

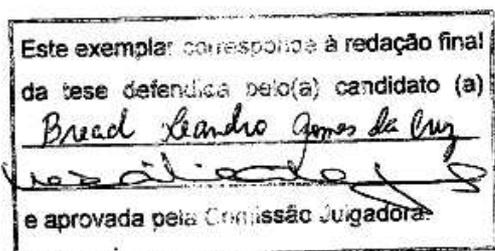
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Bread Leandro Gomes da Cruz**

**Metabolismo protéico e estresse oxidativo em  
musculatura de fetos provenientes de ratas portadoras  
de tumor submetidas à dieta rica em leucina**



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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

**Campinas 2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C889m

Cruz, Bread Leandro Gomes da  
Metabolismo protéico e estresse oxidativo em musculatura de fetos provenientes de ratas portadoras do tumor submetidas à dieta rica em leucina / Bread Leandro Gomes da Cruz. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Feto - Fisiologia. 2. Prenhez. 3. Nutrição - Aspectos fisiológicos. 4. Câncer. 5. Leucina. I. Marcondes, Maria Cristina Cintra Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Protein metabolism and oxidative stress in fetal muscle proceeding from tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet.

**Palavras-chave em inglês:** Fetus - Physiology; Pregnancy; Nutrition - Physiological aspects; Cancer; Leucine.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Miguel Arcanjo Áreas, Maria Alice Rostom de Mello.

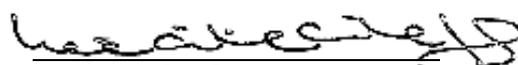
**Data da defesa:** 07/08/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 07 de agosto de 2007

BANCA EXAMINADORA

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



---

Assinatura

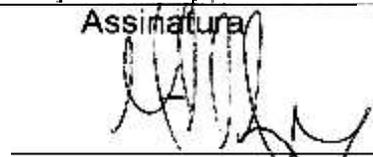
Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello



---

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



---

Assinatura

Prof. Dr. Camilo José Novelo

---

Assinatura

Profa. Dra. Gislaine Ventrucchi

---

Assinatura

**“Da vida não se leva nada. Vamos sorrir e cantar” S.S.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a todo o pessoal do Lab 10 pela força, companheirismo e momentos de descontração: Gi, Mi, Clau, Tati, André, Marcos, Dani, Ângela, Estela.

Agradeço ao pessoal do Depto. Fisiologia pelo carinho: Dna. Zefa, Ale, Ivo, Lécio, Washington, Marcelo.

Agradeço ao prof. Miguel pelo incentivo e exemplo de professor.

Agradeço em especial a profa. Cristina pela dedicação e empenho na minha orientação. Sem ela isso não seria possível. Me espelho em seu profissionalismo e conduta para seguir o meu caminho. Um exemplo de pessoa e de professora.

Agradeço aos amigos de todas as horas, com eles a vida é sempre mais alegre: Santoro, Diler, Bruno, July, Cecília, Camila, Marcão, Oso, Shin e Bitá.

Não posso esquecer a minha família que me deu todo o suporte e apoio para chegar até aqui. Sem vocês eu não seria nada. Mãe (Wanda), Pai (Gomes), irmãzinha (Dani). Vocês são muito importantes para mim. Sempre tenho o meu porto seguro em casa.

Agradeço a meus primos, tios e tias que estão sempre presentes na minha vida. Família unida. Xandão, Dri, Nessola, Cláudio, Vi, Glauco, Richard, Talita, Rose, Geio, Dani, Everton, Laine, Digo, Vado, Lú, Tia Gina, Tia Cida, Cezão.

Agradeço ao Seu Tarcísio, Dona Lídyá e Eiki pelo carinho. Me sinto em casa com vocês.

E por último e não menos importante agradeço a minha Yedinha que me apóia em todos os momentos (principalmente neste aqui). Te amo muito, você é muito importante para mim e me completa em tudo!

**Muito obrigado a todos!**

## Resumo

Câncer acomete, aproximadamente, uma entre 3000 gravidezes e causa um terço de mortes maternas. A leucina é usada experimentalmente para minimizar as alterações do metabolismo protéico durante o crescimento tumoral. Este trabalho investigou os efeitos do crescimento tumoral sobre o metabolismo protéico e estresse oxidativo nos fetos provenientes de ratas alimentadas com dieta suplementada com leucina. Os grupos de fêmeas prenhes foram divididos da seguinte forma: controle (C), controle com dieta suplementada com leucina (L), tumor (W), tumor com dieta suplementada com leucina (WL), dieta pareada á ingestão diária das ratas do grupo W (Cp), dieta suplementada com leucina e pareada á ingestão diária das ratas do grupo WL (Lp). Após 20 dias de prenhes os músculos fetais foram analisados. Os resultados mostraram que a síntese protéica fetal foi reduzida no grupo W quando comparados aos outros grupos. Houve significativa recuperação da síntese protéica no músculo dos fetos WL sugerindo efeito positivo do uso de aminoácido de cadeia ramificada nessa situação. Ocorreu aumento significativo da degradação protéica nos fetos W. Essa perda protéica foi amenizada pelo uso da dieta suplementada com leucina indicando efeito benéfico sobre a degradação protéica no grupo WL que obteve valores similares ao observado no grupo C. A atividade da enzima glutationa-S-transferase ficou elevada no músculo de fetos WL em comparação com o grupo W. Também houve aumento na atividade da enzima fosfatase alcalina no grupo WL indicando maior atividade celular nesse grupo quando comparado ao grupo W. A presença de MDA (Malondialdeído) no músculo fetal também ficou reduzida nos fetos WL. Com a análise desses parâmetros conclui-se que a dieta suplementada com leucina pode alterar o metabolismo muscular fetal aumentando a síntese protéica e reduzindo o efeito danoso do estresse oxidativo.

## **Abstract**

Cancer occurs in approximately 1 per 3.000 pregnancies and accounts for one-third of maternal deaths. Leucine has been used experimentally to minimize the protein metabolism changes during tumor growth. The present work investigated the effects of tumor growth on muscle protein metabolism and oxidative stress in fetus pregnant rats fed a leucine-rich diet. Fetal groups from pregnant Wistar rats were: control (C), control fed leucine-rich diet (L), tumor-bearing (W), tumor-bearing fed leucine-rich diet (WL), Pair-fed control (P) and Pair-fed Leucine (PL). After 20 days the fetal muscles were analyzed. The results showed that fetal protein synthesis was decreased in W group, when compared to the other groups. The significantly recover on muscle protein synthesis in fetus of WL group suggested a positive effect of this branched-chain amino acid. There was a significant increase on protein degradation in W fetus and a protective effect of the leucine-rich diet on muscle protein waste in WL group, since it was similar to C group. The muscle enzyme glutathione-S-transferase activity was increased in WL fetus in comparison to W group. The muscle alkaline phosphatase activity increased in WL group. The malondialdehyde content (MDA) in fetal muscle was decreased in WL fetus. The leucine supplemented diet can alter the fetal muscle protein metabolism, improving the fetal muscle protein synthesis and reducing the oxidative stress.

## Sumário

Resumo.....	vi
Abstract .....	vii
Introdução.....	2
Gravidez .....	3
Câncer.....	5
Câncer associado a gravidez.....	5
Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) associados ao câncer.....	6
Objetivos .....	9
Artigo 1: a ser submetido no periódico internacional “ <i>Placenta</i> ” .....	10
Leucina afeta o metabolismo protéico muscular em fetos de ratas portadores do carcinossarcoma de Walker 256.....	10
Resumo.....	10
Introdução.....	11
Materiais e métodos.....	12
1 – Animais .....	12
2 – Dietas.....	13
3 – Protocolo experimental.....	13
4 – Síntese e degradação protéica.....	14
5 – Western Blot para avaliação do sistema ubiquitina-proteossomo .....	15
6 – Determinação de proteína total muscular e enzimas calpaína, catepsina e quimiotripsina.....	15
7 – Determinação de albumina e proteína sérica .....	16
8 – Análise estatística .....	16
Resultados .....	17
Discussão.....	25
Artigo 2: trabalho a ser submetido no periódico “ <i>Placenta</i> ”.....	29
Suplementação nutricional com leucina minimiza estresse oxidativo muscular fetal decorrente da presença do carcinossarcoma de Walker 256.....	29
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Materiais e métodos.....	32
1 – Animais .....	32
2 – Dietas.....	32
3 – Protocolo experimental.....	33
4 - Atividade das enzimas envolvidas no processo de estresse oxidativo celular.....	34
5 – Determinação de glicose sérica e de células vermelhas.....	35
6 – Análise estatística .....	35
Resultados .....	35
Discussão.....	43
Conclusão.....	46
Referências bibliográficas .....	47

## Introdução

Câncer associado à gravidez é uma situação clínica delicada onde a saúde da mãe fica em conflito com a do feto. Apesar de parecer uma situação muito rara alguns dados demonstram que, por exemplo, uma em cada 3000 mulheres apresenta gravidez associada com câncer de mama e que quanto mais avançada a idade materna maior a chance de ocorrer este tipo de associação. Dados da literatura mostram que a incidência de câncer durante a gravidez é de 2% para mulheres entre 15-32 anos e que sobe para 23 % em mulheres acima de 40 anos. Como as mulheres estão cada vez mais postergando suas gravidezes, a incidência de câncer durante a gestação tende a aumentar com a passar dos anos (LOIBL *et al*, 2006).

Existe o dilema entre salvar a vida da mãe e afetar drasticamente a saúde do feto, podendo causar-lhe a morte, ou continuar com a gravidez e arriscar a vida de ambos. Os tratamentos disponíveis para o câncer devem ser bem analisados antes de serem aplicados para definir sua real ação sobre o desenvolvimento fetal. A quimioterapia e radioterapia não são indicadas para o início da gestação, mas cada dia que passa sem tratamento, o organismo materno pode sofrer danos irreversíveis. Por esta razão é necessária a busca de tratamento capaz de levar essa gestação a termo, sem que ocorra a proliferação descontrolada do tumor. Isto pode se tornar a solução prática para este dilema entre sobrevivência materna ou fetal.

Por outro lado, pesquisas atuais têm mostrado que a utilização de terapias coadjuvantes às terapias clínicas convencionais melhora o estado clínico do paciente com câncer, principalmente, a sua qualidade de vida. Os aminoácidos de cadeia ramificada, também, conhecidos como BCAAs (*Branched-Chain Amino Acids*) englobam a valina (Val), isoleucina (Iso-Leu) e leucina (Leu) estão sendo estudados há bastante tempo, pelo fato de modularem determinadas etapas do metabolismo protéico corpóreo e atuar com efeito protetor sobre a ação do estresse oxidativo. Estudos mostram que a administração como suplemento alimentar de BCAAs estimula positivamente a síntese protéica, além disso atua negativamente no processo catabólico.

Atualmente, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado resultados animadores de redução do efeito da caquexia causada por tumores, quando há administração de dieta rica em leucina. Em trabalhos prévios foi mostrado que a leucina pode controlar os efeitos produzidos pela evolução tumoral, como minimizar o efeito devastador da caquexia ou o efeito lesivo do estresse oxidativo. Durante a gravidez a administração de dieta rica em

leucina pode proteger o organismo materno e, como conseqüência, o organismo fetal. Se ocorrer a presença de tumor, os efeitos por este produzidos podem ficar atenuados e a gravidez se desenvolver a termo.

Portanto apesar da associação entre gravidez e câncer não ser rara, ainda são escassos os trabalhos encontrados na literatura sobre as alterações fisiológicas que ocorrem na associação câncer e gravidez.

Assim, o presente trabalho busca investigar a ação deste aminoácido – leucina – sobre os fetos provenientes de mães portadoras de tumor. Estudos que proporcionam a melhor compreensão dessas alterações materna e fetal, associada à suplementação nutricional, podem ser de grande valia ou mesmo sugerirem métodos terapêuticos visando à melhora da qualidade de vida durante gravidez e, conseqüentemente, bem estar ao crescimento e desenvolvimento fetal.

## **Gravidez**

A gravidez, por si só, é um estado fisiológico único, que consiste em uma série de pequenos e contínuos ajustes fisiológicos que afetam o metabolismo de todos os nutrientes. Sem dúvida estes ajustes variam de mulher para mulher, dependendo do estado nutricional durante a gravidez, determinantes genéticos do tamanho fetal e estilo de vida materno. Estudos de metabolismo de proteína e do metabolismo energético demonstram o potencial de ajuste no uso desses nutrientes para manter a demanda fetal integral. A necessidade de energia para o metabolismo basal do feto é influenciada pelo estado nutricional materno pré-gravidez e, também, pelo tamanho desse feto. Se a reserva de energia materna é baixa no momento da concepção, a taxa metabólica basal é *downregulated* para conservar energia. Na gravidez múltipla, também, ocorre grande aumento na taxa metabólica basal e diminuição no armazenamento de energia. Mudanças na alimentação e na atividade física materna durante a gestação pode aumentar os ajustes fisiológicos. No entanto, variação substancial na ingestão de alimentos e na atividade física tornam difíceis estes ajustes (KING JC, 2000).

A demanda fetal pode dobrar o requerimento por nutrientes materno. Para proteger o desenvolvimento fetal, muitos mecanismos são envolvidos para garantir o fornecimento adequado de nutrientes. Um destes mecanismos é a redução na taxa de síntese lipídica e de armazenamento de gorduras pelo corpo materno, assim como aumento de consumo de alimento com conseqüente aumento de energia ingerida.

Gravidez é um estado dinâmico e predominantemente anabólico. O surgimento de um novo órgão endócrino, a placenta, promove a secreção de hormônios que afetam o metabolismo de todos os nutrientes. Esta característica contribui com os ajustes necessários na homeostase materna, desenvolvimento fetal e desenvolvimento e manutenção da gravidez.

Por esse motivo a relação materno-fetal deve ser precisamente regulada, pois alterações útero-placentárias podem acarretar sérios problemas, comprometendo, principalmente, a nutrição fetal. Pode-se observar isto durante a desnutrição materna, onde a placenta sofre adaptações quanto ao seu tamanho visando absorção mais eficiente de nutrientes e, conseqüentemente, isto pode acarretar hipertensão e alteração no metabolismo de glicose/insulina nos recém-nascidos (BARKER, 1997). A falta ou menor disponibilidade de nutrientes, inclusive de micronutrientes, em função destas alterações útero-placentárias, promovem redução da incorporação de substratos pelo feto, causando-lhe alterações metabólicas e bioquímicas que acarretam dificuldade de distribuição de nutrientes para todos os tecidos levando ao comprometimento do feto com retardo do seu desenvolvimento muitas vezes acompanhado de seqüelas.

A alteração no estado fisiológico materno, para dar suporte ao crescimento fetal, depende da ingestão adequada de nutrientes. Para isto um aumento na absorção intestinal ou uma redução na excreção via rins ou trato gastrointestinal ocorre, tornando o organismo materno adaptado aos ajustes necessário para sustentar a gestação (KING, 2000).

O feto obtém toda sua energia da glicose proveniente do sangue materno e, também, outros nutrientes, como grandes quantidades de aminoácidos, ferro, cálcio, fósforo e vitaminas, tão importantes para o seu metabolismo e desenvolvimento (MOORE, 2000). Desse modo, o feto utiliza aminoácidos como fonte de carbono e nitrogênio para a síntese protéica, como fonte de energia através da reação de oxidação e como interconversores para outros substratos metabólicos (ALDORETTA & HAY, 1994).

