

EDSON ANTONIO TANHOFER

**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

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular  
Da Universidade Federal do Paraná  
para a obtenção do Título de Mestre  
em ciências

Curitiba  
2001

---

EDSON ANTONIO TANHOFFER

**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

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular  
Da Universidade Federal do Paraná  
para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Claudio P.S. Greca.  
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Claudio Fernandez

Curitiba  
2001

A minha querida Claudia que,  
só eu sei o quanto me ajudou,  
e ao Alexandre,  
meu filho querido.

À memória de meu pai,  
e à minha mãe,  
que mostraram o caminho.

E ao meu irmão que  
me mostrou que dificuldades  
foram feitas para serem  
superadas.

## Agradecimentos

Ao Claudio Greca e ao Luiz Claudio, a quem me dou a liberdade de não tratar por doutor ou professor, não por falta de mérito, mas por serem amigos de verdade, há muitos anos, que me orientaram neste trabalho com profissionalismo e dedicação.

À Prof. Dra. Marilia Seelaender, do ICB/USP, que na reta final, foi realmente fantástica, com seus conselhos e observações.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches pelas lições de profissionalismo e competência, (e sobre o corinthians também).

À Prof. Claudia M. Sallai, que me prestou inestimável auxílio na redação e acabamento desta tese, além de cuidar de mim.

À Vanessa, pôr sua ajuda inestimável e muito trabalhosa, de quem eu não ouvi uma queixa sequer e sem quem este trabalho não estaria nem na metade.

Aos colegas de laboratório que deram uma ajuda muito importante, e momentos muito divertidos, cujo o convívio foi, no mínimo, fraterno, .

Ao Osvaldo, Luiz, e Gabriel, em especial, com quem sempre pude contar, não somente como colegas, mas como amigos.

Ao Nino, que além de competente e solícito, é um cara realmente legal.

À Marlene, por sua competência e paciência.

E finalmente, e não menos importante, a todo o corpo docente da Pós graduação, a alma da realização desta nova investida.

## **ABSTRACT**

The association between cancer and pregnancy occurs in a crescent group on population. Studies about the influence of the cancer on the blastocist implantation is still less researched yet. The glycogen concentration increased on decidua is a source of energy to the embryo, on initial pregnancy, and the cancer courses a decrease on glycogen concentration in several tissues. The effects of Walker 256 tumor growth in glycogen concentration on pregnant rats decidua in 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> days of pregnancy show a decrease on succses in the embryo implantation and in the glycogen levels. These alterations were probably related.

## **RESUMO**

A associação entre câncer e gestação ocorre em um grupo crescente na população, contudo não existe na literatura mundial um número grande de pesquisas correlacionando as duas situações. Estudos enfocando a influência do câncer sobre a implantação do blastocisto são menos comuns ainda. O glicogênio, que se acumula na decídua, é uma das fontes energéticas do embrião na gestação inicial, e o câncer é uma das causas da queda de níveis de glicogênio em muitos tecidos. Foram estudados os efeitos do crescimento do tumor de Walker 256 sobre a quantidade de glicídeos acumulados na decídua do útero de ratas grávidas no sétimo e oitavo dias de gestação. Foi verificada uma queda na taxa de implantação embrionária, bem como uma redução na quantidade de glicogênio acumulado, levantando-se a possibilidade destes resultados estarem relacionados entre si.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA                                                                                    | 1  |
| 1.1. Considerações Gerais                                                                                                | 1  |
| 1.2. Alterações no Metabolismo Glicídico Durante o Câncer                                                                | 3  |
| 1.3. Metabolismo Glicídico na Implantação e Decidualização                                                               | 6  |
| 1.4. Alterações Decorrentes da Associação entre Câncer e Gestação                                                        | 11 |
| 2. OBJETIVOS                                                                                                             | 13 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS                                                                                                   | 15 |
| 3.1. Animais                                                                                                             | 15 |
| 3.2. Grupos de Estudo e Cruzamento                                                                                       | 15 |
| 3.2.1. Grupo I                                                                                                           | 15 |
| 3.2.2. Grupo II                                                                                                          | 16 |
| 3.2.3. Grupo III                                                                                                         | 16 |
| 3.3. Acasalamento                                                                                                        | 17 |
| 3.4. Tumor de Walker 256                                                                                                 | 18 |
| 3.5. Obtenção e Transplante das Células do Tumor de Walker 256:<br>Manutenção da Linhagem                                | 19 |
| 3.6. Obtenção e Transplante das Células do Tumor de Walker 256:<br>Formação dos grupos Experimentais                     | 20 |
| 3.7. Controle Ponderal das Ratas                                                                                         | 22 |
| 3.8. Evidenciação e Remoção dos Sítios de Implantação do Embrião<br>nos Cornos Uterinos e Coleta de Fragmentos do Fígado | 23 |
| 3.9. Histoquímica com Ácido Periódico e Reativo de Schiff (PAS)                                                          | 24 |
| 3.10. Dosagem de Glicogênio Decidual e Hepático                                                                          | 26 |
| 3.11. Análise Estatística                                                                                                | 27 |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 4. RESULTADOS                                                         | 28 |
| 4.1. Fase I                                                           |    |
| 4.1.1. Taxa de Mortalidade                                            | 28 |
| 4.1.2. Número de Sítios de Implantação de Embriões                    | 28 |
| 4.1.3. Peso da Neoplasia                                              | 29 |
| 4.1.4. Peso da Carcaça                                                | 30 |
| 4.2. Fase II                                                          | 30 |
| 4.3. Fase III                                                         | 33 |
| 4.3.1 Distribuição do Glicogênio no Endométrio Deciduoado<br>e Fígado | 33 |
| 5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁICA                                            | 35 |
| 6. DISCUSSÃO                                                          | 36 |
| 7. CONCLUSÃO                                                          | 43 |
| 8. REFRERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                        | 46 |

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.

### 1.1. Considerações Gerais.

A etiologia da palavra câncer é derivada de *carcinos*, do latim, cujo similar em grego significa caranguejo. O Câncer é responsável por 2,5 milhões de mortes anuais até a década passada (*apud* FERNANDES, 1995).

Em organismos multicelulares não existe competição entre as células, ao contrário, há cooperação, condição essencial para a sobrevivência de um indivíduo complexo. As células cancerosas não se submetem a este esquema, apresentam o DNA modificado, sobrevivem, mas escapam dos mecanismos de controle de ciclo celular (*apud* LIOTTA, 1992).

O câncer tem como características, mais ou menos acentuadas, dependendo do tipo de tecido modificado, a capacidade de se infiltrar, destruindo tecidos circunvizinhos, formar tumores secundários, denominados metástases, e perder as características morfológicas das células que lhe deram origem, fenômeno chamado de anaplasia (*apud* BERENBLUM, 1970). Mas os tumores malignos não estão somente ocupando lugar no organismo, estão também consumindo nutrientes, produzindo hormônios e substâncias que afetam o organismo como um todo, estimulando vias catabólicas (COSTA,

1977; RUDON, 1987; CINTRA-GOMES et al., 1990; GOMES-MARCONDES et al., 1998).

A implantação do embrião está longe de ser uma condição patológica, mas também é uma situação especial, que envolve divisão e diferenciação celular, além de modificações hormonais e metabólicas no endométrio (PEDERSEN, 1988).

As adaptações fisiológicas, no organismo materno, na gestação inicial, controladas por mecanismos neuroendócrinos, incluem um aumento no anabolismo materno, para garantir energia para os momentos críticos, como a implantação e o grande desgaste orgânico do final da gestação (*apud* HERRERAS et al, 1991; FREINKEL & METZGER, 1992).

Alguns trabalhos mostram que a associação entre câncer e gravidez apresenta uma incidência de 0,1% (DOLL et al., 1988 e 1989) dos casos da doença em mulheres. O câncer de mama é a mais importante das neoplasias malignas que se associam a gestação. Segundo FIORICA (1994), de cada 10000 gestantes uma apresentará de carcinoma mamário. Resultados bem mais sombrios encontrados por GALLEMBERG & LOPRINZI, em 1989 mostram que 2,8% das mulheres desenvolvem câncer de mama na gestação. PARENTE et al (1988) afirmam que 2 a 5% das pacientes em tratamento com câncer de mama engravidam.

Existe uma tendência atual de aumento nos casos oncológicos em gestantes, e mesmo o desejo de engravidar em pacientes oncológicas, em parte devido a muitos tipos de câncer, em especial o câncer de mama ser idade-dependente, em parte devido a modificações sociais, ligadas principalmente a igualdade de direitos e avanços trabalhistas, e acabam postergando a natalidade por motivos profissionais (BERNIK, 1998). Aos 40 anos de idade a possibilidade de desenvolver carcinoma mamário é seis vezes maior que aos vinte (PETREK, 1994).

## **1.2. Alterações no metabolismo glicídico durante o câncer.**

As neoplasias malignas podem matar o hospedeiro devido à invasão e compressão de tecidos vizinhos, metástases, ou a intensa espoliação de nutrientes do hospedeiro, mas o habitual é que o óbito ocorra por uma associação destes fatores (SVANINGER et al., 1989). Aproximadamente 80% dos pacientes oncológicos internados apresentam desnutrição proteico-calórica (NIXON et al., 1988). Em aproximadamente 70% dos pacientes com câncer há o aparecimento de uma condição de intenso catabolismo, perda de peso, alteração do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, denominada

de síndrome da caquexia (*kakos* = mal e *hexis*= condição do corpo) (MORRISON, 1973). A anorexia é um fenômeno, frequentemente ligado ao câncer, em modelos experimentais ou em pacientes humanos (LANGSTEIN & NORTON, 1991; MCCARTHY & DAUN, 1992).

As células neoplásicas têm grande capacidade de utilização de glicose, sendo este o substrato para sua demanda energética, pela glicólise anaeróbia (FERNANDES, 1995; 1991; LEVIN & GEVERS, 1981 a e b; LUQUE et al., 1990; SAUER et al., 1983). É sabido que o carcinossarcoma de Walker 256 é incapaz de utilizar ácidos graxos como substrato energético, por modificações na cadeia enzimática específica (TISDALE & BRENNAN, 1986).

A hipoglicemia é um estado bastante usual em pacientes e em modelos experimentais com câncer (BRENNAN, 1978). O metabolismo anaeróbio da glicose nas células neoplásicas gera grande quantidade de lactato, o que eleva a sua concentração plasmática (BURT et al., 1981; SVANINGER et al., 1989), em continuidade, o paciente forma glicose, a partir deste lactato, que por sua vez é convertida em mais lactato, pelo tumor. Como este processo tem custo energético ocorre o agravamento da caquexia (CORI & CORI, 1925; SAUER & DAUCHY, 1990; TISDALE, 1990).

A manutenção, ainda que precária, da glicemia, em ratos portadores de hepatoma de Morris, é feita a custas de mobilização de glicogênio hepático, e

catabolismo protéico muscular ( CAMERON & ORD, 1983). Este *turnover* elevado de glicose, durante a vigência de neoplasia, associado à proteólise, poderia ser explicado pela concentração plasmática elevada de glucagon e hormônio adrenocorticotrópico (HEBER et al., 1982). Situação semelhante é descrita em pacientes acometidos de câncer de pulmão e de pâncreas ( AMATRUDA & UPTON, 1974; HOLROYDE et al., 1984).

Segundo FERNANDES (1989), as ilhotas pancreáticas de ratos portadores de carcinossarcoma são hiposecretoras de insulina, se comparadas a dos controles, respondendo menos quando incubadas com glicose.

Em resposta à doenças neoplásicas ou infecciosas, o organismo secreta citocinas que alteram o metabolismo. Estão incluídas neste panorama citocinas como gama-interferon, linfotoxina, interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF). Pelo menos este último atua inibitoriamente sobre os centros de apetite, sendo anorexígenos. (BEUTLER & CERAMI, 1990; LUNDHOLM, 1989). Em estudos feitos em camundongos injetados com TNF ocorre uma redução de ingesta hídrica e alimentar, bem como perda de peso ( MAHONY & TISDALE, 1988).

### **1.3. Metabolismo glicídico na implantação e decidualização**

A gestação normal, tanto em humanos quanto em ratas, apresenta duas fases distintas, do ponto de vista metabólico, de reservas fisiológicas e energéticas ( HERRERAS et al., 1991). Na gestação inicial, antes da metade da gestação, observa-se uma fase de anabolismo, com acúmulo de gordura no tecido adiposo, deposição de glicogênio no fígado e músculos e incremento de massa magra. A segunda metade da gestação caracteriza-se pela mobilização destas reservas, sendo denominada de fase catabólica, quando ocorrem grandes gastos energéticos, com o crescimento do conceito (FREINKEL & METZGER, 1992; HERRERAS et al., 1991).

A implantação é o primeiro passo do desenvolvimento embrionário, e para que ocorra com sucesso esta interação entre dois organismos diferentes é vital que condições adequadas, estruturais, bioquímicas e hormonais estejam presentes (ABRAHANSON & ZORN, 1993 ).

A implantação é uma seqüência complexa de eventos que se inicia com o posicionamento do embrião no útero, ligando-se ao epitélio luminal. Após um período em que o blastocisto é transportado no oviduto ocorre uma curta permanência em estado livre na cavidade uterina (BOVING, 1971).

Do instante da fecundação até a implantação existe um período de tempo bastante definido para cada espécie. Se o primeiro dia de gestação (DG)

for considerado o dia de visualização de espermatozóides no esfregaço vaginal, a implantação ocorre no 4º DG no hamster dourado (WARD, 1948), no 5º DG no camundongo e no 6º DG no rato (ENDERS & SCHLAFKE, 1967).

Nos primeiros dias de gestação nos roedores, entre a fertilização e o início da implantação ocorrem modificações vasculares e celulares no endométrio que receberá o embrião. Ocorre uma onda de proliferação de fibroblastos, sob ação do estrogênio e depois da progesterona (FINN, 1977).

Antes do início da implantação, no 2º DG foi observado remodelação do colágeno endometrial, que sofre modificações quantitativas e qualitativas (ZORN et al., 1986, 1989). Também ocorre neovascularização do endométrio durante a implantação (PSYCHOYOS, 1960, 1961), bem como aumento da permeabilidade vascular da região (FINN & McLAREN, 1967). ABRAHANSON (1983) mostrou que tais alterações eram típicas dos sítios de implantação, não ocorrendo nas regiões entre elas, nos sítios de interimplantação.

A implantação em roedores é acompanhada por alterações marcantes no endométrio, que consistem em modificações de forma, organização, metabolismo e conteúdo celular, formando um tecido distinto com tempo de existência curto, a decídua (ABRAHANSON & ZORN, 1993). A

decidualização tem início imediatamente ao redor da mucosa da cripta uterina aonde o embrião está se implantando, com início na área subepitelial e antimesometrial (MOSSMAN, 1987). As células deciduais são formadas a partir de diferenciação nos fibroblastos do estroma uterino, com aumento do volume celular e diminuição do espaço extracelular (LUNDKISVIST, 1978). É possível induzir, provavelmente por estímulo mecânico, a decidualização com a injeção de óleo, água ou ar no lúmen uterino, dando origem a um tecido denominado deciduoma, que é muito semelhante a decídua verdadeira (ABRAHANSON & ZORN, 1993).

Entre as diferenças ultraestruturais as células da decídua contêm níveis mais elevados de glicogênio, lipídios e filamentos intermediários, porém estas modificações são graduais, e atingem o auge, em ratas, no 10º DG (PARR & PARR, 1989).

A quantidade de glicogênio contido no útero de mamíferos durante a gestação inicial tem sido freqüentemente investigada, e acredita-se, que seja uma importante fonte de energia para o embrião, depois da anastomose com o útero materno (GREGOIRE & RICHARDSON, 1970). Aumentos de até 500% na quantidade de glicogênio na decídua foram dosados por ORSINI (1962).

Resultados semelhantes foram obtidos por FOSTER et al. (1963), em deciduomas induzidos por óleo mineral. GREGOIRE & RICHARDSON,

(1969) quantificaram um aumento súbito (373%) na quantidade de glicogênio decidual, em hamster, justamente no dia da implantação.

DEMERS et al., (1972) afirmam que a quantidade de glicogênio uterino em ratas tende a cair a níveis inferiores aos do estro do 1º ao 6º DG, porém se eleva bruscamente a partir do 6º DG, devido ao aparecimento de células deciduais. Resultados semelhantes foram obtidos por KOSTYO (1957); PARVEZ & PARVEZ (1974); e CHEW & RINARD (1979).

