



“Aspectos morfológicos e histológicos de placentas de ratas Wistar prenhes portadoras do tumor de Walker 256. Avaliação dos efeitos do crescimento tumoral e da suplementação nutricional com leucina durante a prenhez”

Palavras-Chave: Gravidez, Câncer, Placenta.

Autores/as:

Vitória Alves da Silva, Igor Fernando dos Santos, Carla de Moraes Salgado - IB - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS; Bianca de Fátima Pereira Sousa - PUC - PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS

Orientadores/as:

Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes; Dr.^a Laís Rosa Viana - IB - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INTRODUÇÃO

A incidência de câncer durante a gestação está aumentando significativamente, por uma série de fatores, como idade materna avançada devido aos avanços tecnológicos para a preservação da fertilidade (Parazzini, Franchi et al. 2017, Shachar, Gallagher et al. 2017). Esse quadro representa um grande desafio terapêutico, uma vez que tanto a saúde materna quanto a fetal/neonatal precisam ser consideradas. Esse quadro patológico pode ocasionar alta incidência de complicações fetais, como parto pré-termo e restrição de crescimento fetal, estando possivelmente relacionado às alterações na placenta (Wang, Dorer et al. 2004). Por esse motivo, são necessários estudos que busquem estratégias para prevenir que ocorram danos placentários em gestações associadas ao câncer. Nesse sentido, novas abordagens terapêuticas coadjuvantes vêm sendo exploradas, como a suplementação nutricional com leucina, um aminoácido de cadeia ramificada capaz de estimular a síntese proteica, além de promover diminuição da degradação de proteínas (Cruz e Gomes-Marcondes 2014).

Nesse sentido, a elucidação das modulações terapêuticas da suplementação com leucina nas alterações na placenta durante a doença neoplásica pode trazer possibilidades de tratamentos clínicos, que até então é inexistente. Portanto, experimentos pré-clínicos com o uso de modelos animais são necessários, pois permitem maior manipulação/intervenção e controle de variáveis. Desse modo, o presente estudo utilizou o carcinossarcoma de Walker 256, originalmente um adenocarcinoma mamário de ratos, e a dieta rica em leucina para avaliar os efeitos deletérios do crescimento tumoral e modulatórios da suplementação nutricional sobre o tecido placentário.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é investigar os efeitos do crescimento tumoral, associado a suplementação nutricional com leucina durante a gestação, sobre a morfologia e histologia placentária em ratas *Wistar*. Os objetivos específicos são avaliar: peso da placenta; peso e número de fetos viáveis; espessura das regiões placentárias (zona juncional, labirinto e decídua); e avaliar a morfometria das células trofoblásticas gigantes.

METODOLOGIA

Animais e dietas

Esta pesquisa apresenta caráter pré-clínico, sendo utilizadas placentas de ratas *Wistar* e a aplicação do modelo de carcinossarcoma Walker 256. Os animais foram distribuídos nos quatro grupos experimentais: 2 grupos de ratas prenhes alimentadas com dieta controle: saudáveis (PC) e portadoras do tumor de Walker 256 (PWC); e 2 grupos de ratas prenhes alimentadas com dieta rica em leucina: saudáveis (PL) e portadoras do tumor de Walker 256 (PWL). O tumor Walker 256 foi inoculado no S.C. do flanco direito nas ratas assim que identificada a prenhez, nesse mesmo momento iniciou-se o fornecimento da dieta rica em leucina que apresenta 18% de proteína adicionados 3% de L-leucina, com uma redução de 3% no amido de milho (38,7%), dextrina (12,2%) e açúcar (9%), sendo essas as principais diferenças em comparação com dieta controle, ambas apresentam as mesmas quantidades de caseína, gordura, fibra, sal, mistura de vitaminas, cisteína e colina, seguindo o proposto em estudos anteriores (Viana e Gomes-Marcondes 2013, Viana, Canevarolo et al. 2016, Viana, Tobar et al. 2019). As dietas controle e leucina são normoproteicas, isocalóricas e normolipídicas. A eutanásia ocorreu por volta no vigésimo dia de prenhez (algumas ratas foram eutanasiadas antes do 20º dia devido a progressão do tumor, considerando que o curso da gestação usual desses animais dura 21 dias). No momento da eutanásia as placentas e os fetos foram retirados e pesados, e as placentas foram rapidamente e fixadas para análises histológicas e armazenadas para futuras análises bioquímicas.

Análises Histológicas

Após a coleta, as amostras foram fixadas em solução 4% paraformaldehide em 0,1 M phosphate-buffered saline [PBS]), pH 7.4, por 24 horas à 4 °C. Após esse período, os tecidos foram desidratados em álcool 70º e então foi realizada secção transversal da placenta (Representado na **Figura 1**) para o emblocamento em historesina (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) e cortados através do micrótomom com espessura de 4 µm e corte com espessura de 4µm; após os cortes, o material foi corado com hematoxilina/eosina (HE) (Esquematisado na **Figura**



Figura 1. Secção transversal da placenta.