No caso de restrição de aminoácidos e outros micro ou macronutrientes, o feto pode apresentar comprometimento cerebral e de outros órgãos vitais, retardo no crescimento intrauterino como, também, falência fetal (CHERIF *et al*, 2001). O retardo de crescimento intra-uterino (IUGR) nos países em desenvolvimento apresenta-se como grande problema de saúde pública. Estima-se que 30 milhões de recém-nascidos (23,8% de 126 milhões de nascimentos por ano) apresentam IUGR a cada ano, enquanto que

nos países desenvolvidos essa taxa é de apenas 2%, sendo que a dieta materna pobre em proteínas é um dos principais fatores para esta ocorrência (OPAS/OMS, 2000).

## **Câncer**

Perda de peso e desnutrição estão entre as características mais comuns observadas em pacientes com câncer associado ao prolongado estresse catabólico. Mais de 50% dos pacientes com câncer apresentam excessiva perda de peso demonstrando quadro de caquexia. E esta situação é citada como sendo a causa mais freqüente de morbidade e mortalidade (CHOUDRY *et al* 2006). Manutenção de nutrição adequada e preservação de massa magra podem aumentar a sobrevivência de pacientes em estado catabólico.

O tumor Walker 256 é extensivamente usado em modelos experimentais para induzir caquexia em ratos (FREITAS *et al*, 2001). A caquexia é uma condição caracterizada pela redução da ingestão de comida, progressiva perda de peso e intenso catabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (FREITAS *et al*, 2001).

O estresse oxidativo pode ser decorrente de uma dieta inadequada em antioxidantes (como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatona), produção excessiva de radicais livres (pela exposição a drogas ou toxinas) ou através da constante ativação do sistema natural de produção de radicais (*p.e.* fagocitose em doenças inflamatórias crônicas); a célula tolera até certo nível de estresse e, através do seu sistema defensivo de auto-regulação de enzimas antioxidantes, tenta restabelecer o equilíbrio, no entanto o aumento do estresse oxidativo produz danos no DNA e em proteínas (incluindo transportadores de íons na membrana), produz peroxidação lipídica, fazendo com que ocorra prejuízo celular ou até mesmo sua morte (HALLIWELL, 1996). A presença de tumor altera constantemente o equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e enzimas antioxidantes (FREITAS *et al*, 2001).

## **Câncer associado a gravidez**

Câncer afeta aproximadamente uma entre mil grávidas e é responsável por um terço das mortes maternas durante a gestação (PAVLIDIS & PENTHEROUDAKIS, 2005). Os tumores malignos comumente diagnosticados durante a gravidez são aqueles com alta incidência durante o período reprodutivo, como por exemplo: câncer de mama, melanoma, câncer da tireóide, linfomas. O sistema reprodutivo é afetado pelo crescimento

tumoral maligno mais freqüentemente que outros sistemas durante a gravidez, sendo que a mama e o cervix são os principais locais afetados seguidos pelo ovário e endométrio. Aproximadamente 3% das mulheres das quais foram detectados câncer do sistema reprodutivo terá gravidez concomitante com o tumor (PAVLIDIS & PENTHEROUDAKIS, 2005). Estudos experimentais mostram que ratas portadoras de carcinossarcoma apresentaram cerca de 70% de reabsorção e 50% de morte fetal (GOMES-MARCONDES, 1994 e 1998; CERVELLO *et al.*, 1992).

Não só o organismo materno sofre com a presença de tumor durante a gestação, mas também o feto é afetado profundamente. O tumor desvia recursos necessários ao desenvolvimento fetal, como glicose e aminoácidos, para seu próprio desenvolvimento e a morte fetal ou perinatal ocorre em cerca de 48% dessas gestações (KING *et al.*, 1985). O aparecimento de má formação, distúrbios mentais ou metabólicos podem ocorrer devido à falta de nutrientes essenciais ao correto desenvolvimento fetal. O retardo no crescimento intra-uterino é uma constante em gestações concomitantes com tumor acarretando em deficiências tanto durante a gestação como na vida pós-natal deste feto. Diabetes, problemas cardíacos são alguns exemplos de seqüelas observadas na vida adulta e que foram originadas durante vida intra-uterina pelo retardo do crescimento fetal.

Nesta interação entre crescimento neoplásico e gravidez temos vários processos metabólicos envolvidos e um dos mais importantes e que causam maiores danos quando em desequilíbrio é o estresse oxidativo. Isto ocorre pelo fato do feto poder ser comparado a um rápido crescimento tumoral e sua taxa de crescimento exponencial depende do adequado suprimento de glicose e aminoácidos (CARBO *et al.*, 1996). Assim o organismo materno tende, também, a sustentar ambos os processos de crescimento, tumoral e fetal, porém o crescimento tumoral causa o desequilíbrio no metabolismo protéico e oxidativo, tanto materno quanto fetal, reduzindo a qualidade da gestação e podendo levar à morte do feto e/ou mãe.

### **Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) associados ao câncer**

Os BCAAs são essenciais para o ser humano. BCAA exógeno, proveniente da dieta, é necessário para função celular normal. Todos os aminoácidos ingeridos, incluindo os BCAAs, são absorvidos pelo intestino delgado levados até o fígado onde são disponibilizados para a circulação sistêmica. Presente na circulação os BCAAs podem

interagir com as células do organismo regulando a síntese e degradação de proteínas e funcionando como precursores na síntese de glutamina e alanina (CHOUDRY *et al* 2006).

Oxidação de BCAAs na musculatura disponibiliza nitrogênio para a gliconeogênese. Pacientes com perda de peso, causada pela presença de câncer, demonstram aumento das taxas de gliconeogênese e seu substrato energético provém principalmente da degradação muscular. Neste caso a suplementação com BCAAs mostra-se interessante, pois protege a degradação protéica esquelética e mantém a gliconeogênese funcionando para sustentar o aporte energético ao paciente (BARACOS e MACKENZIE, 2006).

Metabolismo no músculo esquelético fica restrito a ação de seis aminoácidos: Glutamato, Aspartato, Asparagina e os três BCAAs leucina, Iso-leucina e valina. Dentre estes aminoácidos a leucina modula os efeitos na musculatura esquelética mais notadamente que os outros (NORTON & LAYMAN, 2006).

Os BCAAs têm uma função vital na regulação do metabolismo de proteínas. BCAAs exógenos, principalmente leucina, estimula a síntese protéica na musculatura isolada ou perfundida de ratos, assim como através da administração oral *in vivo*. Estudos em animais e em ensaios clínicos demonstraram que suplementação com BCAAs aumenta o balanço de nitrogênio e recupera o organismo após acometimento por queimaduras, danos por radiação, estresse pós-cirúrgico, sépsis e câncer. (CHOUDRY *et al* 2006)

Recentes estudos têm demonstrado que os BCAAs, mais uma vez com ação destacada para a leucina, assumem importante papel regulador no metabolismo protéico. Trabalhos, tanto *in vivo* como *in vitro*, corroboram para o fato de que dieta suplementada com leucina estimula a síntese protéica, principalmente em musculatura esquelética (GARLICK, 2005), podendo reverter o quadro de catabolismo protéico. Isto é explicado através de duas vias de ação para a leucina: uma via através da interação com os níveis de insulina e a outra via, ainda não bem definida, onde a leucina atua como sinalizadora da síntese protéica muscular (GARLICK, 2005).

Pelo fato do reconhecido potencial dos efeitos benéficos dos BCAAs, o número de ensaios clínicos tem crescido bastante ultimamente, mas infelizmente apresentam grupos pequenos e variados de pacientes, não permitindo padronizar doses adequadas, composição e duração da suplementação nutricional. Mesmo assim, os trabalhos mostram interações entre dietas suplementadas com BCAAs e recuperação de pacientes com câncer ou em estado pós-cirúrgico, assim como, melhoria nas taxas de morbidade e

mortalidade em pessoas com carcinoma hepatocelular indicando avanços no controle de mecanismos de estresse oxidativo nestas situações (CHOUDRY *et al* 2006).

Garlick (2005) realizou em seu trabalho experimentos para analisar a síntese protéica em músculo esquelético de ratos através da administração dos três aminoácidos em conjunto (BCAAs) e isolados (Val, Iso-Leu e Leu). A taxa de síntese protéica foi de aproximadamente 13% acima do controle quando os animais receberam Leu ou os três BCAAs em conjunto, ou isoladamente com val e iso-leu apresentaram taxas significativamente menores, demonstrando que o grande responsável por estimular a síntese protéica na musculatura esquelética dentre os BCAAs é a leucina.

## **Objetivos**

Estudos na área nutricional demonstram que, principalmente, a suplementação protéica age como alternativa bastante promissora, consolidando-se como segmento bastante importante em resultados eficientes e animadores, provavelmente melhorando as deficiências e carências aqui relatadas. Por essa razão, são necessários mais conhecimentos sobre a fisiologia fetal e alterações fisiopatológicas que ocorrem sobre crescimento e desenvolvimento fetal durante a gestação associada ao desenvolvimento de câncer, para que se consiga propor métodos preventivos e protetores tanto para pacientes grávidas portadoras de neoplasia quanto para o feto.

Assim os objetivos deste trabalho foram estudar a fisiologia de fetos provenientes de ratas portadoras do tumor de Walker, submetidas à suplementação nutricional com dieta rica em leucina, usando análises bioquímicas e moleculares para evidenciar alterações relacionadas ao metabolismo protéico fetal, com enfoque na síntese protéica e estresse oxidativo muscular.

## **Artigo 1: a ser submetido no periódico internacional “Placenta”**

### **Leucina afeta o metabolismo protéico muscular em fetos de ratas portadores do carcinossarcoma de Walker 256.**

Bread Leandro Gomes da Cruz & Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes. Depto de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, cep 13083970, Brasil.

**Key words:** Câncer, Feto, Suplementação Nutricional, Aminoácidos de Cadeia Ramificada, Metabolismo Protéico.

**Running title:** Metabolismo protéico fetal em mães com câncer.

#### **Resumo**

A gestação, quando concomitante ao tumor, apresenta alterações não só do metabolismo materno como do fetal. Esta associação afeta o balanço protéico e interfere tanto na síntese como na degradação de proteína muscular. Os aminoácidos de cadeia ramificada podem atuar na regulação do metabolismo e conferir efeito protetor ao organismo com tumor. No presente estudo foram utilizados músculos gastrocnêmios e soro de fetos provenientes de ratas prenhes distribuídas nos seguintes grupos: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Os resultados mostraram que houve decréscimo do peso fetal nos grupos com tumor. Associado a redução de peso fetal, a concentração de proteína total sérica no grupo W foi a menor concentração obtida para a proteína de soro fetal, representando diminuição de 27% em relação ao grupo controle, C. Albumina apresentou níveis reduzidos apenas no grupo W. Proteína muscular decresceu nos grupos W e WL. A síntese protéica reduziu-se apenas no grupo W, sendo que no grupo WL houve recuperação, mostrando níveis semelhantes aos outros grupos. A degradação protéica elevou-se apenas nos grupos L e W, sendo que nos outros grupos a taxa de degradação protéica apresentou valores semelhantes. Atividade da *quimotripsina-like* aumentou no grupo W e os fetos das mães WL tenderam ao aumento da atividade, porém menor que o grupo W e com valores semelhantes ao C, Cp e Lp. A atividade da catepsina H foi significativamente mais elevada nos fetos do grupo W em relação aos demais grupos experimentais. A via proteolítica dependente de cálcio mostrou atividade enzimática da calpaína semelhante em todos os grupos experimentais, sugerindo a não participação desse sistema no processo de catabolismo muscular fetal das mães portadoras de tumor de Walker. Os fetos provenientes de ratas WL tiveram proteção do metabolismo protéico com similaridade aos valores observados nos grupos controles.

## Introdução

Gravidez concomitante ao câncer representa aproximadamente uma entre mil grávidas, sendo essa associação responsável por um terço das mortes maternas (PAVLIDIS & PENTHEROUDAKIS, 2005). Na literatura pertinente há poucos relatos sobre as conseqüências do crescimento neoplásico sobre o organismo materno e, principalmente, fetal. Os poucos estudos experimentais mostram que ratas portadoras de carcinossarcoma apresentaram cerca de 70% de reabsorção e 50% de morte fetal (GOMES-MARCONDES *et al.* e 1998; CERVELLO *et al.*, 1992).

O crescimento neoplásico promove profundas alterações bioquímicas e metabólicas no organismo hospedeiro, levando-o ao processo de caquexia, culminando em profunda espoliação da massa magra (VENTRUCCI *et al.*, 2007). Como conseqüência, há acentuada perda de peso, que não é corrigida com a alimentação forçada. Por outro lado, a gravidez apresenta alterações fisiológicas que garantem o crescimento e desenvolvimento fetal até o período final da gestação, garantindo ao feto suprimento energético, inclusive para o período pós-natal (MOORE, 2000).

Pesquisas têm mostrado que a utilização de terapias coadjuvantes às convencionais melhora o estado clínico do paciente com câncer, principalmente, a sua qualidade de vida. Os aminoácidos de cadeia ramificada, também, conhecidos como BCAAs (*Branched-Chain Amino Acids*) englobam a valina (Val), isoleucina (Iso-Leu) e leucina (Leu) estão sendo estudados há bastante tempo, pelo fato de modularem determinadas etapas do metabolismo protéico corpóreo estimulando a síntese protéica e também atenuando o catabolismo protéico. Os BCAAs são essenciais para o ser humano e outros organismos tanto para função celular normal como para a regulação do metabolismo de proteínas (GARLICK, 2005). BCAAs exógenos, principalmente leucina, estimulam a síntese protéica na musculatura isolada ou perfundida de ratos, assim como através da administração oral *in vivo* (NORTON & LAYMAN, 2006). Estudos em animais e em ensaios clínicos demonstraram que suplementação com BCAAs aumenta o balanço de nitrogênio e recupera o organismo após acometimento por queimaduras, danos por radiação, estresse pós-cirúrgico, sépsis e câncer (CHOUDRY *et al.* 2006). Trabalhos, tanto *in vivo* como *in vitro*, indicam o fato de que dieta suplementada com leucina estimula a síntese protéica, principalmente em musculatura esquelética (GARLICK, 2005), podendo reverter o quadro de catabolismo protéico.

Sabendo-se que o metabolismo materno está direcionado ao suprimento nutricional garantindo o adequado crescimento do feto, que o crescimento tumoral apresenta similaridades ao crescimento fetal quanto à disponibilidade de nutrientes e que as alterações bioquímicas e metabólicas da associação entre esses dois estados, gravidez e câncer, é pouco conhecida, este trabalho tem por principal objetivo avaliar os efeitos do crescimento tumoral sobre o metabolismo protéico muscular fetal e sua resposta quando há suplementação nutricional com leucina.

## **Materiais e métodos**

### **1 – Animais**

Fetos com idade gestacional de 20 dias foram obtidos de ratas Wistar prenhes, após determinação do primeiro dia de gestação, através de esfregaço vaginal. Ratas Wistar obtidas do Centro de Bioterismo da UNICAMP receberam dieta e água *ad libitum* com controle de luz claro-escuro de 12 horas cada ciclo com início do dia a partir das 6 horas da manhã e temperatura  $22 \pm 2$  °C, e foram acasaladas com machos adultos na proporção de quatro fêmeas para um macho, em gaiolas coletivas durante 12 horas, de acordo com método de harém descrito por BAKER (1991).

