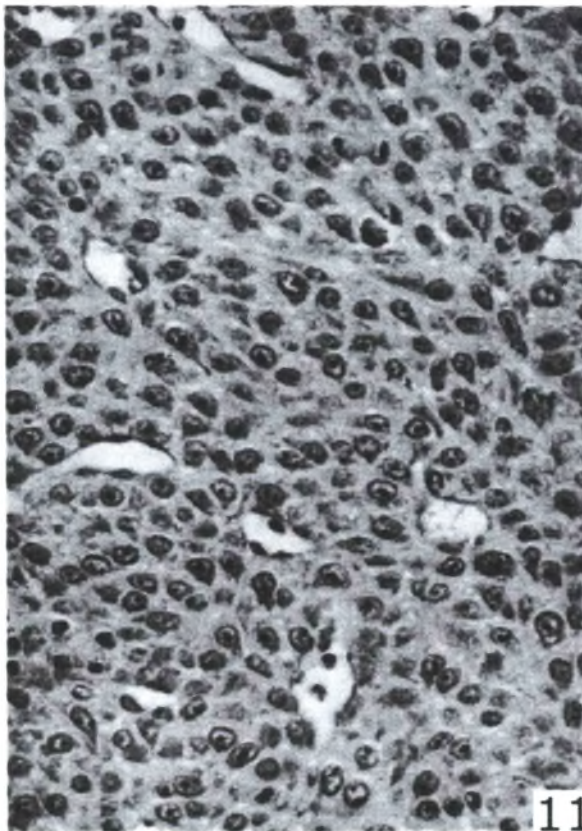
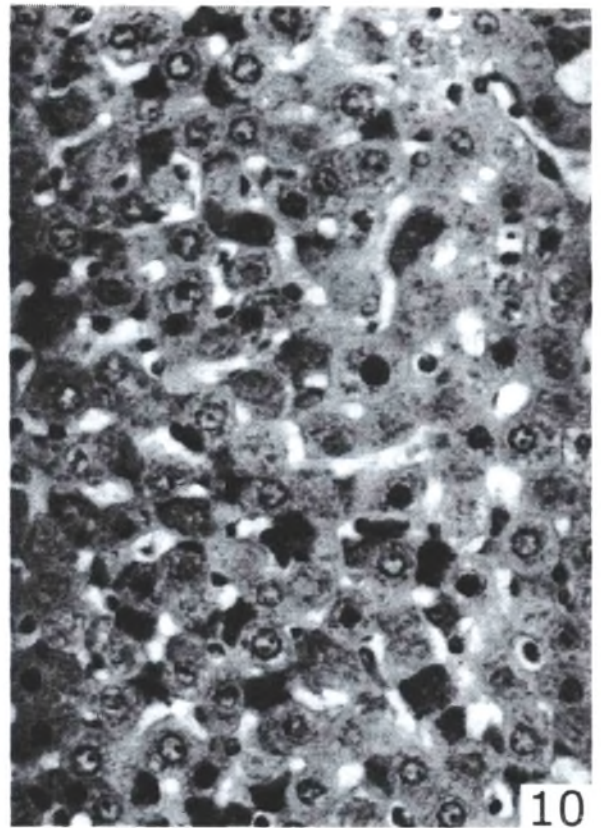
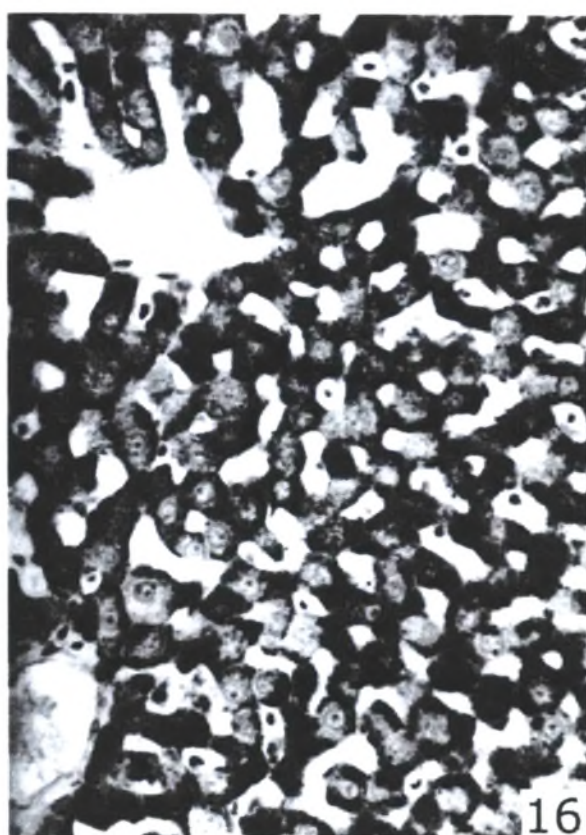