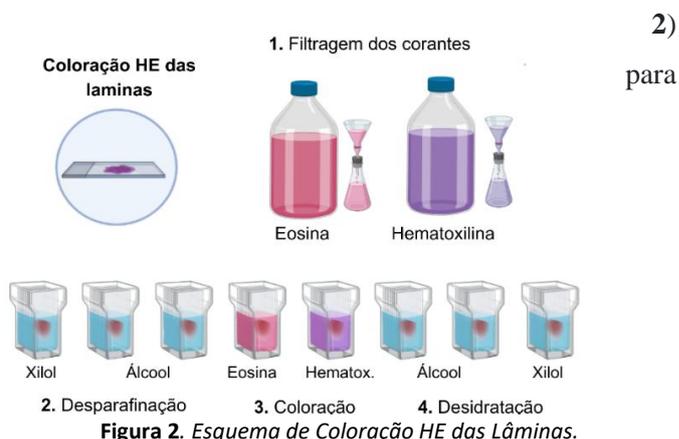


Figura 2. Esquema de Coloração HE das Lâminas.

avaliação do aspecto histológico das camadas labiríntica, zona juncional e decídua, além das células gigantes trofoblásticas. Além disso, a área das placentas também foram calculadas.

Análises Estatísticas

Para as análises dos dados foi utilizado o software Prism 9, no qual foi aplicado o teste de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste Tukey e o Teste T-Student para avaliação do peso de tumor nos grupos PWC e PWL, sendo valores com $P < 0,05$ considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Após a eutanásia dos animais, foram medidos peso de placenta, feto e do tumor nos grupos Walker, além de serem contados o número de placentas e reabsorções, que podem ser encontrados na **Tabela 1**. Não houve diferença significativa no número de placentas e número de reabsorções, entretanto, o peso de feto apresentou diferença entre os grupos: PWC quando comparado ao PC, PWL quando comparado a PL, PWC quando comparado ao PL e entre PWL quando comparado ao grupo PWC, com essa diferença pode-se inferir a influência do tumor presente na rata prenha ao peso do feto e consequente ao seu desenvolvimento, já que os fetos em que as mães portadoras tumor, mesmo recebendo suplementação com leucina, sofreram redução de peso. Ainda sim é importante salientar que, fetos de ratas portadores do carcinoma de Walker 246 e recebiam dieta leucina (PWL) obtiveram peso maior do que aqueles em que as mães foram alimentadas com dieta controle (PWC), impulsionando a hipótese de que a leucina pode ser uma aliada ao tratamento do câncer, especialmente nesse contexto de câncer e gravidez. Sobre o peso de placenta, pelos testes não foi observada diferença significativa, mas é possível notar tendência a isso, devido ao *p-value* com valores próximos a 0,05 quando PWC é comparado a PC ($P = 0,058$) e quando PWL é comparado a PWC ($P = 0,065$). Quanto ao peso do tumor nos grupos PWC e PWL, não houve diferença significativa, segundo o Teste T - Student.

Tabela 1. Parâmetros morfométricos sobre os grupos experimentais, portadores ou não de tumor e que receberam ou não suplementação nutricional com leucina.

Parâmetros Morfométricas	PC (n = 6)	PL (n = 6)	PWC (n = 6)	PWL (n = 6)
Nº de Placentas	11,33 ± 1,50	11,00 ± 0,63	9,00 ± 3,74	10,50 ± 2,88
Peso das Placentas (g)	0,44 ± 0,03	0,41 ± 0,05	0,27 ± 0,11	0,44 ± 0,16
Peso dos fetos (g)	3,28 ± 0,55	3,58 ± 0,22	0,75 ± 0,63 ^{a, b}	2,21 ± 1,43 ^{b, c}
Nº de reabsorções	0,33 ± 0,51	0,16 ± 0,40	1,50 ± 1,25	1,50 ± 2,07
Peso do Tumor (g)	-	-	43,57 ± 7,79	40,71 ± 6,95

Legenda: PC, grupo prenhe controle, PL grupo prenhe com leucina., PWC, grupo prenhe com dieta controle e portadora de tumor de Walker 356 controle; e PWL grupo prenhe com leucina e portador de tumor de Walker 356. Os dados estão expressos como médias ± desvio padrão. O teste utilizado para a análise foi o ANOVA one way, seguido pelo pós teste Tukey ($p < 0.05$). Os valores com "a" apresentam diferença significativa em comparação com PC, os valores com "b" apresentam diferença significativa em comparação com PL; e os valores com "c" apresentam diferença significativa em comparação com PWC. Para peso de tumor foi utilizado o Teste T-Student ($p < 0.05$)

Após a coleta dos dados antropométricos, foi realizado a fixação das placentas e posteriormente o preparo histológico delas. Com as lâminas já prontas foi possível analisar as regiões placentárias dos grupos estudados, sendo elas a decídua, labirinto e zona juncional que estão representadas de forma esquemática na **Figura 3** e os dados sobre as espessuras e área total de cada grupo, na **Tabela 2**.