As células tumorais provenientes do carcinossarcoma de Walker 256 (Tumores *Christ Hospital Line*, EUA) foram mantidas *in vivo*, por inoculações na cavidade abdominal de ratos machos, feitas a cada 7 dias. Após este período, as células neoplásicas foram retiradas por punção e o líquido foi diluído na proporção 1:5. Cerca de 250.000 células viáveis (método de exclusão com azul de tripan) foram injetadas, no 2º dia do experimento, no subcutâneo do flanco direito das ratas experimentais, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES *et al.* (1998). Os animais dos grupos controle receberam inoculação de 0,5mL de solução fisiológica (0,9 g/dL) no tecido subcutâneo do flanco direito.

A manipulação das fêmeas prenhes com tumor foi feita segundo protocolo experimental aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP), protocolo 657-1.

## 2 – Dietas

As dietas semipurificadas isocalóricas, utilizadas nesse projeto, foram definidas como normoprotéica (C), contendo 18% de proteína (AIN-93G, REEVES *et al*, 1993) e leucina (L), contendo 15% de proteína acrescida de 3% de L-leucina. Adicionou-se cerca de 70% de carboidratos (sacarose, dextrina e amido), 7% de gordura (óleo de soja) e 5% de fibra (micro-celulose purificada). As dietas foram complementadas com mistura vitamínica e de sais minerais, bem como cistina e colina. A dieta controle contém 1,6% de L-leucina e a dieta com alto teor de leucina contém 4,6% de L-leucina, conforme vem sendo utilizado em estudos experimentais prévios.

## 3 – Protocolo experimental

As ratas prenhes foram distribuídas em 6 grupos experimentais de acordo com a presença ou não do carcinossarcoma de Walker, submetidas ou não a suplementação de leucina; os grupos experimentais tiveram número mínimo de oito fêmeas, sendo que foram utilizados dois a três fetos por cada mãe.

Grupos experimentais:

- Fetos de ratas (C) submetidas à dieta normoprotéica.
- Fetos de ratas (L) submetidas à dieta com alto teor de leucina.
- Fetos de ratas (W) submetidas à dieta normoprotéica, com implante do carcinossarcoma de Walker 256.
- Fetos de ratas (WL) submetidas à dieta com alto teor de leucina, com implante do carcinossarcoma de Walker 256.
- Fetos de ratas *pair fed* (Cp), submetidas à dieta normoprotéica pareada com o grupo (W).
- Fetos de ratas *pair fed* (Lp), submetidas à dieta com alto teor de leucina pareada com o grupo (WL).

As fêmeas prenhes permaneceram em gaiolas coletivas durante todo o período experimental, com exceção das mães *pair fed* que permaneceram em gaiolas metabólicas e receberam dieta de acordo com a ingestão dos grupos portadores de tumor, determinada previamente em estudos anteriores (GOMES-MARCONDES *et al*, 1998). Ao final do período de 20 dias de prenhez, foi realizado o sacrifício das ratas por

deslocamento cervical e os fetos e placentas foram retirados, dissecados e pesados. Para ensaios com o músculo gastrocnêmio fetal, a porção dos membros distais foi dissecada, pesada e avaliada quanto ao processo de síntese e degradação protéica; os homogeneizados dos músculos fetais foram, também, analisados quanto à atividade das enzimas relacionadas ao sistema de degradação protéica: via ubiquitina-proteossômica (*quimiotripsina-like*), via lisossomal (catepsina) e via dependente de cálcio (calpaína). Avaliou-se também a expressão protéica da subunidade 20S do sistema ubiquitina-proteossomo.

#### **4 – Síntese e degradação protéica**

Para análise de síntese e degradação de proteínas foi utilizado pool de músculos gastrocnêmios dissecados de fetos de uma mesma rata correspondendo a uma amostra. O número de amostras dos fetos para análise estatística foi no mínimo 8 para as mães controles e 10 a 12 para fêmeas prenhes com tumor.

O pool de músculo gastrocnêmio de ambas as patas posteriores dos fetos foram dissecados, colocados em tubos de perfusão com tampão KHB (Krebs-Henseleit bicarbonato (110 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.4 mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub> e 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) suplementado com 5.5 mM glicose e 0.01% (p/v) albumina e incubados a 37 °C, em contínua agitação e gaseamento com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado novo tampão KHB suplementado com 5μCi de L<sup>[3</sup>H]-fenilalanina (*Amersham*). Ao final de 2 horas de incubação, os músculos foram retirados do meio, secados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e guardados em freezer -80 °C. O meio de incubação foi estocado à -80C para posterior medida da fenilalanina marcada (VARY *et al.*, 1998; FEDELE *et al.*, 2001). Os músculos foram homogeneizados em ácido tricloroacético 30% (TCA), seguido de centrifugação 10.000 rpm por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi lavado duas vezes com TCA 10%, eliminando assim a radioatividade do sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado NaOH 1N e incubado a 40 °C por 30 minutos. Alíquotas foram analisadas quanto ao teor de proteína (LOWRY *et al*, 1951) e medida a radioatividade com líquido de cintilação em contador β. A taxa de síntese protéica foi calculada dividindo a concentração de fenilalanina incorporada no precipitado protéico pela radioatividade da fenilalanina no meio de incubação pelo período de 2 horas.

Pool de músculo gastrocnêmio fetal foi utilizado para análise da degradação protéica que foi medida pela liberação de tirosina na solução de incubação dos músculos segundo método descrito por LORITE *et al.* (1998). O pool de músculos foi incubado por 30 min a 37°C em meio RPMI 1640. Após este período, os músculos foram incubados com solução KHB acrescido de ciclohexamida (inibidor de síntese protéica) a 37°C, gaseado com 5% CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub>. Após duas horas, alíquotas do meio de incubação foram tratadas com TCA (30%) e centrifugadas à 4000rpm por 10 min. A dosagem de tirosina foi medida por fluorimetria segundo método de WAALKES & UDENFRIEND (1957), utilizando-se reagente *1-nitroso-2-naphthol* e reagente de ácido nítrico (20%).

## **5 – Western Blot para avaliação do sistema ubiquitina-proteossomo**

Pool de músculos gastrocnêmio, utilizados para determinação de tirosina, foi homogenizado com tampão de homogenização HB (20 mM Tris, 1mM DTT, 2 mM ATP e 5 mM MgCl<sub>2</sub>) para a quantificação da proteína esquelética miosina, da subunidade proteossômica 20S. Gel de acrilamida (12%) foi utilizado para fazer a resolução de 5µg de proteína do homogeneizado muscular para separação e transferência em membrana de nitrocelulose. Foi utilizado anticorpo primário monoclonal anti-subunidade 20S (*Affinity*, Inglaterra) na diluição 1:1000 (*Santa Cruz*, EUA), fazendo reação de ligação com anticorpo secundário *goat anti-mouse* (*Santa Cruz*, EUA) diluído 1:1000. A reação de quimioluminescência foi determinada utilizando-se reagente ECL (*Amersham*) e a densitometria da banda protéica foi feita utilizando-se Image Capture (*Amersham*) e o software Gel Pro II-Plus (*Silver Springer*, MD, EUA). Soro fetal foi usado para determinação de α-fetoproteína também em gel de acrilamida (12%) com anticorpo primário *goat* na diluição 1:500 fazendo reação de ligação com anticorpo secundário *anti-goat* (*Santa Cruz*, EUA) na diluição 1:1000.

## **6 – Determinação de proteína total muscular e enzimas calpaína, catepsina e quimi tripsina**

Homogeneizado muscular, incubado para determinação de tirosina, também foi utilizado para análise do teor de proteína total (LOWRY *et al*, 1951) e para determinar a atividade das enzimas quimi tripsina-*like*, catepsina, e calpaína.

A quimiotripsina-*like*, enzima similar a unidade catalítica do sistema proteolítico via ubiquitina-proteossomo, foi avaliada quanto a sua atividade utilizando-se o substrato *N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amino-4-Methylcoumarin* (Suc Llevy) diluído em *dimethyl sulfoxide* (DMSO) e Tris pH 8,0, fazendo-se a avaliação por fluorimetria a 360 nm para excitação e a 460 nm emissão.

Catepsina, proteinase lisossomal, foi avaliada quanto sua atividade utilizando-se método fluorimétrico, descrito por BARRETT (1980), a partir do substrato Benziloxycarbonil-fenilalnil-arginina 4-metil-7coumarilamida em filtro de 340nm para excitação e filtro de 460nm para emissão.

Calpaína, proteinase envolvida no sistema de degradação de proteína dependente do cálcio, foi medida de acordo com metodologia descrita por JIANG *et al* (1997), incubando-se as amostras diluídas em tempo de reação com caseína, por cinco minutos, e posterior adição de CaCl<sub>2</sub>. Leitura realizada em espectrofotômetro em absorbância de 500nm.

## **7 – Determinação de albumina e proteína sérica**

O sangue fetal foi analisado para determinação da concentração de proteína total e albumina séricas.

A concentração de proteína sérica foi determinada através da utilização de reativo de biureto. Este reativo apresenta íons cobre que, em meio alcalino, reagem com ligações peptídicas gerando coloração violeta. Após 15 minutos de reação a absorbância das amostras foi lida em 540 nm (GORNALL *et al*, 1949).

A concentração de albumina foi determinada utilizando-se amostra de soro fetal em conjunto com verde de bromocresol. Esta associação produz uma coloração verde cuja absorbância é determinada após 15 minutos de reação em 630 nm (MEULEMANS, 1960)

## **8 – Análise estatística**

Os resultados obtidos foram expressos como a média dos grupos com o respectivo erro padrão ( $\pm$ SEM). A análise estatística foi feita usando o teste One-way

Anova e posterior teste de Bonferroni para comparação de todos os grupos experimentais (GAD & WEIL, 1994). Os cálculos foram realizados pelo software Graph-Pad Prism, 3.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) e valores de  $P < 0,05$  indicam significância.

## Resultados

No caso do presente trabalho, os fetos de ratas portadoras de tumor sofreram os efeitos do crescimento neoplásico, similares aos observados em organismos adultos portadores de câncer. Os resultados mostram que houve decréscimo do peso fetal nos grupos W e WL (Figura 1). A relação peso feto/peso placentário, indicativo do processo de crescimento e viabilidade fetal, mostrou-nos que houve maior diferença nos grupos provenientes de ratas com tumor (Figura 2). Associado a redução de peso fetal, a concentração de proteína total sérica no grupo W foi a menor concentração obtida para a proteína de soro fetal ( $W = 2,119 \pm 0,09 \text{ g.dL}^{-1}$ ) representando diminuição de 27% em relação ao grupo controle, C ( $C = 2,903 \pm 0,07 \text{ g.dL}^{-1}$ ) (Figura 3A). Pode-se notar que o grupo WL ( $2,563 \pm 0,08$ ) apresentou valores estatisticamente semelhantes ao do grupo controle, mostrando uma grande recuperação sobre a ação tumoral neste grupo causada pela presença de leucina na dieta materna. O grupo WL não foi estatisticamente semelhante ao seu grupo controle L devido à ação sinalizadora da leucina sobre a síntese protéica, fazendo com que o grupo L ( $2,967 \pm 0,08$ ) apresentasse valores mais elevados que o grupo C (Figura 3A). Albumina sérica no grupo com tumor (W) reduziu-se em cerca de 35% ( $W = 0,99 \pm 0,02 \text{ g.dL}^{-1}$ ) em relação ao grupo C ( $1,54 \pm 0,03$ ) (Figura 3B). Quando há suplementação nutricional, a concentração de albumina apresentou-se em maior concentração no grupo L ( $1,86 \pm 0,05 \text{ g.dL}^{-1}$ ) em relação ao C, sendo que no grupo suplementado com o crescimento tumoral esse valor foi menor ( $WL = 1,44 \pm 0,05$ ). Isto representou diferença em cerca de 22% entre o grupo WL e seu respectivo controle L. Estes dados mostraram que a albumina presente no soro fetal permaneceu com a concentração próxima ao normal no grupo com tumor, quando houve a suplementação com leucina, juntamente com isto notou-se que quando ocorreu a suplementação com leucina, o grupo WL atingiu os níveis de concentração sérica próximos ao observado no grupo C, igualando-se aos valores obtidos nos grupos submetidos a nutrição pareada ( $C_p = 1,31 \pm 0,08$  e  $L_p = 1,47 \pm 0,04$ ), isso indica que a menor concentração de albumina, em relação ao grupo L, deve-se principalmente à alteração nutricional, do que a problemas relacionados com a presença do tumor (Figura 3B).

A concentração de proteína total do músculo gastrocnêmio fetal (Figura 4) reduziu nos grupos de mães portadoras do tumor de Walker (W e WL), em relação aos respectivos controles (C e L). Não se observou diferença do conteúdo de proteína muscular nos fetos de ratas submetidas à nutrição pareada (Cp e Lp).

A análise dos dados relativos à síntese protéica muscular, incorporação de fenilalanina marcada (Phe-<sup>3</sup>H) no músculo gastrocnêmio, mostrou que esse processo estava reduzido nos fetos de ratas portadoras de tumor (W) em relação aos outros grupos experimentais (Figura 5). Verificou-se que houve recuperação do processo de síntese protéica no grupo WL e que o fator nutricional, avaliado nos grupos com nutrição pareada, Cp e Lp, não interferiu no processo de síntese protéica muscular fetal (Figura 5). A síntese de proteína fetal reduziu em cerca de 27% no grupo de animais com tumor ( $W = 0,74 \pm 0,08 \text{ pmol.mg proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), quando comparada aos animais também com tumor mas submetidos à dieta suplementada com leucina ( $WL = 1,02 \pm 0,08$ ). Estes fetos provenientes de ratas portadoras de tumor e alimentadas com dieta contendo excesso de leucina apresentam valores semelhantes ao encontrado no grupo controle ( $C = 1,039 \pm 0,07$ ).

O processo de degradação protéica foi avaliado pela liberação de tirosina do músculo dos fetos de mães portadoras ou não de tumor (Figura 6). Observou-se que no grupo W, houve acentuada liberação de tirosina do músculo fetal em relação ao controle C, já que o catabolismo protéico sempre se eleva pela presença de câncer. Observa-se a degradação protéica cerca de 22% mais elevada em animais com tumor ( $W = 1718,00 \pm 55,16 \text{ pmol.mg proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) do que em animais controle ( $C = 1330,00 \pm 48,53$ ). Os animais do grupo L também apresentaram processo de degradação protéica elevado em relação ao grupo C. O grupo suplementado com leucina, WL ( $1384,00 \pm 37,34$ ), mostrou processo de degradação protéica semelhante ao controle C e inferior ao grupo com tumor (W). Nos grupos com nutrição pareada (Cp e Lp), observou-se liberação de tirosina do músculo semelhante aos padrões do grupo controle.

O processo de degradação protéica envolve três sistemas enzimáticos que são descritos como: 1) sistema ubiquitina-proteossômico, responsável por cerca de 70% da proteólise citoplasmática, relacionado aos processos de remodelação e rearranjos protéicos celulares, como também ao catabolismo protéico presente no estado câncer-caquexia; 2) sistema lisossomal, que envolve basicamente degradação de proteínas extracelulares; 3) sistema dependente de cálcio, relacionado com o extravasamento do conteúdo de organelas celulares, decorrentes do processo de morte celular, mais

especificamente necrose. No presente trabalho, avaliamos a atividade enzimática da quimotripsina-*like*, enzima correspondente a porção catalítica do sistema ubiquitina-proteossômico; a atividade da catepsina H, uma das enzimas que participam da via lisossomal; e a atividade da enzima calpaina que se relaciona a via proteolítica dependente de cálcio.

