



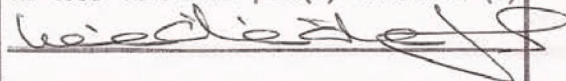
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LAÍS ROSA VIANA

“Avaliação do perfil de aminoácidos fetal e materno e atividade placentária em camundongas NMRI portadoras do adenocarcinoma de colon (MAC16) submetidas com dieta rica em leucina”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)



é aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas, 2012



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V654a Viana, Laís Rosa, 1988-
Avaliação do perfil de aminoácidos fetal e materno e atividade placentária em camundongas NMRI portadoras do adenocarcinoma de colon (MAC 16) submetidas com dieta rica em leucina / Laís Rosa Viana. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. Leucina. 3. Prenhez. 4. Aminoácidos. 5. Placenta. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of maternal and fetal amino acid profile and placental activity in NMRI mice infected with colon adenocarcinoma (MAC 16) feeding with leucine-rich diet

Palavras-chave em Inglês:

Cancer

Leucine

Animal pregnancy

Amino acids

Placenta

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora: .

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Dora Maria Grassi Kassis

Gislaine Ventrucchi

Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 24 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
(Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis



Assinatura

Profa. Dra. Gislaíne Ventrucchi



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre César Santos de Rezende

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram e participaram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho. Em especial eu agradeço:

“A Deus, por toda benção que me concedeu durante minha vida. Agradeço por me dar sempre muita saúde, força, luz e felicidade”

“Ao meu querido e amado pai, Edson, que sempre me apoiou e acreditou nesse sonho! Suas sábias palavras e conselhos sempre me motivaram e fizeram de mim uma pessoa melhor! Agradeço a Deus por ele ter me dado você de presente! Pai, você é o meu exemplo de vida e essa conquista também é sua! Você foi, é e sempre será o meu HERÓI!!! TE AMO MUITO! “

“A minha mãe, melhor amiga e parceira, Sueli, obrigada por “agüentar” meus dias de estresse, nervosismo e mal humor! Você é uma batalhadora e enfrenta tudo sempre com esse seu lindo sorriso, você é iluminada mãe! Tenho muito orgulho de você!!! Deus foi muito bom quando me concedeu o seu ventre como minha primeira morada. TE AMO!”

“Ao meu irmão, Bruno. Obrigada por você ser tão amigo. Foram inúmeras brigas quando éramos crianças mas mesmo assim nunca conseguíamos ficar um dia longe. Você é o meu orgulho! Meu futuro veterinário preferido! Você tem um lindo e iluminado caminho pela frente. AMO VOCÊ”

“A minha orientadora, Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, pela confiança, pelo conhecimento e pelas inúmeras “sessões de terapia”. Obrigada por ser verdadeiramente uma orientadora! É nítida a paixão que a senhora tem em fazer pesquisa. Poucos orientadores são assim e eu agradeço a Deus por ele ter colocado a senhora na minha vida! Muito obrigada por tudo”

“A minha amiga e primeira orientadora, Dra. Carolina Silveira, obrigada por ter me introduzido nesse maravilhoso mundo da pesquisa! Serei eternamente grata a você por tudo que fez por mim”

“A todos do laboratório de nutrição e câncer, em especial aos meus amigos, André, Emilianne, Rebeka, Tati, Bread, João Gabriel (“Marquinhos”), Bianca, Natália, Marcela e Vitória, obrigada pela amizade e força”

“A minha amiga, irmã gêmea, sombra, Aline Toneto. Deus te colocou no meu caminho e não foi por acaso! Passamos muitos momentos especiais juntas e espero que essa nossa amizade dure a vida inteira”

“A minha querida amiga, parceira de todas as horas, Priscila (“Jair”), pelos inúmeros momentos de alegria que passamos juntas. Te amo eternamente, ou até o Corinthians ser campeão da libertadores”

“Aos meus queridos amigos, professores e funcionários do departamento de Fisiologia e Biofísica, em especial ao Luiz Alberto, pela amizade verdadeira, pelos cafezinhos e pelos sábios conselhos; Ao Ivan, que apesar de ser São Paulino eu considero e admiro muito, obrigada por ter me ajudado com o temido Western Blott; A minha querida amiga, conselheira e anja, Aline Arouca, obrigada por você existir! Você é muito iluminada”

“Minhas eternas amigas, Aline Sampaio, Juliana Gomes e Camila Sanches, por dividirem comigo os quatro anos de graduação, obrigada por todos os momentos que passamos juntas”

“Aos meus queridos amigos e treinadores do Labex (laboratório de bioquímica do exercício) da Unicamp, em especial a Camila, Felipe, Carlos, Lucas, Vitor, Nadir, Zé Carlos, Antunes, Larissa, e todos os demais, por dividirem comigo momentos de treinamentos, competições, mas também momentos de muita alegria e descontração. Se não fossem vocês a condução desse trabalho não teria sido a mesma”

“A Clarice Izumi e a todos os funcionários e alunos do Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, que me auxiliaram nas análises de perfil de aminoácido”

“A Fapesp pelo apoio financeiro, processo no. 2009/11982-3”

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.

As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito"

(Chico Xavier)

RESUMO

A gravidez envolve várias etapas de ajustes fisiológicos, sendo que algumas complicações clínicas podem surgir ao longo deste processo. Dentre as complicações durante a gestação, o câncer destaca-se mais pela sua coexistência com essa complexa condição metabólica, do que pela sua incidência. Na mãe portadora de doença neoplásica, pode haver competição nutricional entre feto e tumor, resultando em alterações no crescimento e metabolismo de ambos. A manipulação da dieta e suplementação nutricional podem minimizar os danos causados pelo tumor. A leucina é um aminoácido que participa do processo de síntese proteica tecidual de forma estrutural e também atua diretamente na sinalização celular; considerando organismos portadores de câncer, a leucina age inibindo o processo de proteólise estimulando o processo de proteogênese. O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento fetal em associação ao desenvolvimento de câncer em camundongas prenhes submetidas à dieta rica em leucina. Os resultados obtidos referem-se a avaliação de fêmeas adultas (60-90 dias) da linhagem NMRI, prenhes, submetidas a suplementação nutricional com leucina portadoras ou não do adenocarcinoma de colon MAC16 e inoculadas ou não com líquido ascítico ativo ou inativado. Foram avaliados, nessas fêmeas, dados morfométricos como peso relativo de coração, fígado, baço, adrenal, músculo e placenta, sendo observado discreta diminuição do peso relativo da carcaça, coração, músculo e placenta nos grupos portadores de tumor e inoculados com líquido ascítico ativo, quando comparados aos seus grupos controles. Essa diminuição, provavelmente foi induzida pelo crescimento tumoral ou por seus fatores presentes no líquido ascítico. Em contrapartida, houve aumento no peso relativo do fígado e baço nos grupos portadores de tumor, inoculados com líquido ascítico ativo bem como inativo. Também foi possível observar que, nos grupos suplementados com leucina, o peso relativo de alguns órgãos como, músculo e placenta, foi superior ao dos grupos que receberam a dieta controle, mostrando possível efeito protetor da leucina contra a espoliação desses tecidos. Foram analisados também dados bioquímicos nos soros materno e fetal, além da composição corpórea fetal. No soro materno observamos que houve diminuição discreta na concentração de albumina e glicose nos grupos portadores de tumor. Houve aumento da reabsorção de fetos por fêmea nos grupos portadores de tumor e inoculados com líquido ascítico, e ainda nesses mesmos grupos houve modulação desse efeito quando houve suplementação nutricional com leucina. No soro fetal, houve diminuição na concentração de proteínas totais, albumina e glicose, além do aumento dos aminoácidos gliconeogênicos, como alanina e glutamina, nos grupos implantados com o tumor submetidos a dieta controle. Em contrapartida, os grupos com leucina mostraram discreto efeito protetor da suplementação com esse aminoácido. Concluímos, que os efeitos do crescimento tumoral são para alguns parâmetros mimetizados com a inoculação de líquido ascítico, porém podem ser modulados, na maioria dos parâmetros, com a suplementação nutricional de leucina. A suplementação nutricional com a leucina promoveu efeito benéfico, contribuindo para a manutenção e modulação dos efeitos deletérios causados pela presença da neoplasia, como manutenção da glicemia e proteína totais séricas, além de diminuir reabsorções fetais e também contribuiu para melhorar a atividade placentária nas mães, independente da inoculação ou não do líquido ascítico.

ABSTRACT

Pregnancy is a complex process involving several physiological steps and some clinical complications can alter the homeostasis adjustments during this process. Among the complications during pregnancy, cancer is very important for its coexistence than the incidence with this complex metabolic condition. In tumour-bearing mother, there is possible nutritional competition between foetal and tumour, resulting impaired growth and metabolic changes in both mother and foetus. The nutritional supplementation can minimize the damage caused by the tumour. Leucine acts as a cell signalling improving protein synthesis process and tissue structure. Considering cancer patients, leucine inhibits the process of proteolysis. The aim of this study was to evaluate foetal growth in association with cancer development in pregnant mice subjected to leucine-rich diet. We evaluated NMRI pregnant mice (60-90 days-old) feeding control or leucine-rich diet, bearing or not MAC16 colon adenocarcinoma and inoculated or not with active- or inactivated-ascitic fluid. Morphometric data showed decrease in the relative weight of carcass, heart, muscle and placenta in tumour-bearing groups and active-ascitic fluid injected groups. These results may be induced by tumour growth or its factors presented in ascitic fluid. In contrast, we observed increase in relative liver and spleen in tumour-bearing and both active or inactivated ascitic-fluid-inoculated groups. In groups supplemented with leucine, the muscle and placenta relative weight increased in comparison to control diet group, suggesting a possible protective effect of leucine against these tissues wasting. Biochemical data were also analyzed in maternal and foetal serum, and foetal body composition. Maternal serum showed slight decrease in serum albumin and glucose in tumour-bearing groups and also increase in gluconeogenic amino acids, such as glutamine and alanine. The foetuses resorption per female increased in all tumour-bearing groups and ascitic-fluid-inoculated dams. The foetal body water was increased in tumour-bearing animals, and also enhanced the serum pro-inflammatory cytokines and glucagon. We conclude that some effects produced by tumour growth can be similar by the ascitic fluid injection, and can be partially modulated by leucine-rich diet. Nutritional supplementation with leucine promoted beneficial effect, contributing to the maintenance and modulation of the deleterious effects caused by the presence of cancer. These effects can be related to maintenance of blood glucose and serum total protein, and reduction of fetal resorption and also improved the signalling proteins activity in placenta tissue, independent of the inoculation of the ascitic fluid.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras:

| | |
|--|----|
| Figura 1. Carcinogênese e desenvolvimento tumoral | 3 |
| Figura 2. Esquema da relação entre doenças crônicas e caquexia | 4 |
| Figura 3. Via de sinalização da mTOR | 7 |
| Figura 4. Distribuição dos grupos experimentais | 13 |
| Figura 5. Reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC) | 15 |
| Figura 6. Perfil de aminoácidos do padrão com concentração conhecida, com a área de seus picos | 15 |
| Figura 7. A- Placa de multipoços e B- passagem das <i>beads</i> | 18 |
| Figura 8. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos maternos | 23 |
| Figura 9. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos maternos | 25 |
| Figura 10. Perfil dos aminoácidos glutamina, alanina, prolina e leucina no soro materno | 26 |
| Figura 11. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos fetal | 27 |
| Figura 12. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos fetal | 28 |
| Figura 13. Concentração sérica dos aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) aspartato, leucina, glutamina, alanina e prolina no soro fetal | 29 |
| Figura 14. Análise da concentração (pg/mL) das citocinas séricas maternas pró-inflamatórias (A- IL-1 β ; B- IL-6; C- TNF- α ; D- INF- γ) e anti-inflamatórias (E- IL-4 e F- IL-10) | 32 |
| Figura 15. Análise da concentração (pg/mL) das citocinas séricas fetal pró-inflamatórias (A- IL-1 β ; B- IL-6; C- TNF- α ; D- INF- γ) e anti-inflamatórias (E- IL-4 e F- IL-10) | 34 |
| Figura 16. Análise da concentração (pM) de hormônios no soro materno | 37 |
| Figura 17. Análise da concentração (pM) de hormônios no soro fetal | 39 |
| Figura 18. Análise da expressão das proteínas da via de sinalização | |

| | |
|--|----|
| celular para síntese protéica | 42 |
| Figura 19. Análise da composição corpórea fetal | 50 |

Tabelas:

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Gradiente de separação para a eluição dos PTC-aa. | 17 |
| Tabela 2. Padronização da porcentagem de ganho de peso por dia de gestação. | 21 |
| Tabela 3. Análises dos dados bioquímicos (proteína, albumina e glicose) no soro materno e fetal. Análise do número de reabsorção fetal e de fetos por fêmea e peso fetal. | 47 |
| Tabela 4. Porcentagem do peso relativo dos órgãos (PR) nos diferentes grupos experimentais. | 52 |
| Tabela 5. Composição das dietas semipurificadas baseada na AIN-93G (Anexo 2). | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAC16- Adenocarcinoma de colon -16

IL- Interleucina

TNF- Fator de necrose tumoral

BCAA- *Branched-Chain Amino Acids* – Aminoácido de cadeia ramificada

RNA- Ácido ribonucléico

eIF- Fator de iniciação eucariótico

mTOR- *Mammalian target of rapamycin*

PKA- Proteína quinase A

PKC- Proteína quinase C

PKB- Proteína quinase B

hCG- Hormônio gonadotrófico coriônico

DG- Dia de gestação

GP- Ganho de peso

C- Controle grávidas

MAC- Grávidas portadoras do tumor MAC16

A- Grávidas inoculadas com líquido ascítico

AA- Grávidas inoculadas com líquido ascítico inativo

L- Controle grávidas, suplementadas com dieta rica em leucina

LMAC- Grávidas portadoras do tumor MAC16, suplementadas com dieta rica em leucina

LA- Grávidas inoculadas com líquido, ascítico suplementadas com dieta rica em leucina

LAA- Grávidas inoculadas com líquido ascítico inativo, suplementadas com dieta rica em leucina

IP- Intraperitônio

SC- Subcutâneo

PITC- Fenilisotiocianato

TEA- Trietilamina

NaAc- Acetato de sódio

AcN- Acetonitrila

mM- Milimolar

mg- Micrograma

mL-Microlitro

RPM- Rotação por minuto

SDS-PAGE- *Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis*

GLP- peptídeo semelhante ao glucagon

μmol- Micromol

μL- Microlitros

°C- Graus Celsius

PIF- fator de indução de proteólise

LMF- fator de mobilização de lipídeos

PTC-aa- derivados feniltiocarbamil-aminoácidos

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução Geral..... | 1 |
| 1.1 Câncer..... | 2 |
| 1.2 Aminoácidos..... | 5 |
| 1.3 Gravidez..... | 8 |
| 2. Objetivos... .. | 10 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 10 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 10 |
| 3. Material e métodos..... | 12 |
| 3.1 Animais.. .. | 12 |
| 3.2 Dietas: Controle e Leucina.. .. | 12 |
| 3.3 Protocolo experimental.. .. | 12 |
| 3.4 Implante tumoral e obtenção de líquido ascítico..... | 13 |
| 3.5 Soro fetal e materno.. .. | 14 |
| 3.5.1 Análise do perfil de aminoácidos séricos..... | 14 |
| 3.5.1 a Derivação..... | 16 |
| 3.5.1 b Separação dos PTC-aa..... | 16 |
| 3.5.1 c Quantificação dos PTC-aa..... | 17 |
| 3.5.2 Análise do perfil de citocinas e hormônios séricos..... | 17 |
| 3.5.3 Análises bioquímicas..... | 18 |
| 3.5.3 a Proteínas totais..... | 18 |
| 3.5.3 b Albumina..... | 18 |
| 3.5.3 c Glicose..... | 19 |
| 3.6 Atividade placentária..... | 19 |
| 3.7 Massa protéica e de gordura fetal..... | 20 |
| 3.8 Análise Estatística..... | 20 |
| 4. Resultados e Discussão... .. | 21 |
| 4.1 Perfil de aminoácidos séricos..... | 21 |
| 4.2 Análise do perfil de citocinas séricas..... | 30 |
| 4.3 Análise do perfil de hormônios séricos..... | 36 |
| 4.4 Atividade placentária..... | 41 |
| 4.5 Análises bioquímicas e morfométricas maternas e fetais..... | 45 |
| 4.6 Composição corpórea fetal... .. | 49 |
| 4.7 Análises morfométricas.. .. | 51 |
| 5. Conclusões..... | 55 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 56 |
| 7. Anexos..... | |

1. Introdução Geral

A gravidez é o estado fisiológico caracterizado por aumento na ingestão de alimentos e importantes alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, que visam suprir e garantir o desenvolvimento e nascimento do feto (MITCHELL, 1996). Dentre as complicações clínicas que podem surgir durante a gravidez, a doença neoplásica é especialmente importante, mais pela sua coexistência com essa outra complexa condição metabólica, do que pela sua incidência (MITCHELL, 1996; GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998a).

As características do metabolismo e desenvolvimento fetais dividem importantes similaridades com as de um tumor em crescimento (CARBÓ *et al.*, 1996). O conceito utiliza aminoácidos livres, sendo que a maioria deles incorporada para a síntese de novas proteínas fetais provém da quebra de proteínas dos tecidos extra-embriônicos (BECKMAN *et al.*, 1996; CARVER *et al.*, 1997), o que causa depleção de reservas maternas. Da mesma maneira, o processo de crescimento tumoral utiliza grandes quantidades de glicose e aminoácidos, provenientes do hospedeiro, para oxidação e síntese protéica, respectivamente (MILLEY, 1998; TISDALE, 2009).

Estudos associando gravidez e câncer que avaliam as possíveis mudanças no metabolismo da massa tumoral em associação com essa outra condição, que também demanda grandes alterações do metabolismo do organismo, são escassos. Existem controversas quanto à possível competição nutricional entre feto e tumor ou, ainda, fatores provenientes do tumor e/ou hospedeiro, resultando em alterações no crescimento e metabolismo de ambos – tumor e feto (CARBÓ *et al.*, 1996).

Estudo dos tratamentos co-adjuvantes aos convencionais anti-câncer vem crescendo, e desse modo a manipulação dietética e suplementação de nutrientes ocupam grande espaço nessas investigações. A leucina, aminoácido de cadeia ramificada, participa do processo de síntese protéica tecidual de forma estrutural, como também pode ser oxidado fornecendo energia aos processos celulares. Além disso, esse aminoácido atua diretamente na sinalização celular e, considerando organismos portadores de câncer, a leucina atua inibindo o processo de proteólise estimulando o processo de proteogênese (ANTHONY *et al.*, 1999, 2001; GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003; VENTRUCCI *et al.*, 2004, 2007; ELEY *et al.*, 2008 a,b; RUSSELL *et al.*, 2009).

Revisão bibliográfica

1.1 Câncer

O câncer ou neoplasia é um conjunto de células que cresce de maneira rápida e descontrolada, devido a proliferação celular inadequada, onde uma célula ou grupo de células sofre alterações/diferenciações anormais irreversíveis, tornando-se não responsivo aos controles de crescimento normais e expandindo-se além dos seus limites anatômicos normais (KUSEWITT, RUSH, 2009) (Figura 1). Assim, essas células podem invadir órgãos e tecidos, podendo espelhar-se para outras regiões do corpo, formando as metástases. As metástases ocorrem pela migração dessas células neoplásicas pelo sistema circulatório e linfático, desenvolvendo centros secundários tumorais, distantes do foco primário (BEREMBLUM, 1970; ARGILÉS *et al.*, 1990; BAGGETO, 1992; CHEN-ZION *et al.*, 1992).

Essa doença possui três características principais: invasão (capacidade de infiltrar e destruir ativamente os tecidos vizinhos), formação de metástases e anaplasia das células (alterações estruturais de componentes celulares) (BEREMBLUM, 1970).

Todo tecido maduro possui característica morfológica típica e é bem diferenciado. Os tecidos neoplásicos perdem essa característica de diferenciação. Essa perda da característica morfológica é acompanhada pela perda da capacidade funcional e pelo comportamento agressivo do tumor (KUSEWITT, RUSH, 2009).

As células neoplásicas apresentam alta variabilidade morfológica, podem exibir anaplasia, o núcleo dessas células pode apresentar variabilidade em número, tamanho, distribuição da cromatina e número de nucléolos; as figuras mitóticas normalmente estão em maior número e o conjunto de todas essas alterações resultam em aumento na frequência de divisão celular, anormalidades cromossômicas e estado metabólico ativo (KUSEWITT, RUSH, 2009). Além da perda morfológica, também encontra-se a perda de função do tecido neoplásico, ou seja, qualquer que seja o tecido afetado pela neoplasia, ele não desempenhará mais sua função fisiológica.

Em tecidos maduros a população celular é determinada pela taxa de proliferação e diferenciação celular e pela morte celular, denominada apoptose, que está alterada no tecido neoplásico (KUSEWITT, RUSH, 2009).

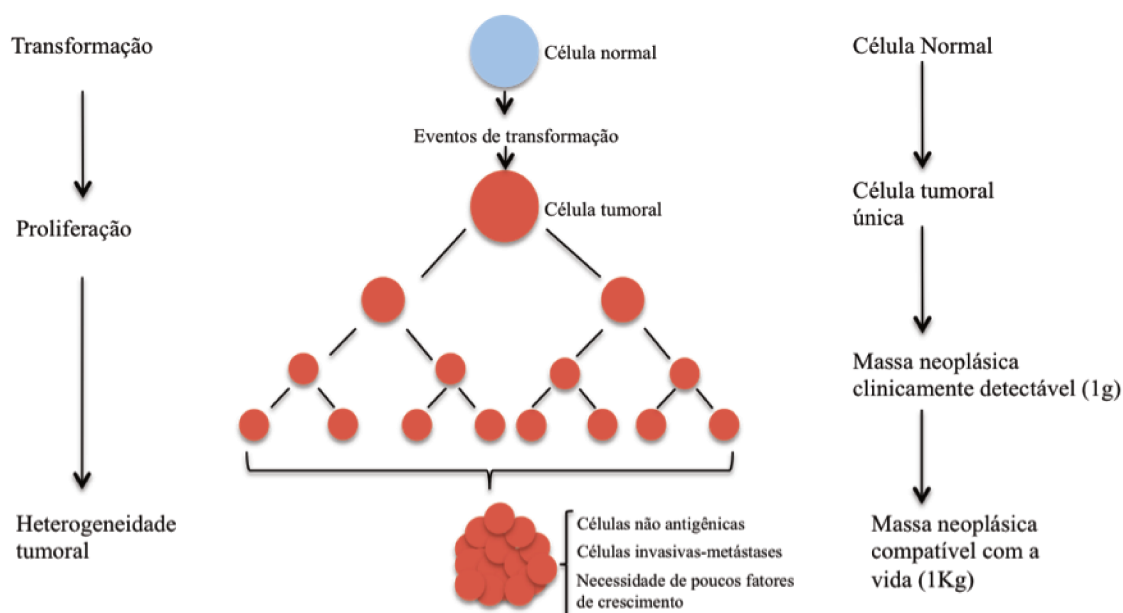


Figura 1. Carcinogênese e desenvolvimento tumoral (modificado de KUSEWITT, RUSH, 2009).

O câncer pode promover a morte do hospedeiro em decorrência da modificação da harmonia dos processos metabólicos, resultando em profundas alterações, como, redução do aporte de nutrientes causada pela anorexia; consumo de substratos específicos pelas células neoplásicas; estimulação das vias catabólicas; transformação qualitativa e quantitativa do meio interno, em função da produção de substâncias pelo câncer e/ou hospedeiro, originando o quadro denominado caquexia (TISDALE, 2002; BARACOS, 2006). Estudos de casos clínicos e trabalhos experimentais mostram que, no organismo hospedeiro de câncer, ocorre elevada mobilização de nutrientes para as células neoplásicas (STOUTHARD *et al.*, 1995; FEARON *et al.*, 2006).

A caquexia é diagnosticada em várias doenças crônicas como câncer, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva, doença renal e infecção (EVANS *et al.*, 2008).

