

# ESTUDO DA MORFOMETRIA PLACENTÁRIA DE RATAS DIABÉTICAS E NÃO-DIABÉTICAS EXPOSTAS À FUMAÇA DO CIGARRO DE TABACO.

Marisa Akemi Takeno, Iracema de Mattos Paranhos Calderon, Yuri Karen Sinzato, Paula Helena Ortiz Lima, Marilza Vieira Cunha Rudge, Débora Cristina Damasceno. Interáreas – Medicina Humana – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu – Campus de Botucatu.

*Diabetes mellitus* é uma desordem crônica caracterizada pela elevação da glicemia de jejum e/ou pós-prandial por falta de produção de insulina pelas células beta das ilhotas pancreáticas ou diminuição do efeito da insulina nas células-alvo. Isto resulta na exposição de tecidos de todos os órgãos à hiperglicemia crônica. Uma quantidade exagerada de glicose materna determina efeitos deletérios na formação e no desenvolvimento da placenta e, conseqüentemente, no crescimento fetal. A placenta é um importante órgão que se desenvolve durante a gestação, constituindo a interface entre o meio materno e fetal. Dentre as suas principais funções, está a transferência de nutrientes da mãe para o feto.

Assim como o diabete, o uso de cigarro aumenta a morbidade e mortalidade perinatal e causa danos à função placentária. Análises morfológicas das placentas de gestantes fumantes e não-fumantes evidenciaram alterações em sua estrutura, dificultando as trocas materno-fetais. Existem modelos com animais de laboratório para avaliar os efeitos de diferentes agentes ambientais na placenta. Na rata, a placentação se inicia por volta do 6º dia de prenhez. A partir do 8º dia de prenhez, as células trofoblásticas diferenciam-se em quatro principais grupos celulares: células espongiotrofoblásticas; células gigantes; células do sinciotrofoblasto e células do citotrofoblasto (Rijk et al, 2002). Do 12º ao 21º dia de prenhez, a estrutura útero-placentária da rata apresenta três camadas morfológicamente distintas: a) decídua - miométrio fortemente decidualizado associado à camada estromal também constituída de células decidualizadas e células de glicogênio; b) zona juncional (responsável pela maior parte da atividade endócrina da placenta) – composta por três tipos celulares distintos: células trofoblásticas gigantes, células do espongiotrofoblasto e células de glicogênio (primeiras células a aparecerem dentro da camada do espongiotrofoblasto migrando posteriormente em direção à decídua materna); c) zona labiríntica (labirinto) – composta de células-tronco capazes de se diferenciarem em células trofoblásticas gigantes ou de se fundirem para formar as células trofoblásticas sinciciais (Ain et al., 2003).

Com o objetivo de ampliar a linha de investigação científica do Grupo Acadêmico de Pesquisa Diabete e Gravidez: Clínico e Experimental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pretende-se desenvolver um estudo com animais expostos à fumaça de cigarro, mimetizando, particularmente, o comportamento de mulheres, diabéticas ou não, que continuam fumando durante o período de gestação para avaliar a morfometria das placentas dessas ratas.

Para desenvolvimento desse estudo, ratas *Wistar* foram adaptadas no Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia durante sete dias. A seqüência experimental foi modificada de Calderon et al. (1992) para o binômio diabete e prenhez e de Paiva et al. (2003) para o modelo de exposição à fumaça de cigarro. A seqüência foi dividida em cinco períodos: adaptação, exposição à fumaça de cigarro, diabetogênese, acasalamento e prenhez. Durante o período de adaptação, os animais permaneceram em gaiolas coletivas com quatro animais, sob temperatura controlada ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas. No período de exposição à fumaça de cigarro, as ratas ( $\pm 47$  dias de vida) foram colocadas em câmaras hermeticamente fechadas para adaptação à fumaça de cinco cigarros durante 30 minutos/dia por sete dias. O respectivo grupo controle foi exposto a ar filtrado durante o mesmo período. A composição do cigarro utilizado consistiu de 10 mg de alcatrão, 0,80 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono. Após o período de uma semana de adaptação à fumaça, as ratas foram expostas à fumaça de 10 cigarros por 30 minutos, com intervalo de 15 minutos de descanso para liberação de toda a fumaça do cigarro contida na câmara e, em seguida, os mesmos animais foram expostos à fumaça de outros 10 cigarros por mais 30 minutos. A concentração de monóxido de carbono na câmara foi de 193,50 partículas por milhão (ppm), a temperatura foi mantida ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e a umidade relativa foi aproximadamente de 40%. A exposição foi realizada até o dia anterior à laparotomia (20º dia de prenhez). Aos 87 dias de idade, as ratas não-prenhes normoglicêmicas sorteadas para indução do diabete receberam *streptozotocin*, uma droga beta-