VASILENKO et al., (1981) afirmam que a quantidade de glicogênio do útero total somente se eleva significativamente a partir do 15º DG em ratas. Porém se as medidas forem efetuadas especificamente nos sítios de implantação, onde ocorre a decidualização, esta elevação já pode ser mensurada a partir do 5º DG.

Alguns autores relacionaram a queda da fertilidade com a diminuição da quantidade de glicogênio decidual. THORPE & CONNORS (1975) observaram que , em hamsters, a fertilidade cai com a da idade dos animais. Em animais jovens o acúmulo de glicogênio é maior e mais precoce , sendo o contrário verificado em animais idosos.

Drogas antiprogestéricas aplicadas via intravenosa no 2º DG em ratas causam uma diminuição dose dependente do glicogênio decidual, diminuindo progressivamente, conforme o aumento da dose, também o

sucesso da implantação nos animais tratados ( KAWANO et al.,1989; TAKAHASHI, 1988).

Em humanos o conteúdo de glicogênio no útero não gravídico pode ser medido e usado como fator prognóstico para tratamentos de infertilidade, sendo que úteros com baixo conteúdo de glicogênio tendem a apresentar mau prognóstico de sucesso ( MIMORI et al., 1981; MAEYEAMA et al., 1977).

O consumo álcool pode causar diminuição da fertilidade, associado a queda aguda do glicogênio decidual, sendo que esta situação pode ser simulada em laboratório com sucesso ( PADMANABHA, 1985). Avaliações conduzidas por MITCHELL & GOLDMAN (1996) são compatíveis com os dados anteriores.

#### **1.4. Alterações decorrentes da associação entre gestação e câncer.**

MARCONDES (1997) estudando os efeitos do tumor de Walker 256 sobre o crescimento da placenta e do feto concluíram que ocorre uma diminuição do peso e quantidade protéica da placenta bem como no número e peso dos fetos. No mesmo trabalho divulgou-se que a concentração plasmática de glicose, albumina e globulina das ratas estava reduzida.

Em estudos, também com gestação tardia, concluiu-se que o tumor de Walker 256 reduz a ingestão e a eficiência alimentar em ratas grávidas, porém em menor magnitude do que as não grávidas. Também foi evidenciado maior crescimento tumoral, em fêmeas não grávidas, ambos os efeitos talvez tenham bases fisiológicas nas modificações hormonais da gestação (MARCONDES, 1994).

Era senso comum, há algumas décadas que a gravidez e lactação eram fatores facilitadores para evolução de tumores malignos (ABRÃO, 1988; BANKS, 1967), sendo a recomendação de então a interrupção da gravidez.

Entretanto estudos clínicos conduzidos por GARBE (1993), demonstraram que o prognóstico materno se mantinha inalterado.

Como nem todos os tumores se comportam de forma semelhante, a agressividade de tumores de tireóide fica bastante aumentada em associação a gravidez (KOBAYASHI, 1994).

Em estudos clínicos o que se pode afirmar é que o prognóstico do conceito e da evolução da gestação é menos entusiasmador do que o da evolução da doença, não sendo raro metástases no feto e em anexos embrionários, baixo peso ao nascimento e altos índices de aborto espontâneo e morte perinatal (Di FRONZO & O'CONNEL, 1996).

Estudos realizados por KING et al. (1985) em pacientes com câncer de mama mostram que 40% das gestações foram interrompidas, neste caso 12% por abortamento espontâneo, 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 obito fetal e 7% de morte perinatal. POTTER & SCHOENEMAM (1970) quantificaram que 24% das pacientes oncológicas grávidas desenvolveram metástases em anexos embrionários ou fetais.

PARENTE et al. (1988) mostram que 7% dos casos de câncer mamário, apresentam associação com a gestação, e que pacientes que apresentam baixa prolactinemia apresentam menor risco de câncer de mama que o restante da população. MEYER et al.(1986 a e b ) afirmam que as mulheres com altas taxas plasmáticas de prolactina e estrógenos apresentam maior risco de câncer mamario ductal.

Drogas de ação anti estrogênica como o tamoxifeno são medicamentos eficazes na profilaxia de recidiva em pacientes mastectomizadas, cuja biopsia evidenciou receptores para este hormônio, no tumor, são hoje usados experimentalmente como profiláticos para pacientes de alto risco, como as mulheres com larga história familiar deste tipo de patologia. (LIBERATO et al., 1993)

## OBJETIVOS

Como pode ser constatado na revisão da literatura, a relação entre câncer e gestação aparentemente é incomum, porém crescente (IOACHIN & MOROSON.1986). Estudos nesta área são relativamente raros, sendo mais raros ainda trabalhos correlacionando o fenômeno da implantação do embrião com o desenvolvimento de um câncer.

A literatura estudada não mostra se ocorrem alterações dos níveis de glicogênio decidual em casos de caquexia induzida pela presença de um tumor. Deve-se considerar que esta possibilidade não é improvável uma vez que justificaria uma diminuição da taxa de fertilidade em situações de caquexia.

Pretendemos nesta pesquisa avaliar quantitativa e qualitativamente a situação do glicogênio nas células deciduais no sétimo e oitavo dias de gestação em ratas, (dias em que ocorre surto de síntese de glicogênio na decídua) na vigência de um modelo de câncer, o tumor de Walker-256, com o objetivo de associar a caquexia cancerosa com queda dos níveis de glicogênio decidual, o que seria uma explicação para a diminuição da taxa de implantação.

É fato aceito que neoplasias malignas deprimem o estoque energético do organismo (BECK & TISDALE,1989 ; MÉSZAROS et al.,1987) bem como depleta glicogênio hepático e muscular (FERNANDES 1989).

Para tanto serão realizados procedimentos para análise em microscopia de luz, que permitam a constatação de alterações da presença de glicogênio nas células decíduais, por meio de técnicas histoquímicas, bem como análise bioquímica do teor de glicogênio no tecido.

Considerando que são poucas as pesquisas que correlacionam os eventos da implantação do blastocisto com o câncer, procuramos estudar , por um modelo experimental a associação do carcinossarcoma de Walker 256 e o sucesso da implantação, analisando:

1. os efeitos do crescimento neoplásico na quantidade de glicogênio decidual.
2. os efeitos destas alterações sobre número de embriões que efetivamente se implantam ao útero.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Para a realização deste estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar com idade entre 90 e 120 dias obtidas no 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 entre 24 e 28°C, com água e alimento *ad libitum*. Foi utilizada ração Nuvital Nutrientes Ltda. tipo Nuvilab CR1.

#### 3.2. Grupos de estudo e cruzamento

##### 3.2.1. Grupo I

Ratas grávidas controle divididas aleatoriamente em 2, subgrupos (IA e IB), de 4 a 6 animais. Os animais dos subgrupos IA e IB receberam injeção de placebo (1ml de salina à 0,9%), sempre oito dias antes do momento da análise dos dados, denominado dia zero do tumor .

- 1) subgrupo IA - ratas grávidas avaliadas no 7º dia da gestação (7ºDG);
- 2) subgrupo IB - ratas grávidas avaliadas no 8ºDG e;

### 3.2.2. Grupo II

Ratas grávidas tratadas com tumor ativo divididas aleatoriamente em 2 subgrupos, (IIA e IIB), de 4 a 6 animais cada. Os animais dos subgrupos IIA e IIB, foram inoculados com 1ml de solução contendo  $2 \times 10^7$  células vivas de tumor de Walker 256, sempre oito dias antes do momento da análise dos dados denominado dia zero do tumor.

3) subgrupo IIA - ratas grávidas avaliadas no 7ºDG;

4) subgrupo IIB - ratas grávidas avaliadas no 8ºDG e:

### 3.2.3. Grupo III

Ratas grávidas tratadas com tumor inativado, também divididas aleatoriamente em 2 subgrupos (IIIA e IIIB) de 4 a 6 animais cada um. Os animais dos subgrupos IIIA e IIIB foram inoculados com 1ml de solução contendo  $2 \times 10^7$  células inativadas de tumor de Walker 256, sempre oito dias antes do momento da análise dos dados denominado dia zero do tumor.

5) subgrupo IIIA - ratas grávidas avaliadas no 7ºDG;

6) subgrupo IIIB - ratas grávidas avaliadas no 8ºDG.

### 3.3. Acasalamento

Para o gerenciamento dos grupos de acasalamento foi adotada a seguinte metodologia: 48 ratas foram aleatoriamente divididas nos 3 grupos acima descritos. Para formar o Grupo I 16 delas receberam 1ml de NaCl 0,9%, via subcutânea, no flanco direito. É importante afirmar que ocorreu uma taxa de gravidez negativa de 30%.

O grupo II foi formado por 16 ratas que receberam 1ml. contendo  $2 \times 10^7$  células vivas de tumor de Walker 256, via subcutânea, no flanco direito.

Para a formação do Grupo III foram inoculadas 16 ratas com 1ml. De solução contendo  $2 \times 10^7$  células inativadas de tumor de Walker 256, via subcutânea, no flanco direito (FERNANDES, 1991).

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 mantidos por 48h. Na manhã seguinte e subsequente, foi feita pesquisa para espermatozóides no conteúdo vaginal. As ratas que apresentaram resultado positivo eram consideradas prenhes e separadas do grupo. Segundo ENDERS & SCHALFKE, (1967) este era considerado o 1º dia gestacional (1º DG). As

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

Por outro lado, as fêmeas que tiveram a prenhez positivada no segundo dia foram rotuladas, conforme material inoculado, como subgrupos IA, IIA e IIIA, sendo sacrificadas no sétimo dia gestacional. Assim todas recebiam as inoculações e eram sacrificadas juntas, o que garantia o mesmo tempo de evolução tumoral, mas idades gestacionais diferentes. Todas as demais fêmeas foram excluídas da pesquisa.

A detecção dos espermatozóides, foi realizada através de esfregaços vaginais, obedecendo aos padrões descritos por ALLEN (1922), que preve a visualização dos flagelos dos espermatozoides, em preparação de laminais do esfregaço vaginal, a fresco.

### **3.4. Tumor de Walker 256**

O tumor de Walker 256 é um carcinoma mamário espontâneo descrito por George Walker em 1928, no *John Hopkins University School of Medicine*.

Apresenta-se infiltrativo e do tamanho de uma noz. Regride na lactação, porém ao término desta, cresce rapidamente (STEWART, 1959).

As amostras do tumor foram cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes do Departamento de Fisiologia da UFPR.

Preliminarmente foi observado que o tumor de Walker, da forma que era manipulado por nos, tornava-se palpável no 2º dia de experimento, e a partir do 8º dia exulcerava e freqüentemente apresentava contaminação bacteriana secundária. Contudo por volta do sétimo dia de desenvolvimento os animais já apresentavam uma perda ponderal em torno de 8 a 10% de seu peso inicial.

Frente a estes parâmetros todos os animais foram sacrificados e avaliados no sétimo dia de desenvolvimento tumoral. Todos os animais com exulceração ou infecção secundária eram descartados da pesquisa.

### **3.5. Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256: manutenção da linhagem.**

Os animais portadores dos tumores dos quais foram coletadas as células utilizadas em nossa pesquisa foram sacrificados por deslocamento cervical sem anestesia e o tecido tumoral retirado e colocado em uma placa de Petri com NaCl a 0,9% em gelo, para que a temperatura se mantivesse entre 0 e 4°C. Com auxílio de uma tesoura de ponta fina foram desbridadas todas as áreas desvitalizadas ou de origem não tumoral. Em seguida, fragmentou-se o

tumor em pedaços de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, os quais foram colocados em um béquer contendo solução salina 0,9% gelada. Ao final desta etapa o material era fragmentado mais uma vez em liquidificador, em processo cuidadosamente suave, para evitar lise celular, sempre tomado-se o cuidado de que nunca a temperatura superasse os 4° C Este material era filtrado em uma gaze e coletado em um béquer, desprezava-se o material retido, e o filtrado transferido para tubos plásticos de 50ml e centrifugado a -2° C de temperatura em 1500 rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada. Ao fim da centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em solução salina gelada a 0,9%. A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer. Em seguida, preparada 100ml solução contendo  $2 \times 10^7$  células/ml, desta solução foi injetado no subcutâneo na flanco direito dos ratos que receberam o tumor. Estes animais foram mantidos em biotério servindo como doadores de células para o reinício do processo.

### **3.6. Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256: formação dos grupos experimentais.**

Para a inoculação do tumor nas ratas dos grupos experimentais, com tumor ativo (grupo II) e das que formaram o grupo inoculadas com tumor

inativado (grupo III) todas as etapas foram seguidas de forma idêntica a descrita anteriormente, para coleta e preparação da solução infectante, porém quando era efetuada o último repique, antes da inoculação nos animais experimentais, as células tumorais não foram inoculadas no subcutâneo do flanco direito dos ratos, e sim intraperitonealmente. Nesta situação formavam-se vários tumores sólidos no peritônio e nas vísceras abdominais do animal, mas também formava-se uma ascite volumosa, muito rica em células neoplásicas livres, facilmente retiradas por punção. Tal líquido ascítico tinha o conteúdo celular quantificado em câmara de Neubauer e diluído, se necessário, com NaCl a 0,9%, até ser obtida a concentração de  $2 \times 10^7$  células/ml. Desta solução foi retirada e inoculada 1ml via subcutânea no flanco direito dos animais experimentais, sem anestesia, no período compreendido entre 14:00 e 16:00,. Este ficou convencionado ser o dia 0 de desenvolvimento do carcinossarcoma . Este procedimento foi adotado, uma vez que FERNANDES, em trabalho não publicado, relata uma aumento da agressividade do tumor graças a esta rotina e que sucessivas passagens subcutâneas modificam o seu comportamento, atenuando-o. Este fato ainda tem sua causa obscura.

Quando a inoculação foi efetuada nos animais que receberam o tumor inativado, todo o processo era repetido, com a diferença das alíquotas

administradas foram aquecidas por 20 minutos a 60°C, com o objetivo de inviabilizar as células.

Os animais do grupo controle (grupo I) receberam injeções de solução salina 0,9% via subcutânea, no flanco direito, da mesma forma que os demais grupos.

### **3.7. Controle ponderal das ratas**

Para todas as ratas foi efetuado um controle de variação de peso, nos dias 0, 3 e 7, por medida direta em balança, entre as 14 e 16 horas. Também foram avaliados os pesos dos tumores, ao final do experimento, e este subtraído do peso corporal das ratas portadoras do carcinossarcoma, sendo assim obtido os pesos das carcaças. Nos casos dos grupos controle os pesos das carcaças foram iguais aos pesos corporais.

### **3.8. Evidenciação e remoção do sítio de implantação do embrião nos cornos uterinos e coleta de fragmentos do fígado**

Todos os animais utilizados na pesquisa foram sacrificados por deslocamento cervical, e somente após a sua morte foi efetuado qualquer procedimento invasivo, diferente da implantação do tumor e esfregaço vaginal.

Imediatamente após a morte das fêmeas, a cavidade abdominal foi aberta, por incisão mediana, sendo o útero localizado, removido e dissecado. Neste processo retirava-se quais quer fragmentos de outros tecidos.

Em uma placa de Petri, com fundo de parafina, os sítios de implantação foram localizados macroscopicamente e removidos com uma lâmina de bisturi.

Sendo, então, 3 sítios de implantação de cada animal armazenados em nitrogênio líquido e destinados à avaliação bioquímica do conteúdo de glicogênio. As demais amostras foram fixadas em METACAN (metanol, ácido acético e clorofôrmio em 1:1:1) para que a rotina de citoquímica para detecção de glicogênio. Logo após a remoção do útero, o fígado foi fragmentado em porções de aproximadamente 0,5g., sendo mantido em

nitrogênio líquido para dosagem de glicogênio e outra fixada quimicamente em METACAN.

### **3.9. Histoquímica com Ácido Periódico e Reativo de Schiff (P.A.S)**

As secções uterinas e hepáticas foram fixadas por imersão em Metacan.

O material foi fixado por 03 horas em temperatura ambiente, desidratado em etanol absoluto, diafanizado em xilol e emblocado em parafina histológica.

Para avaliar o processo de depleção do glicogênio nos animais, foram coletados também fragmentos do fígado. Estas amostras foram submetidas ao mesmo processo de fixação descrito.