No ano de 2006, durante conferência sobre câncer e avanços clínicos, realizada em Washington, DC pesquisadores entraram em consenso sobre a seguinte definição para a caquexia: “caquexia é uma síndrome metabólica complexa associada a algum tipo de doença e caracterizada por perda muscular acompanhada ou não de perda de massa adiposa”. Fatores como anorexia, inflamação, resistência a insulina e aumento na quebra de proteínas musculares são frequentemente associadas a doenças crônicas (Figura 2) (EVANS *et al.*, 2008).

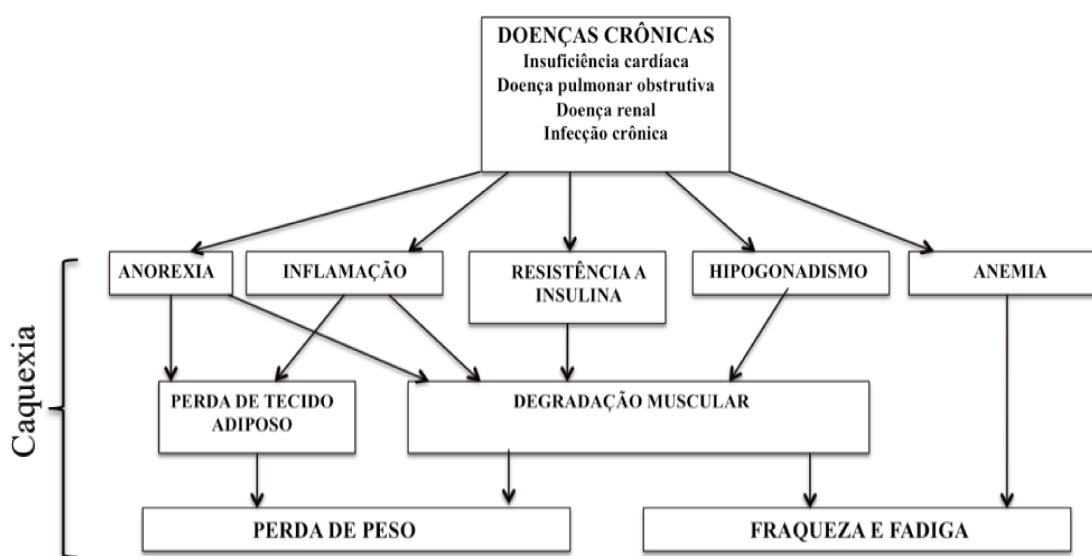


Figura 2. Esquema da relação entre doenças crônicas e caquexia (adaptado de EVANS *et al.*, 2008)

A síndrome caquética, no câncer, é caracterizada por perda involuntária de peso, anorexia, culminando em estado de má nutrição, associada a astenia e anemia. Ainda, a competição por nutrientes entre células neoplásicas e as do hospedeiro promove distúrbios metabólicos, alterando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. O hipermetabolismo, gerado pelo crescimento tumoral, leva a diminuição da eficiência energética do hospedeiro (ARGILÉS *et al.*, 2005).

A perda da massa muscular, principalmente a esquelética, é a principal característica do câncer-caquexia, resultando em menor mobilidade, fraqueza e morte do hospedeiro (KHAL *et al.*, 2005). A perda de proteína do músculo esquelético é consequência da supressão da síntese

de proteína (EMERY *et al.*, 1984) e / ou do aumento da proteólise e oxidação de aminoácidos (O'KEEFE *et al.*, 1990).

Outro componente da caquexia é o aumento da excreção de nitrogênio, causado pela degradação protéica muscular, nessas condições, elevadas taxas de síntese de glicose, em função da gliconeogênese, devido ao aumento da disponibilidade de aminoácidos, resultantes da quebra da proteína muscular, culminam em balanço nitrogenado negativo (WOLFE, 2001).

Além disso, como mencionado acima, a caquexia está associada à perda do apetite, resultando em acelerada perda de peso corpóreo e tecido muscular (EVANS *et al.*, 2008).

As alterações causadas pelo crescimento tumoral, promovem quebra de proteínas e aumento na oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada, principalmente no músculo, para o suprimento energético, como por exemplo gliconeogênese para os esqueletos carbônicos dos aminoácidos (BARACOS & MACKENZIE, 2006; CHOUDRY *et al.*, 2006). A proteólise no hospedeiro é estimulada, em partes, por citocinas inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são produzidas tanto pelo hospedeiro quanto pelas células tumorais (ARGILÉS, 2005).

O adenocarcinoma de cólon murino (MAC16) é um modelo experimental de caquexia utilizado em estudos realizados com camundongos. Como nos pacientes com câncer, os principais fatores responsáveis pela perda de peso corporal no modelo MAC16 são a perda de tecido adiposo e massa muscular esquelética (KHAL *et al.*, 2005). A perda de massa muscular esquelética é decorrente da redução de 60% na síntese de proteínas e aumento, de três vezes, na degradação protéica (BECK *et al.*, 1991).

BARACOS (1995) e LLOVERA (1997) desenvolveram estudos com camundongos portadores de câncer-caquexia e chegaram a conclusão de que a perda de massa muscular em camundongos portadores do tumor MAC16 pode ser induzida pela super regulação da via proteolítica ATP-ubiquitina-dependente (LORITE *et al.*, 1998).

O tumor MAC16 é bastante agressivo e quando induzido, em camundongos, causa caquexia principalmente pela liberação de citocinas como fator de indução de proteólise (PIF) e fator de mobilização de lipídeos (LMF) sempre associados à elevada concentração sérica do TNF α e IL-6 (BECK *et al.*, 1991; KHAL *et al.*, 2005).

A inoculação diária de líquido ascítico, e conseqüentemente dos fatores contidos no mesmo, como o PIF e o LMF, pode promover no animal efeitos nocivos, como redução de peso fetal, similar aos observados no animal portador de tumor.

1.2 Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades formadoras de uma proteína. Existem os essenciais, os quais não são sintetizados endogenamente e, por isso, precisam ser ingeridos por meio da dieta, e os não essenciais, que são sintetizados endogenamente (MARCHINI *et al.*, 1998; WAGENMAKERS, 1998).

Dentre os aminoácidos essenciais estão os aminoácidos de cadeia ramificada – *Branched-Chain Amino Acids* (BCAAs), que correspondem a cerca de 35% dos aminoácidos essenciais em proteínas musculares. Os BCAAs circulantes atuam como sinalizadores de nutrientes, na regulação da síntese e degradação protéica, na secreção de insulina e têm sido correlacionados com o controle do sistema nervoso central, controlando a ingestão de alimento e balanço energético (FAJANS, 1965; HAY *et al.*, 2004; COTA *et al.*, 2006; SHE *et al.*, 2007). Os BCAAs compreendem três aminoácidos: leucina, isoleucina e valina, estes são importantes para a manutenção da proteína corporal, são fonte de nitrogênio para a síntese dos aminoácidos não essenciais, como por exemplo a alanina e a glutamina e ainda, são responsáveis por transportar nitrogênio do músculo esquelético para o fígado (GARBER *et al.*, 1976; DARMAUN *et al.*, 1991). Estudos revelaram que estes aminoácidos, principalmente a leucina tem importante papel na regulação de processos anabólicos que envolvem síntese e degradação protéica (SHIMOMURA *et al.*, 2006). Os aminoácidos de cadeia ramificada também podem apresentar efeitos terapêuticos, atenuando a perda de massa magra durante a redução de massa corpórea, melhorar o balanço protéico muscular e podem servir de tratamento em doenças hepáticas e renais (SHIMOMURA *et al.*, 2006; TOM, NAIR, 2006).

A alimentação rica em aminoácidos promove a síntese de proteínas através da estimulação da tradução do RNA mensageiro (RNAm) (LANG *et al.*, 2004). A suplementação com a leucina estimula a síntese protéica muscular e modula a ação de várias proteínas

envolvidas no controle da tradução do RNAm (KIMBALL *et al.*, 2000; BEUGNET *et al.*, 2003).

O início da tradução do RNAm é estimulado através de mudanças na fosforilação de proteínas efetoras que regulam a síntese de proteína, como a mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (VARY, LYNCH, 2006).

A síntese protéica é regulada por interações entre RNAm, RNA transportador e fatores de iniciação eucarióticos (eIFs). A leucina pode estimular a tradução pela via da mTOR ou pode atuar independentemente dessa via. Esse aminoácido é capaz de estimular a captação de glicose via proteína quinase C (PKC), diferentemente da insulina que modula a captação de glicose via proteína quinase B (PKB) (NISHITANI *et al.*, 2002).

A mTOR é uma proteína quinase que responde a sinais nutricionais e mitogênicos afim de regular a tradução de RNAm em proteína. Uma vez estimulada/fosforilada, a mTOR desencadeia cascata de fosforilação de proteínas reguladas por ela, assim chamadas de *downstreams*, como a 4E-BP1 e P70S6K (HARA *et al.*, 1998; LYNCH, 2001; LYNCH *et al.*, 2002a; LYNCH *et al.*, 2002b) (Figura 3).

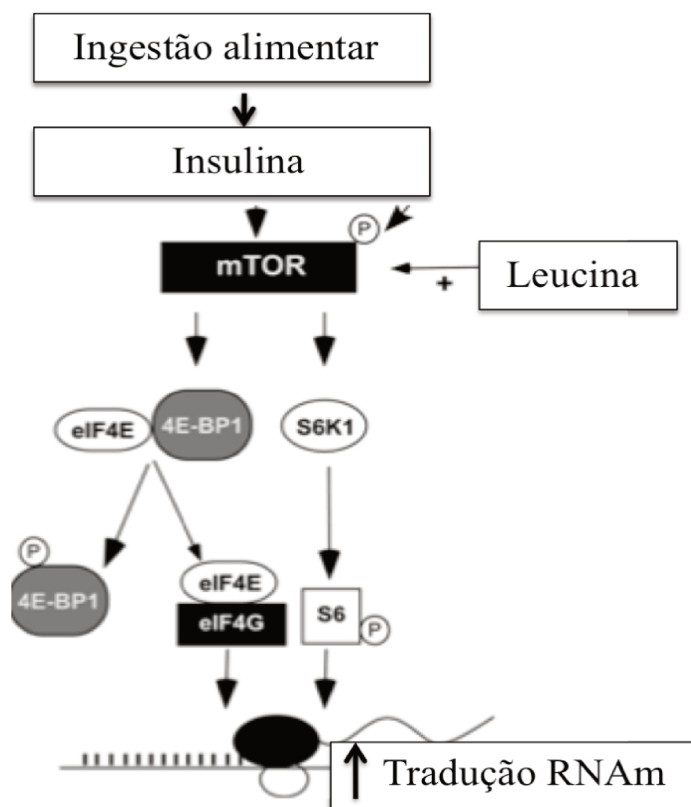


Figura 3. Via de sinalização da mTOR. **Legenda:** **mTOR**-*mammalian target of rapamycin*; **eIF**- fator de iniciação eucariótico; **4E-BP1**- proteína ligadora de fator de iniciação eucariótico 4E; **S6K1**- S6 quinase-1; **P**- fosforilação (Adaptado de VARY & LYNCH, 2004; VARY & LYNCH, 2007).

A 4EBP1 é uma proteína que se associa ao fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) quando não fosforilada, inibindo assim, a iniciação da tradução de proteínas. Por outro lado, quando a 4EBP1 é fosforilada, ela dissocia-se do eIF4E, permitindo que ocorra a tradução protéica (GINGRAS *et al.*, 2001; HAY, SONENBERG, 2004). Muitos estudos avaliam a expressão dessa proteína, mas essa isoforma não é encontrada em abundância em todos os tecidos. Por exemplo, a 4EBP2 é a isoforma mais abundante no cérebro (TSUKIYAMA-KOHARA *et al.*, 2001).

Quando a via da mTOR é estimulada por fatores proliferativos, como fatores de crescimento, mitógenos, hormônios de crescimento ou por nutrientes, ela fosforila a proteína 4EBP1, com isso, ocorre dissociação e liberação do eIF4E que se liga ao fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G), 4A (eIF4A) e 4B (eIF4B), formando o complexo eIF4F que é essencial para a tradução protéica (ROSENWALD *et al.*, 1995) (Figura 3).

A proteína quinase p70S6K atua no controle do crescimento celular aumentando a tradução de RNAm (MONTAGNE *et al.*, 1999; RADIMERSKI *et al.*, 2002). Esses RNAm ativam a maquinaria da tradução, incluindo proteínas ribossomais, fatores de elongação, proteínas ligadoras de cauda poli-A e outros importantes componentes para a maquinaria da síntese protéica (CASTEDO *et al.*, 2002; HAY & SONENBERG, 2004) (Figura 3).

A síntese protéica não acontece na ausência de suas unidades de ligação, que são os aminoácidos. A utilização da suplementação com aminoácidos têm sido utilizada com o objetivo de aumentar a síntese protéica (NORREN *et al.*, 2009).

1.3 Gravidez

A gravidez envolve várias adaptações fisiológicas maternas, como na ingestão alimentar e no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Essas adaptações são essenciais para sustentar o crescimento fetal até o final da gestação. Particularmente, o organismo materno apresenta mecanismos de conservação de nitrogênio corpóreo, mesmo associado ao aumento da

degradação protéica no músculo esquelético (MAYEL-AFSHAR, GRIMBLE, 1982), pois são essenciais para suprir a alta demanda de nitrogênio para o crescimento fetal, que irá ocorrer no terço final da gestação (CARBÓ *et al.*, 1996).

O desenvolvimento fetal caracteriza-se por sequência de crescimento de tecidos e órgãos, sequência de processos de diferenciação e maturação, que são determinados pela oferta materna e transferência placentária de substratos, que garantem o potencial de crescimento determinado pelo genoma (CALDERON *et al.*, 1999). No início da vida fetal, o principal determinante do crescimento é o genoma fetal, mas no final da gestação tornam-se importantes o ambiente intra-uterino, a nutrição materna e a influência hormonal (CUNNINGHAM *et al.*, 2001). A nutrição intra-uterina adequada é condição ímpar para o crescimento e desenvolvimento normais do feto, constituindo fator primordial para a determinação do peso ao nascer (GRUENWALD, 1966; LANG *et al.*, 2000). Por outro lado, sob condições adversas, como no caso de doenças que causam alteração metabólica materna, a nutrição intra-uterina fica prejudicada e inadequada, ocasionando deficiência no crescimento e desenvolvimento fetal. Com estas informações, em estudos prévios foram verificados que os efeitos tumorais sobre o crescimento fetal estavam relacionados predominantemente com a produção de citocinas pelas células neoplásicas e/ou hospedeiro, que atuavam em diferentes tecidos induzindo espoliação severa (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998; TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999, 2004; VENTRUCCI *et al.*, 2004, 2007).

Estudos com implante tumoral, de crescimento rápido, em ratas grávidas, o hepatoma de Yoshida AH-130, não mostraram importantes alterações no desenvolvimento da gravidez e no crescimento do feto (CARBÓ *et al.*, 1996). Já em estudos com o implante do carcinossarcoma de Walker 256, tumor de crescimento rápido e modelo de caquexia (EMERY, 1999), foram observados diminuição do balanço de nitrogênio e da massa corpórea de ratas prenhes (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Com relação ao tumor de Walker 256 em ratos, observou-se que a sua rápida proliferação deve-se ao uso da maioria dos aminoácidos séricos em processos de síntese e oxidação pelo tecido neoplásico (ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO, 1990). Devido à degradação de proteínas do hospedeiro, ocorre diminuição da massa muscular, que somada à anorexia, enfraquecimento e inúmeras outras alterações metabólicas levam esse hospedeiro à caquexia (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Experimentos sobre o transporte de aminoácidos pela placenta de ratos demonstraram a influência de proteínas relacionadas ao processo tumoral sobre o metabolismo fetal. Citocinas, entre elas o TNF- α , podem estar relacionadas à diminuição do número de transportadores de aminoácidos localizados na placenta, como os de L-alanina sódio-dependentes, podendo, assim, prejudicar o suprimento protéico fetal e, conseqüentemente, seu crescimento (SOARES *et al.*, 1987; MALANDRO *et al.*, 1994; CARBÓ *et al.*, 1995; JAFFE, 1998). Entretanto, concentrações significativas de TNF-alfa já foram dosadas no líquido amniótico de gravidez normal, sugerindo possível função regulatória dessa citocina na gravidez (CARBÓ *et al.*, 1995).

Baseando-se pelos dados da literatura, a gravidez associada à doença como o câncer coloca em risco tanto a mãe como o feto. Por outro lado, terapias co-adjuvantes à clínica para o tratamento do câncer vêm aumentando cada vez mais como o uso de manipulações dietéticas para melhorar o estado caquético do paciente com câncer. Assim, estudar os efeitos da suplementação nutricional com leucina durante a gravidez associada ao câncer trará novas perspectivas de terapia para esses dois pacientes.

2. Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Tivemos por principal objetivo avaliar o perfil de aminoácidos fetal e materno e atividade placentária, através de sinalizadores celulares para síntese protéica como mTOR em camundongas prenhes portadoras do adenocarcinoma de colon MAC16 e alimentadas com dieta rica em leucina.

2.2- Objetivos Específicos

- i. Avaliar os efeitos da associação entre câncer, gestação e suplementação nutricional em camundongas prenhes, analisando peso corpóreo e morfometricamente coração, fígado, baço, adrenal, placenta e músculo das mães portadoras ou não de tumor, inoculadas ou não com líquido ascítico ativo ou inativos, e suplementadas ou não com dieta rica em leucina;
- ii. Avaliar número de reabsorção fetal, além de peso fetal de mães portadoras ou não de tumor e compará-las àquelas inoculadas ou não com líquido ascítico (ativo ou inativado) e os efeitos da suplementação nutricional com leucina;
- iii. Avaliar bioquimicamente a quantidade de proteínas totais, albumina e de glicose nos soros materno e fetal;
- iv. Avaliar a composição corpórea fetal e comparar crescimento nas diversas situações experimentais (tumor, líquido ascítico e líquido ascítico inativado) e os efeitos da suplementação nutricional;
- v. Analisar a concentração de citocinas e hormônios séricos de fetos e de mães portadoras de tumor e comparar os efeitos da dieta rica em leucina sobre esses parâmetros;
- vi. Analisar o perfil de aminoácidos fetal e materno nas diferentes situações experimentais (tumor, líquido ascítico e líquido ascítico inativado) e verificar os efeitos modulatórios da suplementação nutricional com leucina.
- vii. Estudar proteínas sinalizadoras da atividade celular (mTOR, 4eBP1, S6K, PKA e PKC) em placentas de fêmeas prenhes portadoras ou não com tumor e os efeitos da dieta rica em leucina.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 64 camundongos da linhagem NMRI (60 a 70 dias; adultos), obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB, UNICAMP). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental no biotério do Laboratório de Nutrição e Câncer do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Unicamp, onde foram mantidos em gaiolas coletivas, com ciclo de luz de 12 h/12 h claro-escuro, com dietas e água *ad libitum*.

As fêmeas foram colocadas com machos adultos (60 a 70 dias) em gaiolas coletivas na proporção de 4 fêmeas para um macho, método de harém descrito por BAKER (1991), onde permaneceram por 4 dias, tendo em vista que o ciclo estral possui duração média de 4 a 5 dias (MATSUZAKI *et al.*, 2011).

A condução deste estudo, assim como a manipulação dos animais, foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia (CEEA-IB) da Unicamp, com número de protocolo 1925-1 (Anexo 1).

3.2 Dietas: Controle e Leucina

A dieta do grupo controle foi baseada na AIN-93G (REVEES *et al.*, 1993), que possui 18% de proteína e a dieta do grupo leucina, também baseada na AIN-93G, possui 18% de proteína suplementada com 3% do aminoácido leucina. Ambas as dietas foram preparadas em nosso laboratório (Anexo 2).

3.3 Protocolo experimental

As fêmeas prenhes, que foram acompanhadas e tiveram a sua prenhez comprovada através da porcentagem de ganho de peso (Tabela 2), foram distribuídas em 8 grupos experimentais, a saber:

Quatro grupos receberam dieta controle perfazendo os seguintes grupos: controle (C), implantado com tumor (MAC 16), inoculado com ascite (A) e inoculado com ascite inativado (AA).

Outros quatro grupos receberam dieta rica em leucina (L), perfazendo os seguintes grupos: controle (L), injetado com tumor (LMAC 16), inoculado com ascite (LA) e inoculado com ascite inativado (LAA) (Figura4).

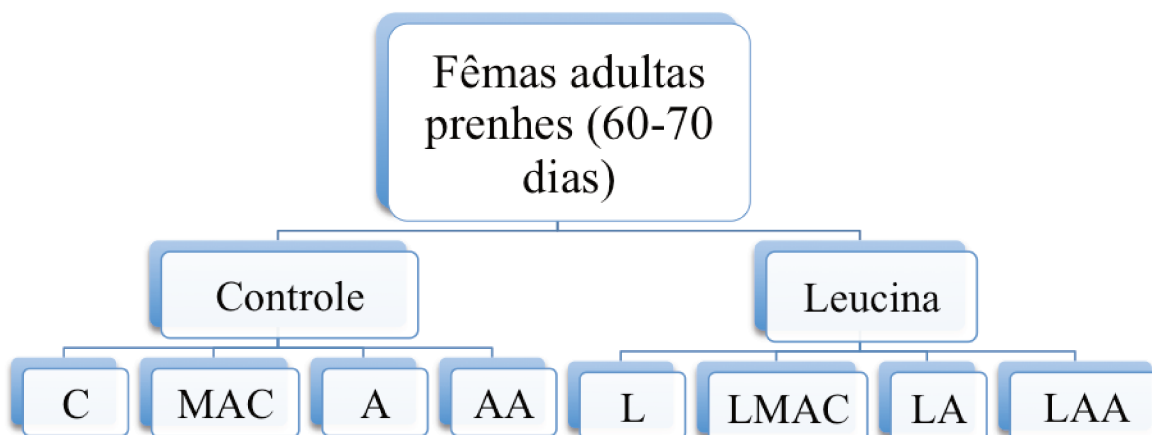


Figura 4. Distribuição dos grupos experimentais. Fêmeas prenhes adultas submetidas à dieta controle: **C**- controle grávidas; **MAC**- grávidas portadoras do tumor MAC16; **A**- grávidas inoculadas com líquido ascítico; **AA**- grávidas inoculadas com líquido ascítico inativo. Fêmeas adultas submetidas à dieta rica em leucina: **L**- controle grávidas; **LMAC**- grávidas portadoras do tumor MAC16; **LA**- grávidas inoculadas com líquido ascítico; **LAA**- grávidas inoculadas com líquido ascítico inativo).

Todas as fêmeas foram pesadas três vezes por semana e sacrificadas por deslocamento cervical no 19^o dia de prenhez, quando foram retirados os fetos para verificar a viabilidade dos mesmos, além do peso, da massa protéica e de gordura; também foram retirados soros fetais por decapitação e materno por punção cardíaca. O coração, fígado, baço, glândula adrenal, músculo e placenta das fêmeas e a glândula adrenal fetal foram retirados e mantidos em nitrogênio líquido, até serem devidamente armazenados no biofreezer (-80°C) para posterior análise.

3.4 Implante Tumoral e obtenção do líquido ascítico

O tumor MAC 16 (*murine colon adenocarcinoma*) foi originalmente doado pelo Prof. Michael J. Tisdale da Aston University, Inglaterra, o qual tem sido mantido no Laboratório de Nutrição e Câncer, por passagens consecutivas no intraperitônio (IP) e no subcutâneo (SC) de animais de manutenção e também criopreservado em nitrogênio líquido.

Suspensão de células tumorais, que corresponde a cerca de 1×10^7 células viáveis, foi inoculada no subcutâneo do flanco das fêmeas prenhas dos grupos MAC16 e LMAC16, no segundo dia de gestação. Essas células foram obtidas de animais doadores, implantados com tumor no peritônio, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES *et al.* (1998).

Para a obtenção do líquido ascítico a ser utilizado foi feita punção do líquido ascítico intraperitoneal de animal portador do MAC16; esse líquido foi centrifugado e separado dos componentes celulares, incluindo células neoplásicas; o líquido sobrenadante foi denominado líquido ascítico, que foi armazenado a -20°C para inoculação intraperitoneal nas fêmeas dos grupos A e LA, a partir do 7º dia de prenhez (que corresponde ao sexto dia de implante tumoral, quando esse já está palpável) até o décimo nono dia de prenhez.