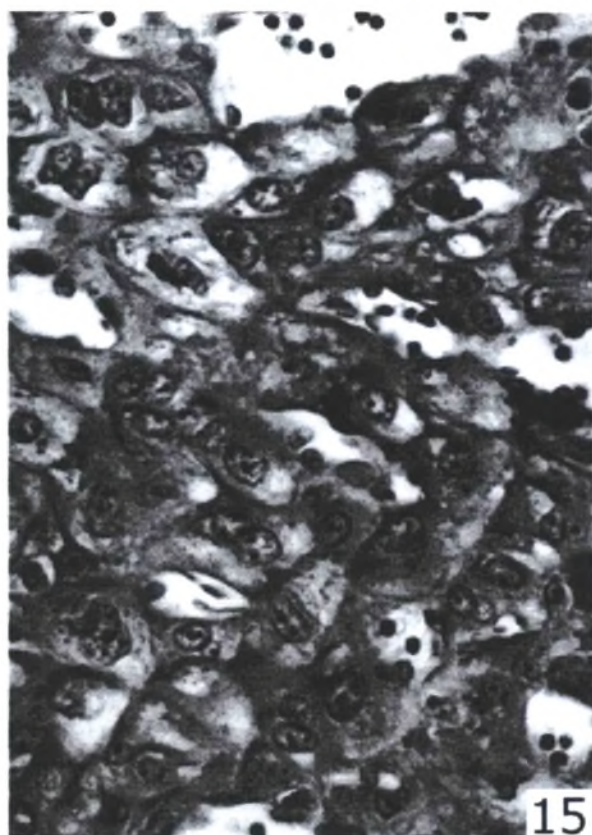
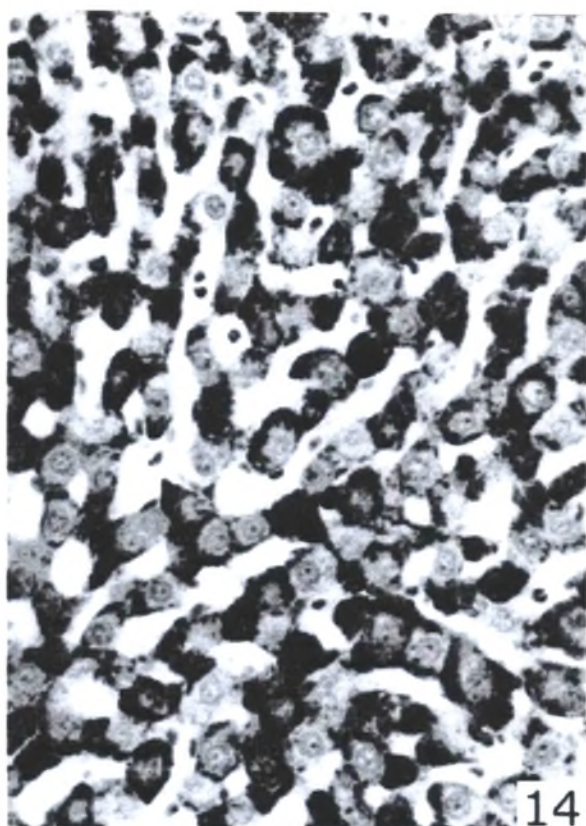
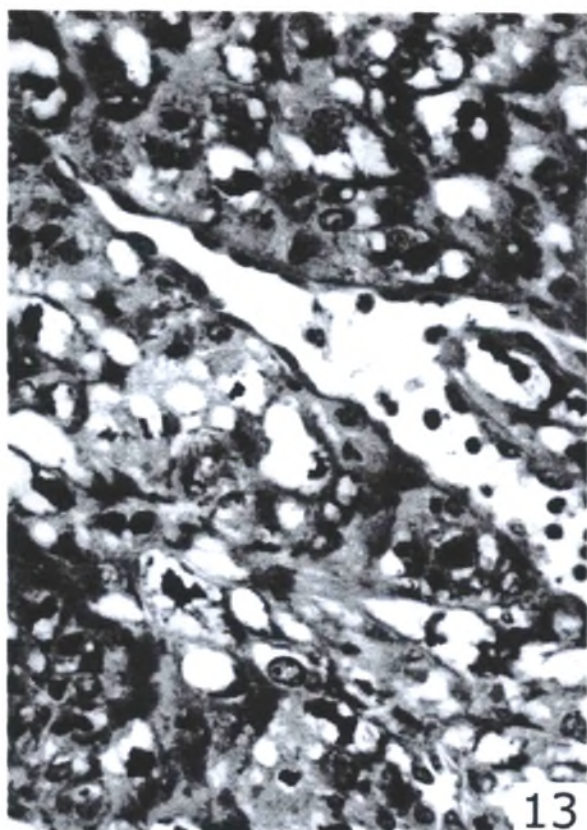