Cortes de 4  $\mu$ m de espessura foram aderidos em lâminas de vidro previamente revestidas com solução de Poly-L-lisina (Sigma Co), permanecendo em estufa a 37°C, por no mínimo duas horas para total adesão do corte à lâmina. Para todas as técnicas utilizadas, os cortes foram desparafinizados em xilol e rehidratados em grade de concentração decrescente de etanol, da seguinte maneira:

- 1) 5 minutos em alcool/xilol 1:1
- 2) 5 minutos em xilol I

- 3) 5 minutos em xilol II
- 4) 5 minutos em álcool 50%
- 5) 5 minutos em álcool 70%
- 6) 5 minutos em álcool 90%
- 7) 5 minutos em álcool absoluto

Esta reação citoquímica é amplamente utilizada para estudar polissacarídeos, os quais são oxidados pelo ácido periódico originando o aparecimento de aldeídos. Estes por sua vez, são evidenciados pelo reativo de Schiff. Os cortes são imersos por 5 minutos no ácido periódico a 0,5% para a oxidação. Em seguida, realiza-se lavagem em água destilada e imergem-se os cortes no reativo de Schiff por 20 minutos. Após esta etapa realiza-se imersão em água sulfurosa (bissulfito de sódio a 10%, HCl 1N em água destilada) em dois banhos de 3 minutos. A seguir realiza-se desidratação, diafanização e montagem em Entellan. O material PAS-positivo se cora em vermelho-púrpura. Nos cortes-controle tratava-se o material com amilase (Sigma Co.).

O exame dos cortes era realizado em microscópio de Luz e as fotomicrografias obtidas no Fotomicroscópio ZEISS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (sob coordenação do Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva).

### 3. 10. Dosagem de glicogênio decidual e hepático

Tem como objetivo dosar o conteúdo de glicogênio produzido e acumulado na decídua, e fígado.

1. O útero é retirado e colocado em tubo de ensaio contendo 50µl de KOH e levados ao banho em temperatura de 60° C por 20 a 30 minutos , onde era homogeizado
2. Retira-se do banho e acrescenta-se ácido acético glacial mais 500µl de tampão acetato, preparado com 100ml de água destilada, 480µl de ácido. Acético glacial 96%, 975 mg de acetato de sódio calibrado para pH. 4.8 adicionado de 20mg de amiloglicosidase (Sigma Co.) e mantém por 2 horas à 37°C. Esta etapa transforma o glicogênio existente no tecido em glicose. Após é possível mensurar a glicose nesta solução por espectofotometria com 100µl da amostra mais 1000µl de tampão TEA, que é constituído de 100ml de água destilada, 5.6g de tris, 0,075g de MgSO<sub>4</sub> em pH7,4 adicionado de ATP 0,490g, NADP 0,050g, HKG6P 600µl e após 40 minutos em temperatura ambiente realizar leitura em espectofotômetro (340nm) e aplicar leitura em formula para cálculo de glicogênio, comparado a solução padrão.

### **3.11. Análise estatística**

Foram calculadas a média e desvio padrão de todos os dados obtidos, e comparados por meio de análise de variância e pelo teste “ANOVA” e teste t de Tukey

Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativo.

## **4. RESULTADOS**

**4.1 FASE I: Efeitos do implante do carcinossarcoma de Walker 256 e do líquido ascítico inativado sobre a evolução ponderal, número de sítios de implantação de embriões no útero e taxa de mortalidade em ratas.**

Ratas inoculadas com o carcinossarcoma de Walker 256 e com líquido ascítico inativado foram mantidas por 8 dias para que se avaliasse os efeitos da neoplasia sobre o sucesso da implantação do embrião no útero e evolução ponderal das ratas grávidas

### **4.1.1. Taxa de mortalidade**

Não foram observadas mortes em nenhum dos grupos

### **4.1.2. Número de sítios de implantação de embriões**

A figura 1 mostra a média e desvio padrão do número de embriões encontrados nos grupos de ratas controle com 7 e 8 dias de gestação (DG) (subgrupos IA e IB), inoculadas com tumor ativo com 7 e 8 dias de gestação (subgrupos IIA e IIB) e inoculadas com tumor inativado com 7 e 8 dias de

gestação (IIIA e IIIB). Foram observados nos grupos controles (IA e IB) os seguintes dados: no subgrupo IA foi totalizada uma média de  $10 \pm 3,3$  embriões para uma amostra de 7 ratas. No subgrupo IB observou-se média de  $11 \pm 1,5$  embriões em 6 ratas.

Nos grupos inoculados com tumor ativo (IIA e IIB) foram obtidos, para o subgrupo IIA média de  $6,0 \pm 1,3$  embriões em 6 ratas. Para o subgrupo IIB foi contabilizada a média de  $6,5 \pm 1,1$  embriões em 6 ratas.

Quando se procedeu a contagem de sítios de implantação nos grupos que receberam o tumor inativado os resultados foram: no subgrupo IIIA, com 4 fêmeas, uma média de  $10 \pm 1,8$  embriões, e no subgrupo IIIB com 5 fêmeas uma média de  $9,6 \pm 1,8$  embriões. Não foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos de um mesmo grupo, nem entre os grupos controle e os que receberam tumor inativado (grupos I e III), porém o grupo que recebeu tumor ativo (grupo II) e significativamente diferente dos grupos controle (grupo I) dos que receberam tumor inativado (grupo III).

#### **4.1.3. Peso da neoplasia**

Para todas as ratas do grupo II as massas tumorais tornaram-se palpáveis a partir do 2º dia de desenvolvimento tumoral, com aproximadamente 10g. ao 7º dia.

#### **4.1.4. Peso da carcaça**

Todos os animais foram pesados nos dias 0 , 3 e 7 de inoculação.

Nas figuras 2, 3 e 4 encontram-se os dados da evolução do peso da carcaça dos subgrupos de ratas implantadas ou não com carcinossarcoma e inoculadas com líquido ascítico inativado, nos 7º e 8º dias de idade gestacional.

As figuras 2 e 3 mostram os resultados dos grupos I e III aonde os peso das carcaças aumentaram progressivamente durante todo o experimento.

No grupo I, das ratas inoculadas com solução salina ocorreu um ganho ponderal semelhante ao grupo III.

No grupo II, representado pela figura 3, em que as ratas receberam o líquido ascítico ativo, e desenvolveram o tumor, ocorreu uma elevação do peso corporal nos 3 primeiros dias de experimento, que se estabilizou ate o final do experimento, porem como, para se obter o peso da carcaça é descontado o peso do tumor, o peso definitivo dos indivíduos deste grupo mostrou-se significativamente reduzido, se comparado aos grupos II e III.

**4.2. FASE II: Efeitos do carcinossarcoma de Walker 256 na quantidade de glicogênio acumulado no fígado e na região de implantação do blastocisto no útero, em ratas.**

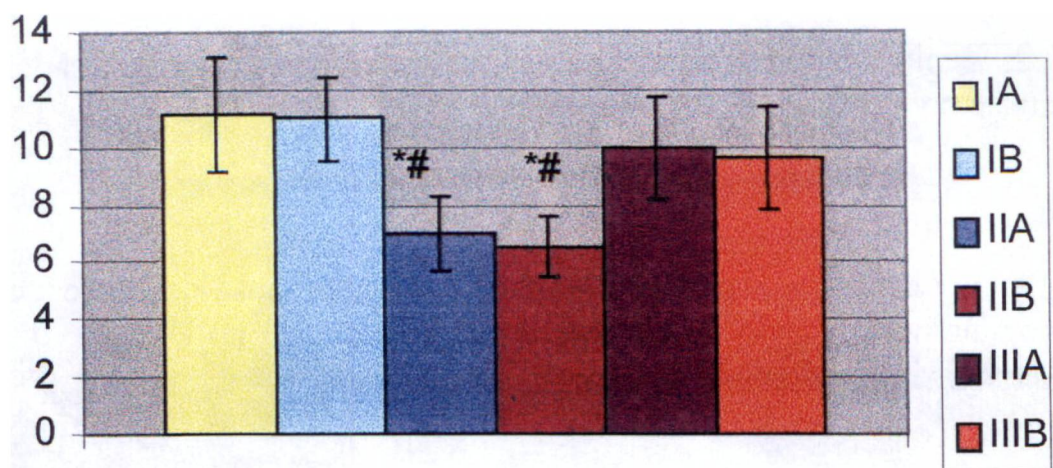


Figura 1: Número de embriões encontrados nos cornos uterinos nos diferentes subgrupos, sendo IA controle de 7<sup>o</sup> D.G, n=7, IB controle de 8<sup>o</sup> D.G., n=6, IIA tumor de 7<sup>o</sup> D.G., n=6, IIB tumor de 8<sup>o</sup> D.G. n=6, IIIA tumor inativado de 7<sup>o</sup> D.G., n=4 e IIIB tumor inativado de 8<sup>o</sup> D.G. n=5. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. (\*  $p < 0,05$  Quando comparado ao controle: #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tumor inativado)

Fig.2: Evolução ponderal em gramas nos subgrupos controle sendo IA controle no 7º D.G. n=7 e IB controle de 8º D.G. n=6

Fig.3: Evolução ponderal em gramas nos subgrupos inoculados com tumor inativado, sendo IIIA o grupo tumor inativado no 7º D.G., n=4 e IIIB tumor inativado de 8º D.G., n=5

Fig.4: Evolução ponderal em gramas nos subgrupos portadores do Carcinossarcoma de walker-256. sendo o IIA 7º D.G., n=6 e IIB 8º D.G., n=6 Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. (\*  $p < 0,05$  Quando comparado ao controle: #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo tumor inativado)

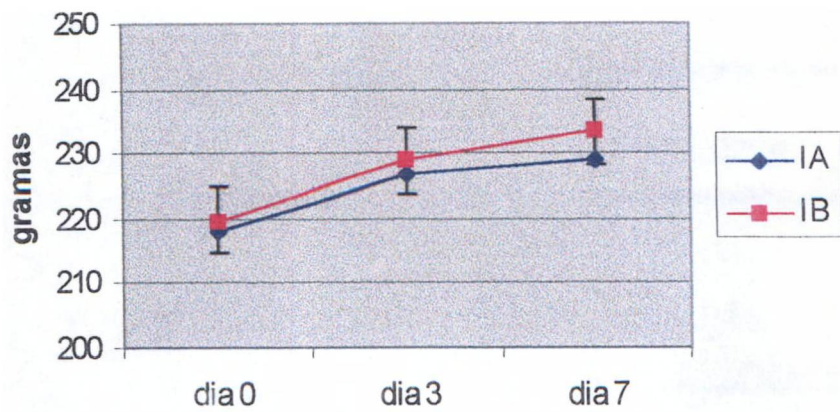


Figura 2

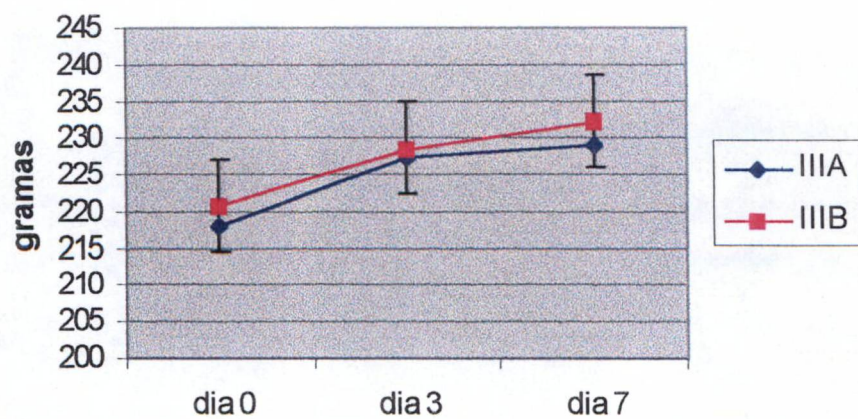


Figura 3

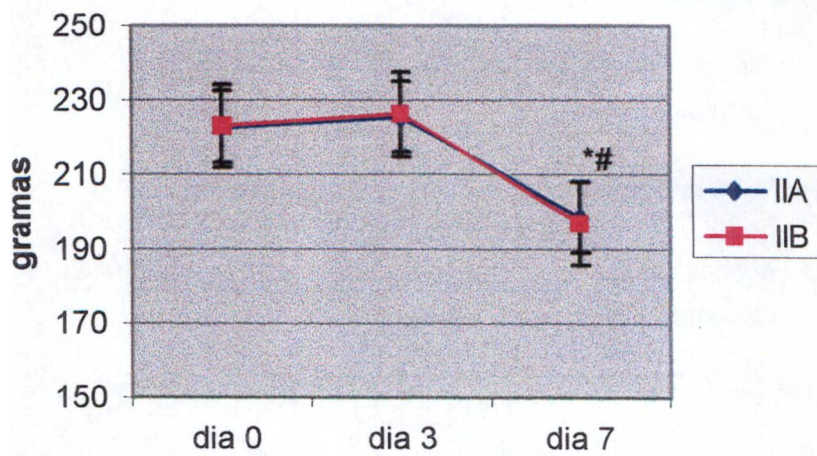


Figura4

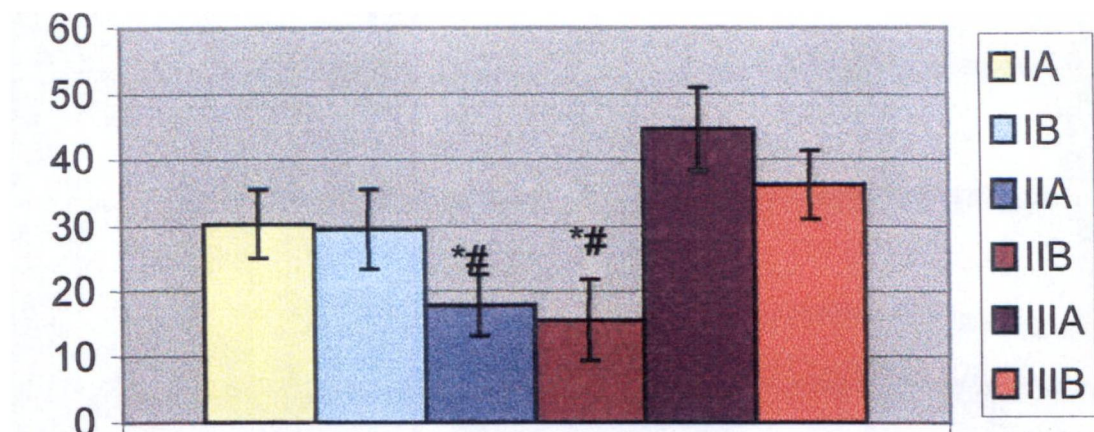


Figura 5: Conteúdo de glicogênio, (mg/100mg de tecido) nos sítios de implantação uterina nos diferentes subgrupos, sendo IA controle de 7<sup>o</sup> D.G, n=7, IB controle de 8<sup>o</sup> D.G., n=6, IIA tumor de 7<sup>o</sup> D.G., n=6, IIB tumor de 8<sup>o</sup> D.G. n=6, IIIA tumor inativado de 7<sup>o</sup> D.G., n=4 e IIIB tumor inativado de 8<sup>o</sup> D.G. n=5. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. (\* p<0,05 Quando comparado ao controle: # p<0,05 quando comparado ao grupo tumor inativado)

A Figura 5 e a tabela 1 mostram a quantidade de glicogênio em mg/100ml nas secções uterinas que incluíam a área de implantação do blastocisto em cada um dos grupos estudados.

| Subgrupos | Sítio de implantação | Hepático       |
|-----------|----------------------|----------------|
| IA        | 30,2±5.2             | 67,3±19,8      |
| IB        | 29,4±6.1             | 102,8±38,4     |
| IIA       | 17,8±4,8 * #         | 68,7±21,3      |
| IIB       | 15,5±6,2 * #         | 84,3±35,5      |
| IIIA      | 44,6±6,4 * a         | 289,2±80,9 * a |
| IIIB      | 36,2±5,1 * a         | 161,4±30,3 * a |

Tabela 1: Quantidade de glicogênio, em mg/100ml nos sítios de implantação uterina e fígado nos diferentes subgrupos, sendo IA controle de 7<sup>o</sup> D.G. n=7, IB controle de 8<sup>o</sup> D.G., n=6 .IIA tumor de 7<sup>o</sup> D.G., n=6 . IIB tumor de 8<sup>o</sup> D.G. n=6 .IIIA tumor inativado de 7<sup>o</sup> D.G., n=4 e IIIB tumor inativado de 8<sup>o</sup> D.G.n=5. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas(p<0.05) para \*≠ I, # ≠ III e a ≠ I.