Os resultados da Figura 7 mostram que os músculos dos fetos provenientes das mães portadoras de tumor apresentaram aumento da atividade da quimotripsina-*like*, estatisticamente significativo, no grupo W. Os fetos das mães WL tenderam ao aumento da atividade, porém cerca de 32% menor que no grupo W. Nos fetos WL, a quimotripsina-*like* não diferiu estatisticamente em relação ao grupo C, e seus valores foram similares aos fetos de mães submetidas a nutrição pareada (Cp e Lp).

Verificou-se que a via lisossomal, avaliada pela atividade da catepsina H, foi significativamente elevada nos fetos do grupo W em relação aos demais grupos experimentais (Figura 8).

A via proteolítica dependente de cálcio mostrou atividade enzimática da calpaina semelhante em todos os grupos experimentais, sugerindo a não participação desse sistema no processo de catabolismo muscular fetal das mães portadoras de tumor de Walker (Figura 9).

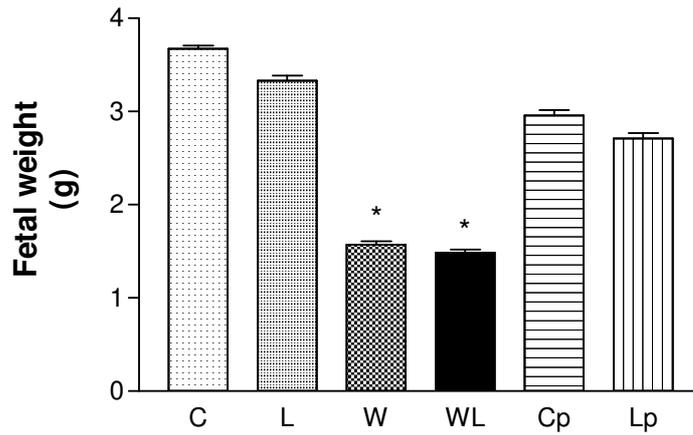


Figura 1. Peso dos fetos (g) provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupos estatisticamente diferentes dos demais.

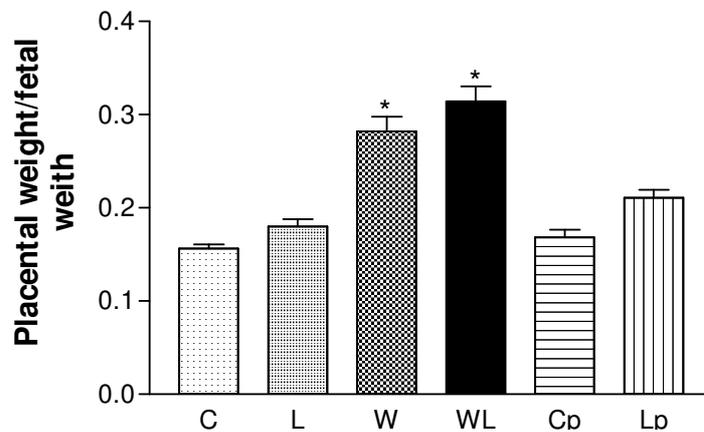


Figura 2. Relação entre peso placentário/peso fetal de ratas prenhes, portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker, submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupos estatisticamente diferentes dos demais.

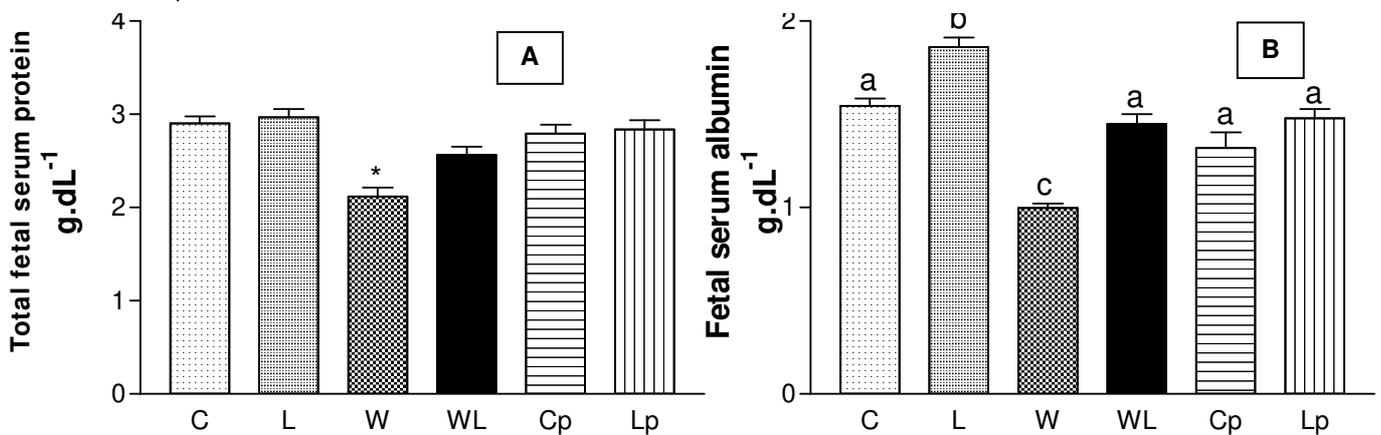


Figura 3. Concentração sérica de proteína total (A) e albumina (B) dos fetos de ratas portadoras ou não de tumor de Walker e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupo estatisticamente diferente dos demais. Letra “a” indica os grupos estatisticamente iguais. Letra “b” e “c” indicam grupos com diferenças estatísticas.

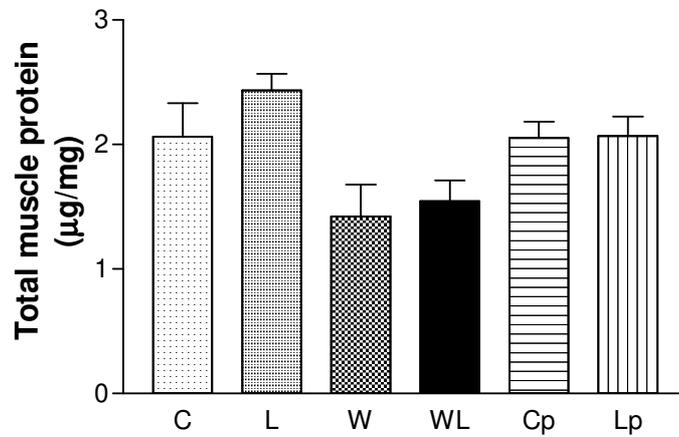


Figura 4. Legenda: Concentração de proteína total muscular dos fetos ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL.

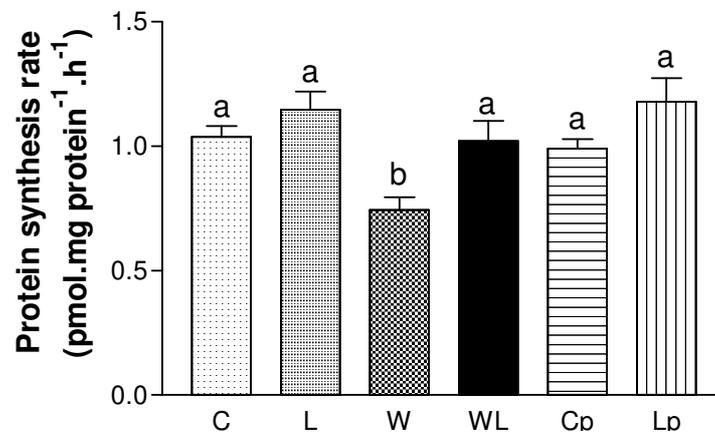


Figura 5. Síntese protéica muscular de fetos ( $\text{pmol}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) incorporação de fenilalanina  $^3\text{H}$  em músculo gastrocnêmios provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Letra “a” indica os grupos estatisticamente iguais. Letra “b” indica grupo estatisticamente diferente.

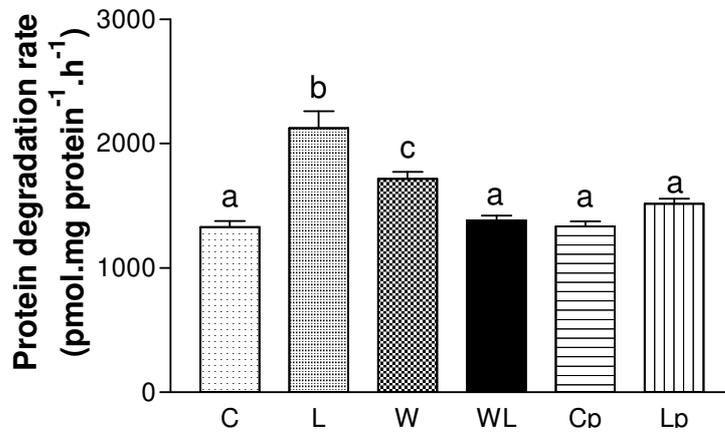


Figura 6. Catabolismo protéico muscular de fetos (pmol.mg proteína<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Letra “a” indica os grupos estatisticamente iguais. Letra “b” e “c” indicam grupos com diferenças estatísticas.

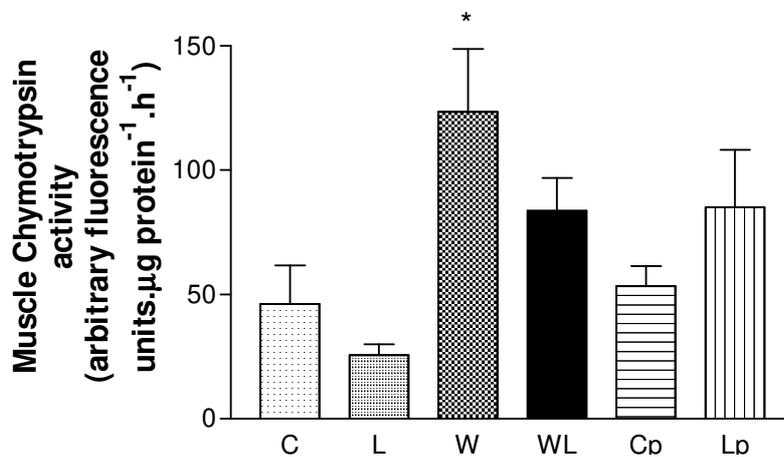


Figura 7. Atividade muscular da enzima quimi tripsina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupo estatisticamente diferente dos demais.

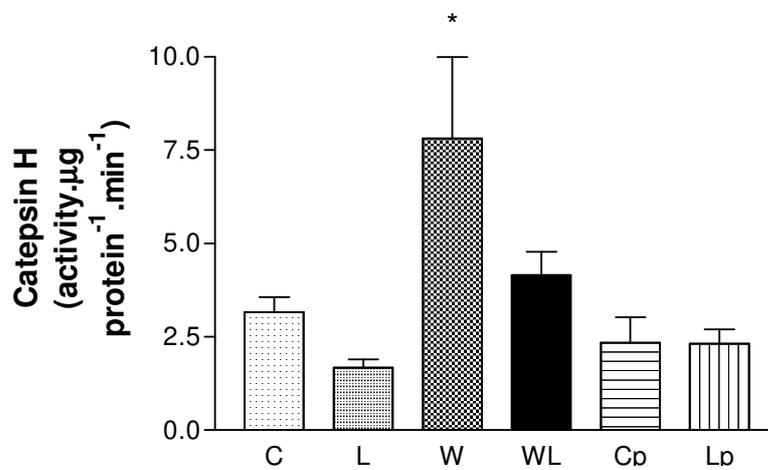


Figura 8. Atividade da enzima catepsina H no músculo de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupo estatisticamente diferente dos demais.

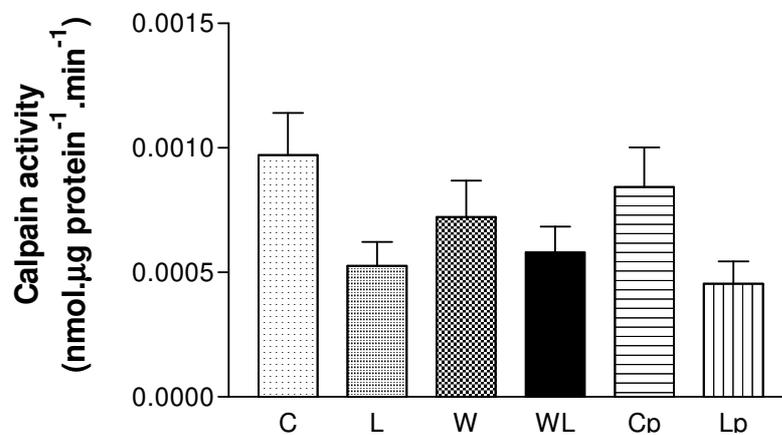


Figura 9. Atividade da enzima calpaína no músculo de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL.

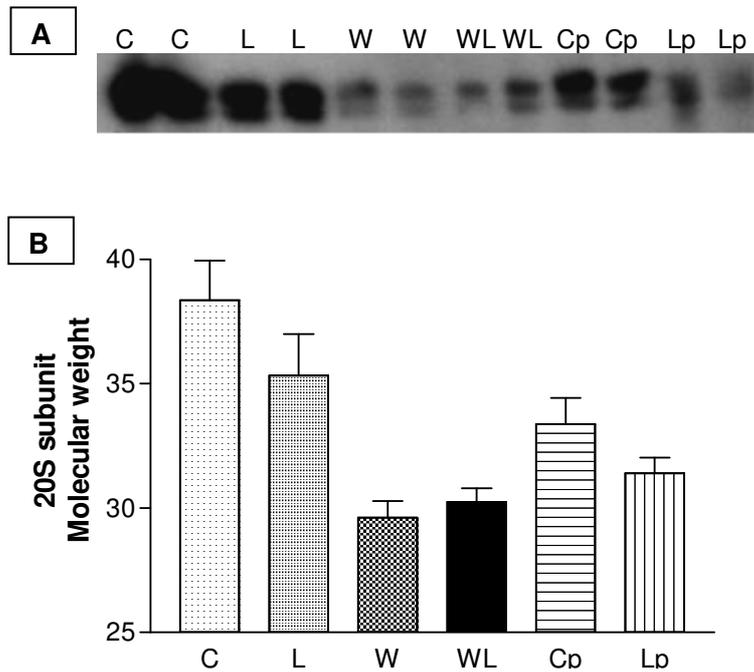


Figura 10. **A** - Figura obtida através do gel de poliacrilamida indicando a presença da subunidade 20S. **B** - Peso molecular da subunidade proteossômica 20S presente na musculatura fetal obtido através de análise densiométrica da imagem. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL.

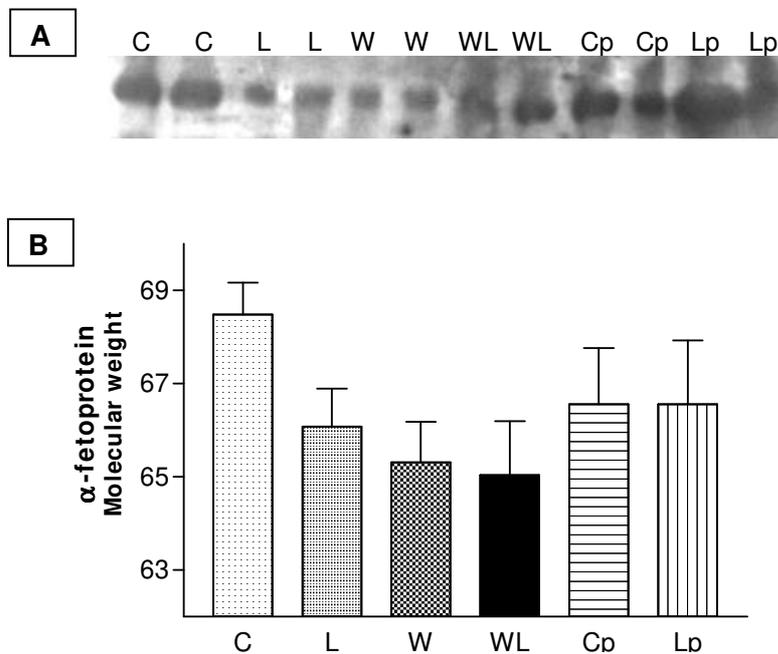


Figura 11. **A** - Figura obtida através do gel de poliacrilamida indicando a presença de  $\alpha$ -fetoproteína. **B** - Peso molecular de enzima  $\alpha$ -fetoproteína presente no soro fetal obtido através de análise densiométrica da imagem. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL.