FIGURA 13 - Endométrio decidualizado de sétimo dia gestacional, obtido de rata inoculada com carcinosarcoma de Walker 256 inativo (subgrupo IIIA), mostrando distribuição de polissacarídeos. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 14 – Distribuição de glicogênio no fígado de rata portadora de tumor de Walker 256 inativo no sétimo dia gestacional (subgrupo IIIA). Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 15 – Endométrio decidualizado de oitavo dia gestacional, obtido de rata portadora de carcinosarcoma de Walker 256 inativo (subgrupo IIIB), mostrando distribuição de polissacarídeos. Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.

FIGURA 16 – Distribuição de glicogênio no fígado de rata inoculada com tumor de Walker 256 inativo de oitavo dia gestacional (subgrupo IIIB). Corado com PAS + hematoxilina; aumento 400 x.



6. DISCUSSÃO

Os pacientes oncológicos apresentam redução da massa magra e da gordura corporal ocorrendo paralelamente ao crescimento neoplásico, devido à elevada mobilização protéica do tumor (VENTRUCCI, 2001). Este estado catabólico, somado a diminuição da ingestão alimentar, resulta num quadro clínico de extrema depleção, denominado caquexia (LANGESTEIN & NORTON, 1991; NIXON *et al.*, 1988).

Os resultados desta pesquisa, relataram um decréscimo de 10%, em média no peso das ratas com carcinosarcoma, ao final de 8 dias de evolução tumoral, quando comparadas às ratas dos grupos controle e tumor inativo. As massas tumorais representam cerca de 3% do peso da carcaça. Em trabalho recente, TANHOFFER (2001) afirmou que as massas tumorais atingiram valores próximos a 6% do peso das carcaças e que a perda de peso, nas ratas portadoras de tumor, foi aproximadamente de 8%.

Estudando os efeitos do tumor de Walker 256 em ratos, GUAITANI *et al.* (1983) verificaram uma redução de 20% no peso da carcaça e que o tumor representava 10 % do peso corporal ao final de 14 dias de experimento.