O líquido ascítico inativado foi obtido após punção dos animais portadores de tumor, segundo descrição acima e aquecido por 80°C durante 10 minutos, rapidamente resfriado e guardado para a inoculação diária, no peritônio, a partir do 7º dia de prenhez até o décimo nono dia de gestação nas fêmeas dos grupos AA e LAA.

A manipulação dos animais com tumor seguiu as regras do comitê internacional de pesquisa em câncer (*United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, UKCCCR*, 1998) (VALE *et al.*, 2005).

3.5 Soro fetal e materno

Os soros fetal e materno foram analisados quanto ao perfil de aminoácidos, perfil de citocinas e hormônios séricos e análises bioquímicas como quantidade de proteínas totais, albumina e glicose, segundo metodologias descritas a seguir:

3.5.1 Análise do perfil de aminoácidos séricos

A composição dos aminoácidos livres foi avaliada em amostras de soro (20 μL) previamente desproteinizadas com ácido sulfossalicílico, na proporção de 1:1. Estas amostras foram secas no equipamento *speed-vac* e submetidas à reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC) (Figura 4). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag, Waters, 3,9x150mm) com comprimento de onda de 254nm. Para realizar a quantificação da

amostra, a área de cada pico de aminoácido foi analisada em equipamento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa, tendo como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida, considerando que o padrão foi derivado nas mesmas condições, e ao mesmo tempo, que as amostras (Figura 5) (BIDLINGMEYER *et al.*, 1984)

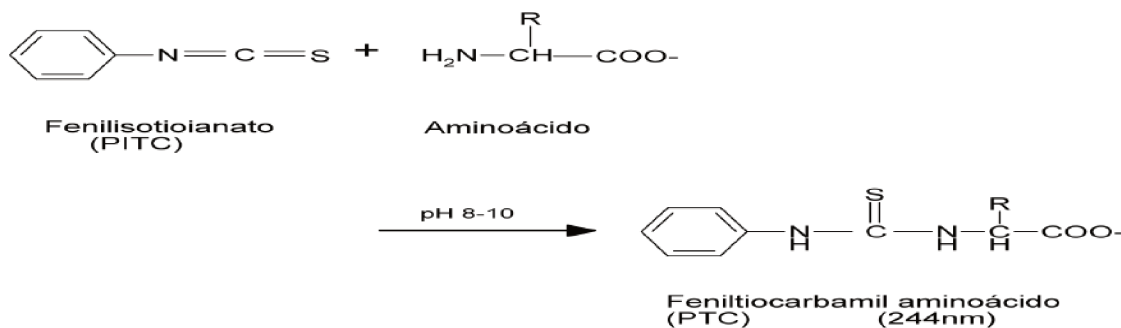


Figura 5. Reação de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC)

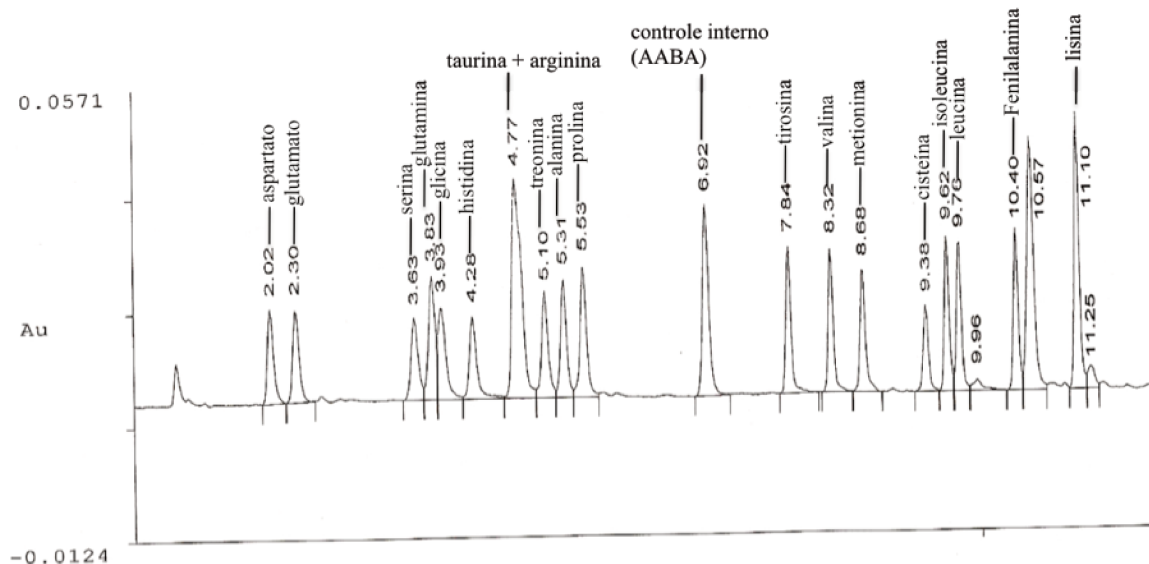


Figura 6. Perfil de aminoácidos do padrão com concentração conhecida, com a área de seus picos. Análise através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa (BIDLINGMEYER *et al.*, 1984; COHEN & TRAVIS, 1984).

3.5.1 a Derivação

As amostras foram alcalinizadas com 20 μ L de mistura de metanol:água:triethylamina (TEA) na proporção de 2:2:1 (metanol, Pierce, grau cromatográfico; TEA; Pierce, grau sequencial e água Milli-Q), agitado e seco por 15 minutos à 50°C, em concentrador rotatório *speed-vac*.

Logo após, foi adicionado a cada amostra 20 μ L do reagente de derivação, metanol: água: TEA: PITC na proporção de 7:1:1:1, e após agitação a amostra permaneceu por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este período, o excesso do reagente foi removido em concentrador rotatório *speed-vac* por uma hora à temperatura ambiente (etapa crítica, pois remove o material desconhecido da amostra que absorve no UV, interferindo na detecção dos PTC-aa).

3.5.1 b Separação dos PTC-aa

A amostra e o padrão, após derivados e secos, foram ressuspensos em 250 μ L e 500 μ L, respectivamente, de tampão de amostra: acetato de sódio (NaAc) 0,14M (Pierce) com 0,06% de TEA (v/v), pH 7,5, contendo 5% de acetonitrila (AcN) (v/v), e 20 μ L foram injetados na coluna. O padrão de aminoácidos possui 100pmol de cada aminoácido em 20 μ L aplicado.

Os solventes utilizados para a separação dos aminoácidos foram: solvente A- acetato de sódio (NaAc) 0,14M com 0,06% de TEA, pH 5,7 (filtrado em membrana 0,45 μ m) e solvente B- Acetonitrila (AcN) e água na proporção de 60:40 (v/v). Os aminoácidos foram separados segundo o protocolo de separação desenvolvido por BIDLINGMEYER *et al* (1984). Utilizou-se para este tipo de separação coluna C18 Pico-Tag Waters com dimensões de 3,9x150mm. A cromatografia foi desenvolvida à temperatura constante de 38,0 \pm 0,1°C, em equipamento CM4000 da *Laboratory Data Control* (Milton Roy Co.), com sistema de bombas binárias; espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 254nm e célula de fluxo contínuo de 10 μ L. Os dados foram coletados em computador com o *software ThermoChrom III da Thermo Separation Products*. Gradiente crescente de acetonitrila foi utilizado para esta separação (ATHERTON, 1989) (Tabela 1), com fluxo de 1,0mL.min⁻¹. A existência de tempo de equilíbrio de 10 minutos em 5% de solvente B logo após a limpeza da coluna com 100% do solvente B é crítico para a reprodutibilidade dos tempos de eluição dos PTC-aa.

Tabela 1. Gradiente de separação para a eluição dos PTC-aa. Análise realizada em equipamento de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) em coluna de fase reversa.

| Tempo (min.) | %B | Fluxo (mL.min ⁻¹) | Tempo (min.) | %B | Fluxo (mL.min ⁻¹) |
|--------------|----|-------------------------------|--------------|-----|-------------------------------|
| 0,0 | 10 | 1,0 | 10,0 | 54 | 1,0 |
| 2,2 | 15 | 1,0 | 11,5 | 100 | 1,0 |
| 2,5 | 17 | 1,0 | 12,0 | 100 | 1,0 |
| 3,0 | 21 | 1,0 | 12,3 | 100 | 1,5 |
| 5,5 | 26 | 1,0 | 17,0 | 100 | 1,0 |
| 6,0 | 35 | 1,0 | 17,5 | 10 | 1,0 |
| 6,5 | 36 | 1,0 | 27,5 | 10 | 1,0 |
| 8,0 | 42 | 1,0 | | | |

3.5.1 c Quantificação dos PTC-aa

O método utilizado apresenta coeficiente de variação entre duplicatas $\leq 10\%$ (critério de confiança do método). A curva dose-resposta do padrão apresenta relação linear entre a área do pico e a quantidade de aminoácidos derivados na faixa de 25 a 2500pmol de cada aminoácido aplicado na coluna (dados não mostrados).

3.5.2 Análise do perfil de citocinas e hormônios séricos

O perfil das citocinas, interleucinas 4 (IL-4), 6 (IL-6), 10 (IL-10), interferon gama (INF- α), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e leptina e o perfil dos hormônios, amilina, peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), glucagon e insulina foram dosados utilizando kits específicos para o equipamento Luminex 200TM (Luminex Corporation, Texas, USA), seguindo as orientações dos protocolos, Mouse Cytokine/Chemokine (MPXMCYTO-70K) e Rat Endocrine (RENDO-85K), respectivamente, fornecidos pelo fabricante (Linco/Milipore).

Este equipamento (Luminex®) utiliza sistema de fluorescência que reconhece o código de cores de microesferas (*beads*), que possuem dois corantes diferentes vermelho e infravermelho. Através da precisa concentração desses corantes, 100 conjuntos de *beads* com cores diferenciadas podem ser criados, sendo que cada conjunto liga-se a um anticorpo específico (Figura 7a). Cada *bead* possui um “endereço espectral” com base no conteúdo vermelho/infravermelho, essas *beads*

são revestidas com reagentes de captura, que neste caso são anticorpos. Depois que o analito de uma amostra é capturado por uma *bead*, o anticorpo de detecção é introduzido, essa mistura de reação é então incubada com *estreptavidina-phyco-eritrina*, que é a molécula repórter, que completará a reação na superfície de cada *bead*. Após incubação com essa molécula repórter, a placa é introduzida no equipamento para realização da leitura. As *beads* passam uma a uma, rapidamente através de um feixe de laser (vermelho) que excita os corantes internos marcando a coloração das *beads*, e após classificação das *beads*, um segundo laser (verde) excita a estreptavidina, que é responsável por emitir o corante fluorescente, o software, então reporta os resultados em tempo real, liberando assim dados quantitativos dos analitos de interesse (Figura 7b).

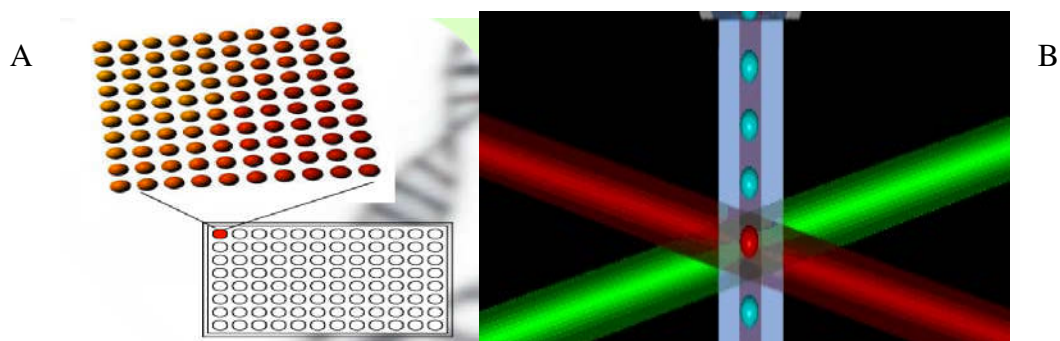


Figura 7. A-placa multi-poços, representado em aumento a capacidade de múltiplos *beads* em um único poço. B- Representação da passagem das *beads*, individualmente, pelos feixes de lasers vermelho e verde.

3.5.3 Análises bioquímicas

3.5.3 a Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada usando-se 2 μ L de soro e 200 μ L do reativo de proteínas totais (método Biureto), que foram incubados durante 15 minutos à 37°C. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (540nm), segundo o método colorimétrico de DOUMAS (1971).

3.5.3 b Albumina

A concentração de albumina foi determinada usando-se 2 μ L de soro e 200 μ L do reativo de verde bromocresol. A reação foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro (620nm), seguindo método colorimétrico descrito por DOUMAS (1971).

3.5.3 c Glicose

A concentração sérica de glicose foi determinada através da utilização de 5 μ L de soro e 200 μ L de reativo glicose-oxidase, incubadas por 15 minutos à 37°C. Após este tempo, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro (540nm), seguindo método colorimétrico de TRINDER *et al* (1969).

3.6 Atividade placentária

A atividade placentária foi mensurada através da técnica de Western Blotting, que permite analisar a expressão de proteínas.

O tecido placentário foi homogenizado em tampão de homogenização contendo inibidores de proteases (10mM EDTA, 100 mM Trisma base, 10 mM Pirofosfato de sódio, 100 mM Fluoreto de sódio, 1mM Ortovanadato de sódio, 2mM fluoreto de fenilmetanosulfonil e 0,1mg/mL Aprotinina), utilizando o homogenizador Polytron Omni (USA) a 15.000 rpm. Todo o processo foi realizado a 4 °C.

O homogenizado foi centrifugado a 12.000 rpm por dez minutos a 4 °C. A fração sobrenadante foi aliquoteada em novos microtubos e armazenadas no biofreezer a -80°C até serem utilizadas, para determinação do teor de proteína total (BRADFORD, 1976) e expressão de proteínas pertencentes à via de sinalização celular de síntese protéica – mTOR total (mTOR), p70S6K, 4EBP1, PKA e PKC.

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, como descrito por JOHANSSON *et al.* (2000). Oitenta microgramas de proteína foram aplicados em gel de SDS-poliacrilamida de 8% (mTOR) e 12% (p70S6K, 4E-BP1, PKA e PKC), seguida de transferência em membranas de nitrocelulose (Millipore, USA), coradas com Ponceau para verificação da transferência de todas as proteínas. As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween contendo 5% de leite desnatado

por 3 horas. Para detecção das proteínas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal, mTOR # 2972S, p70S6K #9202, 4E-BP1 #9452, PKA #4782 e PKC #2056 (Cell Signaling Technology®) na diluição 1:1000 overnight a 4°C. O anticorpo secundário anti-rabbit (Cell Signaling Technology®) foi diluído 1:10000 e incubado com a membrana por aproximadamente 1 hora. A reação de quimioluminescência foi determinada utilizando-se reagente *Supersignal®west Pico#KG135749* (Thermo Scientific, USA) e a revelação das membranas foi feita com o auxílio do programa *Gene snap from Syngene* e para avaliação da densitometria das bandas protéicas foi utilizado o software *Gene tools from Syngene*.

3.7 Massa protéica e de gordura fetal

Os fetos foram desidratados para determinação do teor de água corpórea, a partir de peso constante, em seguida foram desengordurados, a partir do método de extração de gordura com éter de petróleo, e por diferença de peso entre os pesos secos e sem gordura determinou-se a massa de gordura fetal.

3.8 Análise Estatística

Foram utilizados métodos estatísticos para cálculo das médias e erro padrão das médias e comparação dos múltiplos grupos por ANOVA *one-way*, e para determinação de variação entre os diferentes grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5% (GAD & WEIL, 1994). Além disso, utilizamos teste *t-Student* para determinar se houve diferença estatística entre os grupos tratados com leucina quando comparados aos respectivos grupos não tratados.

4- Resultados e Discussão

Foram analisados o total de 64 camundongas grávidas e seus respectivos fetos, divididos entre os 8 grupos experimentais: C, MAC, A, AA, L, LMAC, LA e LAA (cada grupo continha número mínimo de 8 animais).

A evolução da prenhez foi acompanhada através da porcentagem de ganho de peso por dia de prenhez (Tabela 2), uma vez que após contato das fêmeas com o macho, seguindo o método de harém (BAKER, 1991) não era possível a determinação precisa do cruzamento (verificado pela existência do *plug* vaginal, que na maioria das vezes era inexistente ou quando existente não indicava 100% de prenhez). Assim a porcentagem de cruzava foi bastante reduzida, dificultando a obtenção do número mínimo de animais por grupo. Então, para confirmação da prenhez ou ausência dela, acompanhamos o ganho de peso dessas fêmeas e somente as prenhas foram utilizadas e sacrificadas no final do experimento.

Na tentativa de obter maior número de fêmeas prenhas, realizamos testes para indução da ovulação através do citrato de clomifeno combinado com a administração de hCG (gonadotrofina coriônica humana) (CHAUBE *et al.*, 2006). Porém, este teste foi descartado, pois a indução da ovulação exógena através do citrato de clomifeno e hCG causou reabsorção fetal total. Desse modo, a utilização da porcentagem de ganho de peso proporcionou melhores condições para obtenção de camundongas prenhas e também determinar o momento do sacrifício dessas fêmeas.

Tabela 2. Porcentagem de ganho de peso de fêmeas de camundongos por dia de prenhez.

| Dias de prenhez | Ganho de peso(%) |
|------------------------|-------------------------|
| 4 | 3,7 |
| 6 | 5,9 |
| 8 | 10,0 |
| 10 | 17,5 |
| 12 | 28,7 |
| 14 | 42,9 |
| 16 | 48,3 |
| 18 | 63,8 |

4.1 Perfil de aminoácidos séricos

Muitos estudos mostram que alterações na concentração de aminoácidos podem ser causadas por doenças como por exemplo, insuficiência hepática (SOETERS & FISCHER, 1976; HOLM *et al.*, 1999), insuficiência renal (HONG *et al.*, 1998), diabetes (SOLTESZ *et al.*, 1978) e, como objeto de estudo no presente trabalho, câncer (WATANABE *et al.*, 1982; WEINLICH *et al.*, 2007).

Os aminoácidos desempenham papel crucial, tanto como unidades formadoras de proteínas, como moléculas sinalizadoras. Portanto, o perfil de aminoácidos plasmáticos difere dependendo do estado fisiológico de um organismo (FELIG, 1975; NOGUCHI *et al.*, 2006; NOGUCHI *et al.*, 2008; KIMURA *et al.*, 2009; MAEDA *et al.*, 2010; MIYAJI *et al.*, 2010).

O metabolismo em células neoplásicas é significativamente alterado quando comparado ao de células normais, e essa mudança reflete no perfil de aminoácidos plasmáticos de pacientes com vários tipos de câncer (MAEDA *et al.*, 2010). Pacientes com câncer de pulmão apresentaram redução significativa nos aminoácidos gliconeogênicos e aumento significativo no triptofano livre (CASCINO *et al.*, 1995).

O tumor metaboliza vários aminoácidos, preferencialmente a glutamina, acarretando desequilíbrio da concentração plasmática dos mesmos (LEVIN *et al.*, 1983; SAUER, DAUCHY, 1990). O crescimento fetal envolve aumento na demanda de proteínas, demonstrando o papel fundamental que os aminoácidos desempenham nessa etapa (GIEL, 1984). Com relação ao tumor de Walker 256 em ratos, observou-se que a sua rápida proliferação deve-se ao uso da maioria dos aminoácidos séricos, principalmente glutamina e alanina, em processos de síntese e oxidação pelo tecido neoplásico (ARGILÉS, LÓPEZ-SORIANO, 1990). Devido a essa degradação de proteínas do hospedeiro, ocorre diminuição da massa muscular, que somada à anorexia e inúmeras outras alterações metabólicas leva à caquexia (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998; EVANS *et al.*, 2008).

As células tumorais são as maiores consumidoras de glutamina, tanto para síntese quanto para oxidação protéica (RIVERA, 1988) e, portanto, resulta em depleção de glutamina (CHEN, 1991), que culmina em diminuição da resposta imune e integridade da mucosa intestinal (SOUBA, 1993).

Vários estudos revelam que a gravidez está associada com a hip aminoacidemia, redução das concentrações de aminoácidos circulantes, que é mantida por toda a gestação (FELIG *et al.*,

1972; KALHAN *et al.*, 1982; METZGER *et al.*, 1977; SCHOENGOLD *et al.*, 1978) e essa condição tem sido relacionada com os hormônios relacionados com a gravidez (KALHAN, 2000).

A competição nutricional entre feto e tumor pode causar efeitos deletérios ao curso normal da gravidez, porém em alguns tipos de tumor a variação hormonal da gestação pode produzir efeito contrário para o crescimento tumoral (RUSSO *et al.*, 1991; GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Desse modo, no presente estudo observamos que o perfil de aminoácidos do soro materno apresentou diferenças quanto aos grupos suplementado com leucina (L) em relação ao controle (C). Houve aumento significativo dos seguintes aminoácidos no grupo L: glutamina, taurina, treonina, alanina, leucina e lisina (Figura 8). As diferenças nas concentrações de glutamina, prolina e leucina no soro materno foram significativamente diferentes no grupo L em relação a C ($p < 0,05$) (Figura 10).

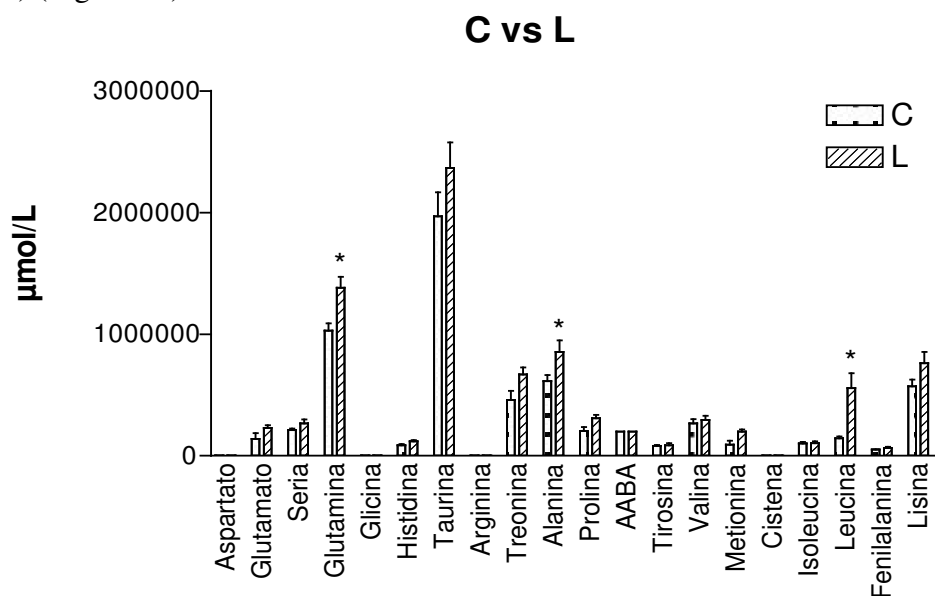


Figura 8. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos maternos. Comparação da concentração de aminoácidos entre os grupos controle (C) e controle suplementado com leucina (L). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA one-way e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com * índice de significância para 5%.

Em contrapartida, nos grupos experimentais com tumor ou inoculados com líquido ascítico, a análise do perfil de aminoácidos materno mostrou que a concentração de determinados aminoácidos variou, principalmente, para os aminoácidos chave na presença de neoplasia, glutamina, alanina, prolina e leucina (Figuras 9 e 10).