A ratas do grupo II, apresentam uma redução significativa na quantidade de glicogênio na região de implantação, mostrando um menor acúmulo glicídico na área decidual, se comparadas ao grupo controle (grupo I) e ao grupo III.

Quando se efetua a comparação do grupo III com os demais encontrou-se uma elevação significativa na quantidade de glicogênio acumulado na decídua, quando comparado com os demais grupos (grupos I e II).

O conteúdo de glicogênio hepático (figura 6) nas ratas do grupo II não foi estatisticamente diferente dos dosados no controle, mas as ratas do grupo III tiveram a quantidade de glicogênio acumulado no fígado significativamente elevada, quando comparada aos grupos I e II.

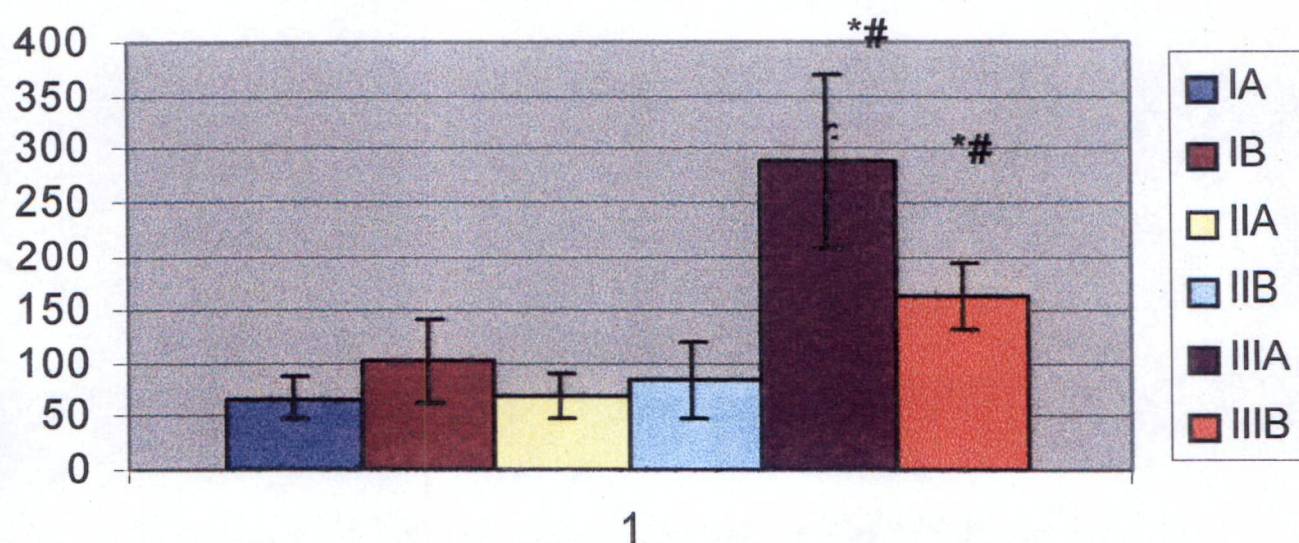


Figura 6: Conteúdo de glicogênio, (mg/100mg de tecido) no fígado nos diferentes subgrupos, sendo IA controle de 7º D.G, n=7, IB controle de 8º D.G., n=6 ,IIA tumor de 7º D.G., n=6 , IIB tumor de 8º D.G. n=6 ,IIIA tumor inativado de 7º D.G., n=4 e IIIB tumor inativado de 8º D.G.n=5. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão. (\* p<0,05 Quando comparado ao controle; # p<0,05 quando comparado ao grupo tumor)

### **4.3. FASE III:**

#### **4.3.1 Distribuição do glicogênio no endométrio decidualizado e fígado .**

Os úteros que apresentaram, macroscopicamente , o aspecto de colar de contas foram considerados gravídicos, portanto decidualizados, levando-se em conta a idade gestacional dos grupos ( dias 7 e 8 de gestação).

A secção do útero para coleta do embrião possibilitou a obtenção do material que forneceu os cortes histológicos para a microscopia de luz, corados com PAS, que evidenciou a presença de glicogênio, predominantemente nas células deciduais na porção antimesometrial, e em menor quantidade na porção mesometrial do endométrio. Foi possível notar um acúmulo marcante do polissacarídeos nas proximidades do embrião. A marcação para glicogênio mostrou-se positiva para todos os grupos estudados (**Figs. 1a, 1b, 1c e 4a, 4b e 4c**), o controle negativo, tratado com amilase não apresentou marcação (**Figs. 1d e 4d**). Visualmente foi possível ser notada uma diminuição na marcação nos grupos tratados com tumor e uma marcação acentuada nos grupos tratados com o tumor inativado, resultados que são compatíveis com a análise bioquímica .

Alem dos cortes histológicos corados com PAS, alguns cortes foram contracorados com hematoxilina (**Figs. 2a e 2b e 5a e 5b**). Nestes casos o

endométrio estava constituído predominantemente por células decíduais maduras, poliédricas e com citoplasma abundante. Estas células mostravam um núcleo grande, esférico com nucléolo, único ou não, proeminente. Frequentemente pode-se notar bi-nucleação. O espaço extracelular era reduzido ocupado por veias e capilares. O embrião, ocupando a luz do útero, mostrava células em intensa divisão, com núcleos grandes e acentuada basofilia.

. A marcação do glicogênio pela técnica de PAS, nos cortes de fígado dos diferentes grupos revelaram abundância de glicogênio em todos os grupos estudados (Figs. 3a, 3b, 3c, 6a, 6b e 6c ) com distribuição homogênea dos grânulos por todo o corte, em todos os grupos. Da mesma forma que na análise da distribuição do glicogênio uterino não foi possível quantificar ou registrar diferenças morfológicas estatisticamente comprovadas entre os grupos, contudo visualmente nota-se uma marcação mais acentuada nos grupos tratados com o tumor inativado (subgrupos IIIA e IIIB).

Todos os cortes , tanto de útero quanto de fígado, foram corados no mesmo dia, na mesma bateria de coloração, e posteriormente fotografados no mesmo fotomicroscópio, com o mesmo filme. Todas as fotografias são provenientes do mesmo processo de revelação. Todos estes cuidados visaram minimizar as possibilidades de variação de coloração, nos cortes e nas reproduções fotográficas.

## **5. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

**Fig. 1a** Embrião no 7º dia de gestação (D.G). e decídua antimesometrial obtida de rata normal (subgrupo IA). Endométrio decidualizado mostrando distribuição de polissacarídeos (●). A seta indica o blastocisto. Corado com PAS (glicogenio +).

**Fig. 1b** Embrião no 7º D.G.. e decídua antimesometrial obtida de rata inoculada com tumor de Walker 256 (subgrupo IIA). Endométrio decidualizado mostrando distribuição de polissacarídeos (●). A seta indica o blastocisto. Corado com PAS. Notar a significativa redução na positividade.

**Fig. 1c** Embrião no 7º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata inoculada com tumor de Walker 256 inativado (subgrupo IIIA). Endométrio decidualizado mostrando distribuição de polissacarídeos (●). A seta indica o blastocisto. Corado com PAS. A positividade se mostra mais acentuada que nos grupos I e II.

**Fig. 1d** Embrião no 7º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata normal (subgrupo IA). Endométrio decidualizado A seta indica o blastocisto. Corado com PAS.+ amilse.(controle negativo de coloração).

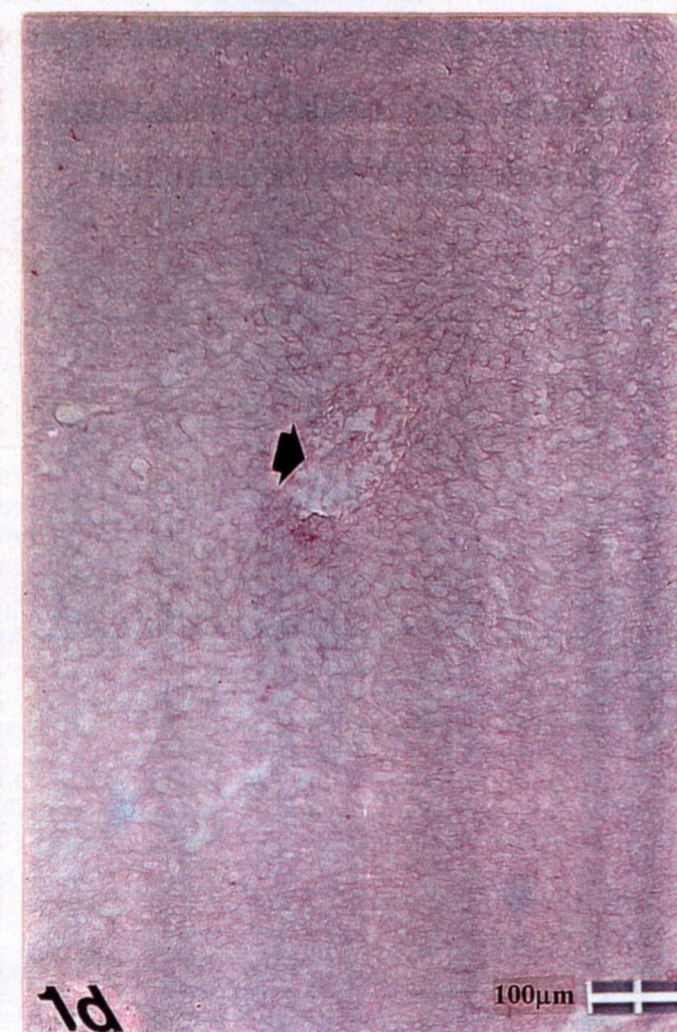
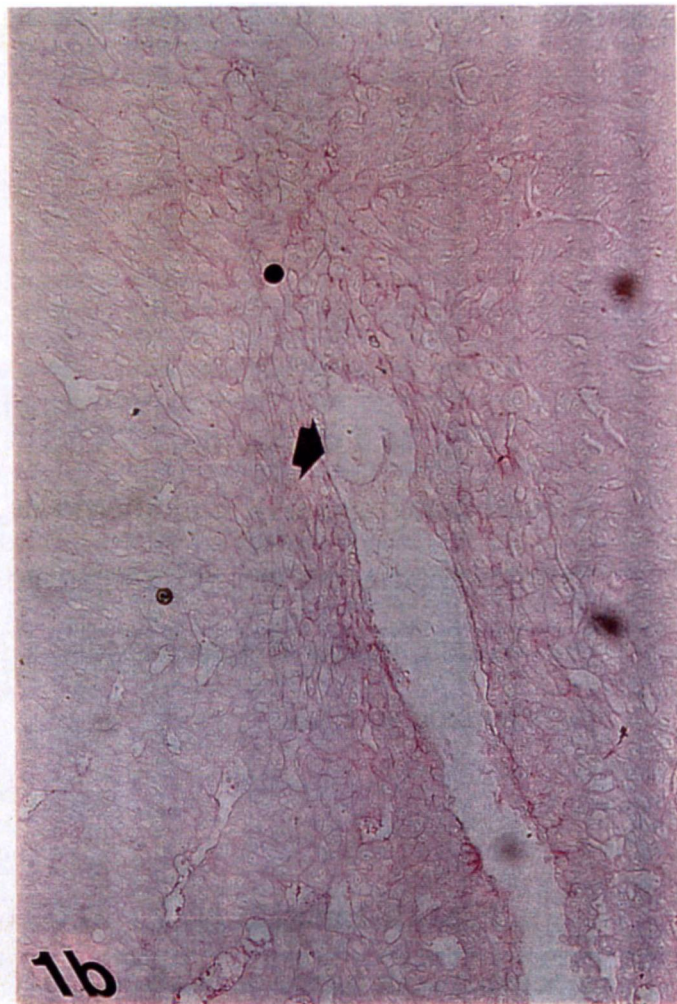
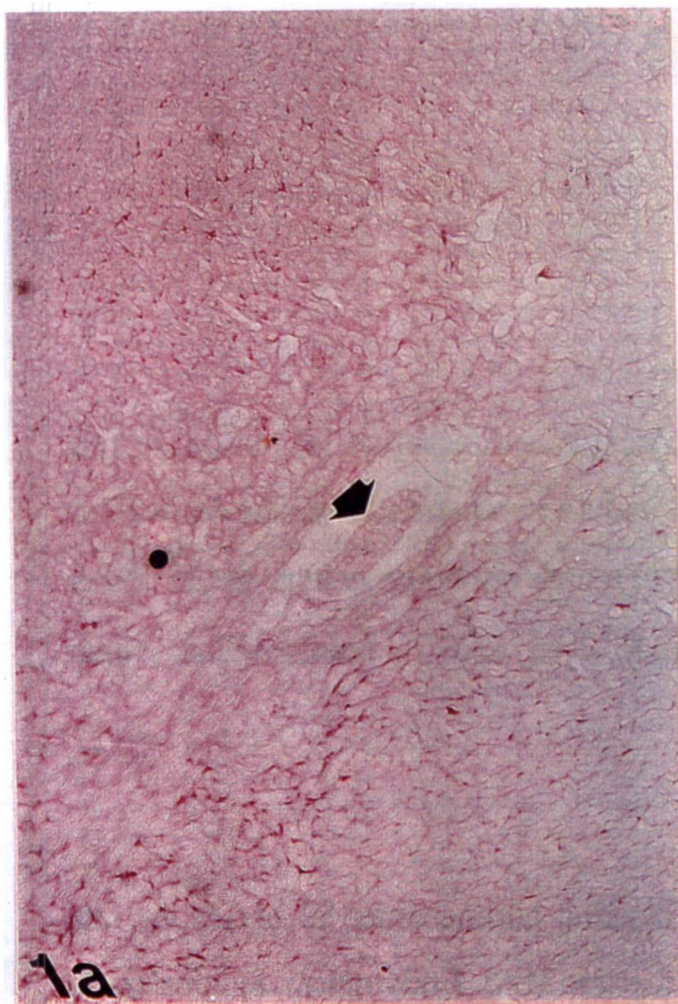


**Fig. 2a** Embrião no 7º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata normal (subgrupo IA). Endométrio decidualizado mostrando região de decídua antimesometrial em arranjo compactado(●) e uma região de células prédeciduais (\*) A seta indica o blastocisto. Corado com PAS + hematoxilina. Notar positividade ao PAS.

**Fig. 2b** Embrião no 7º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata inoculada com tumor de Walker 256 (subgrupo IIA). Endométrio decidualizado mostrando região de decídua antimesometrial em arranjo compactado(●) e uma região de células prédeciduais (\*) A seta indica o blastocisto. Corado com PAS + hematoxilina..

