

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



SAMANTA MARIA GOBBO FEDRIZZI

**“PERFIL PROTÉICO SÉRICO EM RATAS WISTAR
JOVENS E ADULTAS GRÁVIDAS PORTADORAS DO
CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256”**

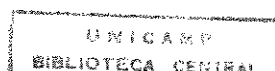
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Samanta Maria Gobbo Fedrizzi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

29/07/99
[Signature]

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas, na
área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas - 1999



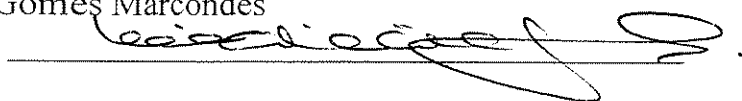
12690

Campinas, 29/07/99

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

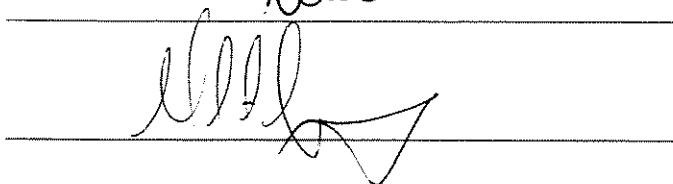
Profa.Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes



Profa.Dra. Maria Alice Rostom de Mello



Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



SUPLENTE

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito



Dedico este trabalho ao meu marido Ricardo, pelo companheirismo e amor nos momentos de estudo e trabalho e pela ajuda na realização de nosso maior sonho, nosso filho Pedro.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes pela orientação, estímulo e amizade que me foi prestado na realização do projeto.

Aos professores da pós- graduação do Depto. de Fisiologia e Biofísica, pelos ensinamentos passados;

Ao Prf. Dr. Flávio Tavares e funcionários do laboratório do Depto. de Genética, ESALQ/ USP, pela ajuda e orientação no desenvolvimento da técnica utilizada;

Aos companheiros de laboratório, Gislaine Ventrucci, Maria Carolina Meira Villani, Cláudia Magno, Gustavo Luís Ramos da Silva, Patrícia Donadon Sousa, Wagner de Jesus Pinto, Luciana P. Magri, pelos momentos juntos e pela ajuda na realização das análises;

À amiga Mércia Tancredo Toledo, pelo intenso apoio para a finalização este trabalho;

À amiga Jaqueline de Lima Brito, que nos momentos mais difíceis do desenvolvimento da tese me ajudou a superá- los;

Aos alunos da pós- graduação, pela amizade e companheirismo;

Aos funcionários do Depto de Fisiologia e Biofísica, em especial a Aparecida Silva Geraldo, Alexandra M. F. Sousa, Ivo S. Moreira, Sonia M.M. de Oliveira pela cooperação a mim prestado. À Josefina S.B. Nogueira, Francisco Leite, Léscio D. Teixeira, Davi Santiago Santos e José F. Machado pelo cuidado dispensados aos animais e amizade.

Ao meu marido Ricardo, pelo incentivo, pelo amor e companheirismo mesmo nos momentos mais difíceis. Ao meu filho Pedro, que veio para iluminar nossas vidas. Aos meus pais Nivaldo e Hermínia pelo amor e apoio. À minha irmã, Sarita pela nossa amizade que nos une.

Agradeço a todos de meu convívio e aos que, involuntariamente, omiti seus nomes.

Agradecimentos especiais à FAPESP, processos nº 9803066-0, 96/09463-6, FAEP/ UNICAMP e CNPq/ CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos Produtos Roche Química e Farmacêutica S.A. pela doação da mistura vitamínica e à Amido Com Products Brasil Ingredientes Industriais Ltda, pela doação do amido de milho e dextrina, utilizados por nós na confecção de dietas.

Meu muito obrigado

ÍNDICE

Resumo.....	vi
Introdução.....	1
a) Gravidez e suas adaptações fisiológicas.....	1
b) Câncer e suas adaptações fisiopatológicas.....	6
c) Câncer e Gravidez.....	8
Objetivos.....	10
Material e Métodos.....	11
Resultados	
1. Parâmetros Fetais e Placentários.....	17
2. Parâmetros Séricos.....	25
2.1 Hematócrito	25
2.2 Concentração Protéica Sérica	27
2.3 Perfil Eletroforético das Proteínas Séricas.....	29
3. Discussão.....	35
4. Conclusões.....	44
5. Bibliografia.....	45