citotóxica, na dose de 40 mg/Kg de peso corpóreo diluída em tampão citrato e administrada na cauda via intravenosa (fase de diabetogênese). As sorteadas para o grupo controle receberam pela mesma via de administração tampão citrato em volume equivalente à droga diabetogênica. A seguir, as ratas foram mantidas em gaiolas individuais até a manhã do 8º dia após a indução.

Após o período de diabetogênese, iniciou-se a fase de acasalamento com duração máxima de 15 dias. No final da tarde, quatro ratas fêmeas e um macho foram colocados em gaiolas de polietileno. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e foram coletados os esfregaços vaginais das ratas para análise para confirmação da prenhez. Em caso afirmativo, este foi considerado dia 0 (Damasceno et al., 2004). Foram colhidas amostras de sangue por punção da parte distal da cauda para determinação da glicemia materna nos dias zero e 21º de prenhez. A glicemia foi determinada em glicosímetro pela amostra de sangue colhida da parte distal da cauda da rata. O critério de inclusão estabelecido para compor os grupos com diabetes de intensidade grave consistiu em ratas que apresentaram valores glicêmicos superiores a 200 mg/dL.

As ratas prenhes constituíram 4 grupos experimentais (n=6/grupo): não-diabéticas não-expostas à fumaça de cigarro de tabaco (NDNF); não-diabéticas expostas à fumaça (NDFS); diabéticas não-expostas (DNF) e diabéticas expostas antes e durante a prenhez (DFS).

No 21º dia de prenhez, após pesagem e determinação da glicemia materna, as ratas foram mortas para colheita das placentas. Após pesagem destas, foram colhidas amostras de tecido placentário em cortes transversais da face fetal (epitélio corio-alantóico) até a face materna (epitélio decidual), mantidas em solução de formol e incluídas em blocos de parafina. Um total de 48 blocos placentários (12 blocos/grupo) foi processado para o estudo morfométrico. As lâminas foram examinadas em aumento 25x para identificação dos campos apropriados para a análise do labirinto e de 50x para a identificação e análise das camadas deciduais e espongiotrofoblásticas e eleição de seis campos por lâmina. As áreas médias de cada zona placentária serão avaliadas em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) por sistema computadorizado de imagem (*software* KS-300, versão 3.0, Zeiss®), que recebe imagem por câmara digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®), acoplada a fotomicroscópio (DMR, Leica®). Para a análise estatística dos dados, foi realizada ANOVA seguida do Teste de *Student Newman Keuls* (Zar, 1999).  $p < 0,05$  foi considerado como limite de significância.

O presente estudo mostrou que, nas ratas não-diabéticas, confirmou-se a normoglicemia durante a prenhez, com valores médios de 90,0 mg/dL. A comparação entre as ratas do grupo NDFS em relação às ratas do grupo NDNF não foi estatisticamente significativa. Da mesma forma, a média da glicemia das ratas DFS não diferiu das ratas do grupo DNF ( $p > 0,05$ ). Houve redução estatisticamente significativa da área de decídua nas ratas do grupo NDFS em relação ao grupo NDNF ( $p < 0,05$ ). As áreas de espongiotrofoblasto e de labirinto das placentas de ratas do grupo NDFS não apresentaram alterações significativas em relação às ratas do grupo NDNF ( $p > 0,05$ ) (TABELA 1). Foi verificado aumento significativo na área de espongiotrofoblasto do grupo DFS em relação ao grupo DNF ( $p < 0,05$ ). Não houve alterações estatisticamente significativas nas áreas de decídua e labirinto das placentas de ratas do grupo DFS em relação às ratas do grupo DNF ( $p > 0,05$ ) (TABELA 2).