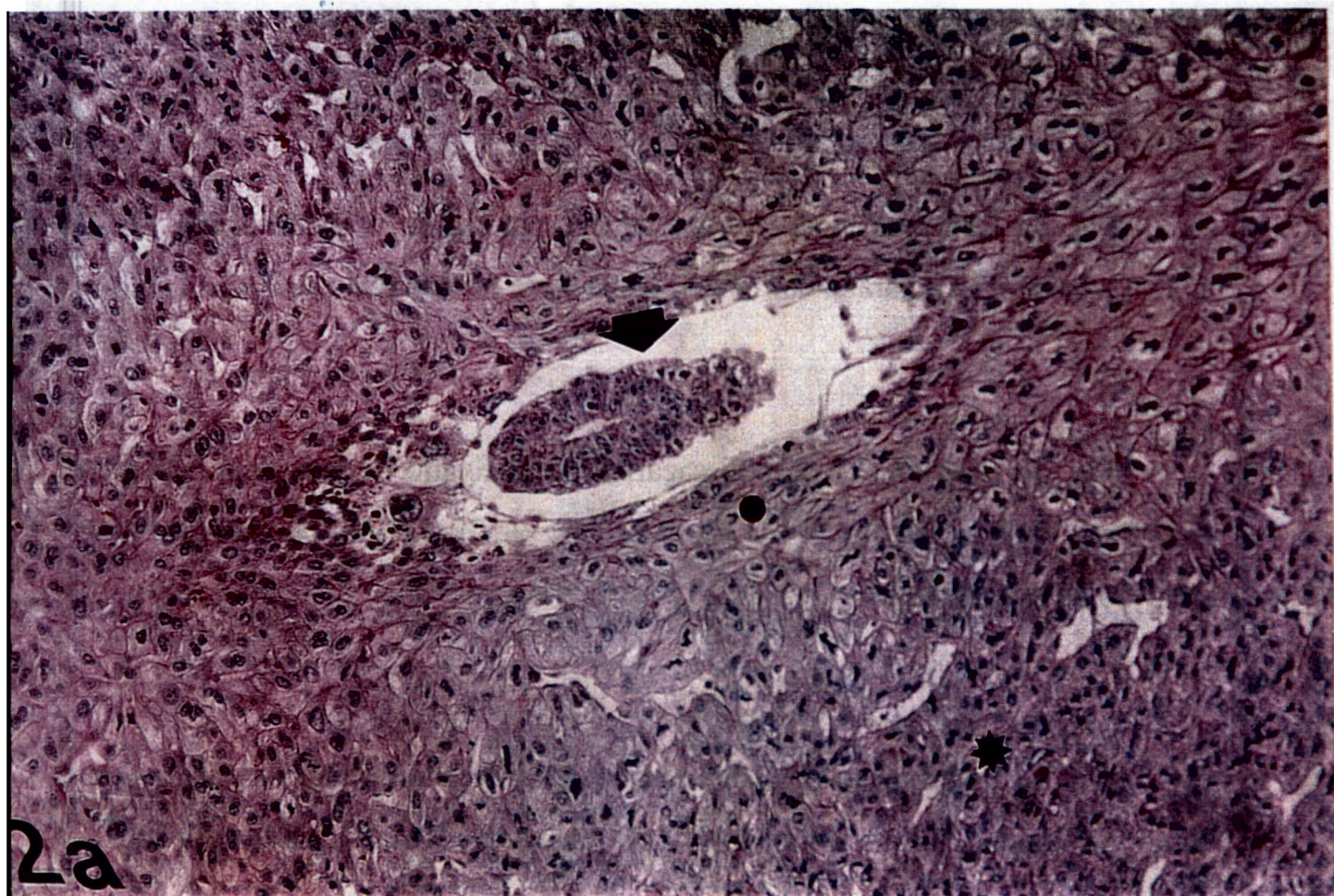


**Fig. 3a** Distribuição de polissacarídeos em fígado de rata normal, no 7º D.G. (subgrupo IA). Corado com PAS. Notar forte positividade ao PAS.

**Fig. 3b** Distribuição de polissacarídeos em fígado de rata inoculada com tumor de Walker 256, no 7º D.G. (subgrupo IIA ). Corado com PAS. Notar redução na positividade

**Fig. 3c** Distribuição de polissacarídeos em fígado de rata inoculada com tumor de Walker 256 inativado, no 7º D.G. (subgrupo IIIA ). Corado com PAS.

**Fig. 3d** Fígado de rata normal no 7º D.G..(subgrupo IA) PAS + amilase (controle negativo de coloração).

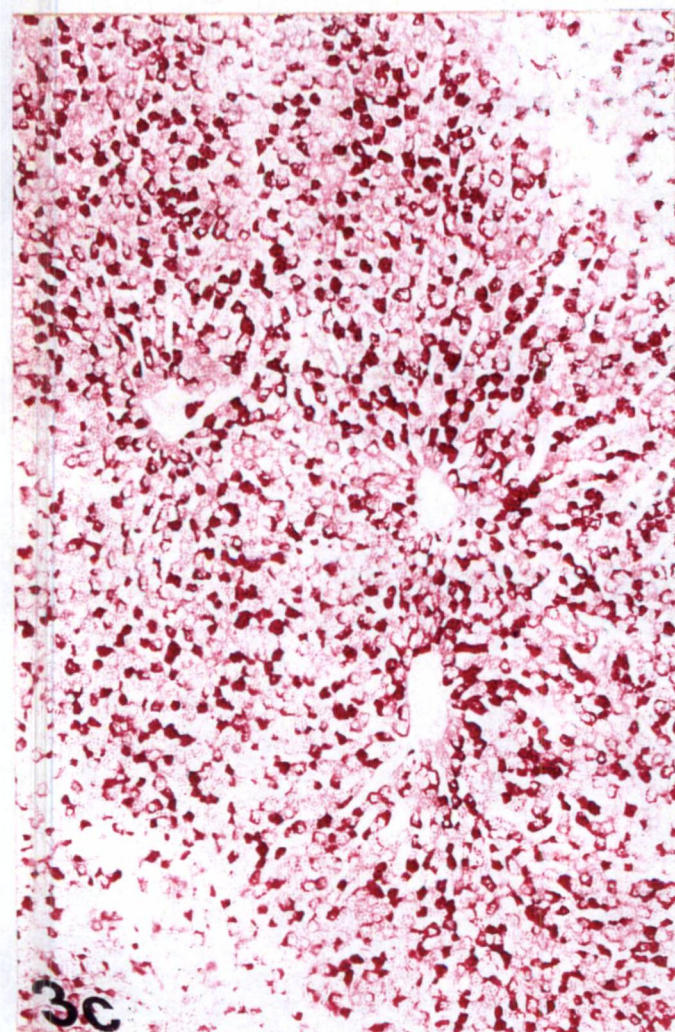
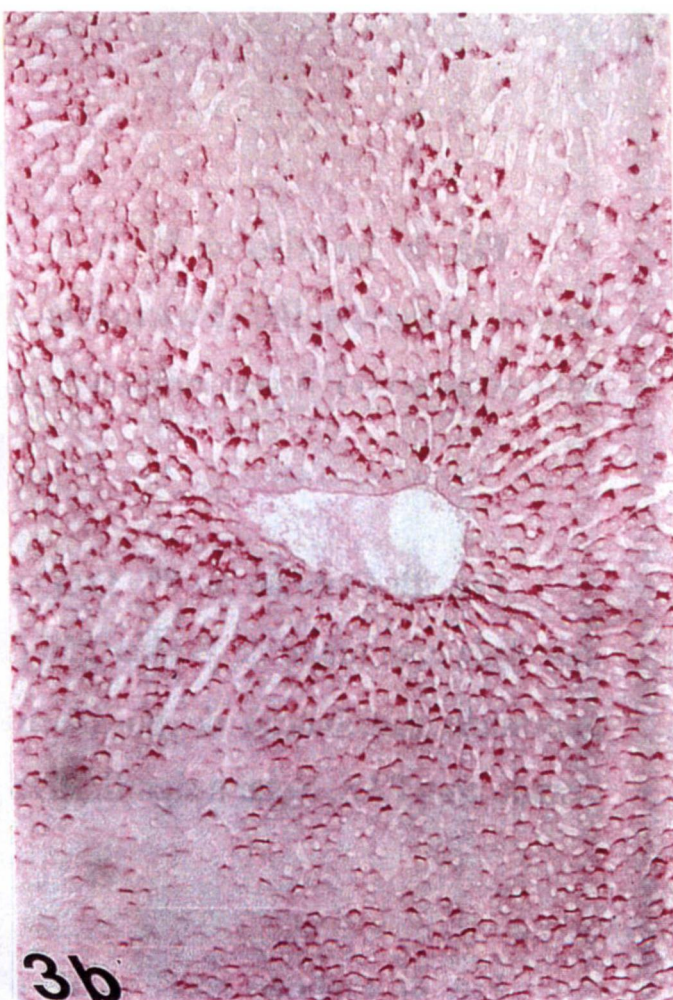
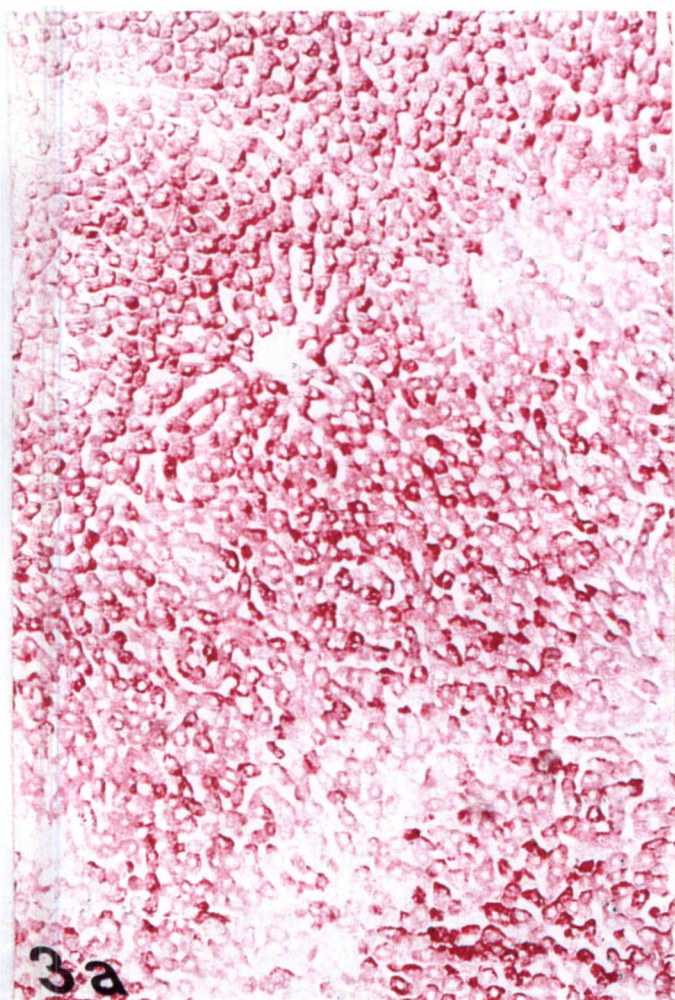


**Fig. 4a** Embrião no 8º D.G.. e decídua antimesometrial obtida de rata normal (subgrupo IB). Endométrio decidualizado mostrando distribuição de polissacarídeo (●). A seta indica o blastocisto. Corado com PAS.

**Fig. 4b** Embrião no 8º D.G.. e decídua antimesometrial obtida de rata inoculada com tumor de Walker 256 (subgrupo IIB). Endométrio decidualizado mostrando distribuição de polissacarídeos (●). A seta indica o blastocisto. Corado com PAS. Notar a significativa redução na positividade

**Fig. 4c** Embrião no 8º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata inoculada com tumor de Walker 256 inativado (subgrupo IIIB). Endométrio decidualizado mostrando distribuição de polissacarídeos (●). A seta indica o blastocisto. Corado com PAS.

**Fig. 4d** Embrião no 8º D.G.. e decídua antimesometrial obtida de rata normal (subgrupo IB). Endométrio decidualizado A seta indica o blastocisto. Corado com PAS.+ amilse.(controle negativo de coloração).

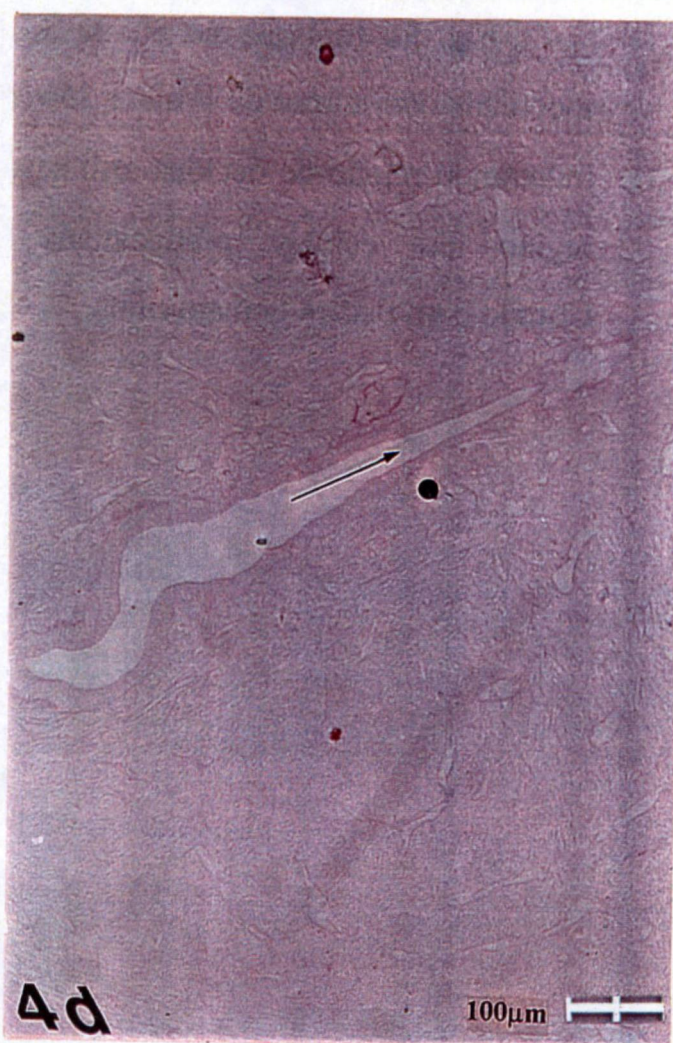
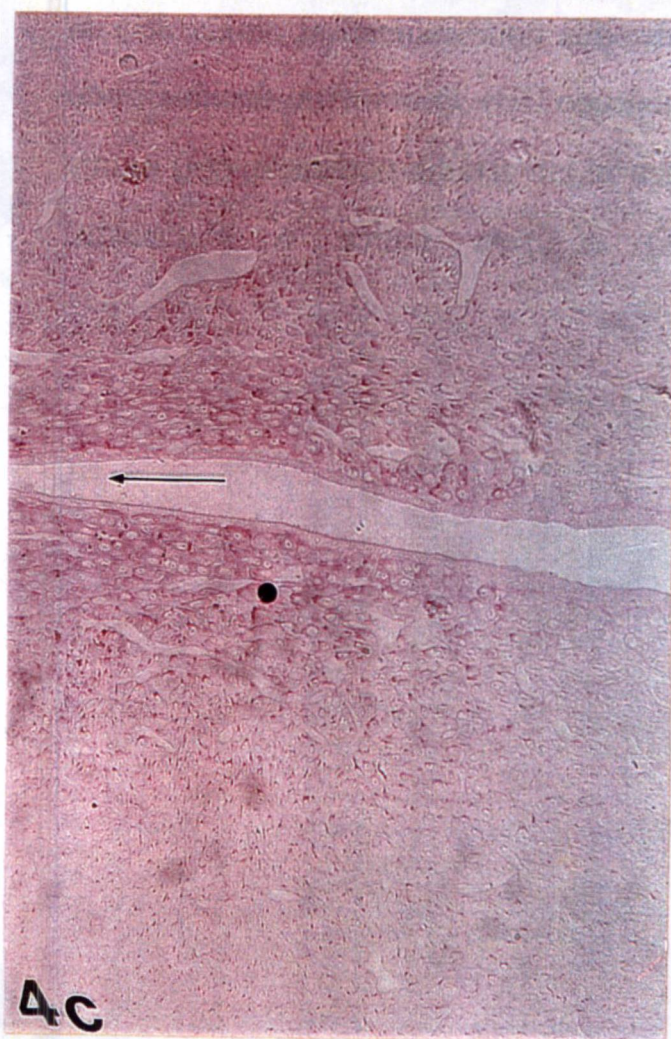
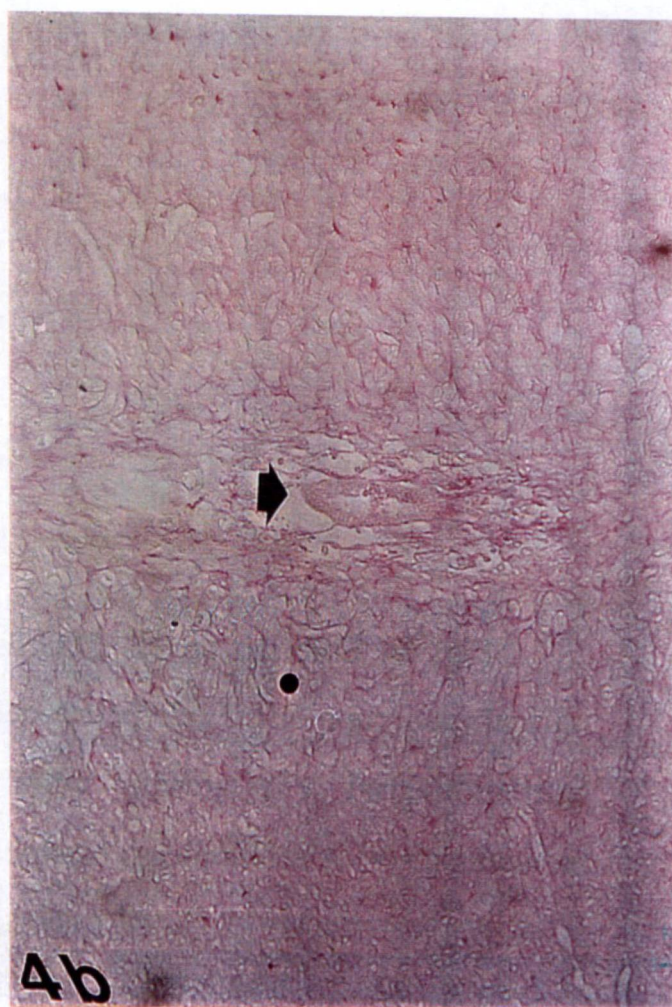
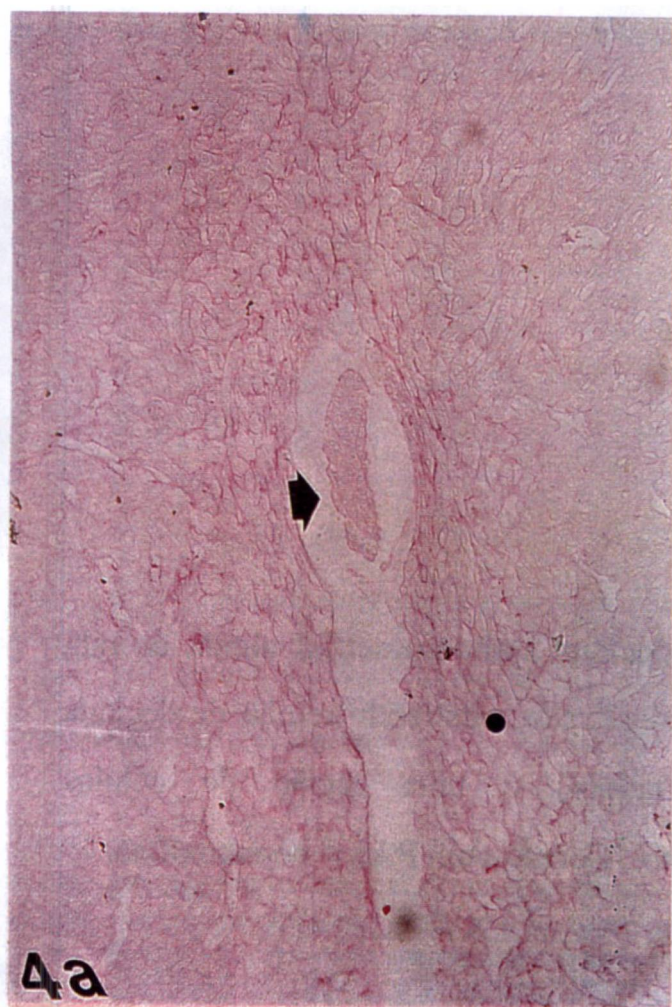