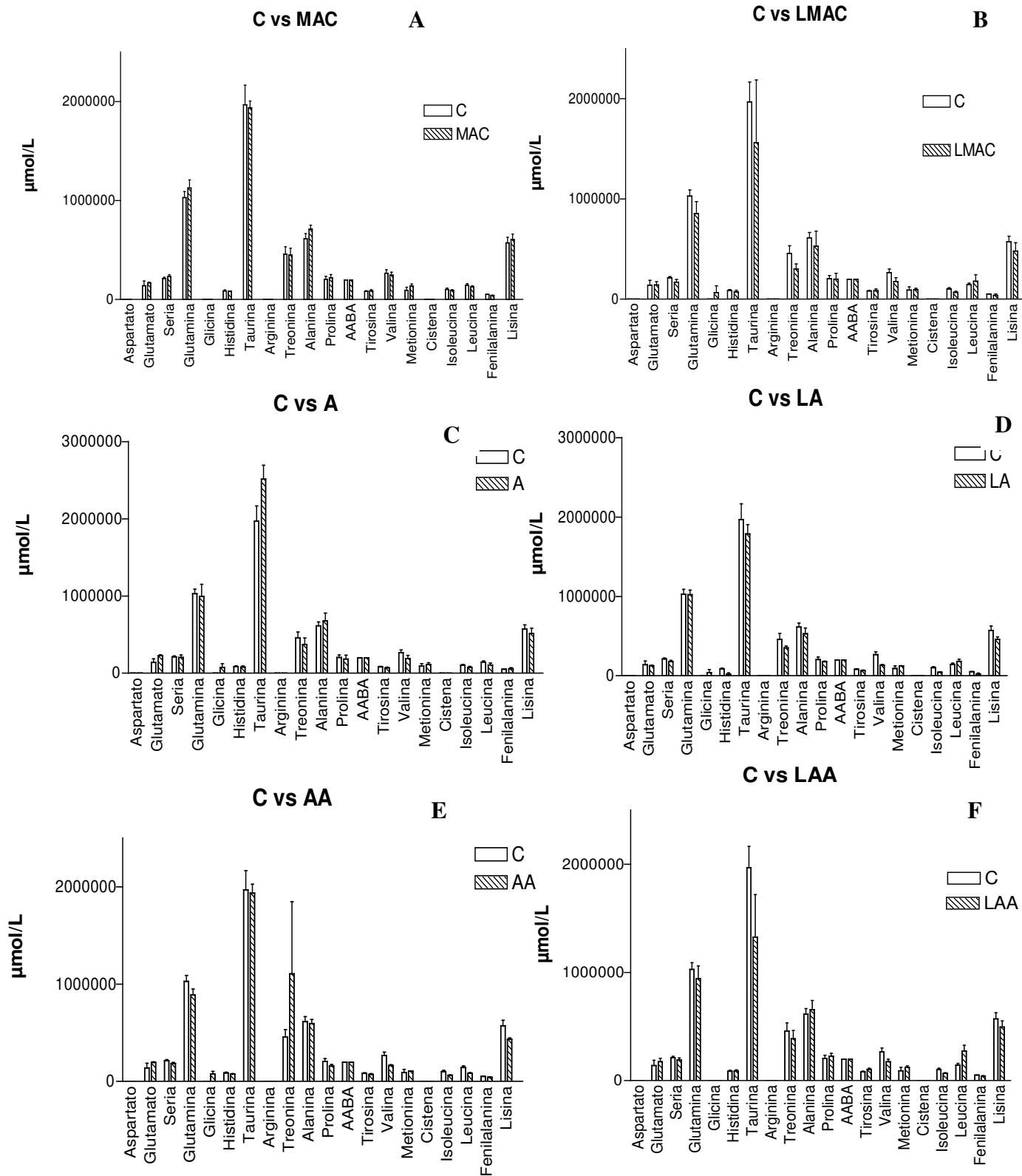


Figura 9. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos maternos. Comparação da concentração de aminoácidos entre o grupo controle (C) vs grupos: **A-** portador do tumor MAC16 (MAC); **B-** portador do tumor MAC 16 e suplementado com leucina (LMAC); **C-** inoculado com líquido ascítico (A); **D-** inoculado com líquido ascítico e suplementado com leucina (LA); **E-** inoculado com líquido ascítico inativo (AA) ; **F-** inoculado com líquido ascítico inativo e suplementado com leucina (LAA). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

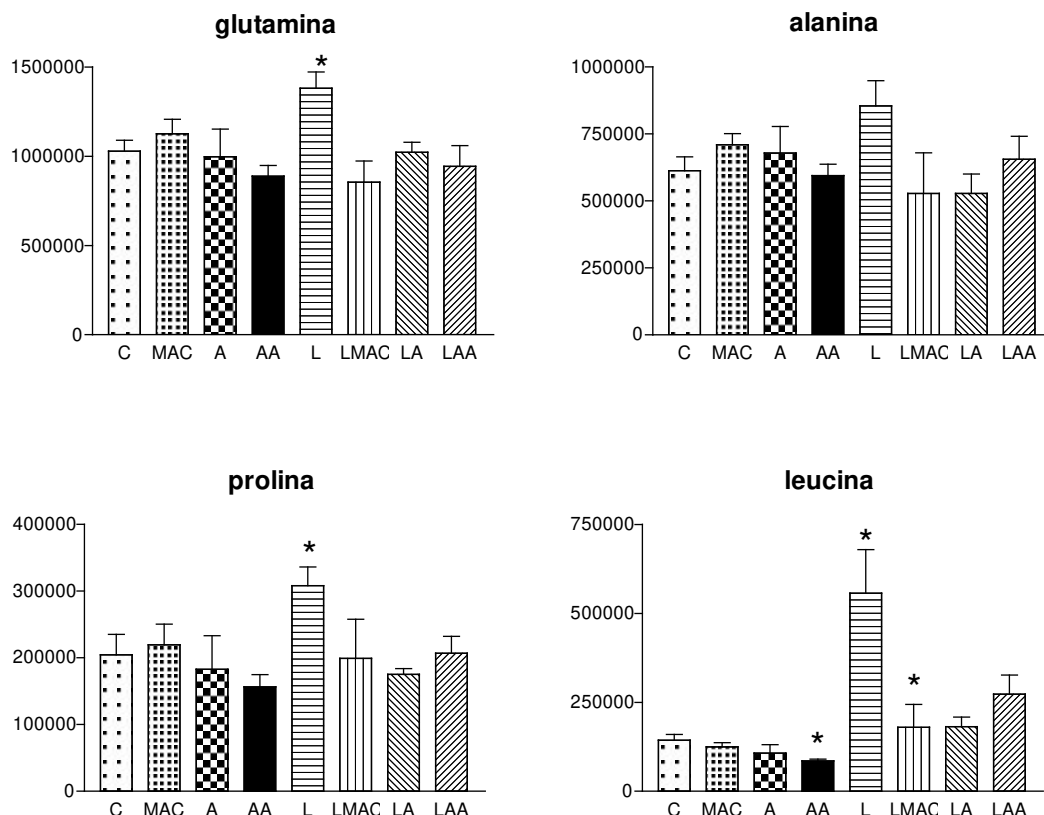


Figura 10. Perfil dos aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) glutamina, alanina, prolina e leucina no soro materno (* $P < 0,05$, em relação ao grupo C). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5% e teste *t-Student* para verificar diferença entre os grupos tratados com leucina quando comparados aos respectivos grupos não tratados.

Na literatura, verifica-se que a evolução tumoral promove espoliação da musculatura esquelética aumentando a concentração da alanina e glutamina; coerentemente nossos resultados mostraram que houve aumento da concentração de glutamina e alanina, no grupo MAC (Figura 10); porém no grupo com tumor suplementado com leucina (LMAC) houve redução da concentração de glutamina e alanina sérica. Os aminoácidos prolina e leucina também tiveram manutenção das suas concentrações nos animais inoculados com líquido ascítico, nos grupos suplementados ou não com leucina (Figura 10). Embora não significativo, esses dados sugerem que o ligeiro aumento dos aminoácidos que participam do processo de gliconeogênese (glutamina e alanina) indicam a ocorrência do processo de espoliação nas fêmeas MAC, e que a suplementação nutricional com leucina possivelmente modulou esse processo, condizente com os

dados da literatura que mostram que a leucina proporciona modulação da degradação protéica muscular.

Por outro lado, quando analisamos o perfil de aminoácidos nos fetos dos diferentes grupos, verificou-se que os grupos controles (L e C), proveniente de mães não portadoras de tumor, foi modificado pela condição de suplementação nutricional. Assim, verificou-se que a suplementação nutricional com leucina causou aumento significativo desse aminoácido no soro fetal e também redução, não significativa, de glutamina no grupo L (Figuras 11 e 13), mantendo a concentração dos demais aminoácidos similar entre os dois grupos C e L (Figura 11 e 13).

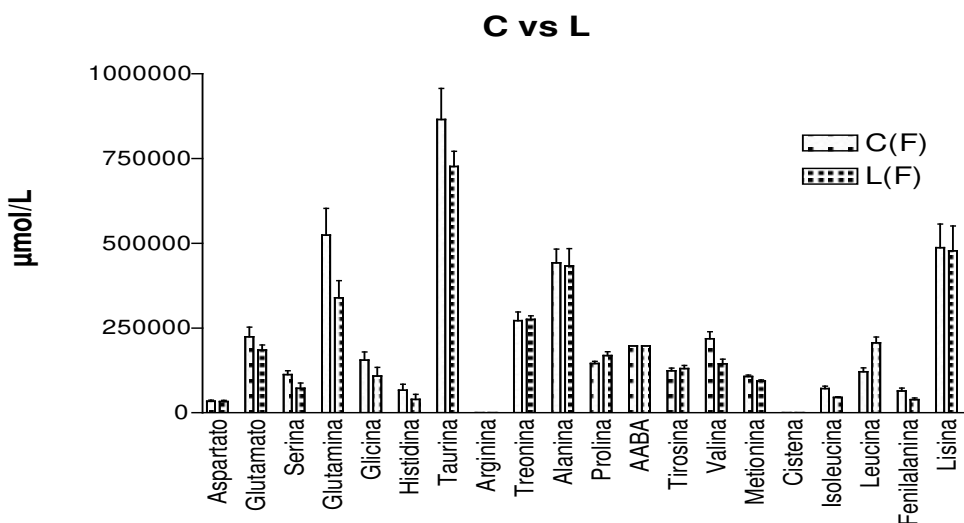


Figura 11. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos fetal. Comparação da concentração de aminoácidos entre os grupos controle (C) e controle suplementado com leucina (L). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Paralelamente, os resultados da análise do perfil sérico de aminoácidos nos fetos de mães portadoras ou não de tumor MAC e também injetadas ou não com líquido ascítico também apresentaram variações de alguns aminoácidos relacionados à situação de câncer. Quando as mães eram portadoras de tumor ou inoculadas com líquido ascítico, verificou-se que, os fetos desses grupos em relação aos do grupo C, apresentaram variação de alguns aminoácidos como: aumento de alanina e prolina sérica nos grupos MAC, A e AA (Figura 12 A, C e E e Figura 13). A suplementação nutricional foi importante e efetiva em aumentar a concentração de leucina

sérica em todos os grupos (LMAC, LA e LAA) (Figura 12 B, D e F e Figura 13); também os aminoácidos alanina e prolina apresentaram aumento significativo da concentração sérica; houve aumento da concentração de aspartato apenas nos fetos do grupo LMAC (Figura 13).

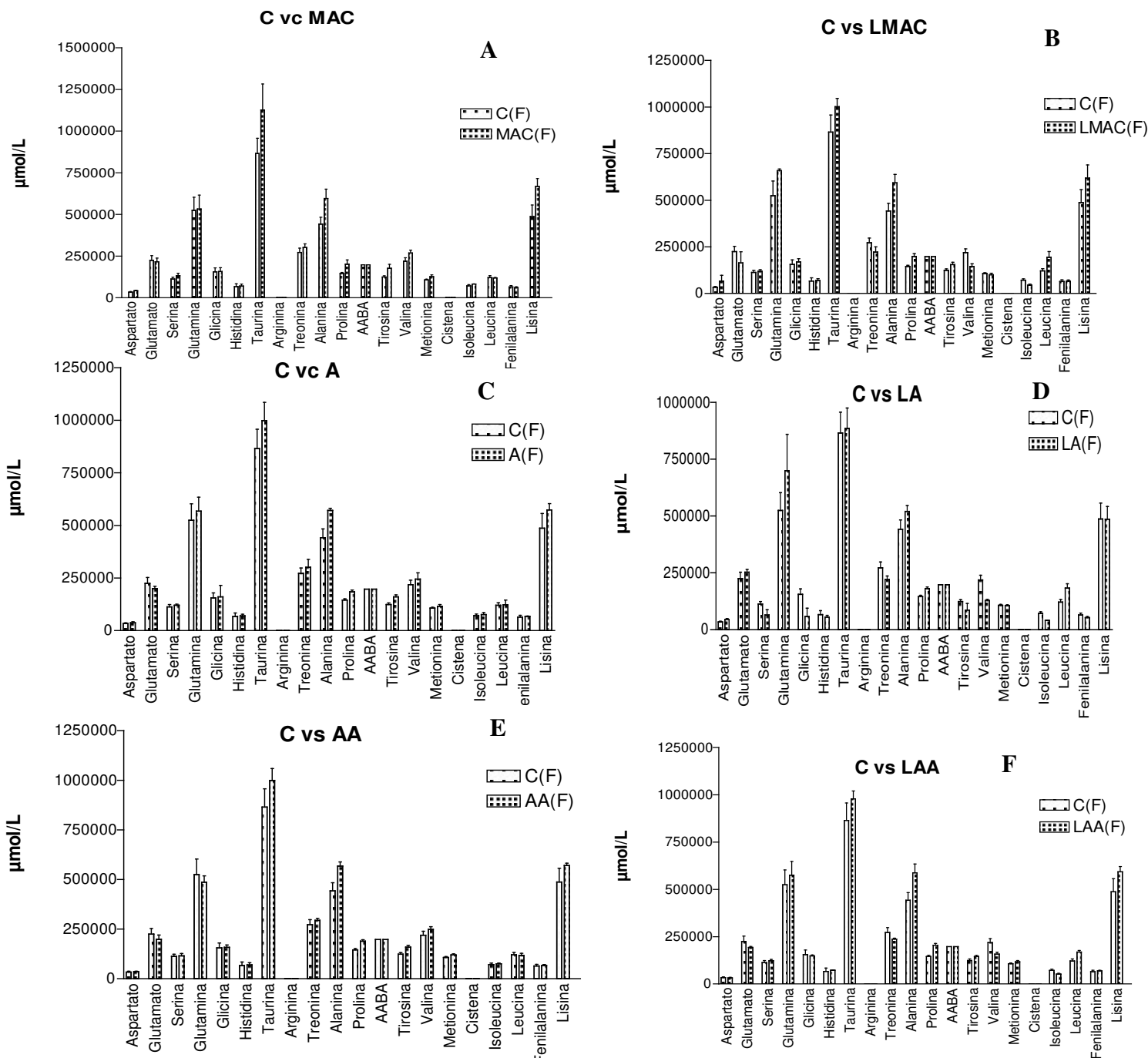


Figura 12. Análise do perfil de aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) séricos fetal. Comparação da concentração de aminoácidos entre o grupo controle (C) vs grupos: **A-** portador do tumor MAC16 (MAC); **B-** portador do tumor MAC 16 e suplementado com leucina (LMAC); **C-** inoculado com líquido ascítico (A); **D-** inoculado com líquido ascítico e suplementado com leucina (LA); **E-** inoculado com líquido ascítico inativo (AA); **F-** inoculado com líquido ascítico inativo e suplementado com leucina (LAA). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

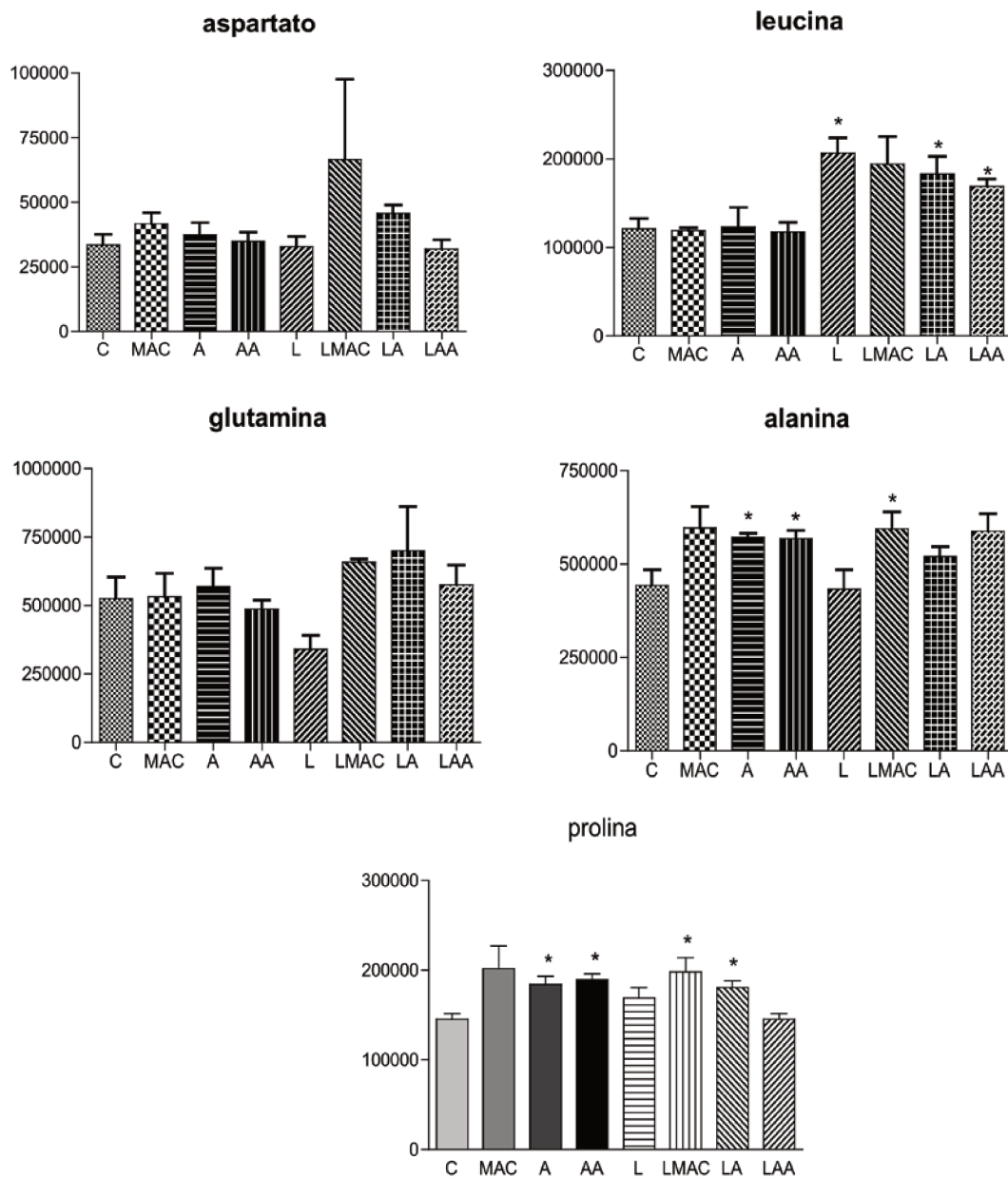


Figura 13. Concentração sérica dos aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) aspartato, leucina, glutamina, alanina e prolina no soro fetal (* $P < 0,05$ em relação ao grupo C). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5% e teste *t-Student* para verificar diferença entre os grupos tratados com leucina quando comparados aos respectivos grupos não tratados.

Desse modo, verificou-se que a presença do adenocarcinoma de colon no organismo materno causou efeitos bastante importantes na mãe, que foi modulado pela suplementação nutricional.

Ao avaliarmos os fetos, verificou-se que independente do esquema nutricional todos os fetos de mães portadoras de tumor apresentaram elevada concentração de alanina, principal aminoácido gliconeogênico, sugerindo intenso processo de espoliação fetal e/ou aumento do transporte desse aminoácido via placentária, mostrando que, nessas condições experimentais a suplementação com leucina não foi suficiente para prevenir esse quadro de espoliação causado pelo crescimento tumoral. Esses dados direcionam para futuras investigações quanto aos mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo protéico fetal. Além disso, os fetos provenientes de mães que receberam a inoculação do líquido ascítico, também, apresentaram importantes alterações quanto aos aminoácidos relacionados a gliconeogênese; esses dados indicam a necessidade de futuras investigações sobre a participação de citocinas produzidas pelo tumor e/ou hospedeiro sobre o desenvolvimento fetal.

4.2 Análise do perfil de citocinas séricas

O crescimento tumoral, assim como, traumas e injúrias induzem a superprodução de citocinas, e como avaliado nesse estudo também nas fêmeas durante a gestação.

Observamos, em nossos resultados, que em relação às citocinas pró-inflamatórias, apesar da interleucina IL-1 β ter concentrações plasmáticas elevadas nos hospedeiros com câncer, nas nossas condições experimentais, os níveis séricos dessa citocina IL-1 β não foram superiores nos grupos portadores de tumor, o perfil encontrado nesses animais inoculados com tumor (MAC e LMAC) foi de redução, independente do esquema nutricional a que foram submetidas essas fêmeas (Figura 14A). Por outro lado, a citocina IL-6 apresentou concentrações séricas maternas superiores nos grupos AA e LMAC, sendo que nos demais grupos a concentração dessa citocina foi semelhante ao grupo controle (Figura 14 B). O TNF α também apresentou suas concentrações séricas aumentadas nos grupos portadores de tumor MAC e LMAC, entretanto os demais grupos de mães alimentadas ou não com dieta rica em leucina (L) e inoculados ou não com líquido ascítico apresentaram valores séricos dessa citocina semelhante ao grupo C (Figura 14 C). O interferon gama (INF- γ) mostrou discreto decréscimo nos grupos portadores de tumor e também inoculados com líquido ascítico (Figura 14 D).

Analisando-se agora duas citocinas anti-inflamatórias verificou-se que a IL-4 foi maior nos grupos com tumor MAC (Figura 14 E); por outro lado a IL-10 reduziu nos grupos MAC, A e

L em relação ao grupo C; porém nos demais grupos a concentração dessa citocina foi semelhante ao grupo C (Figura 14F).