RESUMO

A associação entre gravidez e câncer não é rara, sendo que essas condições fisiopatológicas envolvem mudanças na proteína sérica. Neste trabalho, nós avaliamos o efeito do desenvolvimento do tumor de Walker 256 e sua influência sobre o desenvolvimento fetal e sobre os parâmetros protéicos séricos em ratas jovens e adultas grávidas. Após o acasalamento, fêmeas Wistar jovens (50 dias) e adultas (90 dias) prenhes foram distribuídas em 3 grupos: jovens grávidas controle (jgc), jovens grávidas com tumor (jgw), jovens grávidas inoculadas com líquido ascítico (jga), adultas grávidas controle (agc), adultas grávidas com tumor (agw), adultas grávidas inoculadas com ascite (aga). Foram também utilizadas ratas virgens distribuídas em 3 grupos: jovens controle (jc), jovens com tumor (jw), jovens inoculadas com líquido ascítico (ja), adultas controle (ac), adultas com tumor (aw) e adultas inoculadas com líquido ascítico(aa). Nos grupos (jw) e (aw) injetou-se no subcutâneo $2,5 \times 10^6$ células neoplásicas viáveis. Os grupos (ja) e (aa) receberam inoculação diária de 2,0ml de líquido ascítico. Após o sacrifício, no 19^o e 21^o dias, foram coletadas amostras de sangue para determinação da proteína total e análise eletroforética. Amostras do soro foram diluídas em tampão Tris- Hcl sendo analisado em eletroforese em gel de acrilamida 10% com SDS 1%. O gel foi corado com Coloração de Prata. O peso molecular das bandas foram calculadas pela comparação de proteína padrão, e respectivamente comparada com grupos controle, onde verificamos intensas alterações na unidade feto / placentária, nos grupos de ratas jovens portadoras do carcinoma de Walker 256, em ambos os períodos de experimento (19^o e 21^o). As ratas adultas portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico apresentaram redução do peso fetal no 21^o de experimento. Redução do hematócrito nas ratas jovens e adultas grávidas ou não portadoras de tumor. O perfil eletroforético das fêmeas, tanto jovens quanto adultas, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico, apresentaram alterações em relação à expressão das frações protéicas entre os pesos moleculares de 116KDa e entre 30 e 20KDa. Essas alterações foram provavelmente devido a influência de vários fatores, diretos e/ou indiretos, produzidos pelas células neoplásicas e/ou células do hospedeiro, os quais puderam ser reproduzidos pela inoculação do líquido ascítico.

Auxílio Financeiro: FAPESP (n^o 8/03066-0; 96/09463-6)/ FAEP-UNICAMP, CNPq/CAPES

INTRODUÇÃO

a) Gravidez e suas adaptações fisiológicas

A gravidez, tanto em mulheres como em ratas, é caracterizada por duas fases distintas: formação de estoques energéticos maternos e de atividade metabólica (HERRERAS et al., 1991). A primeira, chamada de fase anabólica, ocorre, predominantemente, do início até a metade da gestação, havendo acúmulo de gordura no tecido adiposo, deposição de glicogênio no fígado e aumento da massa corporal magra (proteína, exclusivamente). A segunda, chamada fase catabólica, é caracterizada pela mobilização dos estoques maternos, provendo os substratos necessários ao crescimento fetal. Nessa fase, o turnover do tecido adiposo está acelerado (aumento da deposição e mobilização de triglicérides), a concentração de glicogênio hepático tende a decrescer e há aumento da proteólise muscular materna (HERRERAS et al., 1991; FREINKEL & METZGER, 1992).

Na fase catabólica da gravidez normal, tem-se catabolismo protéico e mobilização dos triglicérides, em decorrência ao aumento da resistência periférica à insulina e ao aumento de catecolaminas e glicocorticóides; assim ocorre aumento dos substratos plásticos e energéticos para o desenvolvimento da placenta e do feto (ADAM & FELIG, 1978).

Segundo DEMARCO et al., (1997), durante a gravidez, nutrientes derivados da mãe suprem o feto via circulação placentária. O nível plasmático de glutamina na veia umbilical e fetal é alta, sugerindo que a mesma é necessária para o desenvolvimento e rápido crescimento do feto. Uma vez que participa da síntese de purina e pirimidina na divisão celular, contribuindo, portanto, para um metabolismo energético normal.