SEELAENDER (1994) e BERTEVELLO (1999) encontraram redução ponderal semelhante em ratos portadores de carcinosarcoma na mesma evolução temporal. Experimentos conduzidos com ratas virgens por MARCONDES (1994) apresentaram resultados compatíveis aos dados anteriores.

No presente experimento, observou-se uma significativa redução no número de sítios de implantação nos cornos uterinos, e conseqüentemente no número de embriões, nas ratas que desenvolveram o tumor de Walker 256, tanto no 7º dia gestacional quanto no 8º DG (subgrupos II A e II B, respectivamente). Nestes subgrupos, os níveis de glicogênio decidual foram significativamente menores do

que os níveis dos outros subgrupos.

Investigando a influência do tumor, durante 21 dias gestacionais, no desenvolvimento da placenta e do feto, TOLEDO & GOMES-MARCONDES (1999) observaram uma diminuição do número de fetos nas ratas portadoras de tumor em comparação aos grupos controle.

Comparando-se os cortes histológicos dos sítios de implantação, o grupo de ratas portadoras de tumor foi o que apresentou redução na quantidade de grânulos de glicogênio. Já o grupo inoculado com tumor inativo (grupo III) revelou um aumento no nível de glicogênio, comparado aos outros grupos (I e II). (vide figuras 05, 07, 09, 11, 13 e 15)

Como no presente trabalho foram avaliados somente o 7º e 8º dias gestacionais, estes resultados apontam uma diminuição no número de blastocistos implantados com sucesso no útero, causada pela redução no glicogênio decidual ou por outro fator. Entretanto, descarta-se a ocorrência de reabsorção fetal, pois esta somente ocorre após a implantação do embrião.

Experimentalmente, vários pesquisadores relataram redução na taxa de implantação de blastocistos, quando diminuíram a quantidade de glicogênio e lipídios no endométrio com administração aguda de álcool etílico em ratas (MITCHELL & GOLDMAN, 1996); metanol em camundongas (PADMANABHA, 1985) e antiprogestênicos durante o sexto, sétimo e oitavo dias gestacionais (TAKAHASHI et al., 1988). Estes resultados indicam que o glicogênio decidual é mais sensível a depleção causada pelo tumor do que o glicogênio hepático.

O objetivo do jejum alimentar, 24 horas antes do sacrifício, era atenuar a diferença de ingesta alimentar entre o grupo que desenvolveu tumor e apresentava anorexia (grupo II) e os outros dois grupos que não desenvolveram tumor (grupo I e III). Além disso, o jejum alimentar pode comprovar que o aumento da quantidade de glicogênio nos tecidos das fêmeas do grupo III, não era proveniente do aumento

no consumo alimentar e sim pela existência de atividade do tumor inativado por temperatura. Este resultado pode ser parcialmente explicado pelos achados de vários autores. PAULUS *et al.* (1993) ao aquecer células vivas de adenocarcinoma a 46°C por uma hora, obtinha uma proteína de 70 kDa, como resposta ao estresse térmico (heat shock protein family, HSP), que modificava a velocidade de crescimento do tumor *in vitro*. Vários estudos confirmam que determinadas proteínas obtidas do estresse térmico podem funcionar como potentes medicamentos contra um câncer específico quando purificadas do mesmo tumor (SUZUE *et al.*, 1997), adiando o desenvolvimento de caquexia no organismo e prolongando a vida (WANG *et al.*, 2001). A utilização clínica de HSP obtida pela incubação de carcinoma de próstata por 16 horas a 48°C, com melhora no estado geral de pacientes com metástases, sem todavia modificar a história natural da doença (MELCHER *et al.*, 1998).

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo citoquímico do glicogênio decidual em ratas portadoras de Carcinosarcoma de Walker 256 permitem concluir que:

1) Não há diferença significativa, em nenhum dos pontos avaliados, entre o sétimo e oitavo dias gestacionais de um mesmo grupo experimental.

2) No início da gestação, a rápida evolução do tumor causou intenso catabolismo e perda de peso nas ratas inoculadas com células vivas.