## Discussão

Durante a gravidez, o organismo materno sofre ajustes metabólicos e bioquímicos que promoverão o crescimento e desenvolvimento do organismo fetal dentro de condições propícias, a fim de garantir-lhe a sobrevivência.

Os ajustes que ocorrem durante a gestação proporcionam duas fases distintas quanto ao padrão metabólico que, nos primeiros dois terços da gravidez, visam aumentar os processos de síntese, armazenando substratos que serão mobilizados no terço final da gravidez, garantindo o suporte nutricional para que o feto cresça e ganhe peso, para os momentos pós-natal. VENTRUCCI *et al.* (2001) verificaram que ratas prenhes com a presença de tumor apresentaram fetos com significativa perda de peso, sendo que aqueles provenientes de ratas que não receberam uma alimentação suplementada apresentaram redução de 57% de seu peso e nos fetos provenientes de ratas com suplementação alimentar a redução do peso foi de 67%. Este decréscimo no peso fetal foi relacionado com a redução de peso placentário indicando íntima relação entre este órgão e o desenvolvimento fetal. Assim, os fetos apresentam alterações metabólicas e bioquímicas correspondentes aos ajustes da gravidez. TOLEDO *et al.* (2006) observaram que a presença de tumor altera o tecido placentário e afeta os níveis de fatores apoptóticos prejudicando o desenvolvimento fetal normal.

Fetos normais apresentam intenso crescimento no terço final da gestação, com secreções hormonais e processos de síntese direcionados à sobrevivência. Segundo Hay (2006), os fetos apresentam grande capacidade de se adaptar metabolicamente a alterações agudas e crônicas de concentração de glicose, estando intimamente relacionado com a disponibilidade de glicose no plasma fetal; isso foi observado em fetos de ovelhas mantidas alguns dias com restrição de dieta e em estado de hipoglicemia. Houve manutenção da glicemia baseada na glicogenólise e gliconeogênese, juntamente com oxidação de aminoácidos através da degradação de proteína. A síntese protéica total encontra-se elevada, associando-se a padrões semelhantes e/ou aumentados em relação aos maternos ou de indivíduos adultos. Assim, o presente trabalho mostrou que os fetos de ratas controle ou submetidas à dieta rica em leucina apresentaram metabolismo protéico semelhante entre os dois grupos. A síntese protéica elevada ocorre durante todo o desenvolvimento fetal, porém há necessidade de suporte nutricional adequado (CETIN 2003). Avaliação do estado nutricional relaciona-se aos valores séricos de proteína total e albumina séricas que, nos fetos analisados dos grupos C e L, foram semelhantes aos

parâmetros do indivíduo adulto. O *turnover* protéico acelerado muitas vezes está refletindo o elevado processo de síntese, juntamente com alto processo de degradação de proteínas, como acontece nos fetos do grupo suplementado com leucina (L). CARBÓ *et al* (1995) encontraram déficit na mobilização de aminoácidos para os fetos em mães que receberam fator de necrose tumoral (TNF) durante a gestação, relacionando com o menor fluxo sanguíneo placentário, provocado pela ação dessa citocina (TNF). GOMES-MARCONDES *et al* (1998), em seus experimentos, injetaram líquido ascítico em ratas prenhes e obtiveram aumento de reabsorção fetal, redução tanto de peso fetal quanto placentário e aumento de efeitos danosos semelhantes aos encontrados em ratas que desenvolveram o tumor, indicando que estas alterações são induzidas por substâncias produzidas pelas células cancerígenas, e não apenas por efeito da redução do aporte nutricional, como verificado no presente trabalho a comparação entre os fetos W e Cp.

Pode-se notar que os padrões das enzimas proteolíticas quimotripsina-*like*, catepsina e calpaína foram similares entre os dois grupos C e L, sugerindo que o padrão catabólico presente no feto tem finalidade para os ajustes de síntese e renovação de proteínas. Milley (1998) encontrou resultados semelhantes em situação de hipóxia em fetos de ovelhas; em seus experimentos, a diminuição de oxigênio para o feto acarretou aumento dos níveis de descarboxilação e de proteólise com conseqüente redução da síntese de proteína também indicando ajustes fetais, em situação estressante.

O retardo de crescimento fetal, decorrente de patologias como pré-eclampsia, desnutrição, entre outras, decorrem muitas vezes da falência placentária que por sua vez é a interface da retroalimentação positiva entre mãe e feto. No presente trabalho, fetos de ratas submetidas à restrição alimentar apresentaram redução do peso fetal, como também da relação feto/placenta, porém os parâmetros nutricionais, como proteína total e albumina séricas permaneceram similares aos grupos controles, confirmando que o suporte nutricional é de extrema importância para a viabilidade fetal e da unidade feto/placentária. Ovelhas prenhes desnutridas apresentam fetos com cérebro, coração, timo, pâncreas e rins menores que os fetos provenientes de ovelhas eutróficas, juntamente com taxas de proteína, insulina e glicose séricas reduzidas (OSGERBY *et al*, 202).

O crescimento fetal na rata ocorre no terço final da gestação, principalmente nos últimos três dias 19, 20 e 21º dias, quando o peso do tumor corresponde cerca de 10 a 12% do peso corporal materno. Assim vale ressaltar, que a elevada atividade das células tumorais, culminando em crescimento exponencial, está associada diretamente ao

mesmo período de crescimento fetal. Assim, no presente trabalho, os fetos W apresentaram redução do peso corpóreo, associado à diminuição do processo de síntese protéica muscular concomitante à redução das proteínas totais e albumina séricas. Das principais alterações metabólicas que ocorrem na vigência do câncer, encontramos a intensa espoliação da massa corpórea magra. Segundo GOMES-MARCONDES *et al* (2003), a massa magra fica reduzida durante o crescimento tumoral e a suplementação com leucina reduz esta perda. O intenso catabolismo protéico, principalmente da musculatura esquelética, ocorre em função da elevada utilização de substratos, principalmente aminoácidos e glicose, pelas células neoplásicas (HAY, 1995). Desse modo, sugere-se que o crescimento tumoral induziu desvio do aporte nutricional, que beneficiaria a placenta e feto (razão pela qual há decréscimo do peso fetal e redução da relação feto/placenta), em benefício próprio com prejuízos ao feto relacionados à má nutrição (queda da proteína total e albumina séricas). A albumina corresponde à principal proteína a ser catabolizada nos processos iniciais do crescimento tumoral, decorrente dos efeitos diretos e indiretos do tumor. Por isso sua alteração se relaciona com os efeitos tumorais sobre o organismo, principalmente o aumento da degradação protéica muscular se comprado aos fetos controles. Nos organismos com câncer, há aumento da degradação associado à diminuição e/ou manutenção do processo de síntese protéica, como mostrado por VENTRUCCI *et al* (2004), onde a proteólise é aumentada em grupos com a presença de tumor quando comparados aos grupos sem tumor, sendo que a suplementação por leucina estimulou a síntese e reduziu a quebra de proteína através da modulação do sistema ubiquitina-proteossomo. No caso dos fetos aqui avaliados, a síntese protéica reduzida associou-se também a ativação dos sistemas de degradação proteolítica via proteossômica e lisossomal.

A via ubiquitina-proteossômica é a principal via de degradação protéica, representando cerca de 70% do processo total de proteólise. Estudos mostram que a ativação dessa via proteolítica está relacionada a fatores produzidos pelo crescimento neoplásico, como o fator de indução de proteólise. VENTRUCCI *et al.* (2004A e 2007) demonstraram que a leucina pode modular o metabolismo de proteína na musculatura esquelética, através da ação sobre a via ubiquitina-proteossômica. Por outro lado, a via lisossomal relaciona-se basicamente ao catabolismo não específico de proteínas celulares, com ativação autofágica muscular após 24 horas de jejum; apesar da sua contribuição ao processo catabólico, durante a vigência do câncer, ainda ser incerta. Essas duas vias catabólicas mostram que o crescimento tumoral está induzindo

alterações diretas ou indiretas (principalmente por fatores sintetizados pelas células neoplásicas e/ou do hospedeiro) que atravessariam a placenta atuando não só no metabolismo placentário, como também na interação placenta-feto, verificado muitas vezes pelo retardo de crescimento intrauterino. Os fetos responderiam com aumento do catabolismo muscular, prejudicando-os não só quanto ao peso, como também com o aumento de reabsorção e morte fetal, segundo alguns trabalhos da literatura (CARBÓ *et al.* 1995; GOMES-MARCONDES *et al.* 1998).

A suplementação nutricional com leucina causa benefícios ao processo celular ativando síntese, como verificado em muitos estudos experimentais, como feito por VENTRUCCI *et al.* (2004B), onde ratas com tumor e alimentadas com dieta suplementada por leucina mostraram recuperação de massa magra, nitrogênio total da carcaça e nitrogênio não-colagênico, sugerindo efeito benéfico da administração de leucina nestas condições. Os fetos provenientes de mães que receberam suplementação nutricional com dieta rica em leucina, portadoras de tumor, apresentaram os efeitos deletérios do crescimento tumoral, como redução do peso corpóreo fetal e, também, da relação feto/placenta, porém de forma mais tênue em relação aos fetos W. Entretanto, o estado nutricional fetal, refletido pela concentração de proteínas totais e albumina séricas mantém-se iguais aos fetos de ratas controles. Além disso, observou-se nesses fetos WL que a síntese protéica muscular assemelhou-se ao dos fetos C e, também e mais importante, o processo de catabolismo protéico foi minimizado, igualando-se ao grupo controle. Resultados da literatura corroboram esses achados, uma vez que GOMES-MARCONDES *et al.* (1998) e VENTRUCCI *et al.* (2001) descreveram melhorias em ratas com tumor após a administração de dieta rica em leucina e que CHOUDRY *et al.* (2006) relataram que BCAAs administrados em pacientes com câncer, em pacientes no período de recuperação pós-cirúrgica e em pacientes desnutridos induziu excelentes resultados. Isso tudo indica que terapias coadjuvantes melhorariam o estado do organismo a responder de forma mais eficiente aos tratamentos cirúrgicos, quimioterápicos e radioterápicos. No caso da associação câncer e gravidez, é de extrema importância o estudo com terapias coadjuvantes e, principalmente, a suplementação nutricional, para que tenhamos efeitos positivos tanto materno e, principalmente, ao desenvolvimento fetal.

## **Artigo 2: trabalho a ser submetido no periódico “*Placenta*”**

### **Suplementação nutricional com leucina minimiza estresse oxidativo muscular fetal decorrente da presença do carcinossarcoma de Walker 256.**

Bread Leandro Gomes da Cruz & Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.

Departamento Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas – São Paulo, 13083970.

**Key words:** Estresse oxidativo, Câncer, Feto, Suplementação Nutricional, Aminoácidos de Cadeia Ramificada.

**Running title:** Estresse oxidativo fetal em mães com câncer e suplementação nutricional com leucina.

#### **Resumo**

A gestação concomitante ao tumor altera não só o metabolismo materno como o fetal. Esta alteração aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio com conseqüente aumento de estresse oxidativo. Os aminoácidos de cadeia ramificada podem atuar na regulação do metabolismo, conferindo efeito protetor ao organismo com tumor. Nesse trabalho utilizou-se músculos gastrocnêmios e soro de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 distribuídas nos seguintes grupos: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido à dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas à nutrição pareada semelhante á ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas à dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Os resultados mostraram que os fetos das ratas prenhes portadoras de tumor apresentaram redução de peso em cerca de 57% quando comparados aos seus respectivos controles. Os resultados do hematócrito fetal mostraram que apenas o grupo W apresentou cerca de 18% de redução na porcentagem de células vermelhas, em comparação aos demais grupos. A concentração de glicose no soro de fetos W reduziu em cerca de 31% em relação ao observado em C. Nas ratas que receberam dieta suplementada com leucina esta diferença caiu para cerca de 15%, quando se comparou o grupo L com WL. A atividade da enzima fosfatase alcalina foi maior nos grupos L e WL do que nos grupos C e W. Em fetos provenientes de mães L, a atividade da enzima glutationa-S-transferase ficou aumentada em relação ao grupo C e a suplementação nutricional promoveu recuperação dos níveis da atividade enzimática dos fetos WL, sendo 50% maior do que a observada em W. A concentração de glutationa reduzida (GSH) não diferiu, estatisticamente, entre todos os grupos com exceção do grupo W, onde a concentração de GSH tendeu a se elevar. Os fetos provenientes dos grupos de ratas portadoras de tumor apresentaram elevação da atividade enzimática da enzima catalase, sendo que no grupo WL a atividade da catalase foi cerca de 22% menor que a observada no grupo W, aproximando-se aos valores encontrados no grupo C. Fetos do grupo W apresentaram aumento da concentração de malondialdeído em relação aos fetos do grupo C. Este parâmetro não foi alterado no grupo WL,

que mostrou redução de 30% na concentração de malondialdeído quando comparado ao grupo não suplementado (W). Conclui-se que os fetos do grupo WL apresentaram melhoras significativas com relação aos efeitos do estresse oxidativo indicando função protetora da leucina.

## **Introdução**

O estresse oxidativo ocorre quando os níveis de espécies reativas de oxigênio excedem a capacidade antioxidante celular, implicando em várias patologias como o câncer. Por outro lado, patologias, incluindo o câncer, promovem aumento dos produtos reativos elevando os processos de estresse oxidativo, como também reduzindo a capacidade de resposta a esse processo (MANTOVANI *et al*, 2004).

Câncer durante a gestação é uma situação clínica delicada onde a saúde da mãe fica em conflito com a do feto. Na interação entre crescimento neoplásico e gravidez, dentre as várias alterações dos processos metabólicos envolvidos, o estresse oxidativo é o dos mais importantes, causando maiores danos quando em desequilíbrio. Das várias patologias que podem ocorrer durante a gravidez, algumas como pré-eclampsia e retardo de crescimento intra-uterino, podem ser decorrentes do aumento do estresse oxidativo (PERKINS, 2006). Isto ocorre pelo fato do feto poder ser comparado a um rápido crescimento tumoral e sua taxa de crescimento exponencial depende do adequado suprimento de glicose e aminoácidos, assim como da sua alta capacidade energética produzindo energia a partir dos processos oxidativo, gerando desse modo espécies reativas de oxigênio (CARBO *et al.*, 1996). Assim o organismo materno tende, também, a sustentar ambos os processos de crescimento, tumoral e fetal, porém o crescimento tumoral causa o desequilíbrio no metabolismo protéico e oxidativo, tanto materno quanto fetal, reduzindo a qualidade da gestação e podendo levar à morte do feto e/ou mãe.