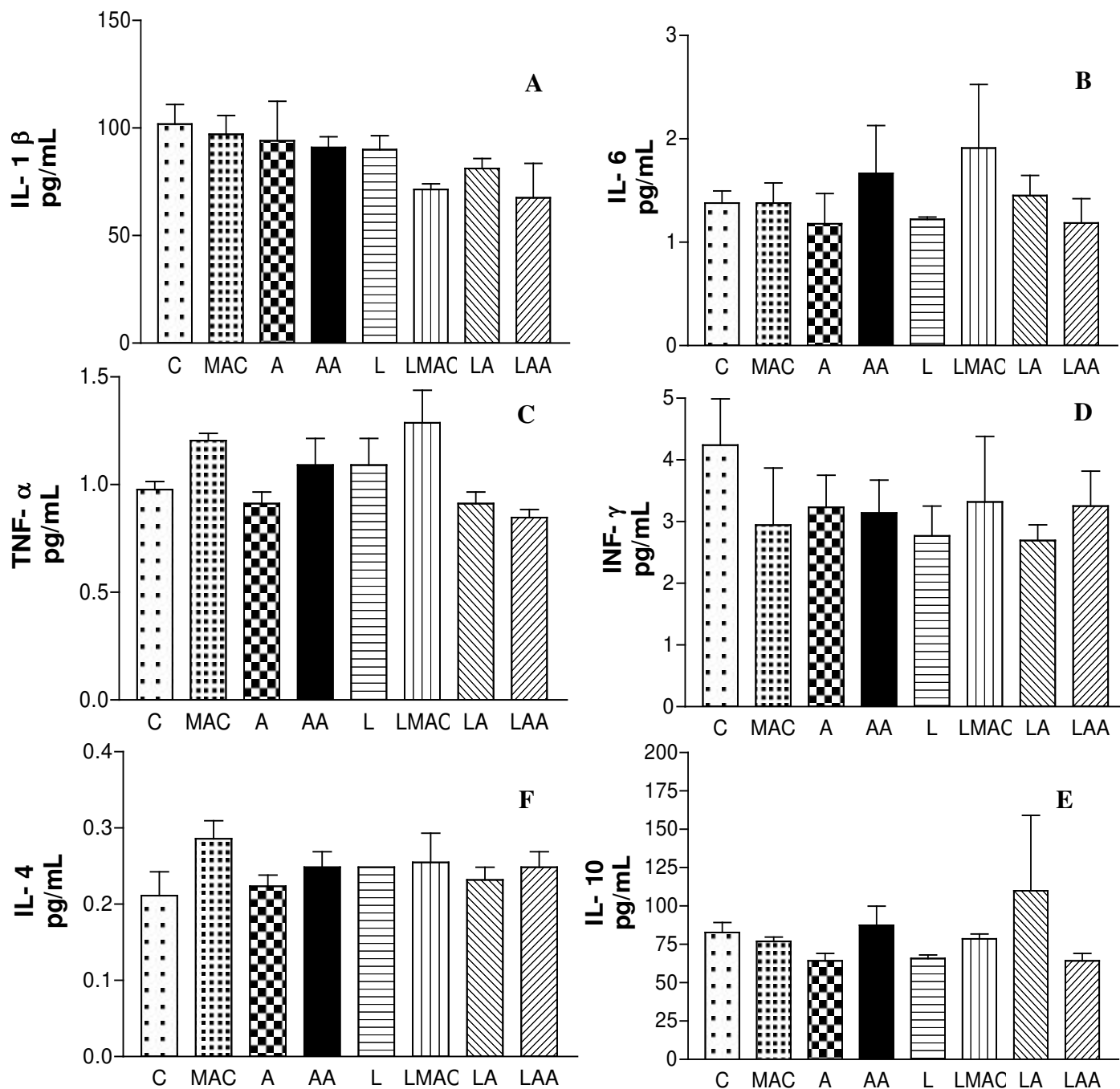


Figura 14. Análise da concentração (pg/mL) das citocinas séricas maternas pró-inflamatórias (A- IL-1 β ; B- IL-6; C- TNF- α ; D- INF- γ) e anti-inflamatórias (E- IL-4 e F- IL-10) com auxílio do equipamento Luminex 200TM (Luminex Corporation, Texas, USA). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Esses dados sugerem que na presença de tumor há aumento de citocinas pró-inflamatórias corroborando com a literatura relativa às alterações decorrentes da caquexia, onde mostra o importante quadro inflamatório crônico instalado durante a caquexia. O tumor MAC16 é considerado bastante agressivo quanto aos seus efeitos e causa caquexia, principalmente pela liberação de citocinas como fator de indução de proteólise (PIF) e fator de mobilização de lipídeos (LMF) sempre associados à elevação do TNF α e IL-6 (BECK *et al.*, 1991; KHAL *et al.*, 2005). Em humanos, aumento na concentração plasmática do TNF- α na metade do trimestre gestacional está associado com crescimento fetal intra-uterino prejudicado (HEYHORNE, 1992). O TNF- α pode também estar relacionado à diminuição do número de transportadores de aminoácidos localizados na placenta, como o transportador L-alanina sódio-dependente, podendo, assim, prejudicar o suprimento protéico fetal e, conseqüentemente, seu crescimento (SOARES *et al.*, 1987; MALANDRO *et al.*, 1994; CARBÓ *et al.*, 1995; JAFFE, 1998). Nesse mesmo sentido, SILEN *et al* (1989) demonstraram que a administração de TNF α e IL-1 causa hemorragia e aborto em experimentos com animais. Entretanto, concentrações significativas de TNF- α já foram dosadas no líquido amniótico de gravidez normal, sugerindo que essa citocina também possa ter função regulatória na gravidez (CARBÓ *et al.*, 1995).

Em estudos prévios verificamos que os efeitos tumorais sobre o crescimento fetal estão relacionados predominantemente com a produção de citocinas pelas células neoplásicas e/ou hospedeiro, que atuam em diferentes tecidos induzindo espoliação severa (GOMES-MARCONDES *et al*, 1998; TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999; 2004; VENTRUCCI *et al*, 2004; 2007).

A análise das citocinas séricas nos fetos provenientes dos diferentes grupos experimentais mostrou que também houve variações das citocinas tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias, sugerindo efeitos indiretos do crescimento tumoral sobre o crescimento fetal.

No soro fetal, a concentração de IL-1 β foi reduzida nos grupos MAC e A e no grupo suplementado com leucina (L) (Figura 15A), os demais grupos apresentaram concentrações dessa citocina semelhante ao grupo C. A interleucina pró-inflamatória IL-6 aumentou em todos os fetos de ambos os grupos portadores de tumor (MAC e LMAC) e também no grupo injetado diariamente com líquido ascítico (A) (Figura 15 B). Concentrações de TNF- α encontrados nos soros fetais apresentou ligeiro aumento nos grupos portadores do adenocarcinoma MAC16 e foi

elevado no grupo LMAC; os demais grupos independente do esquema nutricional ou inoculação do liquido ascítico apresentaram valores dessa citocina semelhante ao grupo C (Figura 15 C).

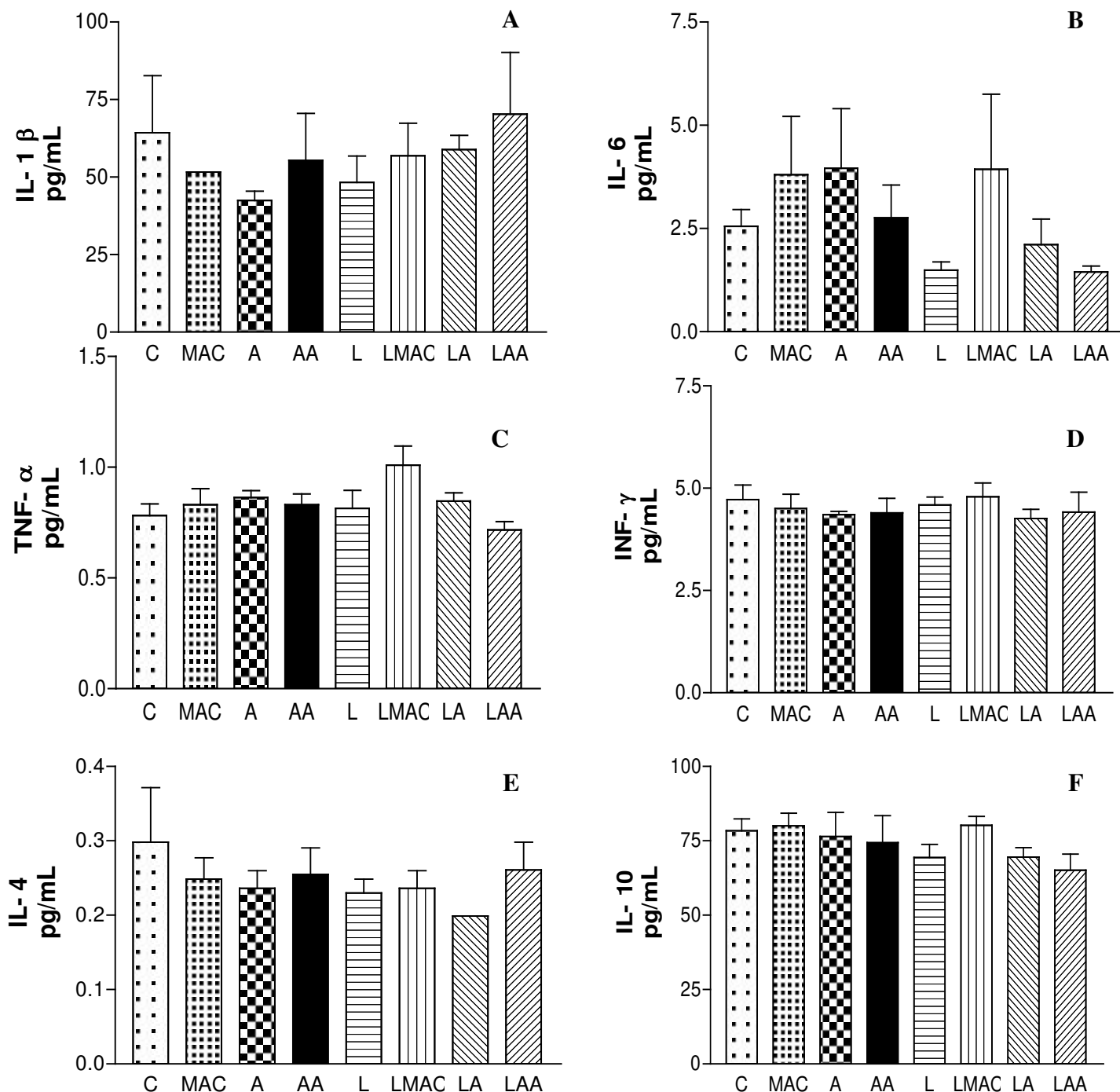


Figura 15. Análise da concentração (pg/mL) das citocinas séricas fetal pró-inflamatórias (A- IL-1β; B- IL-6; C- TNF-α; D- INF-γ) e anti-inflamatórias (E- IL-4 e F- IL-10) com auxílio do equipamento Luminex 200TM (Luminex Corporation, Texas, USA). Resultados expressos em média ± erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Valores reduzidos de $\text{INF}\gamma$ foram observados nos soro dos fetos dos grupos MAC, A e AA, os demais grupos apresentaram valores similares ao grupo C (Figura 15D). Em contrapartidas, citocinas anti-inflamatórias analisadas no soro fetal mostraram que a concentração sérica da citocina IL-4 foi reduzida nos todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle (Figura 15E); quanto a IL-10, verificou-se valores reduzidos apenas no grupo L em relação ao grupo C (Figura 15F).

As citocinas inflamatórias relacionadas com doenças degenerativas são IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β e $\text{INF-}\gamma$ (MANTOVANI *et al.*, 2000; ARGILES *et al.*, 2005). Assim, concentrações elevadas de IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β em pacientes com tumor sugerem alterações bastante importantes quanto ao crescimento e maturação fetal, como relacionados à alguns prejuízos encontrados nos fetos de fêmeas portadoras de tumor como variações no balanço das concentrações tanto de citocinas pró-inflamatórias quanto das anti-inflamatórias nas diferentes situações experimentais.

Vários tecidos e tipos celulares são responsáveis pelo aumento na circulação de citocinas durante o câncer, mas o tumor é a fonte mais expressiva. Sozinhas, essas citocinas são capazes de induzir depleção do tecido muscular (ARGILÉS *et al.*, 2005). O $\text{TNF-}\alpha$ é capaz de estimular o catabolismo através de mecanismos indiretos, alterando os níveis circulantes de hormônios que regulam o crescimento muscular, estimula a produção de citocinas catabólicas e induz anorexia (REED, LI, 2001).

As citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e a IL-6 são as principais mediadoras da resposta na fase aguda pelo fígado durante o processo de caquexia. A IL-6 inibe a produção de albumina pelo fígado, concentrações elevadas dessa citocina estão associadas com elevado tamanho de massa tumoral, perda de peso e prognóstico ruim. Essa citocina tem sido postulada como sendo um fator de crescimento tumoral. As citocinas, IL-1 β e $\text{INF-}\gamma$ também são mediadoras da caquexia (KURODA *et al.*, 2007). Assim, no estado fisiológico, citocinas pró-inflamatórias atuam para manter a homeostasia do tecido muscular. Em todos os tecidos, o dano e reparo ocorrem através do recrutamento de células do sistema imunológico. As citocinas pró-inflamatórias IL-6, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β e IL-8 atuam tanto aumentando a vascularização local quanto acelerando a resposta inflamatória. Essas citocinas podem ser produzidas tanto pelo tecido quanto pelas células do sistema imunológico. O $\text{TNF-}\alpha$ é uma citocina pleiotrópica, ou seja, possui múltiplas ações como também varias células alvo, sendo importante mediadora da degradação celular. Nos tecidos, a

proteólise ocorre através do sistema ubiquitina-proteossoma, e a ativação das proteases ubiquitina-dependentes, que por sua vez são mediadas via TNF- α (SAINI *et al.*, 2006).

Desse modo, verificou-se que as alterações na concentração de citocinas tanto materno quanto fetal podem direcionar para a hipótese de que, nesse modelo experimental, os efeitos tumorais foram deletérios aos tecidos maternos, promovendo alterações de peso de determinados órgãos e da placenta e também induziram alterações fetais quanto ao peso, reabsorção fetal e também do perfil de aminoácidos que corresponde ao processo inflamatório crônico instalado pela caquexia.

4.3 Análise do perfil de hormônios séricos

Os hormônios regulatórios e contra-regulatórios da glicemia também são importantes indicadores dos efeitos deletérios do crescimento tumoral. Os resultados do presente trabalho mostram que, no soro materno, houve redução da concentração de amilina no grupo portador de tumor MAC e inoculado com ascite A, porém nos demais grupos houve discreta redução em função da suplementação nutricional (Figura 16 A), paralelamente, a concentração de insulina sérica foi reduzida nos grupos com tumor MAC e inoculados com ascite (A e AA); embora o grupo L tenha apresentado discreto decréscimo da insulina sérica em relação ao grupo C, houve redução acentuada no grupo LMAC e também nos grupos com ascite (LA e LAA) (Figura 16 B). Esses dois hormônios correspondem aos principais hormônios anabólicos, que na situação do câncer estão preferencialmente alterados em função do intenso processo espoliativo.

Paralelamente, o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) age estimulando a liberação de insulina, e nos resultados aqui apresentados verificou-se que a presença do tumor MAC16 promoveu redução da concentração desse hormônio nas mães desse grupo e também naquelas inoculadas com líquido ascítico ativo (A); os demais grupos, principalmente com suplementação nutricional, apresentaram valores similares de GLP-1 em relação ao grupo C (Figura 16 C).

Por outro lado, o glucagon, que é um hormônio contra-regulatório a insulina, não variou em relação aos diferentes esquemas experimentais, com exceção para o grupo AA e LMAC que apresentaram elevadas concentrações desse hormônio no soro materno (Figura 16 D).

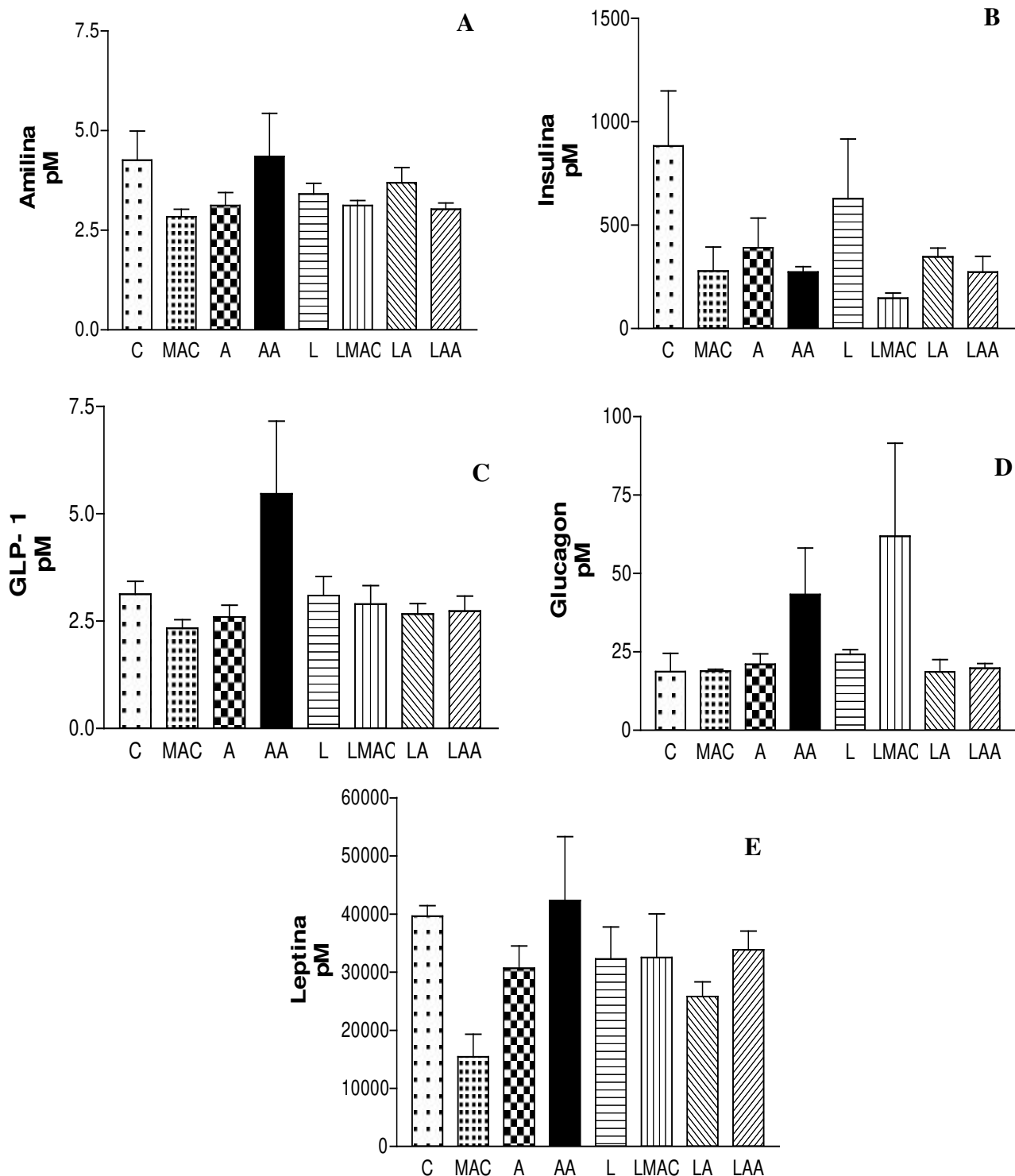


Figura 16. Análise da concentração (pM) de hormônios no soro materno. **A**-Amilina; **B**-Insulina; **C**- GLP-1; **D**- Glucagon; **E**- Leptina, com auxílio do equipamento Luminex 200TM (Luminex Corporation, Texas, USA). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

A leptina, produzida principalmente pelos adipócitos, varia sua concentração de acordo com a quantidade de tecido adiposo, assim em função do crescimento tumoral e elevada espoliação do tecido de reserva – adiposo – verificou-se que houve decréscimo da concentração nas mães MAC; os demais grupos apresentaram valores similares da leptina sérica em relação ao grupo C, independente do esquema nutricional ou inoculação de líquido ascítico (Figura 16 E).

Do mesmo modo que a evolução tumoral causa efeitos deletérios no hospedeiro, como apontado inicialmente nesse trabalho, a gestação associada ao câncer preocupa mais pela sua coexistência e também por tratarmos de dois organismos – mãe e feto. Além disso, ainda são escassos os trabalhos que abordam as variações fisiológicas nos fetos de mães portadoras de neoplasia. Desse modo, analisando-se os efeitos tumorais sobre o crescimento fetal, verificou-se que a concentração de amilina no soro fetal foi maior nos fetos provenientes do grupo de mães portadoras do MAC, e que todos os fetos de mães submetidas à suplementação nutricional com leucina apresentaram valores maiores na concentração de amilina (Figura 17 A).

A insulina fetal foi reduzida nos grupos MAC, A e AA e também nos fetos de mães alimentadas com dieta rica em leucina, com exceção para o grupo LMAC (Figura 17 B).

A concentração de GLP-1 no soro fetal foi similar entre os grupos MAC, A e AA em comparação com o respectivo controle, porém apenas os fetos do grupo L apresentaram decréscimo da concentração desse hormônio estimulador da insulina em relação ao grupo C (Figura 17 D).

No soro fetal, a diferença nos níveis de leptina foram mais expressivos, tendo redução em ambos os grupos portadores de tumor e, ainda, foi possível observar que nos grupos suplementados com leucina, a concentração sérica de leptina foi superior aos grupos que receberam dieta controle (Figura 17 E).

O glucagon, a insulina e amilina são hormônios secretados por células das ilhotas de langerhans do pâncreas, o glucagon pelas células do tipo A e a insulina e amilina pelas células do tipo B. Esses hormônios tanto individualmente quanto coletivamente influenciam no controle da glicose sanguínea e mais especificamente na distribuição de substrato energético aos tecidos (WOODS *et al.*, 2006). Há vários estudos mostrando as variações hormonais durante a evolução do câncer, sendo muitos deles relacionados ao estado caquético na vigência do câncer. O decréscimo da insulina plasmática proporciona além da redução do aporte de nutrientes menor taxa de síntese protéica, o que em trabalhos prévios foram relacionados com o crescimento do

tumor de Walker, também considerado modelo experimental de caquexia como o adenocarcinoma de colon MAC16.

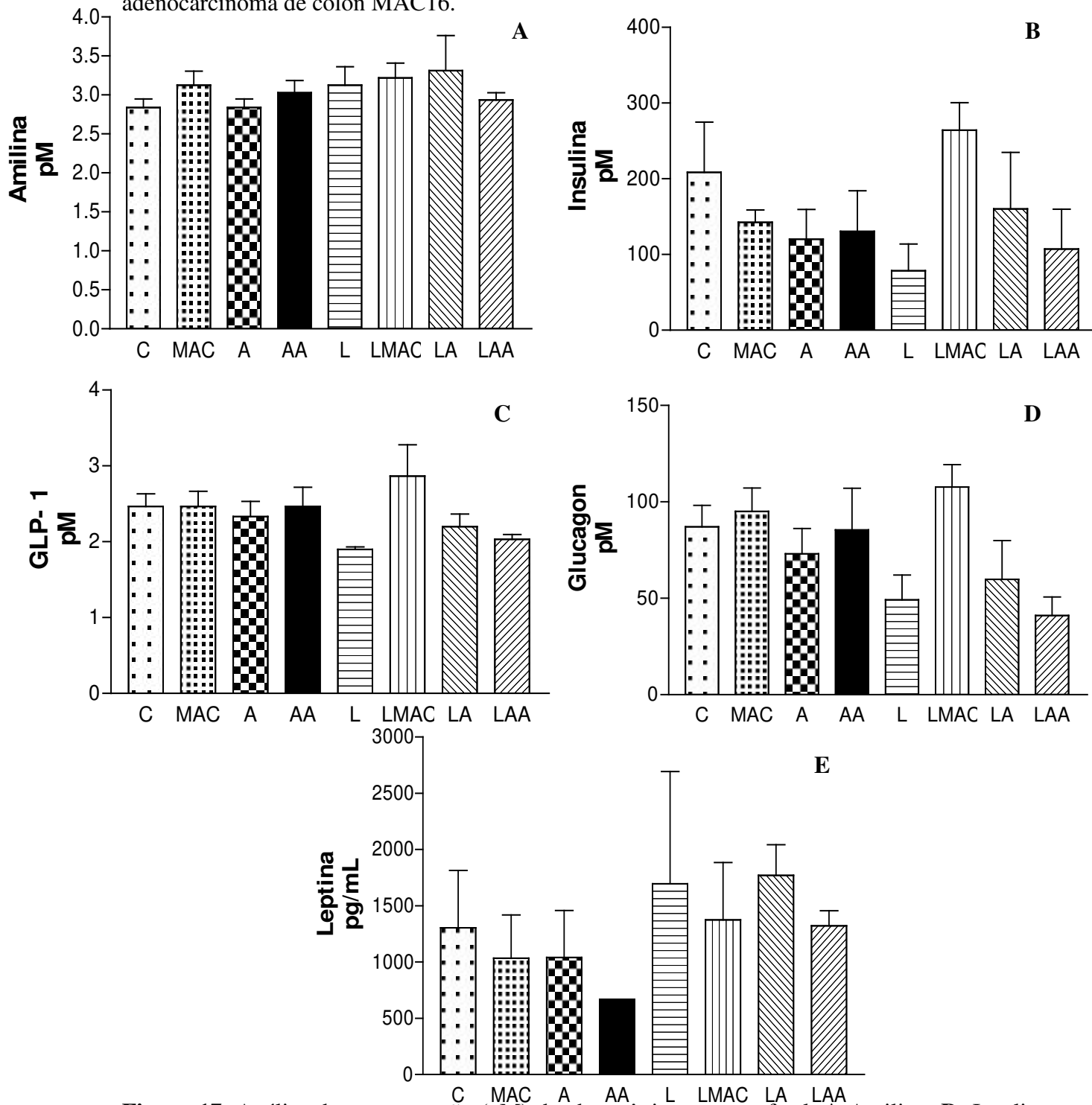


Figura 17. Análise da concentração (pM) dos hormônios no soro fetal. **A**-Amilina; **B**- Insulina; **C**- GLP-1; **D**- Glucagon; **E**- Leptina, com auxílio do equipamento Luminex 200TM (Luminex Corporation, Texas, USA). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Para que ocorra controle do peso corpóreo, a ingestão alimentar deve ser equivalente ao gasto energético; na falta desse controle, ocorre em geral perda de peso corporal. A demanda energética é proveniente das refeições, que fisiologicamente na busca da homeostasia glicêmica, há necessidade da atuação dos hormônios regulatórios e contra-regulatórios (WOODS, 1991). A insulina é responsável por remover a glicose, em excesso, do sangue e inibir a sua secreção pelo fígado; por outro lado, o glucagon estimula a produção e secreção de glicose pelo fígado (WOODS *et al.*, 2006). Alguns estudos observaram que em pacientes com carcinoma hepatocelular e em ratos portadores de sarcoma MCA, a insulina plasmática encontrava-se diminuída (KURZER, 1988; O`KEEFE, 1990). Por outro lado, a amilina secretada em paralelo com a insulina, pelas células beta do pâncreas endócrino, age sinergicamente a insulina, promovendo redução da glicose sanguínea, diminuindo a absorção de glicose pelo intestino, em função da diminuição das secreções digestivas, além de ser anorexígeno diminuindo ingestão de alimento e diminuindo o esvaziamento gástrico (WOODS *et al.*, 2006). Além disso, diminui a atuação do glucagon ou da mobilização de glicose como glicogenólise e gliconeogênese, como consequência há diminuição do fornecimento de glicose para o sangue. Nossos resultados mostram claramente que há desvio do principal substrato energético – a glicose – além de outros nutrientes como aminoácidos – como alanina, glutamina, prolina e a própria leucina – dos tecidos do hospedeiro, nesse caso o organismo materno, em detrimento do crescimento fetal, para as células neoplásicas.