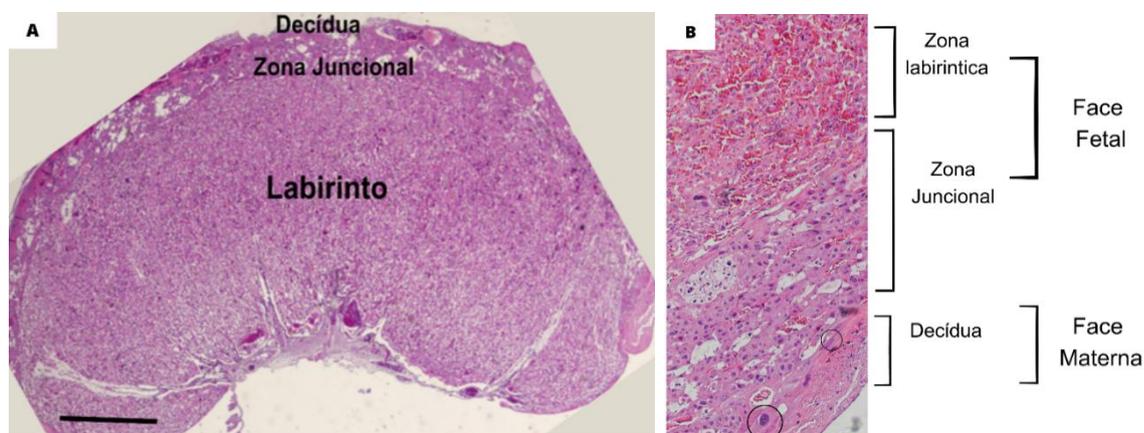


Figura 3. A. Imagem representativa da placenta, com decídua, zona juncional e labirinto. B. Nessa imagem tem-se a esquematização das regiões placentárias e circulado estão as células trofoblásticas gigantes. Coloração HE. Barra= 1000 μ m.

Tabela 2. Medidas das regiões placentárias (mm) dos diferentes grupos experimentais, portadores ou não de tumor e que receberam ou não suplementação nutricional com leucina.

Regiões Placentárias	PC (n = 5)	PL (n = 4)	PWC (n = 3)	PWL (n = 2)
Labirinto	2,04 \pm 0,19	2,26 \pm 0,34	1,70 \pm 0,57	1,68 \pm 1,02
Decídua	0,08 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,08 \pm 0,04	0,21 \pm 0,04 ^a
Zona Juncional	0,28 \pm 0,03	0,23 \pm 0,10	0,45 \pm 0,27	0,37 \pm 0,05
Área total	19,03 \pm 2,64	17,71 \pm 4,71	18,82 \pm 3,71	16,89 \pm 7,92

Legenda: PC, grupo prenhe controle, PL grupo prenhe com leucina., PWC, grupo prenhe com dieta controle e portador de tumor de Walker 356 controle; e PWL grupo prenhe com leucina e portador de tumor de Walker 356. Os dados estão expressos como médias \pm desvio padrão. O teste utilizado para análises foi o ANOVA one way seguido pelo pós-teste Tukey ($p < 0.05$). Os valores com a apresentam diferença significativa em relação aos demais grupos (PC vs PWL; PL vs PWL; PWC vs PWL).

Não foram observadas diferenças significativas nas regiões da zona juncional nem na região do labirinto, mas foram observadas na decídua, em que PWL apresentou diferença significativa (ANOVA, p -value = 0,0019) em relação aos demais grupos apresentando maior espessura (**Tabela 2**), do que os demais grupos (PC, PCW e PL). Entretanto essa diferença significativa pode ter sido observada devido ao pequeno número amostral de PWL, que ainda será aumentado. Essa diferença também pode ter ocorrido devido a suplementação com leucina que foi capaz de manter uma maior espessura da decídua, composta principalmente de células estromais (representadas na **Figura 4D**). Em estudos anteriores (Viana, L. R. and M. C. Gomes-Marcondes (2013)) foi possível observar que a suplementação com leucina pôde ter um efeito protetor contra a depleção muscular sendo assim, pode também ter tido efeito positivo nessa região placentária. As células da parte fetal da placenta estão representadas na **Figura 4A, 4B e 4C**.