Quando a associação câncer e gravidez ocorre, existe o dilema entre salvar a vida da mãe e afetar drasticamente a saúde do feto, podendo causar-lhe a morte, ou continuar com a gravidez e arriscar a vida de ambos. Os tratamentos disponíveis para o câncer devem ser bem analisados antes de serem aplicados para definir sua real ação sobre o desenvolvimento fetal. A quimioterapia e radioterapia não são indicadas para o início da gestação, mas cada dia que passa sem tratamento, o organismo materno pode sofrer danos irreversíveis. Por esta razão é necessária a busca de tratamento capaz de levar

essa gestação a termo, sem que ocorra a proliferação descontrolada do tumor. Isto pode se tornar solução prática para este dilema entre sobrevivência materna ou fetal.

Pesquisas atuais têm mostrado que a utilização de terapias coadjuvantes às terapias clínicas convencionais melhora o estado clínico do paciente com câncer, principalmente, a sua qualidade de vida. Além disso, a suplementação nutricional ou determinados nutrientes têm participado efetivamente nas respostas antioxidantes (VALKO *et al*, 2006). Os aminoácidos de cadeia ramificada, também, conhecidos como BCAAs (*Branched-Chain Amino Acids*: valina (Val), isoleucina (Iso-Leu) e leucina (Leu)) estão sendo estudados há bastante tempo, pelo fato de modularem determinadas etapas do metabolismo protéico corpóreo e atuar com efeito protetor sobre a ação do estresse oxidativo (BARACOS *et al*, 2006). O metabolismo no músculo esquelético fica restrito a ação destes três BCAAs juntamente com os aminoácidos glutamato, aspartato e asparagina (GARLICK, 2005). Dentre estes seis aminoácidos, a leucina possui efeitos sobre o equilíbrio do metabolismo protéico e oxidativo na musculatura esquelética, mais notadamente que os outros (NORTON & LAYMAN, 2006).

Estas alterações no equilíbrio e na regulação do processo de estresse oxidativo podem ser decorrentes de uma dieta inadequada em antioxidantes (como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatona) (PERKINS, 2006), produção excessiva de radicais livres (pela exposição a drogas ou toxinas) ou através da constante ativação do sistema natural de produção de radicais (p.e. fagocitose em doenças inflamatórias crônicas) (HALLIWELL, 1996). A célula tolera até certo ponto os produtos decorrentes do estresse e, através do seu sistema defensivo de auto-regulação de enzimas antioxidantes, tenta restabelecer o equilíbrio. No entanto, o aumento do estresse oxidativo produz danos ao DNA e em proteínas (incluindo transportadores de íons na membrana), produz peroxidação lipídica, fazendo com que ocorra prejuízo celular ou até mesmo sua morte (HALLIWELL, 1996). A presença de tumor no organismo altera constantemente o equilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e enzimas antioxidantes (FREITAS *et al*, 2001).

Pelo fato do reconhecido potencial dos efeitos benéficos dos BCAAs, o número de ensaios clínicos tem crescido bastante ultimamente, mas infelizmente apresentam grupos pequenos e variados de pacientes, não permitindo padronizar doses adequadas, composição e duração da suplementação nutricional. Mesmo assim, os trabalhos mostram interações entre dietas suplementadas com BCAAs e recuperação de pacientes com câncer ou em estado pós-cirúrgico, assim como, melhoria nas taxas de morbidade e mortalidade em pessoas com carcinoma hepatocelular indicando avanços no controle de

mecanismos de estresse oxidativo nestas situações (CHOUDRY *et al* 2006). Desse modo, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da suplementação nutricional com dieta rica em leucina sobre o estresse oxidativo muscular de fetos provenientes de ratas portadoras de tumor de Walker.

## **Materiais e métodos**

### **1 – Animais**

Fetos de ratas Wistar, obtidas do Centro de Bioterismo, da UNICAMP, foram utilizados para o presente estudo. As fêmeas receberam dieta e água *ad libitum* com controle de luz claro-escuro de 12-12 horas (início do dia às 6 horas da manhã) e temperatura  $22 \pm 2$  °C, sendo cruzadas com machos na proporção de quatro fêmeas para um macho, em gaiolas coletivas durante 12 horas, de acordo com método de harém descrito por BAKER (1991). Determinou-se o primeiro dia da gravidez de todas aquelas fêmeas que apresentaram presença de espermatozóides na análise do esfregaço vaginal, para que fosse possível determinar a idade fetal.

As células tumorais provenientes do carcinossarcoma de Walker 256 (Tumores *Christ Hospital Line*, EUA) foram mantidas *in vivo*, por inoculações feitas a cada sete dias, na cavidade abdominal de ratos machos. Após este período, as células neoplásicas foram retiradas por punção e o líquido ascítico foi diluído na proporção 1:5. Cerca de 250.000 células viáveis (método de exclusão com azul de tripan) foram injetadas, no 2º dia do experimento, correspondente ao segundo dia de prenhez, no subcutâneo do flanco direito das ratas experimentais, segundo método descrito por GOMES-MARCONDES (1998). Os animais dos grupos controle receberam inoculação de 0,5mL de solução fisiológica (0,9 g/dL) no tecido subcutâneo do flanco direito.

A manipulação das mães portadoras de tumor foi feita segundo protocolo experimental aprovado pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA-IB-UNICAMP), protocolo 657-1.

### **2 – Dietas**

As dietas semipurificadas isocalóricas, utilizadas nesse projeto, foram definidas como normoprotéica (C), contendo 18% de proteína (AIN-93G, REEVES *et al*, 1993) e

leucina (L), contendo 15% de proteína acrescida de 3% de L-leucina. Adicionou-se cerca de 70% de carboidratos (sacarose, dextrina e amido), 7% de gordura (óleo de soja) e 5% de fibra (micro-celulose purificada). As dietas foram complementadas com mistura vitamínica e de sais minerais, bem como cistina e colina. A dieta controle contém 1,6% de L-leucina e a dieta com alto teor de leucina contém 4,6% de L-leucina conforme vem sendo utilizado em estudos experimentais prévios.

### 3 – Protocolo experimental

Os fetos foram distribuídos em 6 grupos experimentais de acordo com tratamento a que foram submetidas as ratas prenhes: a presença ou não do carcinossarcoma de Walker, suplementação ou não de leucina na dieta; os grupos experimentais tiveram número mínimo de oito mães, onde obteve-se dois fetos de cada.

Grupos experimentais:

- Fetos de ratas (C) submetidas à dieta normoprotéica.
- Fetos de ratas (L) submetidas à dieta com alto teor de leucina.
- Fetos de ratas (W) submetidas à dieta normoprotéica, com implante do carcinossarcoma de Walker 256.
- Fetos de ratas (WL) submetidas à dieta com alto teor de leucina, com implante do carcinossarcoma de Walker 256.
- Fetos de ratas *pair fed* (Cp), submetidas à dieta normoprotéica pareada com o grupo (W).
- Fetos de ratas *pair fed* (Lp), submetidas à dieta com alto teor de leucina pareada com o grupo (WL).

As fêmeas prenhes permaneceram em gaiolas coletivas durante todo o período experimental, com exceção dos grupos *pair fed* que receberam dieta de acordo com a ingestão (obtida previamente em nossos estudos) dos grupos portadores de tumor. Ao final do período de 20 dias de prenhez, foi realizado o sacrifício das mães, por deslocamento cervical, e os fetos foram retirados, pesados e dissecados para ensaios com o músculo gastrocnêmio quanto a atividade das enzimas fosfatase alcalina, catalase, glutatona total, glutatona-S-transferase, malondialdeído (MDA).

#### 4 - Atividade das enzimas envolvidas no processo de estresse oxidativo celular

Homogenizado muscular foi utilizado para determinar a atividade das enzimas fosfatase alcalina, catalase, glutatona total, glutatona-S-transferase e concentração de malondialdeído (MDA).

Para análise da fosfatase alcalina foi utilizado o reagente de *4-nitrophenyl phosphato disodium* (p-NPP, 37mM) como substrato e a atividade da enzima foi determinada nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos por espectrofotometria, expressa em nmol/μg proteína (MARTINS *et al*, 2001).

Glutatona total foi determinada através de comparação colorimétrica entre solução padrão de glutatona reduzida (GSH) e amostras homogeneizadas de músculos. A leitura foi realizada em 400 nm e os resultados expressos em nmol.μg protein<sup>-1</sup>.

A atividade da glutatona-S-transferase (GST) do homogenizado muscular foi determinada utilizando-se o método de HABIG *et al.* (1974), usando como substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e a atividade foi mensurada durante 10 minutos, com leitura a cada minuto e expressa em nmol/min/ug de proteína.

Atividade da catalase foi medida como descrita por COHEN *et al* (1970), utilizando-se triton X-100 para solubilizar a catalase e aumentar seu nível observável. Peróxido de hidrogênio foi adicionado a cada amostra para iniciar a reação, após 3 minutos, ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi adicionado para parar a reação, em seguida utilizou-se permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>), que ao reagir com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formando complexo que foi lido em 480nm, resultados expressos em unidades por mg de proteína utilizada.

A concentração de malondialdeído (MDA) foi determinada utilizando-se homogenizado muscular adicionado ao substrato N-methyl-2-phenylindole (MPO) e ácido clorídrico (HCl), realizando a leitura em 590 nm com resultados expressos em nM/ug de proteína (UCHIYAMA & MIHARA, 1978).

## **5 – Determinação de glicose sérica e de células vermelhas**

O sangue fetal, no momento do sacrifício, foi coletado em capilares para determinação da porcentagem de glóbulos vermelhos e, também, o soro foi guardado, para posterior determinação da concentração de glicose.

A concentração de glicose foi determinada com base na metodologia colorimétrica da glicose-oxidase. Esta enzima catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este peróxido reage com 4-aminoantipirina e fenol produzindo um composto de coloração avermelhada. A intensidade desta cor é proporcional a concentração de glicose sendo a absorvância medida em 540 nm. (BEACH & TURNER, 1958)

O hematócrito foi determinado após centrifugação do sangue fetal em tubos capilares por 5 minutos com posterior medição da porcentagem de glóbulos vermelhos.

## **6 – Análise estatística**

Os resultados obtidos foram expressos como a média dos grupos com o respectivo erro padrão ( $\pm$  SEM). A análise estatística foi feita usando o teste One-way Anova, seguido de teste de Bonferroni para comparação de todos os grupos experimentais (GAD & WEIL, 1994). Os cálculos foram realizados pelo software Graph-Pad Prism, v3.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA) e valores de  $P < 0,05$  indicam significância.

## **Resultados**

O crescimento tumoral promoveu diversos efeitos relacionados ao processo de espoliação tecidual do hospedeiro e muitos desses efeitos podem estar relacionados ao estresse oxidativo, induzindo alterações na atividade celular, padrão de crescimento e, também, indução de morte programada celular. Durante a gravidez, o feto também estava sujeito aos efeitos induzidos por citocinas, que não puderam ser selecionadas pela placenta, passando livremente da circulação materna para a fetal, muitas vezes causando prejuízos aos fetos irreversíveis. Os resultados do presente estudo mostraram que os

fetos das ratas prenhes portadoras de tumor apresentaram redução de peso em cerca de 57% menos quando comparado aos seus respectivos controles ( $C = 3,67 \pm 0,03$  g;  $L = 3,33 \pm 0,05$ ;  $W = 1,56 \pm 0,04$  e  $WL = 1,48 \pm 0,03$ ) (Figura 1). Este padrão de redução de peso fetal parece não envolver problemas de desnutrição, visto que nos grupos *paired*, os fetos apresentaram valores semelhantes aos grupos controles ( $C_p = 2,95 \pm 0,05$  e  $L_p = 2,70 \pm 0,06$ ). Apesar da suplementação nutricional feita com dieta rica em leucina observou-se que ainda houve prejuízo do peso fetal no grupo WL (redução em cerca de 55% em relação ao grupo L).

Para melhor compreensão dos efeitos produzidos pelo crescimento neoplásico, os resultados do hematócrito fetal mostraram que o grupo W apresentou cerca de 18% de redução na porcentagem de células vermelhas, em comparação aos demais grupos ( $C = 33,9 \pm 0,4\%$ ;  $L = 34 \pm 0,3$ ;  $W = 27,6 \pm 0,8$ ;  $WL = 33,4 \pm 0,5$ ;  $C_p = 33,2 \pm 0,6$ ;  $L_p = 35,1 \pm 0,5$ ) (Figura 2). Isto indica que os fetos provenientes de ratas portadoras de tumor sofreram com o processo anêmico, que foi revertido pela administração de leucina.

A demanda de glicose durante a gravidez deve ser intensamente regulada para permitir o desenvolvimento fetal e manter o organismo materno em equilíbrio. Com a presença do tumor o consumo de glicose intensifica-se e o organismo materno sofre com a redução dos níveis de glicose circulante. Este quadro induz o catabolismo protéico, redução de massa magra e conseqüente caquexia. Como conseqüência deste estado, o feto é afetado. A concentração de glicose no soro de fetos provenientes de mães com tumor ( $W = 62,66 \pm 2,8$  mg.dL<sup>-1</sup>) foi reduzida em cerca de 31% em relação ao observado em fetos provenientes de mães sem tumor ( $C = 91,38 \pm 2,6$ ) (Figura 3). Quando as ratas prenhes receberam dieta suplementada com leucina, a diferença entre as glicemias caiu para cerca de 15%, quando se comparou o grupo controle com leucina e o portador de tumor também com leucina ( $L = 89,27 \pm 2,9$ ;  $WL = 76,06 \pm 3,2$ ), mostrando o efeito benéfico da leucina na manutenção da glicemia fetal com conseqüentes reduções dos efeitos catabólicos sobre feto. Observou-se também que os níveis de glicose no feto WL assemelharam-se aos níveis encontrados em fetos *paired* ( $C_p = 80,78 \pm 2,5$  e  $L_p = 81,47 \pm 2,4$ ). Estes três grupos não mostraram diferenças estatísticas entre si, indicando que a redução observada na concentração de glicose do grupo WL em comparação aos grupos controle, C e L, possivelmente estava relacionada aos aspectos nutricionais, do que com a ação tumoral.

Além dos efeitos sobre parâmetros corporais e séricos verificados nos fetos provenientes de ratas portadoras de tumor, também, neste trabalho foram avaliados os

efeitos tumorais sobre os processos oxidativos na musculatura fetal. Assim, avaliando-se a atividade da enzima fosfatase alcalina na musculatura dos fetos, nos resultados apresentados no presente trabalho, pudemos observar que a atividade desta enzima foi maior nos grupos com a suplementação de leucina ( $L = 0,031 \pm 0,001 \text{ nmol. } \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $WL = 0,0231 \pm 0,0008$ ) do que a atividade observada nos grupos com dieta normoprotéica ( $C = 0,0246 \pm 0,0007$ ;  $W = 0,0173 \pm 0,0008$ ) (Figura 4), sugerindo que esses fetos estavam com atividade celular mais acentuada. A análise dos efeitos do crescimento tumoral mostrou que os fetos do grupo W apresentaram significativa redução, cerca de 30%, da atividade da fosfatase alcalina, sugerindo menor atividade celular muscular nesses fetos. Por outro lado, mesmo durante a suplementação nutricional, o crescimento tumoral promoveu alteração da atividade celular, (redução em cerca de 26% da atividade da fosfatase alcalina no grupo WL), porém essa atividade foi semelhante aos padrões controles quando comparada ao grupo C e Cp (Figura 4).

Analisou-se a atividade das enzimas atuantes no processo de controle do estresse oxidativo e encontramos atividades aumentadas nos grupos com a suplementação de leucina.