As concentrações de leptina estão aumentadas quando há aumento do estoque energético como na obesidade e esse hormônio tem papel crucial na regulação da ingestão e também do dispêndio energético (BRENNAN & MANTZOROS, 2006). A avaliação desse hormônio permite estabelecer importante correlação com a espoliação de gordura, que é influenciada pelo crescimento tumoral. As concentrações circulantes de leptina são proporcionais a gordura corpórea, porém sabe-se que a leptina também está envolvida na regulação da resposta inflamatória (FANTUZZI & FAGGIONI, 2000), além de assemelhar-se, estruturalmente, a interleucina 6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória. A leptina atua no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse, similar ao estresse crônico imposto pelo desenvolvimento do tumor. Além disso, é conhecido seu efeito sobre o controle do apetite, evidências atuais demonstram que a leptina está envolvida no controle da massa corporal, reprodução, angiogênese, cicatrização e função cardiovascular. Assim, o presente trabalho mostra que as

variações na concentração de leptina tanto maternas quanto fetais estão relacionadas principalmente aos efeitos deletérios do crescimento neoplásico, direcionando prejuízo ao desenvolvimento fetal e, principalmente, no curso da gravidez.

4.4 Atividade placentária

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR = *mammalian target of rapamycin*) desempenha papel central no metabolismo celular, atuando como reguladora da sobrevivência, crescimento celular, proliferação e motilidade (GINGRAS *et al.*, 2001; CASTEDO *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2003; FINGAR E BLENIS, 2004).

A via de sinalização da mTOR regula o crescimento celular em resposta aos nutrientes e aos fatores de crescimento, controlando a transcrição e a tradução gênica. Assim, a mTOR regula a síntese protéica através da fosforilação e inativação do repressor de tradução de RNA mensageiro (RNAm), 4E-BP1, e através da fosforilação e ativação da S6K (HAY, SONENBERG, 2006) (processos descritos inicialmente na introdução desse trabalho, Figura 3). Além disso, o início da tradução ocorre após a ativação/fosforilação de alguns substratos ou também chamados de *downstream* da mTOR, como a proteína quinase p70S6K e fator de iniciação 4EBP1 (HAY, 2005).

Com intuito de analisar quais fatores foram modulados na sinalização celular placentária em função da suplementação nutricional sobre os efeitos deletérios do crescimento tumoral – MAC16 – estudamos algumas proteínas relacionadas aos processos de tradução como mTOR e algumas proteínas *upstreams* e *downstreams*.

Em nossos resultados, verificamos que a expressão da mTOR total não alterou nos grupos portadores de tumor, assim como não apresentou diferenças nos grupos que receberam a dieta rica em leucina (Figura 18A). Além disso, a proteína 4E-BP1 regulada pela mTOR apresentou perfil similar ao da expressão da mTOR, com exceção para o grupo portador de tumor e suplementado com dieta rica em leucina (LMAC), onde houve aumento na expressão protéica da 4EBP1 quando comparado com o seu grupo controle (L) (Figura 18B). A proteína quinase P70S6K, também conhecida como substrato da mTOR, ou *downstream*, é ativada pela mTOR e têm atuação direta no aumento da tradução de RNA mensageiro, ou seja, atua diretamente favorecendo a síntese protéica.

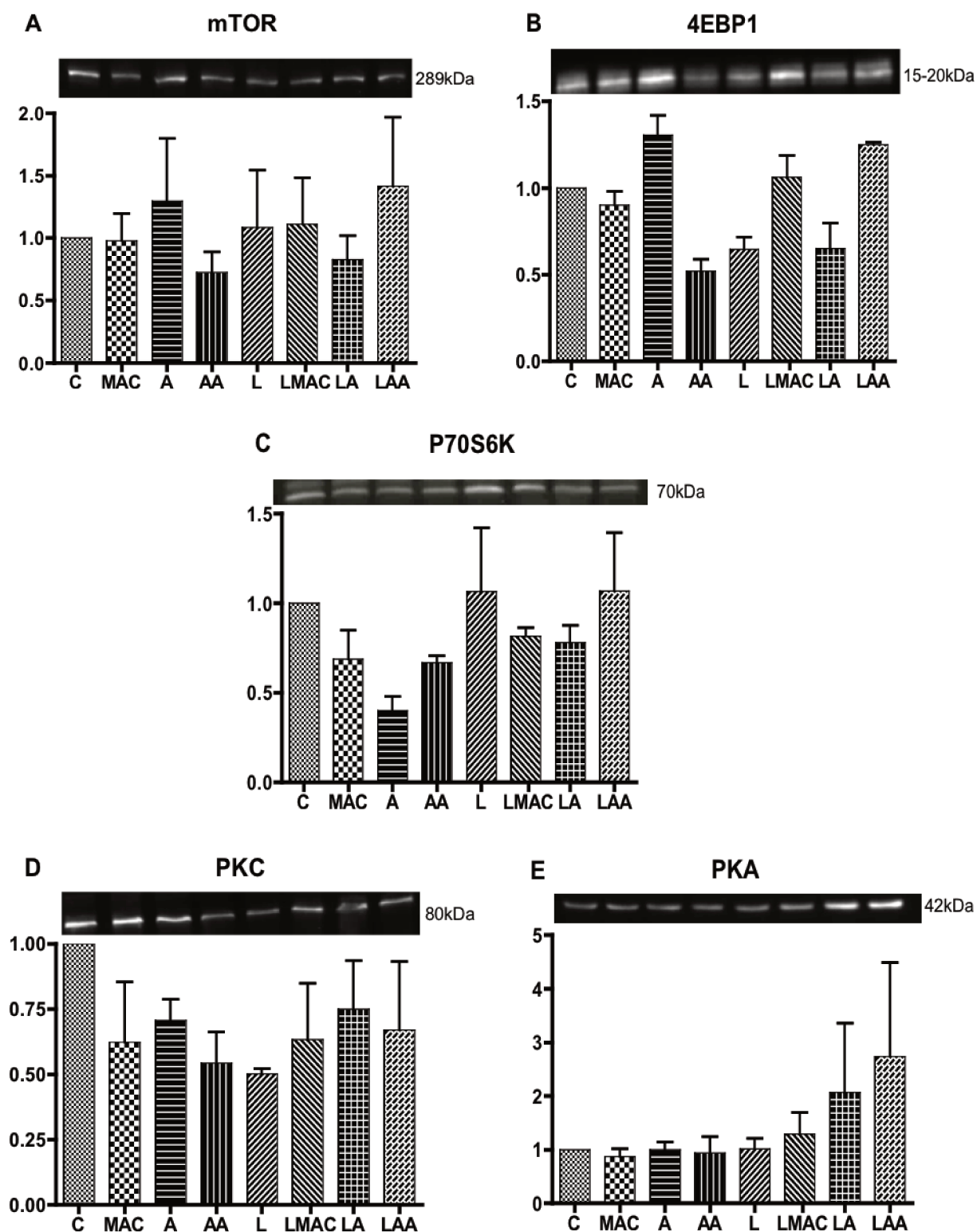


Figura 18. Análise da expressão das proteínas da via de sinalização celular para síntese protéica em tecido placentário (A- mTOR; B- 4EBP1; C- P70S6K; D- PKC e E- PKA). Análises realizadas através da técnica de *Western Blott*. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Assim, nossos resultados mostraram que a suplementação de leucina atua na estimulação dessa via, visto que, nos grupos suplementados, a expressão da P70S6K foi superior quando comparados com os seus respectivos grupos que receberam dieta controle (Figura 18C). Por outro lado, a evolução tumoral promoveu diminuição do processo de síntese protéica, e isso pode ser aventado nesse estudo visto que a expressão da P70S6K diminuiu no grupo com tumor (MAC) e nos grupos que receberam inoculação de líquido ascítico (A e AA), porém o mesmo perfil foi observado nos grupos com tumor alimentados com dieta rica em leucina, sugerindo assim que a leucina nesses animais não modulou os efeitos neoplásicos. Desse modo, observamos que provavelmente a leucina aumentou a atividade placentária, estimulando a via de sinalização de síntese protéica, corroborando com os dados encontrados na literatura (Figura 18C) (CASTEDO *et al.*, 2002; HAY, SONENBERG, 2006), porém esses efeitos modulatórios foram pequenos ou ausentes nos grupos portadores de tumor.

As proteínas PKA (proteína quinase dependente de AMP cíclico) e PKC (proteína quinase dependente de cálcio), são proteínas que atuam na via de sinalização celular de síntese protéica acima da mTOR, e por isso, também são chamadas de *upstreams* da mTOR. Ou seja, a expressão dessas proteínas permite-nos avaliar o estado de sinalização/atividade intracelular para síntese protéica. Ao analisarmos essa via de sinalização, verificou-se que a expressão da PKC apresentou-se reduzida no grupo portador de tumor (MAC), mostrando redução da atividade placentária nesses animais em relação aos do grupo controle (C), assim como os animais que receberam inoculação do líquido ascítico, ativo ou inativado (Figura 18E). Por outro lado, embora a leucina não tenha atuado de forma efetiva nessa via de sinalização da PKC, os demais grupos, com tumor e inoculados com líquido ascítico e suplementados nutricionalmente, apresentaram valores menores que os controles, porém comparando-se intra-grupo, os grupos LMAC, LA e LAA mostraram maior expressão da PKC em relação ao grupo C (Figura 18D). A expressão da PKA permaneceu inalterada na maioria dos diferentes grupos experimentais, exceto nos grupos LA e LAA, onde observou-se aumento da expressão (Figura 18D).

No presente estudo, apesar da leucina ter participação e influência direta na expressão da mTOR, como foi ilustrado na Figura 3, a expressão dessa proteína não alterou em nossas condições experimentais. No presente estudo, a quantificação da mTOR fosforilada foi prejudicada, assim sugere-se que provavelmente, nos animais experimentais e principalmente aqueles portadores de tumor, a razão da mTOR total, que foi quantificada, em relação a mTOR

fosforilada estava em desequilíbrio. Possivelmente, a mTOR fosforilada pode estar superexpressa nos animais suplementados, e especificamente nos animais dos grupos LMAC, LA e LAA, e por isso a expressão da mTOR total não apresentou diferença quando comparada com a expressão nos grupos que foram alimentados com a dieta controle.

Como mencionado acima, a 4EBP1 associa-se ao fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), inibindo-o e, com isso, o início da tradução de proteínas. Quando fosforilada a 4EBP1 dissocia-se do eIF4E, permitindo que ocorra a tradução protéica (ROSENWALD *et al.*, 1995; GINGRAS *et al.*, 2001; TSUKIYAMA-KOHARA *et al.* 2001; HAY & SONENBERG, 2004) (Figura 3). No caso do tecido placentário, avaliado no presente estudo, também sugere-se que haja desbalanço entre a quantidade de proteína total e 4EBP1 fosforilada, principalmente nos grupos suplementados com leucina, e com isso alteração do processo modulatório da suplementação nutricional. A proteína quinase p70S6K, que atua no controle do crescimento celular aumentando a tradução de RNAm (MONTAGNE *et al.*, 1999; RADIMERSKI *et al.*, 2002), no tecido placentário do grupo L foi modulado pela suplementação nutricional, e que, embora tenha sofrido os efeitos tumoral, quando comparada aos grupos eutróficos, as placentas dos grupos LMAC, LA e LAA foram moduladas positivamente pela suplementação com leucina e, provavelmente, sugere-se que houve minimização dos efeitos deletérios do tumor, principalmente nos produtos da concepção.

Por outro lado, o estado de atividade celular pode ser modulado por processo que possam alterar a concentração e consequentemente ativação das proteínas PKA e PKC. Essas proteínas são responsáveis por sinalizar também o processo de síntese protéica. A PKA é ativada, quando fosforilada, por altas concentrações de AMP cíclico (AMPC) e a PKC é ativada quando as concentrações de cálcio elevam-se. Tanto o AMPC quanto o cálcio são segundos mensageiros, presentes intracelularmente, resultantes da interação entre diferentes ligantes a seus respectivos receptores na membrana celular. O AMPC constitui-se no segundo mensageiro utilizado pela maioria das proteínas G, proteína essa associada a receptores de membrana celular. Dentro da célula, o alvo principal do AMPC é a proteína quinase A (PKA). O AMPC ativa o sítio catalítico dessa enzima através da liberação da subunidade regulatória. Por sua vez, a PKA fosforila grande número de proteínas, que vão influenciar na fosforilação e ativação da mTOR. Algumas proteínas G utilizam o inositol trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros. Neste caso, após interação ligante receptor uma proteína G é ativada e sua

subunidade α , acoplada agora ao uma molécula de GTP, estimulando uma fosfolipase C de membrana. Esta cliva o fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP₂) de membrana dando dois componentes, o IP₃ e o DAG. O IP₃ busca seu receptor específico que é um receptor/canal de Ca²⁺ localizado na membrana do retículo endoplasmático, liberando Ca²⁺ para o citoplasma da célula. O DAG permanece na membrana e ativa a proteína quinase C (PKC), que também é dependente de Ca²⁺. Assim, sugere-se que o decréscimo da expressão da PKC no grupo MAC corresponde a menor atividade celular dependente de Ca⁺⁺, porém não houve alteração na concentração de PKA, que por sua vez poderia compensar a atividade tecidual nessa condição deletéria de tumor. Quanto à suplementação nutricional, sugere-se possível modulação da leucina tanto para as proteínas *upstreams* PKC como PKA em todos os grupos LMAC, LA e LAA.

4.5 Análises bioquímicas e morfológicas maternas e fetais

A proteólise no hospedeiro portador de tumor é estimulada, em partes, por citocinas inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são produzidas tanto pelo hospedeiro quanto pelo tumor (ARGILÉS, 2005).

Nessas condições experimentais, não observamos diferença entre os grupos experimentais em relação à concentração de proteínas totais séricas maternas e fetais (Tabela 3). Esses dados não corroboram com os dados da literatura, visto que nos pacientes com câncer e em animais portadores de tumor, há redução das proteínas totais séricas em função, principalmente, da elevada taxa de proteólise, sabendo-se que, no estado câncer-caquexia, o tumor promove redução de 60% na síntese de proteínas e aumento, em três vezes, na degradação protéica (BECK *et al.*, 1991). Assim, nossos resultados são discrepantes daqueles apresentados na literatura, pois esperava-se redução importante do teor de proteína total sérica; porém são poucos os trabalhos que relacionam o adenocarcinoma de colon MAC16 associado a gravidez; provavelmente as alterações metabólicas ocorridas durante a prenhez modularam os efeitos do crescimento tumoral. Apesar da proteólise não ter sido estimulada, encontramos aumento nas concentrações séricas maternas de IL-6 e TNF- α nos animais do grupo LMAC e MAC, respectivamente (Figura 14B e C).

Os BCAAs têm sido utilizados com o objetivo de melhorar o balanço de nitrogênio protéico muscular, e assim garantir melhor qualidade de vida ao paciente com câncer. TAYEK (1986) realizou estudo onde pacientes com adenocarcinoma, intra-abdominal avançado,

receberam dieta suplementada com BCAAs e observou que houve melhora na concentração protéica e síntese de albumina. O aumento da atividade hipotalâmica serotoninérgica é um dos principais mecanismos para o desenvolvimento do câncer caquexia. Na verdade, o triptofano livre (precursor da serotonina) é aumentado no câncer e os BCAAs podem atuar competindo pelos mesmos transportadores do triptofano através da barreira hemato-cefálica (KRAUSE, 1979; MEGUID, 1985). Nesse sentido, era esperado que as concentrações de proteínas totais séricas fossem maiores nos animais que receberam a dieta rica em leucina, pois este aminoácido atua na regulação de processos anabólicos que aumentam a síntese e diminuem a degradação protéica (SHIMOMURA *et al.*, 2006).

Tabela 3. Análises dos dados bioquímicos (proteína, albumina e glicose) no soro materno e fetal. Análise do número de reabsorção fetal e de fetos por fêmea e peso fetal.

| Resultados (média) | C | MAC | A | AA | L | LMAC | LA | LAA |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | (n=8) | (n=8) | (n=8) | (n=8) | (n=8) | (n=8) | (n=8) | (n=8) |
| Materno | | | | | | | | |
| Proteína (g/L) | 5,4±0,4 | 7,1± 1,4 | 5,7± 0,5 | 5,6±0,7 | 5,1±0,2 | 5,2±0,6 | 5,7±0,8 | 5,2±0,6 |
| Albumina (g/L) | 2,6±0,6 | 2,6±0,7 | 2,7±0,6 | 2,4±0,4 | 2,5±0,4 | 2,3±0,2 | 2,5±0,3 | 2,7±0,5 |
| Glicose (mg/dL) | 113,0±15,2 | 105,9±17,1 | 123,3±30,6 | 130,6±17,9 | 135,9±13,8 | 131,8±27,5 | 131,8±22,6 | 118,9±15,3 |
| Número de reabsorção fetal por fêmea | 1,7±0,5 | 2,4±1,4 | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 | 1,0±0,0 | 2,0±0,8 | 1,5±1,1 | 1,0±0,0 |
| Número de fetos por fêmea | 7,0±1,9 | 7,7±1,5 | 7,7±1,9 | 6,0±2,1 | 8,7±1,3 | 7,7±2,7 | 7,4±1,7 | 7,5±1,6 |
| Fetal | | | | | | | | |
| Proteína (g/L) | 4,0±0,4 | 3,3±0,1 | 4,6±1,0 | 3,2±0,2 | 3,9±0,2 | 4,0±0,5 | 4,7±0,6 | 3,9±0,3 |
| Albumina (g/L) | 1,6±0,1 | 1,4±0,3 | 1,6±0,2 | 1,5±0,1 | 1,8±0,2 | 1,4±0,1 | 1,4±0,2 | 1,8±0,2 |
| Glicose (mg/dL) | 76,7±13,4* | 58,3±6,5* | 81,4±8,8 | 70,7±6,0 | 84,3±20,2 | 82,5±15,1* | 81,6±12,0 | 79,0±7,4 |
| Peso (g) | 0,6 ±0,2 | 0,6±0,1 | 0,6±0,3 | 0,6 ±0,2 | 0,4±0,1 | 0,8 ±0,2 | 0,6±0,3 | 0,71±0,2 |

Resultados expressos em média ± erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Conforme mostrado na Tabela 3, não houve diferença na concentração de albumina materna entre os grupos experimentais, por outro lado, no soro fetal a concentração de albumina foi ligeiramente inferior nos grupos provenientes de mães portadoras de tumor (MAC e LMAC) e superior no grupo em que as mães foram suplementadas com leucina (L). Em hospedeiros com câncer, ocorre redução da albumina sérica devido ao estado caquético, causado pelo câncer

(TISDALE 2002; GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003). Na fase aguda do câncer-caquexia, a IL-6 inibe a produção de albumina pelo fígado (KURODA *et al.*, 2007). Sabe-se que durante a gestação, há profunda redução nos aminoácidos glicogênicos, alanina, serina, treonina, glutamina e glutamato, que são responsáveis pela hipoglicemia observada durante a gravidez (FELIG *et al.*, 1972; METZGER *et al.*, 1977; GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003; KALHAN *et al.*, 1982). Os crescimentos fetais e tumorais utilizam grandes quantidades de glicose e aminoácidos do hospedeiro para oxidação e síntese protéica (LEMONS *et al.*, 1976; MARCONI *et al.*, 1989; CHUNG *et al.*, 1998; MILLEY, 1998; TISDALE 2009). Desse modo, pode haver competição nutricional entre feto e tumor, resultando em alterações no crescimento e metabolismo de ambos (CARBÓ *et al.*, 1996). Nos nossos resultados foram condizentes com a literatura, pois houve discreta diferença na concentração sérica de glicose entre os grupos experimentais. Nas mães do grupo implantado com tumor (MAC), as concentrações séricas de glicose foram menores quando comparadas aos controles (C e L) (Tabela 3); esses dados demonstram que há utilização de glicose tanto pelo feto, quanto pelo tecido tumoral, promovendo redução da glicemia em função das células tumorais. Essa suposição baseia-se no fato de não haver alteração nos grupos inoculados com líquido ascítico (ativo ou inativado); por outro lado em estudos prévios e tomando como base as fêmeas apenas com tumor não grávidas há redução da glicemia em função do crescimento tumoral. Assim, a hipoglicemia encontrada nessas fêmeas foi imposta preferencialmente pela evolução tumoral. A suplementação nutricional promoveu modulação do efeito tumoral, pois em contrapartida o grupo LMAC apresentou discreta recuperação da glicemia quando comparado ao grupo MAC.

Foi possível observar, em relação ao peso dos fetos dos diferentes grupos experimentais, que não houve diferença entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 3). Esses dados não condizem com os dados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa, onde foram realizados experimentos com inoculação do tumor de Walker 256 em ratas grávidas e houve redução no peso dos fetos e da placenta nos animais portadores do tumor, quando comparados ao grupo controle (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998). Observou-se diferença no número de fetos por fêmea nos grupos MAC, A e AA quando comparados ao grupo C. No grupo L, o número de fetos ligeiramente superior ao grupo C, mas nos grupos LMAC, LA e LAA houve redução quando comparados aos grupos L e C (Tabela 3). Além disso, observamos que houve aumento no número de reabsorção fetal por fêmea no grupo MAC e LMAC quando comparado com os demais grupos

experimentais. Nos grupos LMAC e LA também houve aumento quando comparados ao grupo L e LAA. Nos grupos experimentais suplementados com leucina, exceto no grupo LA, o número de reabsorção fetal foi menor quando comparados aos mesmos grupos que não receberam essa suplementação (Tabela 3). Em experimento semelhante com ratas grávidas portadoras do tumor Walker 256, foi observado que o índice de reabsorção fetal aumentou em 25% nas fêmeas com tumor e 25,3% nas fêmeas injetadas com líquido ascítico quando comparadas ao grupo controle (GOMES-MARCONDES, 1994 e GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998). A associação entre crescimento neoplásico e gravidez, pode causar danos para o feto, levando a reabsorção ou até morte fetal ou neonatal (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998, 1990).