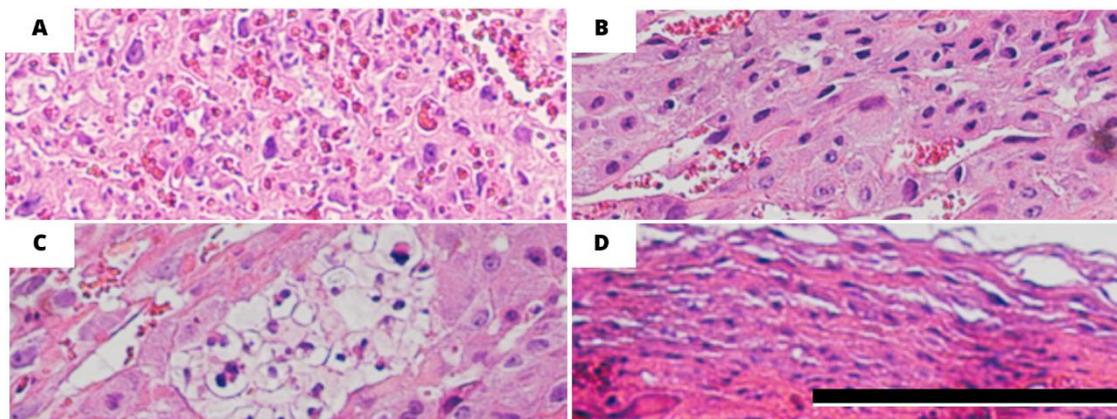


Figura 4. Imagens representativas dos diferentes grupos experimentais, portadores ou não de tumor e que receberam ou não suplementação nutricional com leucina. A. Células trofoblásticas compreendendo sinciotroblasto e citotroblasto, na região do labirinto; B. Células espongiotrofoblásticas, na zona juncional; C. Células da decídua; D. Células de glicogênio, barra= 1000µm.

CONCLUSÕES:

A dieta rica em leucina não apresentou efeito sobre o peso das placentas, nem sobre as regiões do labirinto e zona juncional, entretanto foi possível observar que o grupo com tumor suplementado com leucina, PWL, apresentou espessura maior da decídua comparado aos outros grupos. O peso dos fetos também apresentou diferenças, mostrando que os grupos com tumor tiveram fetos de menor peso em relação ao seu respectivo grupo controle e que PWL teve peso maior que PWC. Esses resultados podem indicar que o tumor tem efeitos negativos ao desenvolvimento fetal e que a leucina pôde ser capaz de trazer benefícios a esse desenvolvimento, visto que pode causar influências sobre o tamanho da placenta.

BIBLIOGRAFIA

1. Charest, P. L., Vrolyk, V., Herst, P., Lessard, M., Sloboda, D. M., Dalvai, M., Haruna, J., Bailey, J. L., & Benoit-Biancamano, M. O. (2018). Histomorphologic Analysis of the Late-term Rat Fetus and Placenta. *Toxicologic pathology*, 46(2), 158–168.
2. Furukawa, S., Tsuji, N., & Sugiyama, A. (2019). Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. *Journal of toxicologic pathology*, 32(1), 1–17.
3. Parazzini, F., Franchi, M., Tavani, A., Negri, E., & Peccatori, F. A. (2017). Frequency of Pregnancy Related Cancer: A Population Based Linkage Study in Lombardy, Italy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 27(3), 613–619.
4. Shachar, S. S., Gallagher, K., McGuire, K., Zagar, T. M., Faso, A., Muss, H. B., Sweeting, R., & Anders, C. K. (2017). Multidisciplinary Management of Breast Cancer During Pregnancy. *The oncologist*, 22(3), 324–334.
5. Wang ML, Dorer DJ, Fleming MP, Catlin EA. Clinical outcomes of near-term infants. *Pediatrics*. 2004 Aug;114(2):372-6. doi: 10.1542/peds.114.2.372. PMID: 15286219.
6. Cruz, B., Gomes-Marcondes, M.C. (2014). Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 2.
7. Viana, L. R., & Gomes-Marcondes, M. C. (2013). Leucine-rich diet improves the serum amino acid profile and body composition of fetuses from tumor-bearing pregnant mice. *Biology of reproduction*, 88(5), 121.
8. Viana, L. R., Canevarolo, R., Luiz, A. C., Soares, R. F., Lubaczeuski, C., Zeri, A. C., & Gomes-Marcondes, M. C. (2016). Leucine-rich diet alters the 1H-NMR based metabolomic profile without changing the Walker-256 tumour mass in rats. *BMC cancer*, 16(1), 764.
9. Viana, L.R., Tobar, N., Busanello, E.N.B. *et al.* (2019). Leucine-rich diet induces a shift in tumour metabolism from glycolytic towards oxidative phosphorylation, reducing glucose consumption and metastasis in Walker-256 tumour-bearing rats. *Sci Rep* 9, 15529.