A glutationa-S-transferase (GST) é uma das enzimas citosólicas que participa de múltiplas funções, incluindo detoxificação, *clearance* de produtos do estresse oxidativo, modulação da atividade celular e sinalização de apoptose. No presente trabalho, verificou-se que nos músculos dos fetos dos grupos com leucina, a atividade da GST estava aumentada ( $L = 0,17 \pm 0,01 \text{ nmol.} \mu\text{g proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) em relação aos grupos com dieta eutrófica controle ( $C = 0,136 \pm 0,007$ ) (Figura 5), conferindo-lhes maior efeito protetor ao organismo fetal. Os efeitos tumorais puderam ser observados nos fetos do grupo W, onde a atividade da GST estava significativamente reduzida em cerca de 50% ( $W = 0,068 \pm 0,010$ ). A suplementação nutricional promoveu recuperação da atividade enzimática nos fetos WL ( $WL = 0,123 \pm 0,006$ ) valores similares ao do grupo C (Figura 5). A alimentação pareada, grupos Cp e Lp, proporcionou atividade da enzima GST semelhante aos grupos controles (C e L) (Figura 5).

A concentração celular de glutationa reduzida (GSH) é importante, pois representa o substrato para atuação da glutationa-S-transferase. Assim verificou-se que a concentração de GSH não diferiu, estatisticamente, entre todos os grupos com exceção do grupo W, onde a concentração de GSH tendeu a se elevar (Figura 6), provavelmente em resposta à menor atividade da GST.

Esse efeito estendido ao organismo fetal pode ser observado na proteção do organismo ao aumento de estresse oxidativo, gerado pela presença de tumor materno. A catalase participa dos eventos de proteção ao processo de estresse oxidativo, decompondo peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Os fetos dos grupos de mães portadoras de tumor (W) apresentaram elevação da atividade enzimática da catalase. Os valores significativamente elevados de catalase no grupo tumor ( $W = 1,02 \pm 0,18 \text{ nmol} \cdot \mu\text{g prote\u00edna}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (Figura 7) associados aos outros par\u00e2metros analisados neste trabalho sugerem que houve elevado \u00edndice de estresse oxidativo no organismo fetal. Grupo com tumor e suplementa\u00e7\u00e3o nutricional (WL=  $0,79 \pm 0,07$ ) apresentou atividade da catalase cerca de 22% menor \u00e0 observada no grupo W, aproximando aos valores encontrados nos grupos controles com e sem leucina (C =  $0,54 \pm 0,09$ ; L =  $0,42 \pm 0,34$ ). Esses dados somados a outros par\u00e2metro analisados sobre a a\u00e7\u00e3o de estresse oxidativo indicam que al\u00e9m da melhora dos par\u00e2metros s\u00e9ricos, a leucina tamb\u00e9m apresenta efeitos protetores sobre o organismo fetal quanto \u00e0s enzimas antioxidantes.

As les\u00f5es celulares decorrentes do estresse oxidativo s\u00e3o provenientes da desestrutura\u00e7\u00e3o da bicamada lip\u00eddica a partir da peroxida\u00e7\u00e3o de lip\u00eddeos, al\u00e9m de preju\u00edzos do conte\u00fado e fun\u00e7\u00e3o das prote\u00ednas a partir do processo de carbonila\u00e7\u00e3o de prote\u00ednas. Assim, nesse trabalho verificou-se o produto final da peroxida\u00e7\u00e3o de lip\u00eddeos celulares, evidenciada pela concentra\u00e7\u00e3o de malondialde\u00eddo (MDA), no organismo fetal. Os resultados mostraram que nos fetos do grupo tumor ( $W = 0,49 \pm 0,03 \text{ nM} \cdot \mu\text{g prote\u00edna}^{-1}$ ) houve aumento da concentra\u00e7\u00e3o de MDA, em rela\u00e7\u00e3o aos fetos do grupo C ( $0,29 \pm 0,03$ ) (Figura 8). Este par\u00e2metro n\u00e3o foi alterado no grupo com tumor e suplementa\u00e7\u00e3o com leucina (WL  $0,34 \pm 0,02$ ), apresentando redu\u00e7\u00e3o de 30% na concentra\u00e7\u00e3o de malondialde\u00eddo quando comparado ao grupo n\u00e3o suplementado (W); os valores do grupo WL n\u00e3o diferiram estatisticamente do respectivo grupo controle (L =  $0,21 \pm 0,02$ ). Esta situa\u00e7\u00e3o, provavelmente, ocorreu devido \u00e0 sinaliza\u00e7\u00e3o comandada pelos BCAAs, principalmente leucina, aumentando a atividade celular com conseq\u00fcente aumento na s\u00edntese de enzimas anti-estresse oxidativo.

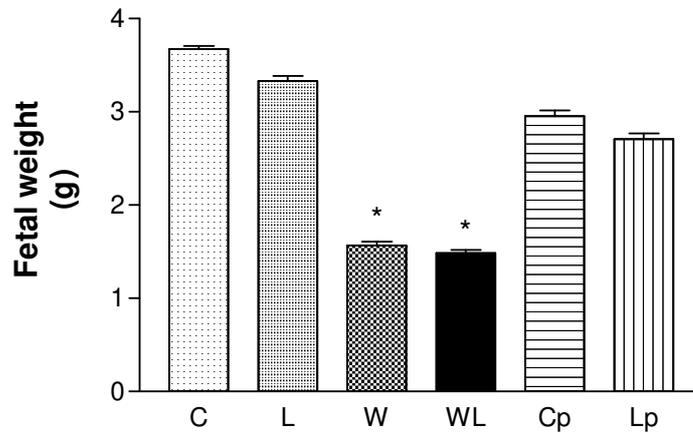


Figura 1. Peso dos fetos (g) provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupos estatisticamente diferentes dos demais.

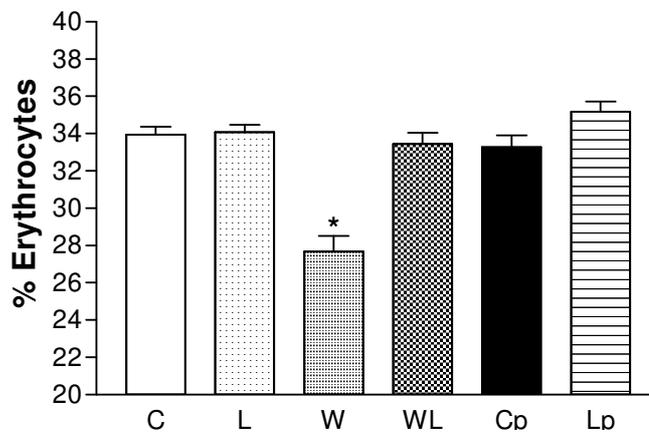


Figura 2. Porcentagem de células vermelhas presente no sangue de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupo estatisticamente diferente dos demais. \*Grupo estatisticamente diferente dos demais.

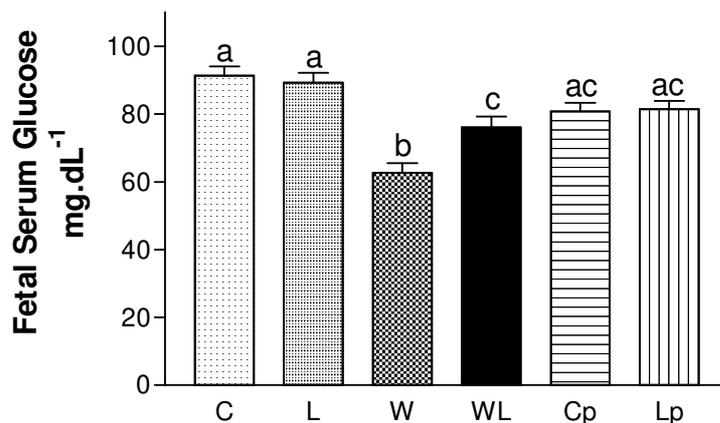


Figura 3. Concentração de glicose sérica de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Letra “a” representa grupos estatisticamente iguais. Letra “b” representa grupo estatisticamente diferente dos demais. Letra “c” representa grupos estatisticamente iguais. Letras “a e c” representam grupos estatisticamente iguais tanto aos grupos marcados com letra “a” quanto com letra “c”.

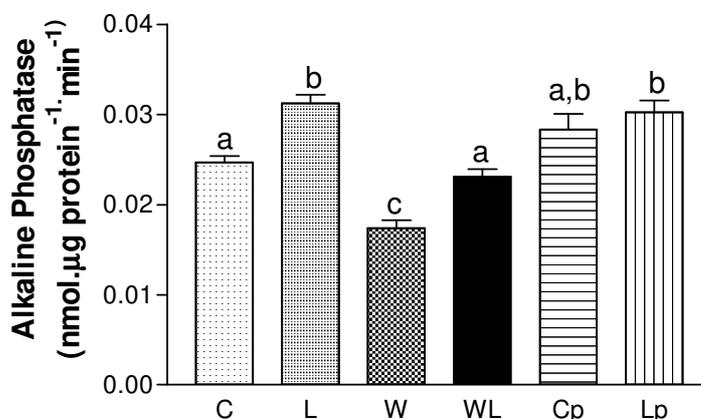


Figura 4. Atividade da enzima fosfatase alcalina presente no músculo gastrocnêmio de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Letra “a” representa grupos estatisticamente iguais. Letra “b” representa grupo estatisticamente iguais. Letra “c” representa grupo estatisticamente diferente dos demais. Letras “a e b” representam grupos estatisticamente iguais tanto aos grupos marcados com letra “a” quanto com letra “b”.

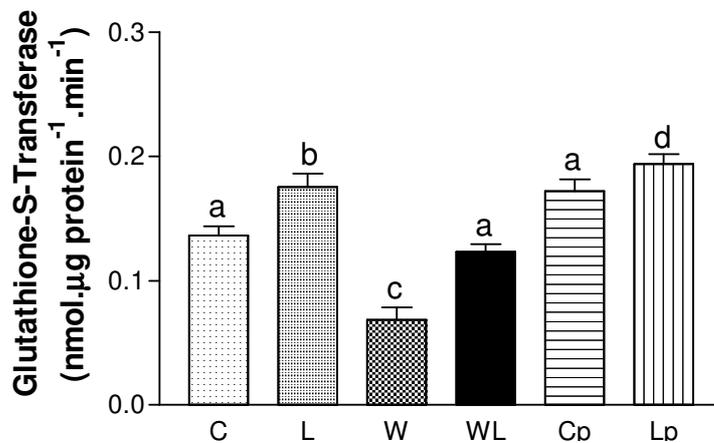


Figura 5. Atividade da enzima glutathione-S-transferase presente no músculo gastrocnêmio de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. Letras iguais representam semelhança estatística entre os grupos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

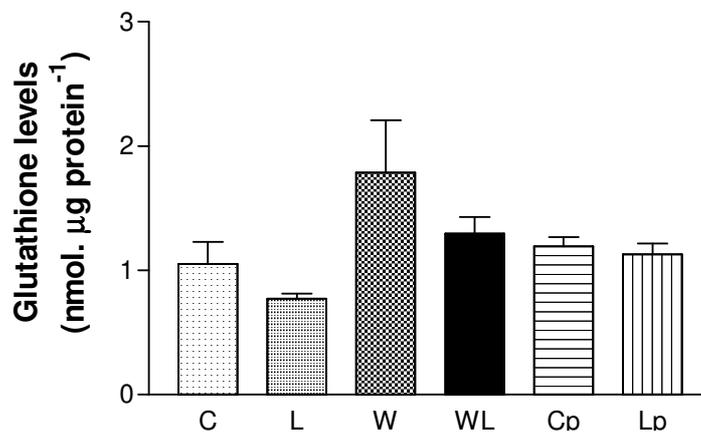


Figura 6. Níveis de glutathione presente no músculo gastrocnêmio de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL.

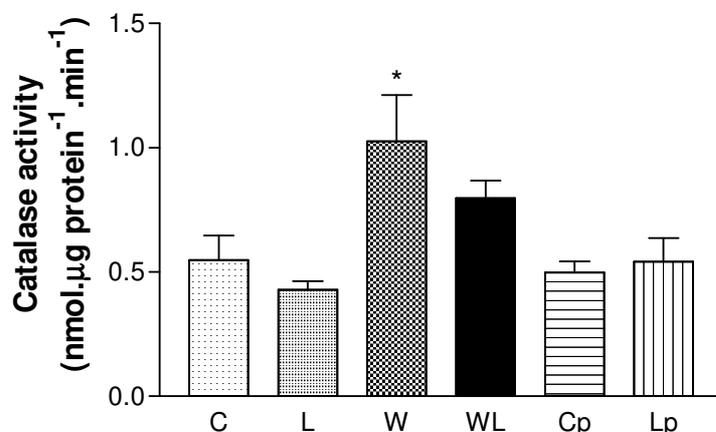


Figura 7. Atividade da enzima catalase presente no músculo gastrocnêmio de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupo estatisticamente deferente dos demais.

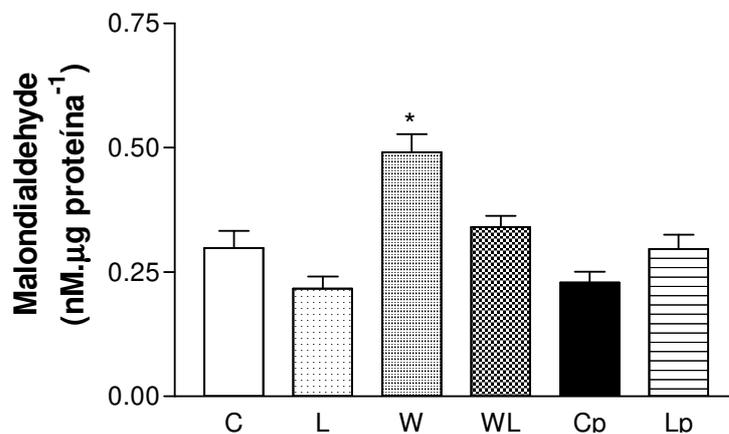


Figura 8. Concentração de malondialdeído (MDA) presente no músculo gastrocnêmio de fetos provenientes de ratas portadoras ou não do carcinossarcoma de Walker 256 e submetidas ou não a dieta rica em leucina. Legenda: C – Rata controle; L – Rata suplementada com dieta rica em leucina; W – rata com tumor; WL – rata com tumor submetido a dieta rica em leucina; Cp – ratas submetidas a nutrição pareada semelhante a ingestão diária das ratas do grupo W; Lp – ratas submetidas a dieta rica em leucina e a nutrição pareada à ingestão diária das ratas WL. \*Grupo estatisticamente deferente dos demais.

## Discussão

Dentre as patologias que ocorrem durante a gravidez a coexistência com neoplasia maligna torna o estado gravídico débil não pela incidência, mas sim pela associação desses dois estados metabolicamente muito complexos. De todos os pontos mais preocupantes, ressalta-se o crescimento e desenvolvimento fetal como o ponto mais frágil desse processo.

O estresse oxidativo acontece em todas as células do organismo aeróbico, proporcionando adaptação celular para que essas possam suportar o elevado grau de lesão produzido pelos radicais livres e, também, os produtos oriundos da oxidação. O feto também sofre com o estresse oxidativo, porém como todo mecanismo celular, adapta-se desenvolvendo o equilíbrio entre os efeitos oxidativos em relação às respostas antioxidantes (WAN & WINN, 2006).