4.6 Composição corpórea fetal

Verificou-se que a porcentagem de água corpórea dos fetos provenientes das mães portadoras de tumor (MAC e também LMAC) foi ligeiramente maior em proporção ao grupo C, em função do crescimento tumoral (Figura 19A). A literatura mostra que a evolução tumoral promove alterações importantes na composição corpórea, quanto a relação da massa corpórea magra e quantidade de água corpórea (COHN *et al.*, 1981; TISDALE, 2001). Coerentemente com a evolução tumoral, há intensa espoliação dos estoques energéticos como do tecido adiposo (KHAL *et al.*, 2005). Assim, concordante com a literatura, a porcentagem de gordura fetal foi reduzida nos grupos portadores de tumor MAC, LMAC e também naqueles que receberam inoculação de líquido ascítico (AA); porém essa porcentagem foi semelhante entre os grupos suplementados com leucina (Figura 19B). A proteína corpórea fetal mostrou redução em todos os grupos com tumor (com exceção para o grupo LMAC) e inoculados com líquido ascítico, sendo mais pronunciadas para os grupos AA e LAA (Figura 19C).

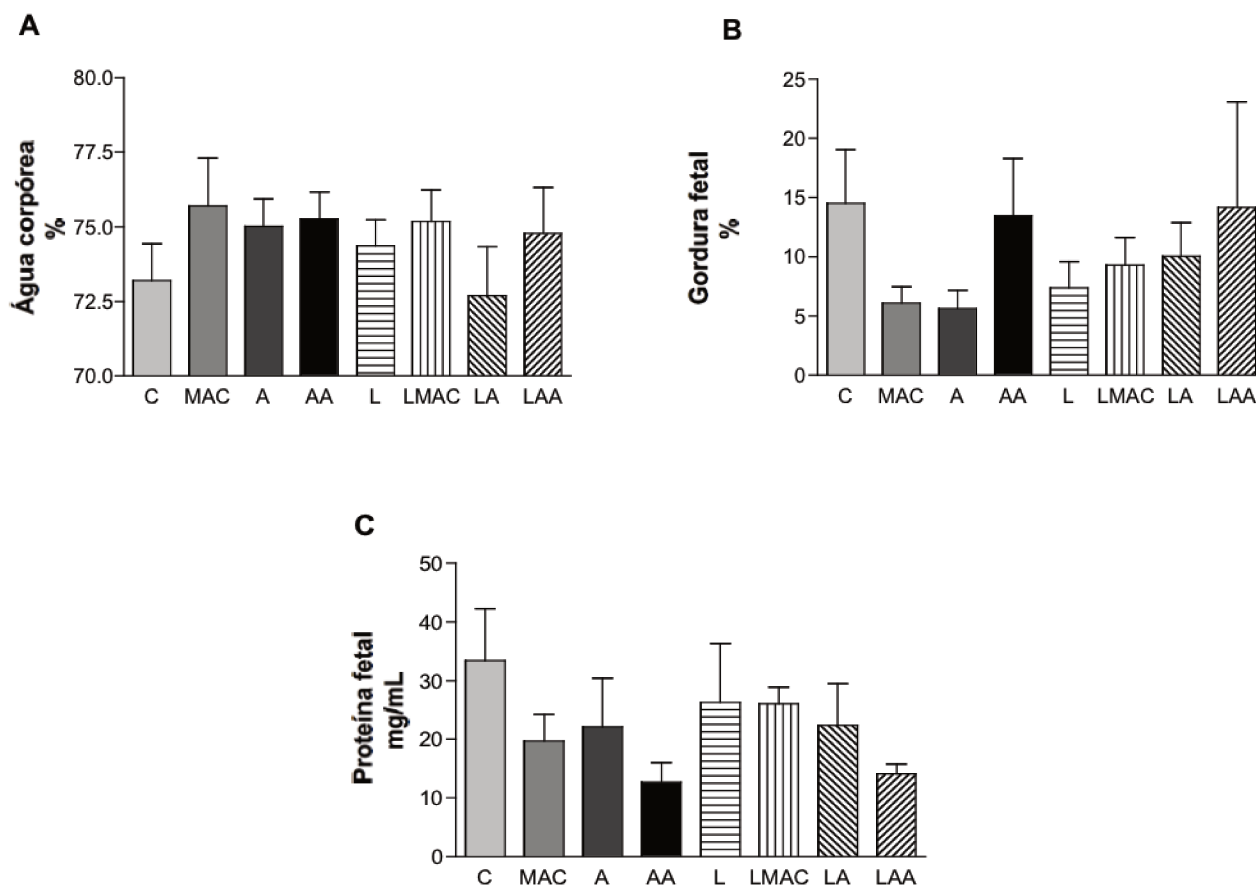


Figura 19. Análise da composição corpórea fetal. A- Porcentagem (%) de água corpórea presente nos fetos dos diferentes grupos experimentais; B- Porcentagem (%) de gordura corpórea presente nos fetos dos diferentes grupos experimentais; C- Quantificação do teor total de proteína (mg/mL) fetal pelo método de Lowry et al. (1951) nos grupos experimentais. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

4.7 Análises Morfométricas

PITKIN (1977) estimou que aproximadamente 40% do total de ganho de peso da mãe durante a gestação são representados pelo feto, placenta e líquido amniótico. Os 60% restantes representam tecidos maternos, incluindo útero, mama, sangue, tecido adiposo e líquidos extracelulares. Assim, no presente estudo, encontramos ligeiro aumento do peso relativo dos produtos da concepção (fetos mais placenta) nos grupos MAC, e mais expressivamente no grupo LMAC, provavelmente em função do conteúdo de água corpórea desses fetos (como observado na Figura 19A) e também, agora levando-se a suposição que haja aumento do teor de água placentária (Tabela 4). Entretanto, essa estimativa não inclui mudanças em outros órgãos, como

fígado, rim e coração, que aumentam seu tamanho durante a gestação (KALHAN, 2000). Além disso, há vários relatos na literatura apontando para os efeitos espoliativos do crescimento tumoral (BECK *et al.*, 1991; KHAL *et al.*, 2005; TISDALE, 2005, 2009) e quando em associação a um outro processo metabolicamente complexo, como a gravidez, em alguns órgãos ou tecidos, os efeitos devastadores tendem a ser modulados. Nessas condições experimentais, apresentadas no presente estudo, não observamos diferença estatística em relação ao peso relativo dos órgãos entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem (%) do peso relativo dos órgãos das mães (PR) nos diferentes grupos experimentais.

| | GRUPOS EXPERIMENTAIS | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| | C | MAC | A | AA | L | LMAC | LA | LAA |
| Carcaça (PR, %) | 66,6±9,54 | 60,86±15,47 | 62,65±2,56 | 64,38±3,78 | 64,27±5,10 | 57,58±3,20 | 61,67 ± 4,26 | 63,97 ± 3,36 |
| Músculo (PR, %) | 0,58 ± 0,10 | 0,56±0,06 | 0,59±0,09 | 0,58±0,06 | 0,55±0,09 | 0,69±0,13 | 0,62 ± 0,05 | 0,63 ± 0,06 |
| Fígado (PR, %) | 6,25 ± 0,82 | 6,45 ± 0,64 | 6,18 ± 0,89 | 6,19 ± 0,57 | 6,43 ± 0,98 | 7,02 ± 0,86 | 6,74 ± 1,12 | 6,77 ± 0,95 |
| Adrenal (PR, %) | 0,05 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,04 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 |
| Placenta (PR, %) | 0,34 ± 0,04 | 0,32 ± 0,05 | 0,36 ± 0,05 | 0,30 ± 0,08 | 0,32 ± 0,07 | 0,42 ± 0,09 | 0,34 ± 0,04 | 0,33 ± 0,05 |
| Fetos mais Placentas (PR, %) | 15,13±3,02 | 18,30±3,72 | 17,21±5,37 | 15,37±3,83 | 14,79±8,86 | 27,16±13,75 | 15,27±3,63 | 17,72±4,07 |
| Baço (PR, %) | 0,39 ± 0,09 | 0,36 ± 0,03 | 0,38 ± 0,08 | 0,39 ± 0,09 | 0,38 ± 0,06 | 0,53 ± 0,31 | 0,48 ± 0,20 | 0,44 ± 0,04 |
| Coração (PR, %) | 0,53 ± 0,14 | 0,53 ± 0,12 | 0,55 ± 0,08 | 0,52 ± 0,06 | 0,59 ± 0,13 | 0,62 ± 0,08 | 0,54 ± 0,06 | 0,58 ± 0,09 |

Resultados expressos em média ± erro padrão da média por ANOVA *one-way* e para o cálculo de variação entre os grupos foi utilizado teste de Bonferroni com índice de significância para 5%.

Contrariamente aos dados da literatura, não houve diferença em relação ao peso relativo do fígado entre os grupos. O crescimento tumoral causa aumento do peso relativo hepático, em função do aumento da atividade e secreção de proteínas C reativa (TISDALE, 2004; ARGILÉS *et al.*, 2005). A evolução tumoral também promove intensa espoliação da massa magra corpórea (BOSSOLA *et al.*, 2006; CAMPS *et al.*, 2006), mas nenhuma diferença expressiva foi encontrada no peso do músculo dos grupos experimentais analisados. A proteólise muscular, principalmente esquelética, que ocorre no câncer caquexia é necessária para mobilizar aminoácidos requeridos para síntese protéica no fígado e no tumor (ARGILÉS, 2007). Portanto, a administração de aminoácidos exógenos pode servir como protetor da massa corpórea magra, preservando a

proteína tecidual, provendo substrato para o metabolismo muscular e para a gliconeogênese (LAINSCAK, 2008; PASINI, 2008).

Atualmente, ainda há poucos estudos relacionados à influência da gravidez sobre o câncer e vice versa. Publicações recentes apontam para o efeito protetor da gestação sobre o câncer; porém há outros autores que relatam a gravidade dessa associação, acelerando o crescimento e evolução da neoplasia. Além disso, alguns autores apontam para a dificuldade de diagnóstico precoce do tumor em mulheres grávidas. Estudos verificaram que pacientes com câncer de mama associado à gravidez apresentaram diagnóstico de estágio mais avançado e maior incidência de metástases, comparadas às controles não gestantes (KING *et al.*, 1985; ZEMLICKS *et al.*, 1992). Ressalta-se ainda que as pacientes grávidas com câncer apresentam evolução da doença mais avançada, devido ao atraso no diagnóstico ou que as alterações hormonais e fisiológicas da gravidez resultam em doenças mais agressivas.

As alterações endócrinas e metabólicas na gravidez associadas ao câncer são pouco estudadas, já que a gravidez envolve adaptações fisiológicas no organismo materno, centrada basicamente na unidade materno / fetal – a placenta. Assim, o aumento da progressão neoplásica em função da complexa alteração da homeostasia hormonal imposta pela gravidez, infere a importância do conhecimento e estudo do desenvolvimento tumoral em função do estímulo hormonal e/ou alterações dos produtos secretados pelo tumor (líquido ascítico), induzindo mudanças importantes no curso da gravidez e do bem estar da unidade materno / fetal.

O curso normal da gestação é dependente de alterações fisiológicas particulares a esse estado, como a elevação e manutenção das concentrações de alguns hormônios, principalmente de progesterona, estrogênio e prolactina, além dos hormônios regulatórios da glicose, e também aumento do processo anabólico, além do gerenciamento de processos celulares que são entre outros fatores aspectos importantíssimos para a gravidez ir a termo. Por outro lado, esta complexa condição fisiológica é severamente prejudicada quando associada a doenças, como o câncer, que também envolvem intensa alteração metabólica e hormonal. Assim o presente trabalho abordou aspectos bastante pontuais quanto à associação dessas duas condições metabolicamente muito complexas, como gravidez e câncer, mostrando as alterações que ocorrem na prenhez de camundongas com tumor e as lesões teciduais, que culminaram em danos para a gravidez como um todo, e conseqüentemente prejudicando ambos mãe e feto. Embora, nossos resultados não apresentaram expressiva variação dos parâmetros estudados, a maioria deles é concordante com a

literatura e com estudos prévios (GOMES-MARCONDES, 1994, 1998; CRUZ, 2007; DREZZA, 2008; TOLEDO, 2003, 1999; VENTRUCCI *et al*, 2005, 2001). Sabe-se que, tanto o crescimento fetal quanto tumoral requer aumento de síntese protéica e que, em condições fisiológicas normais, aminoácidos essenciais são transportados da mãe para o feto em diferentes taxas (LEMONS *et al.*, 1976; MARCONI *et al.*, 1989; CHUNG *et al.*, 1998). Por outro lado, essa associação do crescimento tumoral com a gravidez, pode resultar em danos para o feto e levar à reabsorção e morte do mesmo (WILLIAMSON *et al.*, 1988; GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998; GOMES-MARCONDES *et al.*, 1990). Da mesma maneira, a existência concomitante da gravidez e tumor pode induzir competição nutricional entre o tumor e o feto (TOLEDO *et al*, 2004), causando efeito protetor do organismo materno contra o crescimento da neoplasia (GULLINO *et al*, 1985; IOACHIM & MOROSON, 1986). Estudo realizado por GOMES-MARCONDES (1994) mostrou que ratas prenhes portadoras de tumor apresentavam menor massa tumoral quando comparadas às sem gravidez.

A inoculação diária de líquido ascítico, e conseqüentemente dos fatores contidos no mesmo, provocou nas fêmeas do grupo A redução de peso fetal similar a observada no grupo MAC, mas sem que esses animais fossem hospedeiros de neoplasia. Portanto, no grupo ascite há evidência de que não houve competição nutricional entre o feto e o tumor. Dessa forma, acredita-se que a redução de peso tenha ocorrido pela elevação da proteólise nas placentas e, também, nos fetos desse grupo. Mediadores catabólicos, como PIF e LMF, também, atuariam contribuindo para a redução de peso nos fetos do grupo com tumor e, também, como verificado no grupo ascite e, portanto, sugere-se ação acentuada desses fatores sobre vários tecidos inclusive sobre a unidade feto-placentária.

Dessa forma, observamos que a influência dos hormônios da gravidez no desenvolvimento placentário, e conseqüentemente fetal, e também a influência das citocinas presentes no líquido ascítico alterando o *milieu* hormonal e de citocinas circulantes da condição normal da gravidez, ainda apresenta diversos campos que podem ser pesquisados e desenvolvidos. No caso de doenças complexas, como o câncer, que envolvem fatores genéticos, hormonais e fisiológicos, a necessidade da análise integrada desses fatores torna-se evidente.

5. Conclusões

Após análise dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1- o desenvolvimento da neoplasia promove várias alterações no desenvolvimento fetal, relacionadas a reabsorção fetal, composição corpórea e alguns parâmetros bioquímicos como proteína total e glicose sérica, além de alterações na concentração de citocinas e hormônios relacionados ao metabolismo protéico e glicídico.
- 2- Existe competição por nutrientes entre feto e tecido neoplásico, porém conclui-se que os efeitos indiretos exercidos pela influência de citocinas presentes no líquido ascítico são mais evidentes em função da reabsorção fetal.
- 3- A inoculação do líquido ascítico, que possui fatores produzidos pelas células neoplásicas, promove alterações que levam a um desbalanço da homeostasia no hospedeiro, em alguns parâmetros semelhantes à evolução tumoral, como decréscimo da concentração de insulina e amilina e manutenção de leptina, associada a manutenção de citocinas
- 4- No organismo fetal, o líquido ascítico injetado nas mães, também promoveu alteração do balanço hormonal, redução da insulina e amilina, com aumento do glucagon e variações de citocinas principalmente pró-inflamatórias.
- 5- A suplementação nutricional com a leucina promoveu efeito benéfico, contribuindo para a manutenção e modulação dos efeitos deletérios causados pela presença da neoplasia, como manutenção da glicemia e proteína totais séricas, além de diminuir reabsorções fetais e também contribuiu para melhorar a atividade placentária nas mães, independente da inoculação ou não do líquido ascítico.

6. Referências Bibliográficas

ALBANESE, A.A. & ORTO, L.A. **Protein and aminoacids**. In ALBANESE, A.A. *Newer Methods of Nutritional Biochemistry*. New York, Academic Press, 1(1): 84, 1963

ANTHONY J.C.; ANTHONY T.G. & LAYMAN D.K. **Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise**. *J. Nutr.* 12:1102-1106, 1999.

ANTHONY J.C.; ANTHONY T.G. KIMBALL S.R. & JEFFERSON L.S. **Signalling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine**. *J. Nutr.* 131: 856-860S, 2001.

ARGILÉS, J.M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. **The oxidation of leucine in tumour-bearing rats**. *Biochem J.*, 268:241-244, 1990.

ARGILÉS, J. M., BUSQUETES, S., GARCÍA-MARTINEZ, C., LÓPEZ-SORIANO, F. J. **Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future**. *Nutrition* , 21: 977-985, 2005.

ARGILÉS, J.M., BUSQUETS, S., LOPEZ-SORIANO, F.J. **The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer**. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1609–1619, 2005.

ARGILÉS, J.M., LOPEZ-SORIANO, F.J., BUSQUETS, S. **Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia**. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, 1: 293–298, 2007.

ATHERTON, D. - **Successful PTC amino acid analysis at the picomol level**. In: *Techniques in Protein Chemistry* (HUGLY, T.E., ed.), San Diego, Academic Press, Inc. chapter 27, pp.273-283, 1989.

BAGGETTO, L. G. **Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells**. *Biochimie*, 74: 959-74, 1992.

BAKER HL: Reproduction and breeding. In: BAKER, H.L; LINDSEYL, J.R; WEIBROTH, S.H. **The laboratory rat**. New York, Academic Press, v.1, cap.7,p. 153-168, 1991.

BARACOS VE, DE VIVO C, HOGLE DHR, GOLDBERG AL. **Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma**. *Am J Physiol* , 268: 996–1006, 1995.

BARACOS, V. E. **More research needed on the treatment of the cancer anorexia/cachexia syndrome**. *J Support Oncol.*, 10:508-9, 2006.

BARACOS, V. E.;M. L. MACKENZIE. **Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer**. *J Nutr*, 136: 237-42, 2006.

BECK SA, SMITH KL, TISDALE MJ. **Anticachectic and antitumour effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover**. *Cancer Res* 51: 6089–6093, 1991.

BECKMAN, D.A.; BRENT, R.L.; LLOYD, J.B. **Sources of amino acids for protein synthesis during early organogenesis in the rat. Mechanisms before envelopment of the embryo by the yolk sac**. *Placenta*, 8: 635-41, 1996.

BEUGNET A, TEE AR, TAYLOR PM, PROUD CG: **Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability**. *Biochemical J*, 372:555-566, 2003.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. **Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization**. *J. Chromatogr*, 336: 93-104, 1984.

BOSSOLA, M.; TAZZA, L.; GIUNGI, S.; LUCIANI, G. **Anorexia in hemodialysis patients: an update**. *Kidney Int*, v.70, n.3, Aug, p.417-22. 2006.

BRADFORD MM. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding**. *Anal Biochem*, 72:248-254, 1976.

BRENNAN, A. M.; C. S. MANTZOROS. **Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2:318-27, 2006.

CAMPS, C.; IRANZO, V.; BREMNES, R. M.; SIRERA, R. **Anorexia-Cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway.** *Supp Car Canc*, 14: 1173-83, 2006.

CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. **Administration of tumor necrosis factor-alpha results in a decreased placental transfer of amino acids in the rat.** *Endocrinology*, 8: 3579-84, 1995.

CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; FIERES, W.; ARGILÉS, J.M. **Tumour growth results in changes in placental amino acid transport in the rat: a tumour necrosis factor alpha-mediated effect.** *Biochem J*, 313: 77-82, 1996.

CARVER, T.D.; QUICK, A.A.; TENG, C.C.; PIKE, A.W.; FENNESSEY, P.V.; HAY Jr., W.W. **Leucine metabolism in chronically hypoglycemic hypoinsulinemic growth-restricted fetal sheep.** *Am J Physiol*, 272: 107-17, 1997.

CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C.; DELGI, M. R.; PERAÇO, L.J.C.; **Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico, de placentas de ratas diabéticas: relação com a macrossomia e o retardo de crescimento intra-uterino.** *RBGO*; 21: 91-98, 1999.

CASCINO, A.; MUSCARITOLI, M.; CANGIANO, C.; CONVERSANO, L.; LAVIANO, A.; ARIEMMA, S.; MEGUID, M.M.; ROSSI, F. **Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer.** *Anticancer Res*, 12:507-510, 1995.

CASTEDO, M.; FERRI, K. F.; KROEMER, G. **Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic.** *Cell Death Differ*, 9: 99-100, 2002.

CHAUBE, S. K.; PRAMOD, D.; PRASAD, P. V.; TRIPATHI, V.; PHIL, M. e SHRIVASTAV, T. G. **Clomiphene citrate inhibits gonadotropin-induced ovulation by reducing cyclic**

adenosine 3=,5=-cyclic monophosphate and prostaglandin E2 levels in rat ovary. *Fert and Stert*, 3:1106-1111, 2006.

CHEN, M.K., SALLOUM, R.M., AUSTGEN, T.R., BLAND, J.B., BLAND, K.I., COPELAND III, E.M., SOUBA, W.W. **Tumor regulation of hepatic glutamine metabolism.** *Jpen J Parenter Enteral Nutr*, 15: 159–164, 1991.

CHOUDRY, H. A.; SOUBA, H. A.; LIN, C.; MENG, Q.; KARINCH, A. M.; HUANG, J.; PAN, M. **Stimulation of expression of the intestinal glutamine transporter ATB0 in tumor-bearing rats.** *Ann Surg Oncol.*, 12:1747-53, 2006.

CHUNG, M.; TENG, C.; TIMMERMAN, M.; MESCHIA, G.; BATTAGLIA, F. C. **Production and utilization of amino acids by ovine placenta in vivo.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 274:13-22, 1998.

COHN, S. H.; GARTENHAUS, W.; SAWISKY, A.; RAI, K.; ZANZI, I.; VASWANI, A.; ELLIS, K. J.; YASUMURA, S.; CORTES, E.; VARTZKY, D. **Compartmental body composition of cancer patients by measurement of total body nitrogen, potassium, and water.** *Metabolism*, 30:222-9, 1981.

COTA, D., PROULX, K., SMITH, K. A., KOZMA, S. C., THOMAS, G., WOODS, S. C., SEELEY, R. J. **Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake.** *Science*, 312: 927–930, 2006.

CUNNINGHAM FG, GANT N, LEVENO KJ, GILSTRAP III LC, AUT, JC, WENSTROM KD. *Williams obstetrics* 21st ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

DARMAUN D, DECHELOTTE P. **Role of leucine as a precursor of glutamine a-amino nitrogen in vivo in humans.** *Am J Physiol*, 260:326–9, 1991.

DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG. **Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green.** *ClinChimActa*, 1:87-96, 1971.

DUPONT, D.R.; KEIM, P.S.; CHUI, A.H.; BELLO, R.; BOZZINI, M.; WILSON, K.J. - **A comprehensive approach to amino acid analysis**. In: *Techniques in protein chemistry* (hugly, t.e., ed.), San Diego, Academic Press, Inc, chapter 28, pp.284-294, 1989.

ELEY, H. L.;RUSSELL, S. T.;TISDALE, M. J. **Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate**. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*, 6:1409-16, 2008a.

ELEY,H. L.;RUSSELL, S. T.;TISDALE, M. J.**Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate**. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*, 6:1417-26, 2008b.

EMERY PW. **Cachexia in experimental models**. *Nutrition*, 8:600-3, 1999.

EMERY PW, EDWARDS RHT, RENNIE MJ, SOUHAMI RL, HALLIDAY D. **Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer**. *BMJ* 289: 584–589, 1984.

EVANS, W.J., MORLEY, J.E., ARGILES, J., BALES, C., BARACOS, V., GUTTRIDGE, D., JATOI, A., KALANTAR-ZADEH, K., LOCHS, H., MANTOVANI, G., MARKS, D., MITCH, W.E., MUSCARITOLI, M., NAJAND,A., PONIKOWSKI, P., ROSSI FANELLI, F., SCHAMBELAN, M., SCHOLS, A., SCHUSTER, M., THOMAS,D., WOLFE, R., ANKER, S.D. **Cachexia: a new definition**. *Clin. Nutr*, 27: 793–799, 2008.

FAJANS, S. S. **Leucine-induced hypoglycemia**. *N. Engl. J. Med*, 272: 1224 –1227, 1965.