**Fig. 5a** Embrião no 8º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata normal (subgrupo IB). Endométrio decidualizado mostrando região de decídua antimesometrial em arranjo compactado(●) e uma região de células prédeciduais(\*) A seta indica o blastocisto. Corado com PAS + hematoxilina..

**Fig. 5b** Embrião no 8º D.G. e decídua antimesometrial obtida de rata inoculada com tumor de Walker 256 (subgrupo IIB). Endométrio decidualizado mostrando região de decídua antimesometrial em arranjo compactado(●) e uma região de células prédeciduais (\*) A seta indica o blastocisto. Corado com PAS + hematoxilina..

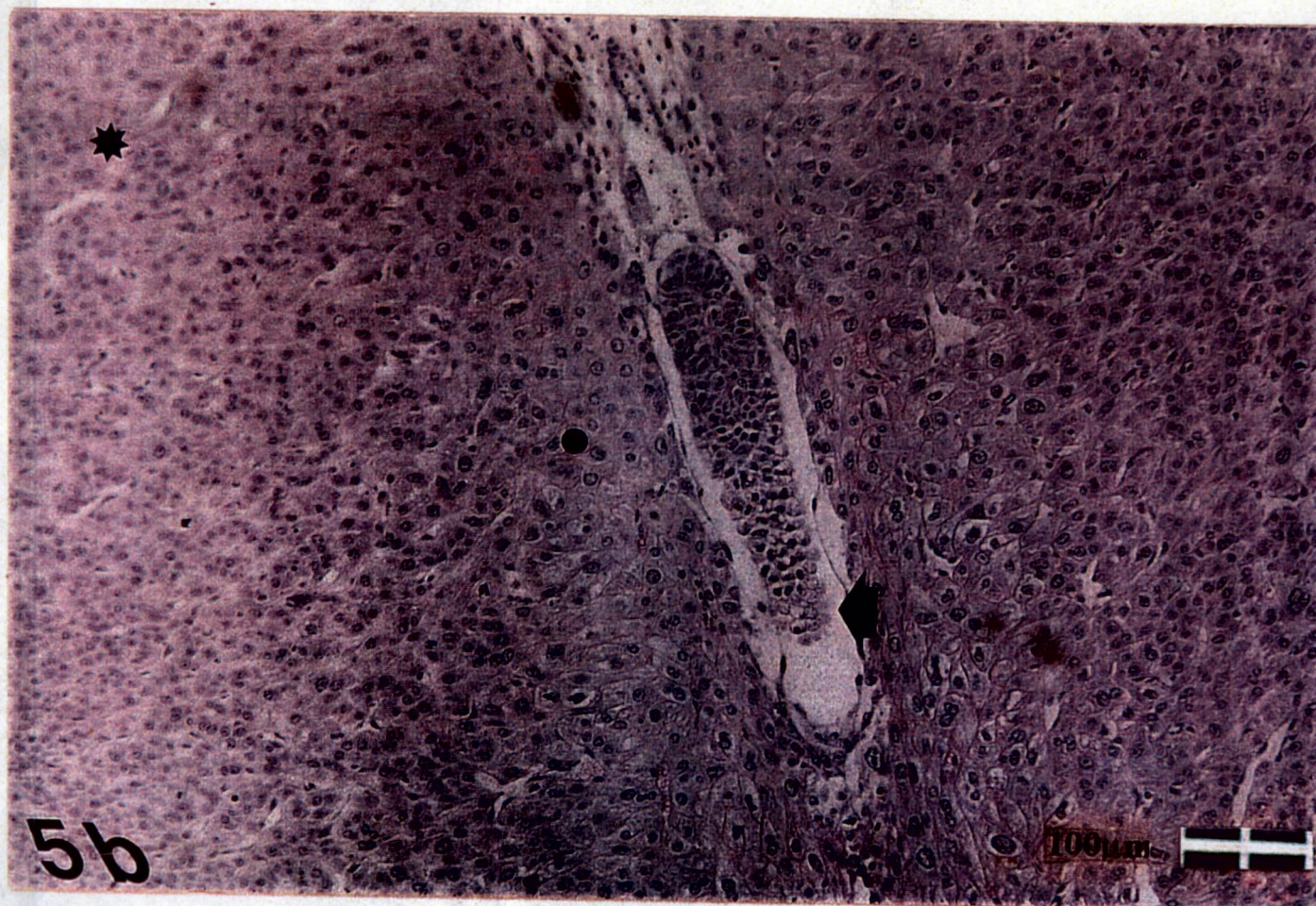
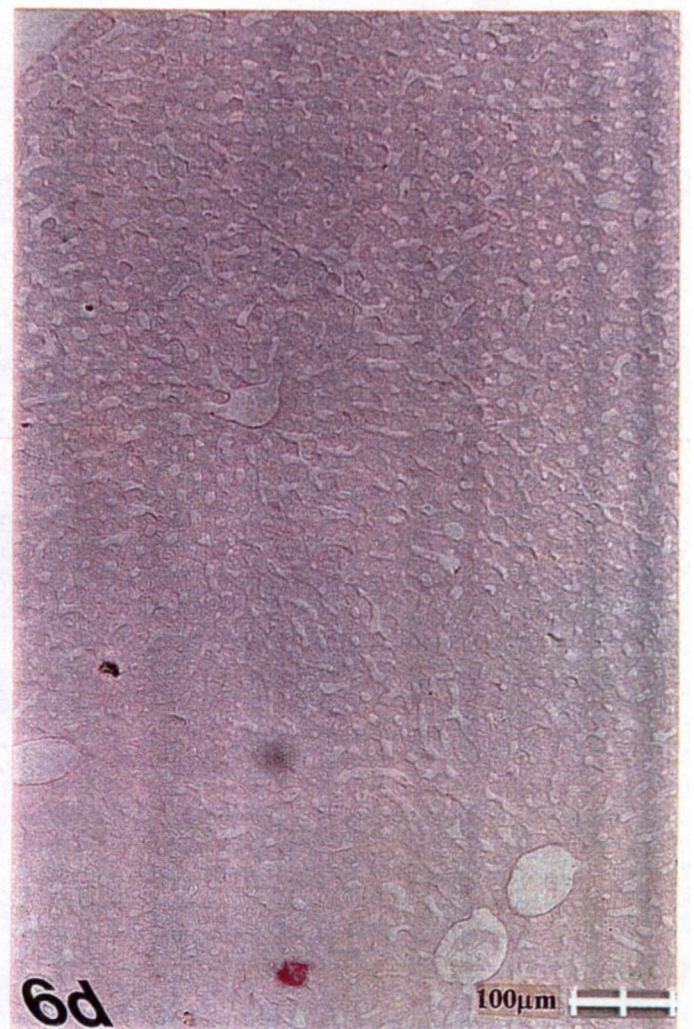
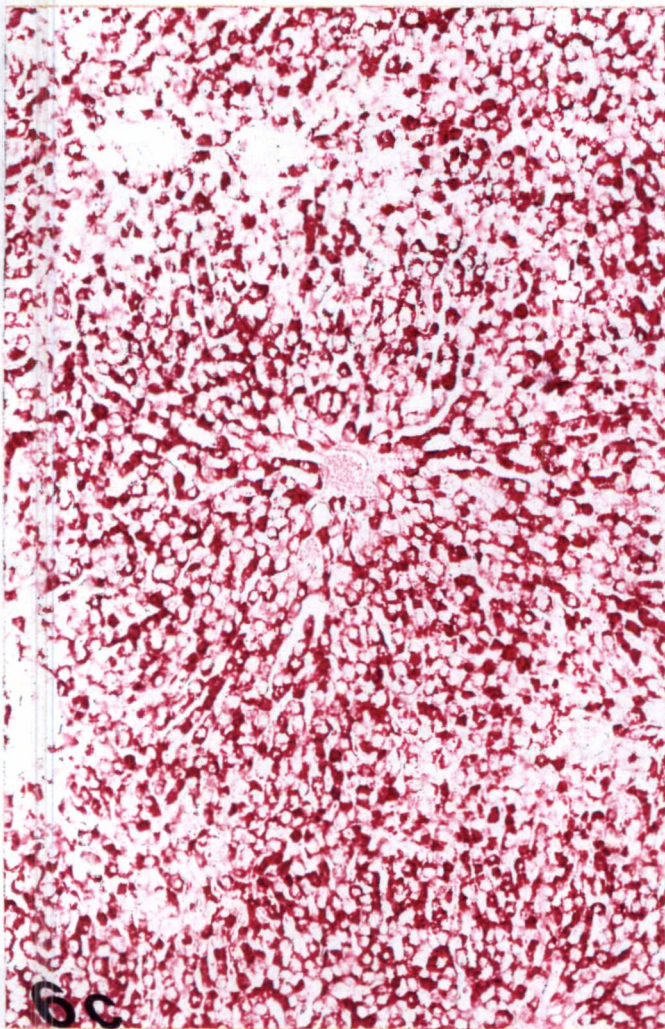
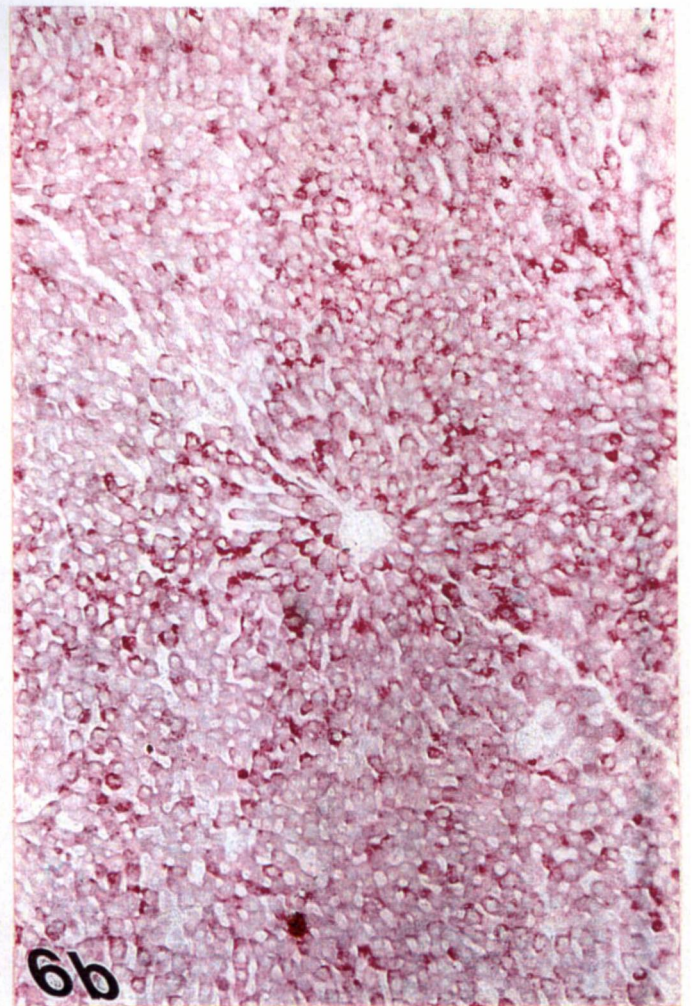
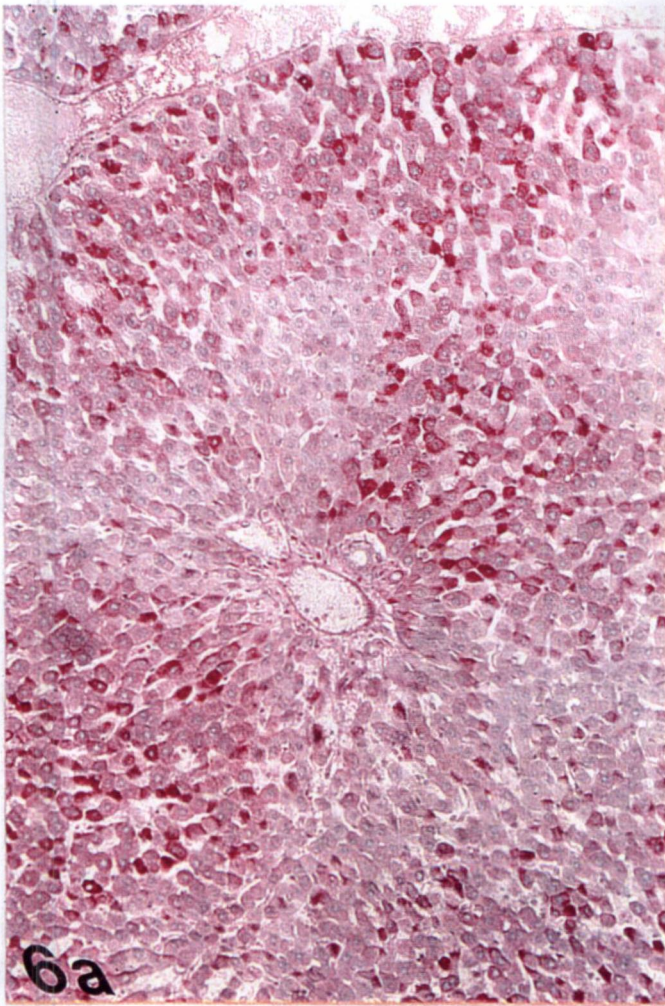


**Fig. 6a** Distribuição de polissacarídeos em fígado de rata normal, no 8º D.G. (subgrupo IB). Corado com PAS.

**Fig. 6b** Distribuição de polissacarídeos em fígado de rata inoculada com tumor de Walker 256, no 8º D.G. (subgrupo IIB ). Corado com PAS. Tal como ocorreu no 7º D.G. , há redução da quantidade de glicogênio.