3) A reserva de glicogênio decidual, nas ratas portadoras de carcinosarcoma, sofreu maior redução que a de glicogênio hepático, sugerindo que a decídua seja mais sensível à elevada demanda nutricional.

4) O número de sítios de implantação, conseqüentemente o número de embriões, também foi menor nas ratas infectadas, sugerindo que o sucesso do evento da implantação do blastocisto é dependente da reserva de glicogênio decidual.

5) Fica evidente existência de atividade no tumor de Walker 256 inativado por aquecimento, pois nestes subgrupos ocorreu um aumento no conteúdo de glicogênio hepático e decidual, sendo esta a única diferença significativa entre este grupo experimental e o grupo controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, **166**: 263-274, 1983.

ABRAHAMSOHN, P.A. & ZORN, T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. **The Journal of Ex. Zool.**, **266**: 603-628, 1993.

AJARIM, D.; IBRAHIM, E.M.; EZZAT, A.; BALOUSH, A.; HUSSAIN, Z. Pregnancy-associated breast cancer: Case-control study In: 36th Annual Meeting, 2000, New Orleans, LA. **2000 ASCO Abstract**. p. 518 Disponível em: < http://www.asco.org/prof/me/html/00abstracts/bc/m_518.htm > Acesso em: 15 set. 2001.

ALLEN, E. The oestrous cycle in the mouse. **Am. J. Anat.**, **30**: 297-371, 1922.

AVISAR, E.; LITTLE, V.; JOHNSON, R.J.; EDINGTON, H. Tumor biology of pregnancy-associated breast cancer. In: 36th Annual Meeting, 2000, New Orleans, LA. **2000 ASCO Abstract**. p.560. Disponível em: <http://www.asco.org/prof/me/html/00abstracts/bc/m_560.htm> Acesso em: 15 set. 2001.

BACKER, H.L. Reproduction and breeding. In: BACKER, H.L.; LINDSEYL, J.R.; WEISBROTH, S.H. **The laboratory rat**. New York, Academic Press, v. I, cap. 7, p. 153-168, 1991.

- BERTEVELLO, P.S. **Alterações no conteúdo de gordura corporal em ratos providas pela presença do tumor de Walker 256: heterogeneidade de resposta de tecido adiposo e efeito da suplementação lipídica.** São Paulo, 1999. 132p. Tese (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, **320**: 652-654, 1990.
- BOVING, B.G. Biomechanics of implantation. **The Biology of the Blastocyst.** Blandau R.J., Ed. The University of Chicago Press, Chicago, p. 423-442, 1971.
- CARBÓ, N.; COSTELLI, P.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J.M. Tumor growth influences skeletal muscle protein turnover in the pregnant rat. **Pediatric Res.** **43 (2)**: 250-252, 1998.
- CHEW, C.S. & RINARD, G.A. Glycogen levels in the rat myometrium at the first day of pregnancy and immediately postpartum. **Biol. Reprod.** **20**: 1111-1114, 1979.
- CINTRA-GOMES, M.C.; CURY, L.; PARREIRA, M.R.; ELIAS, C.F.; AREAS, M.A. Effects of Walker 256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **23**: 909-913, 1990.
- DEMERS, L.M.; YOSHINAGA, K.; GREEP, R.O. Uterine glycogen metabolism of the rat in early pregnancy. **Biol. Reprod.** **2**: 297-304, 1972.
- ENDERS, A.C. & SCLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. **Am. J. Anat.** **12**: 185-226, 1967.

FERNANDES, L.C.; CARPINELLI, A.R.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and decrease of Walker 256 growth by insulin administration in rats. **Cancer Ther. Cont.**, 1: 259-268, 1991.

FERNANDES, L.C. **Papel da insulina na caquexia e no crescimento do tumor de Walker 256 *in vivo***. São Paulo, 111p., 1989. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

FERNANDES, L.C. **Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos**. São Paulo, 98p., 1995. (Dissertação de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

FINN, C.A. The implantation reaction. **In: WYNN, R.M. Biology of the Uterus**, Ed. Plenum Press, New York, p. 245-253, 1977.