FANTUZZI, G.;R. FAGGIONI. **Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis**. *J Leukoc Biol*, 68: 437-46, 2000.

FEARON KC, VOSS AC, HUSTEAD DS; CANCER CACHEXIA STUDY GROUP. **Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis**. *Am J Clin Nutr*. 83:1345-50, 2006.

FELIG, P.; KIM, Y. J.; LYNCH, V.; HENDLER, R. **Amino acid metabolism during starvation in human pregnancy.** *J Clin Invest*, 51:1195-202, 1972.

FELIG P. **Amino acid metabolism in man.** *Annu Rev Biochem*, 44: 933–955, 1975.

FINGAR, D. C.; J. BLENIS. **Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression.** *Oncogene*, 23: 3151-71, 2004.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animals cells: a manual of basic technique.** New York: Willey-Liss, Inc. 3rd ed., 1994.

GAD, S. C. & WEIL, C. S. **Statistic for toxicologists.** In: Wallace H (editor), *Principles and Methods of toxicology.* Raven Press Ltda., New York, 221-274, 1994.

GARBER AJ, KARL IE, KIPNIS DM. **Alanine and glutamine synthesis and release form skeletal muscle. II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis.** *J Biol Chem*, 10:836–43, 1976.

GILL, T. J. **The borberland of embryogenesis and carcionogenesis. Major histocompatibility complex- linked genes affecting development and their possible relationship to the development of cancer.** *Biochim. Biophys. Acta*, 738:93-102, 1984.

GINGRAS, D.; BOUSQUET-GAGNON, N.; LANGLOIS, S.; LANCHAMBRE, M. P.; ANNABI, B.; BÉLIVEAU, R. **Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP).** *FEBS Lett*, 507: 231-6, 2001.

GRUENWALD, P. **Growth of the human fetus. I. Normal growth and its variation.** *Am J Obstet Gynecol*, 94:1112-1119, 1966.

GOMES-MARCONDES, M.C.C.; CURY, L.; PARREIRA, M. R.; ELIAS, C. F. **Effects of walker 256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy.** *Braz. J. Med. Biol. Res*, 23:909-913, 1990.

GOMES-MARCONDES, M. C. C. **Influência da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário: Estudo experimental em ratas Wistar inoculadas com carcinoma de Walker 256.** São Paulo, 1994. [Dissertação de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo].

GOMES-MARCONDES, M.C.C.; CURY, L.; CURI, R. **Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats.** *Canc Res TerContr*, 5: 277-283, 1998.

GOMES-MARCONDES, M. C.C.; HONMA, H.N.; AREAS, M.A.; CURY, L. **Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats.** *Braz J Med Biol Res*, 31: 1345-1348, 1998.

GOMES-MARCONDES, M. C. C.; VENTRUCCI G, TOLEDO MT, CURY L, COOPER JC.A **leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats.** *Braz J Med Biol Res*, 36:1589-94, 2003.

GULLINO, P. M.; GRANTHAM, F. H.; HILL, D. M.; PETTIGREW, H. M. **Effect of pregnancy and nursing on the growth of metastases from N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinomas.** *J Natl Cancer Inst*, 74: 229-34, 1985.

HARA, K.; YONEZAWA, K.; WENG, Q. P.; KOLOWSKI, M. T.; BELHAM, C.; AVRUCH, J. **Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism.** *J Biol Chem*, 273: 14484-94. 1998.

HAY, N., SONENBERG, N. **Upstream and downstream of mTOR.** *Genes Dev*, 18: 1926 – 1945, 2004.

HAY, N. **The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer.** *Cancer Cell*, 8:179-83, 2005.

HUANG, S.;P. J. HOUGHTON. **Targeting mTOR signaling for cancer therapy.** *Curr Opin Pharmacol*, 3: 371-7, 2003.

JAFFE, R. **First trimester utero-placental circulation: maternal-fetal interaction.** *J Perinat Med*, 26: 168-74, 1998.

KALHAN, S. C.; TSERNG, K.; GILFILLAN, C.; DIERKER, L. J. **Metabolism of urea and glucose in normal and diabetic pregnancy.** *Metabolism*, 31:824-33, 1982.

KALHAN, S. C. **Protein metabolism in pregnancy.** *Am J Clin Nutr*, 71:1249-55, 2000.

KHAL, J; WYLE, S. M.; RUSSELL, S. T.; HINE, A. V.; TISDALE, M. J. **Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia.** *Brit. J. of Canc*, 93: 774-80, 2005.

HEYHORNE, K. D.; WITHIN, S. S.; MC GREGOR, J. A. **Tumor necrosis factor-alpha in midtrimester amniotic fluid associated with impaired intrauterine fetal growth.** *Am. J. Obst. Gynecol*, 167:920-925, 1992.

HOLM, E.; SEDLACZEK, O.; GRIPS, E. **Amino acid metabolism in liver disease.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2: 47-53, 1999.

HONG, S. Y.; YANG, D. H.; CHANG, S. K. **The relationship between plasma homocysteine and amino acid concentrations in patients with end-stage renal disease.** *J Ren Nutr*, 8: 34-39, 1998.

HUANG, S.; HOUGHTON, P. J. **Targeting mTOR signaling for cancer therapy.** *Curr Opin Pharmacol*, 3: 371-7, 2003.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S.; NGUYEN, H.V.; SURYAWAN, A.; BUSH, JÁ.; DAVIS, T.A. **Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependent process.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279:1080-1087, 2000.

KIMURA, T.; NOGUCHI, Y.; SHIKATA, N.; TAKAHASHI, M. **Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*,

12: 49–53, 2009.

KING, R. M.; WELCH, J. S.; MARTIN, J. K.; COULAM, C.B. **Carcinoma of the breast associated with pregnancy.** *Surg Gynecol Obstet*, 160, 228-32, 1985.

KRAUSE, R., JAMES, J.H., ZIPARO, V., FISCHER, J.E. **Brain tryptophan and the neoplastic anorexia–cachexia syndrome.** *Cancer*, 44, 1003–1008, 1979.

KURODA, K., NAKASHIMA, J., KANAO, K., KIKUCHI, E., MIYAJIMA, A., HORIGUCHI, Y., NAKAGAWA, K., OYA, M., OHIGASHI, T., MURAI, M. **Interleukin 6 is associated with cachexia in patients with prostate cancer.** *Urology*, 69: 113–117, 2007.

KUSEWITT, D. F.; RUSH, L. J. **Neoplasia e biologia tumoral.** In: MCGAVIN, M. D & ZACHARY, J. F. *Bases da Patologia em Veterinária.* Rio de Janeiro: Elsevier. 253-294, 2009.

KURZER, M.; JAINSEWSKI, J.; MEGUID, M. M. **Amino acid profile in tumor-bearing and pair-fed nontumor-bearing malnourished rats.** *Cancer*, 62:1492-6, 1988.

LAINSCAK, M., FILIPPATOS, G.S., GHEORGHIADE, M., FONAROW, G.C., ANKER, S.D. **Cachexia: common, deadly, with an urgent need for precise definition and new therapies.** *Am. J. Cardiol*, 101: 8–10, 2008.

LANG U, BAKER RS, KHOURY J, CLARK KE. **Effects of chronic reduction in uterine blood flow on fetal and placental growth in the sheep.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: 53-59, 2000.

LANG, C. H.; R. A. FROST;T. C. VARY. **Thermal injury impairs cardiac protein synthesis and is associated with alterations in translation initiation.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286:740-50, 2004.

LEMONS, J. A.; ADCOCK, E. W.; JONES, M. D.; NAUGHTON, M. A.; MESCHIA, G.; BATTAGLIA, F. C. **Umbilical uptake of amino acids in the unstressed fetal lamb.** *J Clin Invest*, 58:1428-1434, 1976.

LEVIN, L.; GEVERS, W.; JARDINE, L.; DE GUEL, F. J. M.; DUNCAN, E. J. **Serum amino acids in weight-losing patients with cancer and tuberculosis.** *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*, 19:711-5, 1983.

LLOVERA M, GARCIA-MARTINEZ C, AGELL N, LOPEZ-SORINO FJ, ARGILES JM. **TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles.** *Biochem Biophys Res Commun*, 230: 238–241, 1997.

LORITE MJ, THOMPSON MG, DRAKE JL, CARLING G, TISDALE MJ. **Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor.** *Br J Cancer*, 78: 850–856, 1998.

LOWRY, O.H. et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol. Chem*, 193:265-75, 1951.

LYNCH, C. J. **Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies.** *J Nutr*, 131: 861S-865S, 2001.

LYNCH, C. J.; HUTSON, S.M.; PATSON, B. J.; VAVAL, A.; VARY, T.C. **Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283:824-35, 2002.

MAEDA, J; HIGASHIYAMA, M; IMAIZUMI, A; NAKAYAMA, T; YAMAMOTO, H; DAIMON, T; YAMAKADO, M; IMAMURA, F; KODAMA, K. **Possibility of multivariate function composed of plasma amino acid profiles as a novel screening index for non-small cell lung cancer: a case control study.** *Bmc canc*,10:690, 2010.

MANTOVANI, G., MACCIO, A., MURA, L., MASSA, E., MUDU, M.C., MULAS, C., LUSSO, M.R., MADEDDU, C., DESSI, A. **Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites.** *J. Mol. Med*, 78: 554–561, 2000.

MATSUZAKI, T.; TAKESHI, I.; KINOCHI, R.; YOSHIDA, S. ; MURAKAMI, M.; GERELTSETSEG, G.; YAMAMOTO, S.; KUWAHARA, A.; YASUI, T.; IRAHARA, MI. **Fasting reduces the KiSS-1 mRNA levels in the caudahypothalamus of gonadally intact adult female rats.** *Endocr J*,10: 6, 2011.

MALANDRO, M.S.; BEVERIDGE, M.J.; KILBERG, M.S.; NOVAK, D.A. **Ontogeny of cationic amino acid transport systems in rat placenta.** *Am J Physiol*, 267: 804-11, 1994.

MARCHINI, J.S.; MORIGUTI, J.C.; PADOVAN, G.J.; NONINO, C.B.; VIANNA, S.M.L.; OLIVEIRA, J.E.D. **Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: Aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos.** *Med*, 31: 22-30, 1998.

MARCONI, A. M.; BATTAGLIA, F. C.; MESCHIA, G.; SPARKS, J. W. **A comparasion of amino acid arteriovenous differences across the liver and placenta of the fetal lamb.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 257: E909-E915, 1989.

MARONE M, MOZZETTI S, DE RITIS D, PIERELLI L, SCAMBIA G. **Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample.** *BiolProced Online*, 3:19-25, 2001.

MAYEL-ASFAR, S.; GRIMBLE, R. F. **Tyrosine oxidation and protein turnover in maternal tissues and the fetus during pregnancy in rats.** *Bioch Bioph Acta.*, 27: 201-7, 1982.

MEADUS WJ. **A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acido n porcine muscle PPAR gene expression.** *BiolProced Onl*, 5:20-28, 2003.

MEGUID, M. M.; MEGUID, V. **Preoperative identification of the surgical cancer patient in need of postoperative supportive total parenteral nutrition.** *Cancer*, 55: 258-62, 1985.

MEGUID, M.M., MUSCARITOLI, M., BEVERLY, J.L., YANG, Z.J., CANGIANO, C., ROSSIFANELLI, F. **The early cancer anorexia paradigm: changes in plasma free tryptophan and feeding indexes.** *Jpen J Parenter Enteral Nutr*, 16: 56S–59S, 1992.

METZGER, B. E.; UNGER, R. H.; FREINKEL, N. **Carbohydrate metabolism in pregnancy. XIV. Relationships between circulating glucagon, insulin, glucose and amino acids in response to a “mixed meal” in late pregnancy.** *Metab*, 26:151-6, 1977.

MITCHELL, M.S..Doenças Neoplásicas. In “**Complicações Clínicas Durante a Gravidez**”, Burrow & Ferris, Ed. Roca, 535-566, 1996.

MILLEY, J.R.: **Ovine fetal leucine kinetics and protein metabolism during decreased oxygen availability.** *Am J Physiol*, 274: E618- 26, 1998.

MIYAJI, K; NAGAO, BANNAI, M; ASAKAWA, H; KOHYAMA, K; OHTSU,D; TERASAWA, F; ITO, S; IWAO,H; OHTANI,N; OHTA,M. **Characteristic Metabolism of Free Amino Acids in Cetacean Plasma: Cluster Analysis and Comparison with Mice.** *Plos one*, 11:1-8, 2010.

MONTAGNE, J. J.; LADRAM, A.; NICOLAS, P.; BULANT, M. **Cloning of thyrotropin-releasing hormone precursor and receptor in rat thymus, adrenal gland, and testis.** *Endocrinology*, 140:1054-9, 1999.

NISHITANI S, MATSUMURA T, FUJITANI S, SONAKA I, MIURA Y, YAGASAKI K: **Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats.** *Biochem Bioph Res Com*, 299:693-696, 2002.

NOGUCHI Y, ZHANG QW, SUGIMOTO T, FURUHATA Y, SAKAI R. **Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use.** *Am J Clin Nutr*, 83: 513S–519, 2006.

NOGUCHI Y, SHIKATA N, FURUHATA Y, KIMURA T, TAKAHASHI M. **Characterization of dietary protein-dependent amino acid metabolism by linking free amino acids with transcriptional profiles through analysis of correlation.** *Physiol Genomics*, 34: 315–326, 2008.

NORREN, K. V., KEGLER, D., ARGILÉS, J. M., LUIKING, Y., GORSELIN, M., LAVIANO, A., ARTS, K., FABER, J., JASEN, H., VAN DER BEEK, E. M., VAN HELVOORT, A. **Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice.** *British J of Canc*, 100: 713 – 722, 2009.

O'KEEFE SJD, OGDEN J, RAMJEE G, RUND J. **Contribution of elevated protein turnover and anorexia to cachexia in patients with hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res*, 50: 1226–1233, 1990.

PASINI, E., AQUILANI, R., DIOGUARDI, F.S., D'ANTONA, G., GHEORGHIADE, M., TAEGTMEYER, H. **Hypercatabolic syndrome: molecular basis and effects of nutritional supplements with amino acids.** *Am. J. Cardiol*, 101: 11e–15e, 2008.

PITKIN, R. M. **Components of weight gain during pregnancy.** In: SCHNEIDER H.A., ANDERSOM, C. E., COUSIN, D. B. B. *Nutritional support of medicine practice.* Hagerstown, MD: HARPER & ROW, 407-21, 1977.

RADIMERSKI, T.; RADIMERSKI, T.; MONTAGNE, J.; RINTELEN, F.; STOCKER, H.; VAN DER KAAY, J.; DOWNES, C.P.; HAFEN, E.; THOMAS, G. **dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1.** *Nat Cell Biol*, 4: 251-5, 2002.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, Jr. G.C. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents, final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet.** *J Nutr*, 123: 1939-51, 1993.

REID, M.B.; LI, Y.P. **Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective.** *Respir. Res*, 2: 269–272, 2001.

RIVERA, S., AZCON-BIETO, J., LOPEZ-SORIANO, F.J., MIRALPEIX, M., ARGILES, J.M. **Amino acid metabolism in tumour-bearing mice.** *Biochem. J*, 249: 443–449, 1988.

ROSA, J.C.; BELTRAMINI-SABBAG, L.M.; GREENE, L.J. **Quantitative HPLC analysis of phenylisothio-carbamyl-amino acids at picomol levels.** *XVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBq) – Caxambu/MG, 22 a 25/04/87 – Arq. Biol. Tecnol.* 30(1): 35, 1987.

ROSENWALD, I. B. **Growth factor-independent expression of the gene encoding eukaryotic translation initiation factor 4E in transformed cell lines.** *Cancer Lett*, 98: 77-82, 1995.

ROOS, S.; JANSSON, N.; PALMBEG, I.; SALJO, K.; POWELL, T.L.; JANSSON, T. **Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth.** *The J of phys.* 582, 449-459, 2007.

RUSSELL ST, SIREN PM, SIREN MJ, TISDALE MJ. **Attenuation of skeletal muscle atrophy in cancer cachexia by D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate.** *Cancer Chem Pharm*, 64:517-27, 2009.

RUSSO, I. H.; KOSZALKA, M.; RUSSO, J. **Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis.** *Br. J. Cancer*, 64:481-4, 1991.

SAINI, A.; NASSER, A. L. S.; STEWART, C. E. H. **Waste management-Cytokines, growth factors and caquexia.** *Cytokine & growth factor*, 17:475-486, 2006.

SAUER, L. A. & DAUCHY, R. T. **Tumor-host metabolic interrelationships.** *Biochem. Soc. Trans*, 18: 80-82, 1990.

SCHOENGOLD, D. M.; DEFIORE, R. H.; PARLETT, R. C. **Free amino acids in plasma throughout pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol*, 131:490-9, 1978.

SILEN, M. L.; FIRPO, A.; MORGELLO, S.; LOWRY, S. F.; FRANCUS, T. **Interleukin-1- α and tumor necrosis factor- α cause placental injury in the rat.** *Am. J. Pathol*, 135:239-244, 1989.

SOARES, M.J.; SCHABERG, K.D.; PINAL, C.S.; DE, S.K., BHATIA, P.; ANDREW, G.K. **Establishment of a rat placental cell line expressing characteristics of extraembryonic membranes.** *Developmental Biology*, 124: 134-44, 1987.

SOETERS, P.B.; FISCHER, J.E. **Insulin, glucagon, aminoacid imbalance, and hepatic encephalopathy.** *Lancet*, 2: 880–882, 1976.

SOLTESZ G, SCHULTZ K, MESTYAN J, HORVATH I. **Blood glucose and plasma amino acid concentrations in infants of diabetic mothers.** *Pediatrics*, 61: 77– 82, 1978.

SOUBA, W.W. **Glutamine and cancer.** *Ann. Surg*, 218, 715–728, 1993.

SHE, P.; REID, T. M.; BRONSON, S. K.; VARY, T. C.; HAJNAL, A.; LYNCH, C. J.; HUTSON, S. M. **Disruption of BCATm in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle.** *Cell Metab.* 6, 181–194, 2007.

SHIMOMURA, Y.; FUJII, H.; SUZUKI, M.; MURAKAMI, T.; FUJITSUKA, N.; NAKAI, N. **Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in rat skeletal muscle: regulation of the activity and gene expression by nutrition and physical exercise.** *J. Nutr*, 125: 1762S-1765S, 1995.

SHIMOMURA, Y.; HARRIS, R.A. **Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1.** *J. Nutr*, 136: 232S-233S, 2006.

STOUTHARD, J.M.; ROMIJN, J.A.; VAN DER POLL, T.; ENDERT, E.; KLEIN, S.; BAKKER, P.J.; VEENHOF, C.H.; SAUERWEIN, H.P. **Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans.** *Am J Physiol*, 268: 813-9, 1995.

TAYEK, J.A., BISTRAN, B.R., HEHIR, D.J., MARTIN, R., MOLDAWER, L.L., BLACKBURN, G.L. **Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial.** *Cancer*, 58: 147–157, 1986.

TOM, A.; NAIR, K.S. **Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers.** *J. Nutr.*, 136: 324S-330S, 2006.

TISDALE, M.J. **Cachexia in cancer patients.** *Nat Rev Cancer*, 11:862-71, 2002.

TISDALE, M.J. **Mechanisms of cancer cachexia.** *Physiol Rev*, 89:381-410, 2009.

TRINDER, P. **Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non carcinogenic chromogen.** *J. Clin. Path*, 22:158-61, 1969.

TOLEDO, M.T.; GOMES-MARCONDES, M. C. **Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma.** *Oncology Research*, 11: 359-66, 1999.

TOLEDO, M. T.; GOMES-MARCONDES, M. C. **Placental glycogen metabolism changes during Walker tumour growth.** *Placenta*, 25: 456-62, 2004.

TOM, A.; NAIR, K.S. **Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers.** *J. Nutr.*, 136: 324S-330S, 2006.

UKCCR: **United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia.** *Laboratory Animals*, 22: 195- 201, 1998.

VALE, C.; STEWART, L.; TIERNEY, J.; UK COORDINATING COMMITTEE FOR CANCER RESEARCH NATIONAL REGISTER OF CANCER. **Trends in UK cancer trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials.** *Br. J. Cancer*, 92:811-4, 2005.

VARY, T. C.; LYNCH, C. J. **Meal feeding stimulates phosphorylation of multiple effector proteins regulating protein synthetic processes in rat hearts.** *J Nutr*, 136: 2284-90, 2006.

VENTRUCCI, G.; RAMOS- SILVA, L.G.; ROSTON -MELLO, M. A.; GOMES-MARCONDES, M. C. **Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats.** *Nutrition*, 20: 213-7, 2004.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M. A.; GOMES-MARCONDES, M. C. **Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats.** *BMC Cancer*, 6: 42, 2007.

WAGENMAKERS, A.J. **Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism.** *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 26: 287-314, 1998.

WATANABE, A.; HIGASHI, T.; SAKATA, T.; NAGASHIMA, H. **Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma.** *Cancer*, 54: 1875–1882, 1984.

WEINLICH, G.; MURR, C.; RICHARDSEN, L.; WINKLER, C.; FUCHS, D. **Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients.** *Dermatology*, 214: 8–14, 2007.

WILLIANSOM, D. H.; WOOD, S.; EVANS, R. D. **Tumor growth and lipid metabolism during lactation in the rat.** *Adv. Enzyme Regul*, 27: 93-104, 1988.

WOLFE, R. R. **Control of muscle protein breakdown: effects of activity and nutritional states.** *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 11:164-9, 2001.

WOODS, S. C. **The eating paradox: How we tolerate food.** *Psychol. Rev*, 98: 488–505, 1991.

WOODS, S. C.; LUTZ, T. A.; GEARY, N.; LANGHANS, W. **Pancreatic signals controlling food intake;insulin, glucagon and amylin.** *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361: 1219–1235, 2006.

XIAO N, LI H, LUO J, WANG R, CHEN H, CHEN J, WANG P. **Ubiquitin-Specific Protease 4 (USP4) targets TRAF 2 and TRAF6 for deubiquitination and inhibits TNF α -induced cancer cell migration.** *Biochem J*, 441:979:86, 2011.

ZEMLICKIS, D.; LISHNER, M.; DEGENDORFER, P.; PANZARELLA, T.; BURKE, B.; SUTCLIFFE, S.B.; KOREN, G. **Maternal and fetal outcome after breast cancer in pregnancy.** *Am J Obstet Gynecol*, 166: 781-7, 1992.

Anexo 1 Protocolo comitê de ética



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1925-1**, sobre "**Avaliação do perfil de aminoácidos fetal e materno e atividade placentária em camundongas NMR1 portadoras do adenocarcinoma de cólon (MAC 16)**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes / Laís Rosa Viana**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **31 de agosto de 2009**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1925-1**, entitled "**Fetal and maternal amino acid profile and placental activity in MAC 16 tumour-bearing mice submitted to leucine rich diet**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **August 31, 2009**.

Campinas, 31 de agosto de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 2. Tabela 5. Composição das dietas semipurificadas baseada na AIN-93G(REEVES et al, 1993). ¹ Doação da *Corn Products Brazil*. ² Segundo AIN-93G. ³ Doação da Ajinomoto Brasil.

| Ingredientes | Dietas | |
|-----------------------------------|----------------|---------------|
| | Controle (3kg) | Leucina (3kg) |
| Amido ¹ | 1.193g | 1.163g |
| Caseína | 600g | 600g |
| Dextrina ¹ | 396g | 366g |
| Açúcar | 300g | 270g |
| Fibra de celulose | 150g | 150g |
| Mistura de sais ² | 105g | 105g |
| Mistura de vitaminas ² | 30g | 30g |
| Cistina ³ | 9g | 9g |
| Colina | 7,5g | 7,5g |
| Óleo de soja | 210g | 210g |
| Leucina ³ | - | 90g |

Modo de preparo das dietas Em ambas as dietas, os ingredientes foram pesados em balança convencional, misturados e por fim passados em máquina, para adquirir o formato ideal da dieta.

O amido foi cozido com o auxílio de um microondas, e os demais ingredientes foram somente pesados e peneirados.