**Fig. 6c** Distribuição de polissacarídeos em fígado de rata inoculada com tumor de Walker 256 inativado, no 8º D.G. (subgrupo IIIB ). Corado com PAS.

**Fig. 6d** Fígado de rata normal no 8º D.G.(subgrupo IB) PAS + amilase (controle negativo de coloração).



## 6. DISCUSSÃO

Diversos estudos indicam que a principal causa do êxito letal das neoplasias malignas esta ligado à intensa espoliação do hospedeiro, devido a um estado francamente catabólico, bem como a diminuição da ingestão alimentar. Como resultado destes desequilíbrios temos um estado de extrema depleção que se instala no paciente oncológico, denominado caquexia (LANGESTEIN & NORTON, 1991 ; NIXON et al. 1988).

Já foi anteriormente mostrado que a sobrevida em ratas adultas não grávidas, portadoras do carcinossarcoma de Walker 256, está entre 26 e 31 dias e a latência tumoral (período de implantação do tumor até momento que ele se torna palpável) de 4 dias (MARCONDES, 1994).

GOMES (1985) mostrou, trabalhando com o mesmo tumor, uma sobrevivência de 25 a 27 dias, sendo relatada uma latência de 6 dias. Possivelmente o menor período de latência em fêmeas sejam devido as modificações hormonais cíclicas.

Estes resultados são compatíveis com os dados desta pesquisa, em que durante os 7 dias do protocolo não foram anotadas mortes entre as ratas. Em discordância aos dados referidos anteriormente encontramos um período de latência menor, de 2 dias.

Os resultados , neste trabalho mostram que as ratas portadoras de carcinossarcoma de Walker 256 apresentavam um decréscimo de peso, nos 7 dias de evolução tumoral em cerca de 8%. As massas tumorais representaram valores vizinhos a 6% do peso da carcaça.

MARCONDES (1994) afirmou que em ratas virgens, portadoras do carcinossarcoma de Walker 256 apresentavam um decréscimo de peso da carcaça em cerca de 20%, da ingestão alimentar de 28% a 83% e da eficácia

alimentar em 46% associados a redução do balanço alimentar em 14 dias de experimento. Estes achados são semelhantes encontrados por outros autores. GUAITANI et al (1983) estudando os efeitos do carcinossarcoma de Walker 256 em ratos CO/COBS, verificaram que aos 14 dias de experimento o tumor apresentava cerca de 10% do peso corporal, causando uma redução de 20% na ingestão alimentar e 15% no peso da carcaça. BERTEVELLO (1999) e SEELAENDER (1994) mostram redução ponderal, em ratos portadores de carcinossarcoma de Walker 256 semelhantes, na mesma evolução temporal.

Outros tipos de neoplasias malignas tem andamento semelhante, no tocante ao balanço metabólico. Estudos clínicos, com pacientes portadores de câncer de cólon mostram perda importante de massa corporal, bem como espoliação de nitrogênio corporal (PISTERS & BRENNAN, 1990). Estudos semelhantes, conduzidos em camundongos com câncer de cólon (MAC 16) apresenta resultados compatíveis (BECK & TISDALE, 1989).

Quando foi avaliado o número de embriões implantados no útero foi observada uma redução significativa nos subgrupos que desenvolveram o carcinossarcoma de Walker 256, tanto no 7º DG como no 8º DG (subgrupos IIA e IIB), também nestes subgrupos foram mensurados níveis de glicogênio decidual significativamente inferiores aos grupos que não desenvolveram o tumor. MARCONDES et al.,(1997) usando uma metodologia, que também, associava o carcinossarcoma de Walker 256 com gestação, porém, em fase gestacional mais avançada, em que não ocorria simultaneidade do tumor com os dias próximos a implantação, não observaram redução no números de blastocistos que se implantavam, mas ocorreram maior número de óbitos fetais e conseqüente menor número de nascimentos.

Em nossos resultados o número de sítios de implantação nos cornos uterinos e conseqüente diminuição no número de fetos no útero das ratas com

tumor foi significativamente menor que os grupos que não desenvolveram nenhuma neoplasia.

Também foi mensurada uma queda significativa na quantidade de glicogênio estocado na decidua destas ratas, em comparação com os demais grupos.

A implantação depende de múltiplos fatores, mas podemos supor que, ao menos parcialmente, esta queda de fertilidade com a diminuição dos níveis de carboidratos acumulados ali.

A queda no acúmulo de glicogênio em diferentes tecidos na vigência de câncer parece ser a conclusão dos autores que avaliaram este parâmetro.

FERNANDES et al., (1991) afirmam que o conteúdo de glicogênio do fígado e músculos gastrocnêmios e sóleo de ratos portadores de tumor de Walker 256 é menor que o controle.

As células do tumor de Walker 256, bem como outros tumores malignos, reduz a glicemia sérica em ratos, bem como humanos ( VILLA et al., 1992).

O fluxo elevado de glicose materna, necessário para a implantação e desenvolvimento embrionário é compensado, parcialmente, pelo aumento da ingestão alimentar, em ratas sadias (KNOPP et al., 1973). Além disso, a mãe desenvolve mecanismos de resistência periférica à insulina que reduz o consumo de glicose pelos tecidos (LETURQUE et al., 1987; MARTIN et al. 1986; HERRERAS et al., 1991). Estes mecanismos, porém não são suficientes para manter a glicemia normal na fêmea , pois tecidos uterinos, placentários e fetais utilizam uma quantidade elevada de glicose proveniente da mãe Esta hipoglicemia é um estímulo potente para que se eleve a secreção de catecolaminas simpáticas, que ativam a gliconeogênese (GLODFIEN et al., 1958).

Desse modo, e lembrando o consumo suplementar de glicose, imposto pela doença, pode-se articular que o tumor, agravaria esta condição, pondo em desequilibrando o metabolismo de carboidratos , principalmente durante a gestação.

Durante a gravidez normal, a glicose contribui para o fornecimento de energia para o feto, mesmo antes do início da formação da placenta e também é fonte de carbono para síntese de proteínas, necessário para o crescimento. Além disto, o acúmulo de glicogênio “tampona” flutuações encontradas na glicemia materna, no transcurso do dia (BATTAGLIA & MESCHIA 1978; FREIKEL & METZER, 1992).

A elevação da quantidade de glicogênio no útero e na região de implantação de embrião foi quantificada por VASILENKO et al. (1981), que verificaram a ocorrência de elevações importantes após o 6º DG com um auge em torno do 12º DG. Em decíduomas induzidos por óleo (FINN & KEEN, 1962) ou cloreto de sódio a 0,9% (CHAMBON, 1960) também foram dosados quantidades elevadas de glicogênio, se comparado a ratas não tratadas.

Resultados semelhantes foram descritos, posteriormente, em hamster com decíduomas induzido, (GREGOIRE & RICHARDSON, 1970).

A carência de glicogênio decidual parece ser uma das causas para a diminuição da implantação e conseqüente queda na fertilidade em várias espécies de roedores. Uma única dose de metanol, via endovenosa em uma concentração de 0,03ml/g de massa corporal reduz significativamente a taxa de implantação, bem como a quantidade de glicogênio da decídua em camundongos (PADMANABHA, 1985).

MITCHELL & GOLDMAN (1996), experimentalmente, reduziram a taxa de implantação dos blastocistos de rata com administração aguda de álcool etílico diminuindo a quantidade de glicogênio e lipídeos no endométrio.

Bloqueio experimental no acúmulo de glicogênio uterino , com antiprogesterônicos, durante o 6º, 7º e 8º DG causam a diminuição na implantação (TAKAHASHI et al., 1988).

THORPE & CONNORS, (1975), acompanhando a variação de fertilidade em hamster, em relação com a variação etária concluiu que a fertilidade caía em relação direta com a idade, na mesma investigação notou que a quantidade de acúmulo de carboidratos no útero caía da mesma forma.

Nossos resultados não indicam, que no período de experimento tenha ocorrido queda significativa na quantidade de glicogênio hepático do grupo inoculado com tumor ativo, quando comparado ao controle. FERNANDES et al., (1991) e FERNANDES, (1989) em experimentos que dosavam a quantidade de glicogênio hepático em ratos Wistar machos constatou quedas significativas neste parâmetro, porém, o tempo de evolução tumoral, foi de duas semanas, enquanto nosso experimento foi efetuado, no 7º dia de evolução da neoplasia. MARCONDES, (1994) notou que a evolução do carcinossarcoma de Walker 256 é menos agressivo, a perda de peso menos acentuada e a espoliação de nitrogênio menor quando ratas grávidas eram comparadas com ratas virgens, com 12, 16, 19, 21 ou 23 dias de experimento.

Estes fatos nos levam a concluir que o útero seja mais sensível a perda de glicogênio que o fígado ou que a gestação interfira com a história natural da doença, contudo, provavelmente ambos os elementos, ou outros ainda, estejam contribuindo para tais resultados.

Quando foi inoculado o tumor inativado nas fêmeas (grupo III) tínhamos o objetivo incluir mais um grupo controle no experimento, com resultados esperados semelhantes ao controle inoculado com solução salina a 0,9%. O objetivo era a comprovação de que o crescimento tumoral era o causador das diferenças observadas entre os grupos, e não substâncias

presentes no meio em que as células eram colhidas. De fato ,a evolução ponderal e o número de sítios de implantação tiveram resultados idênticos aos controle salina (grupo I). Contudo ocorreram elevações significativas nas dosagens de glicogênio decidual e hepático em relação aos grupos tumor (grupo II) e controle salina (grupo I). Estes resultados podem ser parcialmente explicados quando confrontados com os achados de vários autores. PAULUS et al., (1993) ao aquecer células vivas de adenocarcinoma ate 46° C por 1 hora obtinha uma proteína de 70kDa, como resposta ao estresse térmico (heat shock protein family, HSP) que modificava a velocidade de crescimento do tumor *in vitro*. Efeitos preventivos e terapêuticos de HPSs na evolução de câncer de fígado induzido por vírus, em ratos, obtida de fibrossarcoma hepático de ratos foram observados (YADEVELLY, 1999). Também foi descrita utilização clínica de HPS 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).

As análises dos cortes histológicos , com marcação histoquímica para glicogênio buscava uma comprovação qualitativa morfológica para os resultados quantitativos obtidos na análise bioquímica, bem como uma comprovação de que efetivamente estava sendo analisada a região decidual.

Uma vez que foi possível a visualização de marcação bastante evidente de glicogênio nos cortes em todos os grupos a possibilidade de um falso positivo na análise bioquímica ficou praticamente afastada. Os cortes de fígado tiveram a mesma função. Lamentavelmente a técnica disponível não permitiu uma análise quantitativa na coloração, o que poderia reforçar a análise quantitativa efetuada, com o mesmo material.

Como forma de confirmação de que a área cuja quantidade de glicogênio foi avaliada era efetivamente a região de implantação embrionária

tomou-se o cuidado de que os cortes histológicos mostrassem claramente a presença do blastocisto, sendo que para que este ficassem morfologicamente mais evidente foram confeccionados cortes dos diferentes grupos com contracoloração em hematoxilina, além do PAS.

## 7.CONCLUSÕES

De acordo com nossas condições experimentais foi possível concluir que as ratas portadoras de carcinossarcoma de Walker 256 mostram:

- 1- peso corporal menor que as ratas controle e inoculadas com tumor inativado no 7º dia de experimento.
- 2- que não ocorreram mortes no ate o 7º dia de evolução tumoral.
- 3- decréscimo no número de embriões implantados no útero, em elevação ao controle e ao tumor inativado.
- 4- decréscimo na concentração de glicogênio decidual, em relação ao controle e ao tumor inativado.
- 5- concentração de glicogênio hepático semelhante aos grupos controle e tumor inativado.
- 6-o material fotográfico revelou-se compatível com os dados bioquímicos e reforçam a certeza da localização da decidua mostrando claramente o embrião.

Quando as ratas grávidas são inoculadas com o liquido ascítico com células tumorais inativadas pelo calor os resultados mostram:

- 1-que não ocorre desenvolvimento tumoral, durante o período do experimento.

2- a evolução ponderal é semelhante ao controle

3-o número de embriões implantados no útero é semelhante ao controle

4-a quantidade glicogênio uterino e hepático é maior que o controle

5-a análise morfológica do material submetido a marcação histoquímica para polissacarídeos demonstra que efetivamente existia este material, afastando resultados de falso positivo na análise bioquímica.

6- demonstrou que a área analisada era efetivamente uma área de decidualização, pois foi possível a observação do embrião no mesmo tipo de material utilizado nas dosagens bioquímicas.

A evolução rápida do tumor nos primeiros dias de gestação possivelmente causou uma perda de peso e sinais consumptivos nas ratas inoculadas com o células vivas o que presumivelmente causou reflexos na capacidade de fixação do blastocisto no útero materno.

Podemos concluir que esta dificuldade reprodutiva foi, provavelmente, influenciada pela queda das reservas de carboidratos que normalmente se formam na área que recebe o embrião, no útero. Pelo fato do fígado não ter apresentado uma redução na concentração de glicogênio, podemos citar duas situações possíveis, que não são mutuamente excludentes, primeiro, o fígado perde suas reservas mais tardiamente que o útero, em casos de desnutrição ou

caquexia, ou a gestação causa modificações endócrinas e metabólicas que influenciariam nesta menor depleção.

A maior quantidade de glicogênio acumulada, tanto no útero, quanto no fígado das ratas que receberam o inóculo inativado pode ter sido causada por alguma substância que não nos foi possível caracterizar, surgida no processo de inativação térmica, ou mesmo já existente no líquido ascítico ativo, mas que permanecia mascarada pelos efeitos do tumor.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, P.A.: Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, **166**:263-74, 1983.
- ABRAHAMSON, P.A. & ZORN, T.M.T.: Implantation and decidualization in rodents. **The J. of Ex. Zool.**, **266**: 603-28, 1993.
- ABRÃO, A.: Câncer de mama associado à gravidez e lactação. **Rev. Assoc. Med. Brasil.**, **34**: 180-2, 1988.
- ALLEN, E. The oestrous cycle in the mouse. **Am J. Anat.**, **30**:297-371, 1922.
- AMATRUDA, T.T. & UPTON, G.V. Hyperadrenocorticism and ACTH-releasing factor. **Ann, N.Y. Acad. Sci.**, **230**: 168-80, 1974.
- BACKER, H.L.: Reproduction and breeding. In BAKER, H.L.; Lindsey, J.R.; Weisbroth, S.H.: The laboratory Rat. New York, Academic Press, 1991, v.I, cap 7, p. 153-168.
- BATTAGLIA, F.C. & MESCHIA, G.: Principal substrates of fetal metabolism. **Physiol. Ver.**, **58**: 499-527, 1978.
- BECK, S.A. & TISDALE, M.J.: Nitrogen excretion in cancer cachexia and its modification by a high fat diet in mice. **Cancer Res.**, **49**: 3800-4 1989.
- BANKS, H.L.: Pregnancy and lymphoma. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **109**: 952-8, 1967.
- BERENBLUM, I.: The nature of tumor growth. In: FLORY, L. , W.B. ed. General Pathology. Philadelphia, Saunders, cap. 21, 612-18, 1970.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A.: Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, **320**: 652-4, 1990.
- BERNIK, S. F.: Carcinoma of the breast during pregnancy: a review and update on treatment options. **Surgical Oncology-Oxford** **7**:45-49 Jul-Aug. 1998.