**TABELA 1.** Áreas das regiões placentárias (decídua, espongiotrofoblasto e labirinto) de ratas não-diabéticas expostas ou não à fumaça de cigarro de tabaco.

Variáveis	Grupos	
	NDNF (n=12)	NDFS (n=12)
<b>Decídua (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	333564,98 $\pm$ 89163,83	259281,93 $\pm$ 69604,53*
<b>Espongiotrofoblasto (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	836450,63 $\pm$ 159548,89	885895,36 $\pm$ 333747,46
<b>Labirinto (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	8843918,22 $\pm$ 1009940,56	8179641,02 $\pm$ 1474032,06

Valores expressos como média  $\pm$  desvio-padrão

Legenda: **NDNF**: Não-diabético não-exposto à fumaça de cigarro de tabaco; **NDFS**: Não-diabético exposto à fumaça de cigarro de tabaco.

\*  $p < 0,05$  – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NDNF

**TABELA 2.** Áreas das regiões placentárias (decídua, espongiotrofoblasto e labirinto) de ratas diabéticas expostas ou não à fumaça de cigarro de tabaco.

Variáveis	Grupos	
	DNF (n=12)	DFS (n=12)
<b>Decídua</b> ( $\mu\text{m}^2$ )	298751,32 $\pm$ 72931,81	289021,49 $\pm$ 38776,88
<b>Espongiotrofoblasto</b> ( $\mu\text{m}^2$ )	843461,98 $\pm$ 240177,68	1078994,43 $\pm$ 242830,41*
<b>Labirinto</b> ( $\mu\text{m}^2$ )	8289675,52 $\pm$ 851799,93	7670119,30 $\pm$ 728990,01

Valores expressos como média  $\pm$  desvio-padrão

Legenda: **DNF**: Diabético não-exposto à fumaça de cigarro de tabaco; **DFS**: Diabético exposto à fumaça de cigarro de tabaco.

\*  $p < 0,05$  – diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DNF

Apesar de não existirem estudos sobre a associação do diabete e exposição à fumaça de cigarro na prenhez, o presente trabalho mostrou que houve alterações morfométricas evidentes nas placentas de ratas não-expostas à fumaça de cigarro de tabaco com a redução da decídua. Isto poderia estar relacionado a alterações na nutrição, controle da invasão trofoblástica e desenvolvimento do embrião. A associação diabete e exposição à fumaça de cigarro causou aumento da camada espongiotrofoblástica nas placentas das ratas. Sugere-se que esta expansão poderia estar relacionada ao desenvolvimento anormal do trofoblasto durante os estágios iniciais da implantação, levando a anormalidades placentárias. Outra possibilidade, para explicar a placentomegalia seria uma alteração decorrente de possíveis defeitos fetais. Outros estudos estão em desenvolvimento para melhor compreensão destas alterações nas placentas de ratas.

#### Referências bibliográficas (de acordo com a ABNT)

- Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol* 2003; 260(1):176-90.
- Calderon IMP, Rudge MVC, Brasil MAM, Henry MACA. Diabete e gravidez experimental em ratas I. Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cir Bras*. 1992, 7: 142-146.
- Czekaj P, Palasz A, Lebda-Wyborny T et al. Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75(Suppl):S27-S35.
- Damasceno DC; Volpato GT, Calderon IMP, Aguilar R, Rudge MVC. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomedicine* 2004, 11: 196-201.
- deRijk EP, van Esch E, Flik G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 271-82.
- Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol* 2003; 81: 221-9.
- Zar JH. *Bioestatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 1999.