FINN, C.A. & Mc LAREN, A. A study of the early stages of implantation in mice. **Journal Reprod. Fertil.**, 13: 259-267, 1967.

FIORICA, J.V. Special problems breast cancer and pregnancy. **Obstetrics and Gynecology of North America**, 21: 721-732, 1994.

FREINKEL, N. & METZGER, B.E. Metabolic changes in pregnancy. **In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W. Willians, Testbook of endocrinology**. 8° ed. Philadelphia, Saunders, p. 993-1006, 1992.

GARBE, C. Pregnancy, hormone preparations and malignant melanoma. **Hantarzt**, 44: 347-352, 1993.

- GEMIGNANI, M.L. & PETREK, J.A. Breast cancer during pregnancy: diagnostic and therapeutic dilemmas. **Adv. Surg.**, **34**: 273-286, 2000.
- GEMIGNANI, M.L.; PETREK, J.A.; BORGEN, P.I. Breast cancer and pregnancy. **Surg. Clin. North Am.** **79 (5)**: 1157-1169, 1999.
- GLASSER, S.R.; JULIAN, J.A. Intermediate filament protein as a marker for uterine stromal cell decidualization. **Biol. Reprod.**, **35**:463-76, 1986.
- GOMES, M.C.C.; BEVILACQUA, R.G.; LIMA-GONÇALVES, E.; RESENDE, L. Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. **Ciência e cultura**, **35**: 736, 1983. Abstract.
- GREGOIRE, A.T. & RICHARDSON, D. W. The effect of 1, 10, 100g estradiol on glycogen content deposition in the rat uterus, cervix and vagina. **Journal Reproduc. Fert.**, **4**: 231-234, 1970.
- GUAITANI, A. **Cartterizzazione di anoressia e cachessia indotte da tumori sperimentali approccio nutrzionale come terapi di supporto.** Progetto Oncologia, 1993. Inst. Ricerche Farmacologiche, Milano, Italia.
- HERRERAS, E.; LASUNCIÓN, M.A; PALACÍN, M.; ZORZANO, A; BONET, B. Intermediary metabolism in pregnancy. **Diabetes**, **40 (suppl. 2)**: 83-88, 1991.
- JERNSTROM, H.; LERMAN, C.; GHADIRIAN, P.; LYNCH, H.T.; WEBER, B.; GARBER, J.; DALY, M.; OLOPADE, O.I.; FOULKES, W.D.; WARNER, E.; BRUNET, J. S.; NAROD, S.A. Pregnancy and risk of early breast cancer in carriers of BRCA 1 and BRCA 2. **Lancet**, **354**: 1846-1850, 1999.

- KING, R.H.; WELCH, J.J.; MARTIN, J.K.; COULAM, C.B. Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **160**: 228-232, 1985.
- KOSTYO, J.L. A study of the glycogen levels of the rat uterus and certain skeletal muscles during pregnancy. **Endocrinology** **60**: 33-37, 1957.
- LANGSTEIN, H.N. & NORTON, J.A. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, **5**: 103-123, 1991.
- LENTZ, M.R. The Phylogeny of Oncology. **Mol. Biother**, **2**: 137-144, 1990.
- LEVIN, L. & GEVERS, W. Metabolic alteration in cancer. Part I. Carbohydrate metabolism. **S. Afr. Med. Journal**, **59**: 518-521, 1981a.
- LEVIN, L. & GEVERS, W. Metabolic alteration in cancer. Part I. Protein and fat metabolism. **S. Afr. Med. Journal**, **59**: 553-556, 1981b.
- LIOTTA, L.A. Cancer cell invasion and metastasis. **Sci Amer.**, **34 (feb.)**, 1992.
- LUNDHOLM, K. Interactions of cytokines in the host. **Acta Chir Scand.**, **549 (suppl)**: 31-34, 1989.
- LUNDKVIST, O. Ultrastructural studies of the endometrial stroma cells in the rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. **Biol. Reprod.**, **18**: 306-316, 1978.
- LUQUE, L.; PAREDES, S.; SEGURA, J.A.; CASTRO, I.N.; MEDINA, M. A. Mutual effect of glucose and glutamine on their utilization by tumor cells. **Biochem. Intern.**, **21**: 09-15, 1990.