A atividade dos tecidos fetais é muita elevada, quanto ao consumo de substratos (CETIN, 2003), perfazendo assim o conjunto de processos anabólicos, extremamente elevado durante todo o período gestacional. HAY (1995) e CETIN (2003) descrevem que a demanda de substrato gerada pelo feto é intensa e o organismo materno deve suprir esta necessidade para não afetar a gestação, contribuindo com o constante anabolismo. Em contrapartida o catabolismo também está presente e é necessário no *turnover* protéico contribuindo para o crescimento fetal (HAY, 1995). O equilíbrio entre estes dois processos, anabolismo e catabolismo, é vital para que o feto chegue a termo dentro de condições viáveis. O feto consome elevada quantidade de glicose (HAY, 2006) e aminoácidos (KING, 2006) para esses processos. Qualquer falha no fornecimento adequado de substratos ao feto prejudica o crescimento e desenvolvimento fetal, seja falha relacionada à glicose (como no caso do presente trabalho, onde há redução da glicose sérica dos fetos das fêmeas com tumor), aminoácidos (como em GOMES-MARCONDES *et al* (1998 e 2003) onde a presença de tumor altera tanto desenvolvimento fetal quanto a concentração de proteína muscular esquelética de ratos) ou oxigênio (como no caso da redução do hematócrito dos fetos W deste trabalho). WALLACE *et al.* (2002) realizaram experimento com desnutrição em ovelhas e percebem que o estado materno é fundamental para a perfeita manutenção da gestação; em seus experimentos observaram a ocorrência de fetos com retardo no crescimento intra-uterino e redução no tamanho e peso da placenta em ovelhas quando submetidas à restrição alimentar. OSGERBY *et al.* (2002), também trabalhando com ovelhas, observaram que

modificações na nutrição durante a gestação afetava o desenvolvimento fetal, inclusive causando seqüelas no organismo que irão afetar a saúde e a sobrevivência dos animais gerados.

Além do fator nutricional, que poderia ser preponderante nos fetos W e WL comparados aos respectivos controles e fetos *pair fed*, há também fatores indiretos que atuariam prejudicando o desenvolvimento do feto como a presença de substâncias produzidas pelo tumor e/ou organismo materno. CARBÓ et al (1995) encontraram déficit na mobilização de aminoácidos para os fetos em mães que receberam fator de necrose tumoral (TNF) durante a gestação, relacionando com o menor fluxo sanguíneo no local provocada pela ação da citocina TNF. Corroborando com os resultados do presente trabalho, GOMES-MARCONDES *et al* (1998), em seus experimentos, injetaram líquido ascítico em ratas prenhes e obtiveram aumentam de reabsorção fetal, redução tanto de peso fetal quanto placentário e aumento de efeitos danosos semelhantes aos encontrados em ratas que desenvolveram o tumor, indicando que estas alterações são induzidas por substâncias produzidas pelas células cancerígenas. Estudos mostram que a presença de fator de indução de proteólise (PIF) causa alterações celulares como indução de morte celular programada, além da espoliação da massa protéica estrutural. RUSSELL *et al* (2007) em seus experimentos verificaram que PIF juntamente com o TNF estimulam o aumento de espécies reativas de oxigênio e isso aumentou a degradação de proteína muscular através da ativação do sistema ubiquitina-proteossomo.

O feto também está sujeito, em função do seu alto metabolismo, a produção de radicais livres e conseqüentemente desenvolvimento de processos oxidativos danosos ao seu desenvolvimento. O estresse oxidativo é relacionado como sendo a causa de ampla variedade de doenças ou de estados degenerativos, como câncer, artrite reumatóide, problemas cardiovasculares e envelhecimento precoce (PERKINS, 2006). O organismo possui sistema de defesa contra o estresse oxidativo através da utilização de algumas enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase somadas a estas enzimas existem substâncias exógenas que também tem papel importante na ação antioxidante, como vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides (VALKO *et al*, 2006). O câncer pode produzir anorexia/caquexia no paciente gerando radicais livres no organismo e aumentando a ação do estresse oxidativo, sendo a suplementação nutricional uma das poucas soluções para esta situação (MANTOVANI *et al*, 2004).

A suplementação nutricional com aminoácidos de cadeia ramificada tem contribuído, em muito, para processos de recuperação da massa corpórea magra em organismos com crescimento neoplásico, inclusive em determinadas patologias como o câncer. Em experimentos realizados por GOMES-MARCONDES *et al* (2003) houve menor perda de massa magra e manutenção de miosina muscular em ratos com crescimento tumoral, quando receberam dieta suplementada com leucina quando comparados aos animais que receberam dieta controle. CHOUDRY *et al* (2006) relataram que BCAAs administrados em pacientes com câncer, pacientes no período de recuperação pós-cirúrgica e em pacientes desnutridos promoveram resultados de recuperação de massa magra acima da média para esses pacientes.

Desse modo, pode-se notar, no presente trabalho, que os fetos de mães portadoras de tumor, que receberam suplementação nutricional, apresentaram significativa melhora quanto aos substratos ofertados pela placenta (refletindo em parâmetros da glicemia, hematócrito e atividade celular – fosfatase alcalina – similares ao grupo controle) e aos mecanismos antioxidantes (como valores similares da atividade de enzimas antioxidantes (GST e catalase) e produtos do estresse oxidativo (MDA)). Gomes-Marcondes *et al.* (2007) verificaram que a suplementação nutricional com leucina promoveu ativação das enzimas anti-oxidantes e diminuição da peroxidação lipídica em placenta de ratas portadoras de tumor. Assim como ELEY & TISDALE (2007) afirmam que a presença de tumor causa a depressão da síntese de proteína e aumento na sua degradação, pudemos dizer que a ação antioxidante teve efeito bastante atuante na recuperação de animais com a presença de tumor, assim como visto por RUSSELL *et al* (2007), onde a administração de antioxidante  $\alpha$ -tocoferol em camundongos com tumor MAC16 agiu na recuperação do peso corpóreo, atenuou a degradação protéica e acentuou a síntese de proteína na musculatura esquelética. Podemos sugerir que em nosso trabalho apesar dos fetos WL apresentaram também danos produzidos pelo crescimento neoplásico, a suplementação nutricional, como forma coadjuvante à todas as terapias, pode ser um novo caminho a ser utilizado nesta área ainda pouco estudada.

## **Conclusão**

Dieta suplementada com leucina mostrou-se vantajosa na redução dos efeitos prejudiciais causados pela presença do tumor no organismo de ratas prenhes com conseqüente proteção do feto.

A síntese protéica mostrou-se semelhante em todos os grupos analisados, com exceção do grupo com tumor e sem suplementação com leucina. Isso indica que o uso desse aminoácido melhora a síntese protéica no músculo de fetos provenientes de ratas com neoplasia.

Situação semelhante foi encontrada na análise de degradação protéica. O grupo com tumor e sem suplementação apresentou valores elevados de degradação muscular quando comparados aos outros grupos, principalmente quando comparado ao grupo com tumor e suplementado com leucina, indicando novamente o efeito protetor do uso de leucina na presença de tumor.

Esse efeito benéfico da utilização da leucina também ficou evidente com relação aos parâmetros de estresse oxidativo. O grupo com tumor apresentou índices de atividade celular e enzimática bem distintos aos observados no grupo com tumor que recebeu suplementação de leucina, sendo que os valores obtidos para esse último grupo foram próximos aos valores do grupo sem tumor e do grupo sem tumor com suplementação de leucina.

Esses resultados permitem concluir que a presença da leucina na dieta de ratas prenhes com tumor melhora o quadro geral do metabolismo protéico e reduz o estresse oxidativo celular nos fetos.

## Referências bibliográficas

ADENIYI FA, OLATUNBOSUN DA. Origins and significance of the increased plasma alkaline phosphatase during normal pregnancy and pre-eclampsia. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**. 91(9) 857, 1984.

ALDORETTA PW & HAY WH: Fetal Nutrition. **Nutrition Research** 14(6):929-965, 1994.

BARACOS VE, MACKENZIE ML: Investigations of Branched-Chain Amino Acids and Their Metabolites in Animal Models of Cancer. **J. Nutr.** 136:237S-242S, 2006.

BARKER DJP: Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. **Nutrition** 13(9):807-813, 1997.

BARRETT A. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. **Biochem. J.** 187:909-912, 1980.

BEACH EF, TURNER JU. **Clin. Chem.** 4:462-75, 1958.

CARBÓ N, LÓPEZ-SORIANO FJ, ARGILIÉS JM. Administration of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Results in a Decreased Placental Transfer of Amino Acids in the Rat. **Endocrinology**. 136:3579-3584, 1995.

CARBÓ N, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILÉS JM: Tumour growth and fetal uptake of amino acids in the pregnant rat. **Eur J Cancer** 32A(8):1413-9, 1996.

CERVELLO I, LAFUENTE A, GIRALT M, MALLOL J: Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. **Planceta** 13:273-80, 1992.

CETIN I. Placental transport of amino acids in normal and growth-restricted pregnancies. **Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.** 110:S50–S54. 2003

CHERIF H, Reusens B, Dahri S, Remacle C: A Protein-Restricted Diet during Pregnancy Alters in Vitro Insulin Secretion from Islets of Fetal Wistar Rats. **J. Nutr.** 131:1555–1559, 2001.

CHOUDRY H, PAN M, KARINCH A, SOUBA W: Branched-Chain Amino Acid-Enriched Nutritional Support in Surgical and Cancer Patients. **J. Nutr.** 136:314S-318S, 2006.

COHEN G, DEMBIEC D, MARCUS J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Anal Biochem.** 34:30-8, 1970.

ELEY HL, TISDALE MJ. Skeletal Muscle Atrophy, a Link between Depression of Protein Synthesis and Increase in Degradation. **The journal of biological chemistry.** 282:10(9), 7087-97, 2007.

FEDELE MJ, THOMAS CV, FARRELL PA. Selected contribution: IGF-I antibody prevents increases in protein synthesis in epitrochlearis muscles from refed, diabetic rats. **J App Physiol.** 90(3):1166-1173, 2001.

FREITAS JJS, POMPÉIA C, MIYASAKA CK, CURI R. Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. **J. Neurochem.** 77:655-663, 2001.

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

GARLICK PJ. The Role of Leucine in the Regulation of Protein Metabolism. **J Nutr.** 135: 1553S–56S, 2005.

GOMES-MARCONDES MCC. Influência da gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário: Estudo experimental em ratas Wistar inoculadas com o carcinossarcoma de Walker 256. São Paulo, 1994 [Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Univ. de São Paulo].

GOMES-MARCONDES MC, CURY L, CURI R: Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. **Cancer Research Therapy and Control**. 5: 277-83, 1998.

GOMES-MARCONDES MCC, 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(11), 2003.

GOMES-MARCONDES MCC, VENTRUCCI G, YANO CL, MELLO MAR. Leucine rich diet changed the placental activity in pregnant tumor-bearing rats. Submetido a publicação no periódico **Placenta**, 2007

GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MMJ. **Biol. Chem**. 1977, 751, 1949.

HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione S-transferases. The first step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem**. 249:7130-7139, 1974.

HALLIWELL B. Antioxidants in human health and disease. **Anna Rev. Nutr**. 16:33-50, 1996.

HAY WW. Current Topic: Metabolic Interrelationships of Placenta and Fetus. **Placenta**. 16:19-30, 1995.

HAY WW. Recent observations on the regulation of fetal metabolism by glucose. **J Physiol**. 572.1:17–24, 2006.

JIANG ST, WANG JH, CHANG T, CHEN CS. A continuous method for measuring calpain activity. **Anal. Biochem** 244: 233-238, 1997.

KING JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. **Am. J. Clin. Nutr**. 71 (suppl): 1218S-1225S, 2000.

KING RM, WELCH JS, MARTIN JK, COULAM CB. Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Surg. Gynecol. Obstet**, 160: 228-32, 1985.

LOIBL S, MINCKWITZ G, GWYN K, ELLIS P, BLOHMER JU, SCHLEGELBERGER B, KELLER M, HARDER S, THERIAULT RL, CRIVELLARI D, KLINGEBIEL T, LOUWEN F, KAUFMANN M. Breast Carcinoma during Pregnancy. **Cancer**. 106(2): 237-46, 2006.

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(7): 850-6, 1998.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FAN AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol. Chem**. 193: 265-75. 1951.

MANTOVANI G, MADEDDU C, MACCIO A, GRAMIGNANO G, LUSSO MR, MASSA E, ASTARA G, SERPE R. Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 13(10):1651–9, 2004.

MARTINS MJ, NEGRAO MR & HIPOLITO-REIS C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clinical Biochemistry** 34(6) 463-468, 2001.

MEULEMANS O. **Clin. Chim. Acta**. 5:757, 1960.

MILLEY JR. Ovine fetal leucine kinetics and protein metabolism during decreased oxygen availability. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 274:618-626, 1998.

MOORE KL, PERSAUD, TVN. **Embriologia clínica**. 6º ed. Guanabara Koogan, p114, 2000.

NORTON LE, LAYMAN DK. Leucine Regulates Translation Initiation of Protein Synthesis in Skeletal Muscle after Exercise. **J Nutr**, 136: 533S–S537, 2006.

OPAS/OMS–Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde. Informativo. <http://www.opas.org.br/sistema/fotos/nutricao.htm>, 2000.

OSGERBY JC, WATHES DC, HOWARD D, GADD TS. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. **Journal of Endocrinology**. 173:131–141, 2002.

PAVLIDIS N, PENTHEROUDAKIS G. The pregnant mother with breast cancer: Diagnostic and therapeutic management. **Cancer Treatment Reviews**, 31: 439–447, 2005.

PERKINS AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**. 46:77–83, 2006.

REEVES PG, NIELSEN FH & FAHEY J. 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. **Journal of Nutrition** 123 1939-1951,

RUSSELL ST, ELEY H, TISDALE MJ. Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. **Cell. Signal**. Article in press: doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.003, 2007.

TOLEDO MT, VENTRUCCI G, GOMES MARCONDES MCC. Cancer during pregnancy alters the activity of rat placenta and enhances the expression of cleaved PARP, cytochrome-c and caspase 3. **BMC Cancer**. 6:168, 2006.

UCHIYAMA M & MIHARA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thibarbituric acid test. **Anal Biochem**. 86,271-278, 1978.

VARY TC, JEFFERSON LS & KIMBALL SR. Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. **American Journal Physiology** 277 (6 Pt 1) E1077-E1086, 1999.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. 160:1–40, 2006.

VENTRUCCI G, MELLO MAR, GOMES-MARCONDES MCC. Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor. **Braz J Med Biol Res.** 34(3), 2001.

VENTRUCCI G, MELLO MAR, GOMES MARCONDES MCC. Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet. **Endocrine-Related Cancer.** 11:887–895, 2004A.

VENTRUCCI G, SILVA LGR, MELLO MAR, GOMES-MARCONDES MCC. Effects of a Leucine-Rich Diet on Body Composition During Nutritional Recovery in Rats. **Nutrition.** 20:213–217, 2004B.

VENTRUCCI G, MELLO MAR, GOMES MARCONDES MCC. Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **BMC Cancer.** 7:42, 2007.

WAALKES TP & UDENFRIEND S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **Journal Laboratory Clinical Medicine.** 50:733-736, 1957.

WALLACE JM, BOURKE DA, AITKEN RP, MILNE JS, HAY WW. Placental glucose transport in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. **Journal of Physiology.** 547.1:85–94, 2002.

WAN J, WINN LM. In Utero–Initiated Cancer: The Role of Reactive Oxygen Species. **Birth Defects Research.** 78:326–332(Part C), 2006.