- BERTEVELLO, P.S.: Alterações no conteúdo de gordura corporal em ratos promovidas pela presença do tumor de Walker 256: heterogeneidade de resposta do tecido adiposo e efeito da suplementação lipídica. São Paulo, 1999.132p.[Tese de mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo].
- BOVING, B.G.: Biomechanics of implantation. In: The Biology of the Blastocyst. BLANDAU R.J. , ed. **The University of Chicago Press, Chicago, p. 423-42, 1971.**
- BRENNANI, M.F.: Host vs tumor metabolism. **Cancer Bull.**, **30**: 72-7, 1978.
- BURT, M.E.; LOWRY, S.F.; GORSCHBOTH, C.; BRENNAN, M.F.: Metabolic alterations in a noncachectic animal tumor system. **Cancer**, **47**: 2138-46, 1981.
- CAMERON, I.L. & ORD, V.A.: Parental level of glucose intake on glucose homeostasis, tumor growth, gluconeogenesis, and body composition normal and tumor-bearing rats. **Cancer Res.**, **43**: 5228-34, 1983.
- CHAMBON, Y.: Réalisation de décíduomes artificiels par injection intrautérine d'eau salée isotonique chez la ratte pseudogestante. . **R. Séanc. Soc. Biol.** **154**: 686-9, 1960.
- CHEW, C.S. & RINARD, G.A.: Glycogen levels in the the rat myometrium at the first day of pregnancy and immediately postpartum.. **Biol. Reprod.** **20**: 1111-14, 1979.
- CINTRA-GOMES, M.C.; CURY, L.; PARREIRA, M.R.; ELIAS, C.F.; AREAS, M. A.: Effects of Walker256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **23**: 909-913 1990.
- CORI, C.F. & CORI, G.T.: The carbohydrate metabolism of tumors. II. Changes in the sugar, lactic acid, and CO<sub>2</sub>- combination power of blood passing nitrogen, through a tumor. **J. biol. Chem.**, **65**: 397-405, 1925.
- COSTA, G.: Cachexia. The metabolic component of neoplastic diseases. **Cancer Res.**, **37**: 2327-35, 1977.

- DEMERS, L.M.; YOSHINAGA, K.; GREEP, R.O.: Uterine glycogen metabolism of the rat in early pregnancy. **Biol. Reprod.** **2**: 297-304, 1972.
- DEWYS, W.D.: Anorexia as a general effect of cancer. **Cancer**, **43**: 2013-9, 1979.
- DEWYS, W.D.: Anorexia in cancer patients. **Cancer Res.**, **37**: 2354-58, 1977
- DiFRONZO, L. A. & O'CONNEL, T. X.: Breast cancer in pregnancy and lactation. **Surgical Clinics of North America**, **76**: 267- & April 1996.
- DOLL, D.C.; RINGENBERG, S.; YARBRO, J.W.: Antineoplastic agents and pregnancy. **Semin. Oncol.**, **16**: 337-46, 1989.
- DOLL, D.C.; RINGENBERG, S.; YARBRO, J.W.: Management of cancer during pregnancy. **Arch. Intern. Med.**, **148**: 2058-64, 1988.
- ENDERS, A.C. & SCHLAFKE, 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**: 259-68, 1991.
- FERNANDES, L.C.: Papel da insulina na caquexia e no crescimento do tumor de Walker 256 *in vivo*. São Paulo, 1989, 111p., [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
- FERNANDES, L.C.: Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos. São Paulo, 1995, 98p., [Dissertação de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
- FINN, C.A.: The implantation reaction. In: WYNN, R.M., **Biology of the Uterus**, ed. Plenum Press, New York, p. 245-53, 1977.
- FINN, C.A. & McLAREN, A.: A study of the early stages of implantation in mice. **J. Reprod. Fertil.**, **13**: 259-67, 1967.

- FINN, C.A. & KEEN, P.M.: Studies on deciduomata formation in the rat. **J. Reproduc.**, 4:215-6, 1962.
- 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. WILLIAMS, **Textbook of endocrinology**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Saunders, 1992, cap. 17, p. 993-1006.
- FOSTER, G.A.; ORSINI, M.W.; STRONG, F.M.: Localization of glycogen in the opcacity charaterizing decidualization in the cleared hamster uterus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 113: 262-65, 1963.
- GALENBERG, M.M. & LOPRINZI, C.L.: Breast cancer and pregnancy. **Semin. Oncolo.**, 16; 369-76, 1993.
- GARBE, C.: Pregnancy, hormone preparations and malignant melanoma. **Hantarzt**, 44: 347-52, 1993.
- GOMES-MARCONDES, M. C. C.; CURY, L.; CURI, R.: Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. **Cancer Research Theraphy&Control** 5&(4): 277-283 1998.
- GOMES, M.C.C.; BEVILACQUA, R.G.; LIMA-GONÇALVES, E.; RESENDE, L.: Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. **Cien. Cult.**, 35(7): 736, 1983.
- GOMES, M.C.C.: Desnutrição proteico-calórica, desenvolvimento corporal e crescimento do carcinossarcoma de Walker 256: Alterações metabólicas e morfológicas em ratos jovens. São Paulo, 112p.1985 [Tese de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
- GREGOIRE, A.T. & RICHARDSON, D.W.: The effect of 1, 10, 100µg. estradiol on glycogen content deposition in the rat uterus, cervix and vagina. **J. Reproduc. Fert.**, 4: 231-4, 1970.

- GUAITANI, A.: Caratterizzazione di anoressia e cachessia indotte da tumori sperimentali approccio nutrizionale come terapie di supporto. Progetto Oncologia, 1993, Inst. Ricerche Farmacologiche, Milano Italia.
- GLODFIEN, A.; ZIELELI, S.; DESPOINTES, R.H.; BETHUNE, J.E.: The effect of hypoglycemia on the adrenal of epinephrine and norepinephrine in the dog. **Endocrinology**, **62**: 794-57, 1958.
- HEBER, D.; CHIEBAWSKI, R.T.; ISHIBASHI, D. E.; HERROLD, J.N.; BLOCK, J.B.: Abnormalities in glucose and protein metabolism in noncachectic lung cancer patients. **Cancer Res.**, **42**: 4815-9, 1982.
- HERRERAS, E.; LASUNCIÓN, M.A.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A.; BONET, B.: Intermediary metabolism in pregnancy.. First theme of Freinkel Era. **Diabetes**, **40(suppl 2)**: 83-8, 1991.
- HOLROYDE, C.P.; SKUTCHES, C.L.; RODEN, G.; REICHARD, G.A.: Glucose metabolism in cachectic patients with colorectal cancer. **Cancer res.**, **44**: 5910-13, 1984.
- KAWANO, T.; TAJIMA, C.; FUKUMA, K.; YAMAMOTO, S.; OKAMURA, H.: Effect of RU 486 on glycogen metabolism in endometrium. **Fertil.** **41**: 1507-11, 1989.
- KING, R.H.; WELCH, J.J.; MARTIN, J.K.; COULAM, C.B.: Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **160**: 228-32, 1985.
- KNOPP, R.H.; BOROUSH, M.A.; O'SULLIVAN, J.B.: Lipid metabolism in pregnancy. Postheparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnant rat. **Metabolism**, **24**: 984-8, 1973.
- KOBAYASHI, K.; TANAKA, Y.; MRI, T.: Rapidly growing thyroid carcinoma during pregnancy. **J. of Surgical Oncology**. **55**:61-64 1994.
- KOSTYO, J.L.: A study of the glycogen levels of the rat uterus and certain skeletal muscles during pregnancy. **Endocrinology** **60**: 33-7, 1957.
- LANGSTEIN, H.N. & NORTON, J.A.: Mechanisms of cancer cachexia. **Hematol.Oncol. Clin. N. Am.**, **5**: 103-23, 1991.

- LETURQUE, A.; HAUGUEL, S.; FERRÉ, P.; GIRARD, J.: Glucose turnover during pregnancy in anesthetized post abortive rats. **Biol. Neonate**, **51**: 64-9, 1987.
- LEVIN, L. & GEVERS, W.: Metabolic alterations in cancer. Part. I. Carbohydrate metabolism. **S. Afr. Med. J.**, **59**: 518-21, 1981a.
- LEVIN, L. & GEVERS, W.: Metabolic alterations in cancer. Part. II. Protein and fat metabolism. **S. Afr. Med. J.**, **59**: 553-56, 1981b.
- LIBERATO, M.H.; SONOHARA, S.; BRENTANI, M.M.: Effects of androgens on proliferation and progesterone receptor levels in T 47D human breast cancer. **Tumour Biol.**, **14**: 38-45, 1993.
- LIOTTA, L.A.: Cancer cell invasion and metastasis. **Sci. Amer.**, (Feb.): 34-36, 1992.
- LUNDHOLM, K.: Interactions of cytokines in the host. **Acta Chir Scand.**, **549(suppl)**: 31-4, 1989.
- LUNDKVIST, O.: Ultrastructural studies of the endometrial stroma cells in the rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. **Biol. Reprod.**, **18**: 306-16, 1978.
- LUQUE, L.; PAREDES, S.; SEGURA, J.A.; NUNEZ de CASTRO, I.; MEDINA, M.A.: Mutual effect of glucose and glutamine on their utilization by tumor cells. **Biochem. Intern.**, **21**: 9-15, 1990.
- MAEYAMA, M.; SUDO, I.; SAITO, K.; MATSUO, I.; NAKAHARA, K.: Glycogen estimation content in the endometrium in infertile patients. **Fertil. Steril.**, **28(2)**: 159-62, 1977.
- MAHONY, S.M. & TISDALE, M. J.: Induction of weight loss and metabolic alterations by human recombinant tumour necrosis factor. **Br. J. Cancer**, **58**: 345-49, 1988.

- MARCONDES, M.C.C.G.: Influência da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário. 1994 p.103 [Dissertação de Doutorado, Instituto de Biociências, da Univ. de São Paulo].
- MAcRTHY, D.O. & DAUN, J.M.: The role of gastric stasis in tumor-induced anorexia in rats. **Cancer**, **79**: 1601-4, 1992.
- MARTIN, A.; ZORZANO, A.; CARUNCHO, I.; HERRERA, E: Glucose tolerance tests and *in vivo* response to intravenous insulin in the unanaesthetized late pregnant rat and their consequences to the fetus. **Diabete metab. Rev.**, **12**: 302-7, 1986.
- 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)**: 581-7, 1998.
- MEYER, F.; BRISSON J.; MORRISON, A.S.; BROWN, J.B.: Endogenous sex hormones, prolactin and mammographic features of breast cancer tissue in premenopausal women.. **J. Nat. Cancer Inst.**, **77**: 617-20, 1986a..
- MEYER, F.; BROWN, J.B.; MORRISON, A.S.; MacMAHON, B.: Endogenous sex hormones, prolactin and breast cancer in premenopausal women.. **J. Nat. Cancer Inst.**, **77**: 613-6, 1986b.
- MIMORI, H.; FUKUMA, K.; MATSUO, I.; NAKAHARA, K.; MAEYAMA, M.: Effect of progestogen on glycogen metabolism in the endometrium of infertile patients during the menstrual cycle. **Ferti. Steril.** **35**: 289-95, 1981
- MITCHELL, J.A. & GOLDMAN, H. Effects of alcohol on blastocist implantation site blood flow in the rat. **Alcohol alcohol**, **31**: 81-7, 1991.
- MORRISON, S.D.: Control of food intake during growth of a Walker 256 cacinoma. **Cancer Res.**, **33**:526-28, 1973.
- MOSSMAN, H.W.: **Vertebrate Fetal Membranes**, ed. Rutgers University Press, New Brunswick, p. 383 1987.

NIXON, D.W.; KUTNER, M.; HEYMSFIELD, S.; FOLTZ, A T.; CARTY, C.; SEITZ, A.; CASPER, K.; EVANS, W.K.; JEEJEEBHOY, K.N.; DALY, J.M.; HEBER, D.; POPEENDIEK, H.; HOFFMAN, F.A.: Resting energy expenditure in lung and colon cancer. **Metabolism**, **37**: 1059-64, 1988.

ORSINI, M.W.: Induction of deciduomata in hamster and rats by injected air. **J. Endocrinol.**, **28**: 119-21, 1963.

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)**: 229-39, 1985.

PARR, M.B. & PARR, E.L.: The implantation reaction. **In: Biology of the uterus**, ed. Plenum Publishing, New York, p 233-77, 1989.

PARENTE, J.T.; AMSEL, M.; LERNER, R.; CHINEA, F.: Breast cancer associated with pregnancy. **Obstet. Gynecol**, **71**: 861-4, 1988.

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)**: 263-70, 1993.

PARVEZ, S. & PARVEZ, H.: Glycogen storage during the last part of pregnancy uterus, liver and heart of rats. **Experientia**, **30(II)**: 942-80, 1974.

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**. New York, Raven Press, 1988.p.187-230.

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

PISTERS, P.W.T. & BRENNAN, M.F.: Amino acid metabolism in human cancer cachexia. **Ann. Ver. Nutri.**, **10**: 107-32, 1990.

- POTTER, J.F. & SCHOENEMAN, M.: Metastasis of maternal cancer to the placenta and fetus. **Cancer**, **25(2)**: 380-8, 1970.
- PSYCHOIOS, A. La réaction déciduale est précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire del'utérus. **C.R. Séances Soc. Biol.**, **154**: 1384-87. 1960.
- PSYCHOIOS, A. Permeabilité capillaire et decidualisation utérine. **C.R. Acad. Sci. III**, **252**: 1515-17, 1961.
- RUDON, R.W.: Nature of malignant tumors. **In: Cancer Biology**, New York, Oxford University Press. 1987. Cap. I p.3-24.
- SAUER, L.A.; STAYMAN III, J.W.; DAUCHER, R.T.: Aminoacid, glucose and lactic acid utilization *in vivo* by rat tumors. **Cancer Res.**, **43**: 3497-503, 1983.
- SAUER, L.A. & DAUCHY, R.T.: Tumour-host metabolic interrelationships. **Biochem. Soc. Trans.**, **18**: 80-2, 1990.
- SEELAENDER, M.C.L.: Metabolismo de lipídeos em ratos portadores do tumor de Walker 256. Avaliação da atividade do sistema canitina palmitol transferase mitocondrial hepático. São Paulo, 1994. 122p. [Tese de dourado, Instituto de Ciências biomédicas da Univ. de São Paulo.].
- STEAWART, H.L. In: **Transplantable and transmissible tumor of animal**. Washington, Armed Forces Inst. Of Pathology, 1959. P.F40-261 a f-40-271.
- SVANINGER, E.B.; SAUER, L.A.; STAYMAN III, J.W.; DAUCHER, R.T.: Aminoacid, glucose and lactic acid utilization *in vivo* by rat tumors. **Cancer Res.**, **43**: 3497-503, 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 antiprogesterone RU-38486. **Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi** (resumo) **64**:1081-1087 1988

- TISDALE, M.J.: Metabolic effects in a murine cachexia model. **Biochem. Soc. Trans.**, **18**: 83-4, 1990.
- TISDALE, M.J. & BRENNAN, R.A.: Metabolic substrate utilization By a tumour cell line with induces cachexia model. **Br. J. Cancer**, **54**: 601-6, 1986.
- THORPE, L. W.; CONNORS, T. J.: The distribution of uterine glycogen during early pregnancy in the young and senescent golden hamster. **J. Gerontol.** **30**: 149-153, 1975.
- VASILENKO, P.; ADAMS, W.C.; FRIEDEN, E.H.: Uterine size and glycogen content in cycling and pregnant rats: influence of relaxin. **Biol. Reprod.** **25**: 162-69, 1981.
- VILLA, P.; ARIOLI, P.; GUAITANI, A.: Protein, turnover, synthesis and secretion of albumin in hepatocytes isolated from rats bearing Walker 256 carcinoma. **In vivo Cell. Dev. Biol.**, **28A**: 157-60, 1992.
- WARD, M.: The early development and implantation of the golden hamster, *Cricetus auratus*, and the associated endometrial changes. **Am. J. Anat.**, **82**: 231-76, 1948.
- YADEVELLI, S.P.; GUO, L.; DAOU, M.E.; SRIVASTAVA, P.K.; MITTELMAN, A.; TIWARI, R.K.: Preventive and therapeutic effect of tumor derived heat shock protein, gp96, in an experimental prostate cancer model. **Int. j. Med.** **4(30)**: 243-8, 1999.
- ZORN, T.M.T.; ABRAHAMSOHN, P.A.; MARIANO, M.: The local origin of decidual cell in pregnant mice. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **19**: 221-26, 1986.
- ZORN, T.M.T.; BJOVVSKEY, A.T.; BEVILACQUA, E.M.A.F.; ABRAHAMSOHN, P.A.: Phagocytosis of collagen by mouse decidual cells. **Anat. Rec.**, **224**: 96-100, 1989.