- MAHONY, S.M. & TISDALE, M.J. Induction of weight loss and metabolic alterations by human recombinant tumour necrosis factor. **Br. Journal Cancer**, **58**: 345-349, 1988.
- MARCONDES, M.C.C.G. **Influência da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário**. São Paulo, 103p., 1994. (Dissertação de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo).
- MARCONDES, M.C.C.G.; CURY, L.; CURI, R. Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental / fetal development in rats. **Cancer Research Therapy & Control**, **5 (4)**: 277-283, 1998.
- MELCHER, A.; TODRYK, S.; HARDWICK, N.; FORD, M.; JACOBSON, M; VILE, R.G. Tumor immunogenicity is determined by mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. **Nat. Med.** **4 (5)**: 581-587, 1998.
- MITCHELL, J.A. & GODMAN, H. Effects of alcohol on blastocist implantation site blood flow in the rat. **Alcohol alcohol**, **31**: 81-87, 1991.
- MOORE, H.C. & FOSTER JR., R.S. Breast cancer and pregnancy. **Semin. Oncol.** **27 (6)**: 646-653, 2000.
- MORRISON, S.D. Control of food intake during growth of a Walker 256 carcinosarcoma. **Cancer Res.**, **33**: 526-528, 1973.
- MOSSMAN, H.W. **Vertebrate Fetal Membranes**. Ed. Rutgers University Press, New Brunswick, p. 383, 1987.

NACIONAL CANCER INSTITUTE. **Breast cancer and pregnancy**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancer_information/doc_pdq.aspx?viewid=51DC247F-9F08-4A0C-A0A2-42B94848FC74#1> Acesso em: 09 out. 2001.

NIXON, D.W.; KUTNER, M.; HEYMSFIELD, S.; FOLTZ, A.T.; CARTY, C.; SEITZ, A.; CASPER, K.; EVANS, W.K.; JEEJEBHOY, K.N.; DALY, J.M.; HEBER, D.; POPEENDIEK, H.; HOFFMAN, F.A. Resting energy expenditure in lung and colon cancer. **Metabolism**, **37**: 1059-1064, 1988.

PADMANABHA, R. Histological and histochemical changes of the placenta in fetal alcohol syndrome due to maternal administration of acute doses of ethanol in the mouse. **Drug. Alcohol Depend.**: **16 (3)**: 229-239, 1985.

PARR, M.B. & PARR, E.L. The implantation reaction. **In: Biology of the uterus**. Ed. Plenum Publishing, New York, p. 233-277, 1989.

PARVEZ, S. & PARVEZ, H. Glycogen storage during the last part of pregnancy uterus, liver and heart of rats. **Experientia**, **30 (II)**: 942-980, 1974.

PAULUS, J.A.; TCKER, R.D.; FLANAGAN, W.W.; MOSELEY, P.L.; LOENING, S.A.; PARK, J.B. Heat shock protein response in a prostate tumor model to interstitial thermotherapy: implications for clinical treatment. **Prostate**, **23 (3)**: 263-270, 1993.

PEDERSEN, R.A. Early mammalian embryogenesis. **In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.; EWING, L.L.; GREENWALK, G.S.; MARKET, C.L.; PFAFF, D.W. The physiology of reproduction**. Raven Press, New York, p. 187-230, 1988.

PETREK, J.A. Breast cancer during pregnancy. **Cancer**, **74**: 518-527, 1994.

- PETTER, J.F. & SCHOENEMAN, M. Metastasis of maternal cancer to the placenta and fetus. **Cancer**, **25 (2)**: 380-388, 1970.
- PSYCHOYOS, A. La réaction déciduale est précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire de l'utérus. **C. R. Séances Soc. Biol.** **154**: 1384-1387, 1960.
- PSYCHOYOS, A. Perméabilité capillaire et decidualisation utérine. **C. R. Acad. Sci.** **III, 252**: 1515-1517, 1961.
- SAUER, L.A.; STAYMAN III, J.W.; DAUCHER, R.T. Amino acid, glucose and lactic acid utilization *in vivo* by rats tumors. **Cancer Res.**, **43**: 3497-3503, 1983.
- SEELAENDER, M.C.L. **Metabolismo de lipídeos em ratos portadores do tumor de Walker 256: avaliação da atividade do sistema canônico palmitol transferase mitocondrial hepático.** São Paulo, 1994. 122p. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- SNELL, G.D. The early embryology of the mouse. In: **Biology of the laboratory mouse.** New York, Dover, p. 1-54, 1941.
- STEWART, H.L. In: **Transplantable and transmissible tumor of animal.** Washington, Armed Forces Inst. Of Pathology, p. F40-261 a F40-271, 1959.
- STRICKLAND, S. & RICHARDS, W.G. Invasion of the Trophoblasts. **Cell** **71 (3)**: 355-357, 1992.

SUZUE, K.; ZHOU, X.; EISEN, H.N.; YOUNG, R.A. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94 (24)**: 13146-13151, 1997.

SVANINGER, E.B.; SUER, L.A.; STAYMAN III, J.W.; DAUCHER, R.T. Aminoacid, glucose and lactic acid utilization *in vivo* by rat tumors. **Cancer Res.**, **43**: 3497-3503, 1989.

TAKAHASHI, T.; SAKAMOTO, O.;OHTANI, K.; SUZUKI, H.; DEN, K.; TAKAGI, S. A study of progestin, glucocorticoid binding and glycogen content in rat endometrium before and after implantation: effect of antiprogestosterone RU-38486. **Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi** **64**: 1081-1087, 1988. Abstract.

TANHOFFER, E.A. **Influência do tumor de Walker 256 sobre os níveis de glicogênio decidual em ratas e taxa de sucesso na implantação do blastocisto no útero.** Possíveis mecanismos envolvidos nas dificuldades reprodutivas associadas ao câncer. Curitiba, 55p., 2001. (Tese de Mestrado, Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná).

THE MID-ATLANTIC BREAST CANCER INFORMATION EXCHANGE. **Pregnancy and cancer: Review of Recent Studies.** Disponível em: <http://www.mabcie.com/archives/july_3,_2000.htm> Acesso em: 09 out. 2001.

TISDALE, M.J. & BRENNAN, R.A. Metabolic substrate utilization by a tumour cell line with induces cachexia model. **Br. J. Cancer**, **54**: 601-606, 1986.

TOLEDO, M.T. & GOMES-MARCONDES, M.C.C. Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. **Oncology Research** **11**: 359-366, 1999.

VASILENKO, P.; ADAMS, W.C.; FRIEDEN, E.H. Uterine size and glycogen content in cycling and pregnant rats: influence of relaxin. **Biol. Reprod.** **25**: 162-169, 1981.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M.A.R.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**: **34 (3)**: 333-338, 2001.

WANG, X.; KAZIM, L.; REPASKY, E.A.; SUBJECK, J. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. **J. Immunol.** **166 (1)**: 490-497, 2001.

ZORN, T.M.T.; ABRAMSOHN, P.A.; MARIANO, M. The local origin of decidual cell in pregnant mice. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **19**: 221-226, 1986.

ZORN, T.M.T.; BJOVVSKEY, A.T.; BEVILACQUA, E.M.A.F.; ABRAMSOHN, P.A. Phagocytosis of collagen by mouse decidual cells. **Anat. Rec.**, **224**: 96-100, 1989.