As adaptações do metabolismo protéico durante a gravidez são muito pouco definidas. Existem evidências de que, durante o início da gestação de ratas,

ocorre acúmulo de proteína na carcaça, que será mobilizada através do catabolismo protéico muscular materno, assegurando o suprimento de aminoácidos que serão utilizados para o crescimento fetal nos estágios finais da gravidez (BEATON et al. 1954; NAISMITH 1966 e 1973; MAYEL-AFSHAR & GRIMBLE, 1982 e 1983). Segundo MILLICAN et al. (1985 e 1987) em camundongos, a síntese de proteínas no tecido materno aumenta durante a gravidez. No período gestacional há uma intensa mobilização de aminoácidos associados a ingestão de alimentos, que não podem ser comparados ao aumento do crescimento fetal durante a gravidez (WEJS et al., 1995). Para suprir as necessidades de síntese protéica, ou outros processos metabólicos, os aminoácidos livres são rapidamente captados do sangue materno pela placenta. Uma das principais funções da placenta nos mamíferos é de proporcionar nutrição ao embrião em todos os estágios do seu desenvolvimento. Assim, através do mecanismo da difusão ocorre passagem de água, gases e nutrientes ao feto, bem como de produtos de excreção do feto para a mãe. Para que isso ocorra, há uma profunda alteração no metabolismo materno decorrente da ação de diversos hormônios em diferentes estágios da gravidez (KALKHOFF, 1991; FREINKEL & METZGER, 1992).

A atividade metabólica da placenta é, portanto, de regular a passagem de nutrientes para o feto, e o controle de seu balanço energético e crescimento (HAY, 1991). Sendo que, a maior influência sobre esta transferência são: fluxo sanguíneo e uma nutrição materna adequada (LANGLEY et al., 1996).

Durante a gravidez, alterações bioquímicas são canalizadas para fornecerem suporte para estas alterações metabólicas, variando de acordo com o período gestacional, como por exemplo o elevação do volume sanguíneo, de 3500 ml, (antes da gestação) para 5000 ml (ao seu final), hemodiluição das proteínas

plasmáticas circulantes e a síntese de outras subunidades protéicas em humanos (LORENZI, 1991).

As proteínas circulantes constituem os componentes mais importantes do plasma. Representam uma mistura muito complexa de mais de 100 diferentes tipos. Destas proteínas, as principais são: albumina, imunoglobulinas, fatores de coagulação, fibrinogênio, componentes do sistema de complemento, transferrina, haptoglobulina, plasminogênio, ceruloplasmina, lipoproteínas, α_1 antitripsina, transcobalamina, α_1 -glicoproteína (LORENZI, 1991). Todas as proteínas do plasma são produzidas pelos hepatócitos, exceto as imunoglobulinas, sintetizadas por linfócitos tipo B e por plasmócitos.

O fígado é o órgão responsável pela síntese da albumina e fibrinogênio, bem como 50 a 80% das proteínas plasmáticas. A síntese de cada uma delas é controlada por mecanismos reguladores específicos, sendo que seus teores dependem da integridade de muitos aspectos da função celular, incluindo os mecanismos de transcrição no núcleo, mecanismos de translação no retículo endoplasmático e mecanismos secretórios do aparelho de Golgi. Apesar dessas características comuns, as proteínas séricas, individualmente são afetadas diferentemente nas várias doenças. Além disso, a cinética da síntese e da renovação de determinadas proteínas, são essenciais para determinar uma resposta à uma lesão patológica aguda. Em geral, é mais provável que as concentrações plasmáticas das proteínas séricas, cujas renovações são rápidas, sejam deprimidas por uma lesão aguda grave em relação às proteínas, que são renovadas mais lentamente (p. ex., albumina). Finalmente, o catabolismo de certas proteínas plasmáticas pode ser acelerado, principalmente na presença de neoplasia maligna. A velocidade da síntese dessas proteínas, pode ser extremamente elevada, atingindo 30g/dia (MOORE, 1964). Em certos tipos de doenças, incluindo processos inflamatórios, neoplásicos, e outros há liberação de

certas enzimas hepáticas na circulação sanguínea, como por exemplo as transaminases e a fosfatase alcalina (WEISIGER, 1996).

HARAM et al. (1983), sugeriram que a síntese rápida das proteínas essenciais para o crescimento e desenvolvimento do feto, sejam um dos fatores que causam alterações dos níveis de albumina materna. MELLO (1985), também constatou que ratas jovens grávidas, apresentaram queda nos teores das frações β e γ e aumento da fração α . Por outro lado, HARAM et al. (1983), verificaram aumento do nível das frações α_1 , α_2 , β e γ em mulheres gestantes.

A maioria dos pacientes que sofrem alterações orgânicas, decorrentes de processos patológicos como câncer, colite ulcerativa, ulcera péptica, cirrose, hepatite, dentre outras patologias, apresentaram deficiência de proteínas. Para estes pacientes a necessidade básica é aporte protéico, para reconstituição tecidual, após qualquer intervenção médica. Estudos importantes da homeostase protéica consideram que a) as proteína do soro e dos tecidos estão em equilíbrio constante entre si, b) durante o catabolismo, as proteínas do soro são depletadas antes das proteína tissulares, c) um catabolismo crônico faz com que as proteínas do soro sejam mantidas às custas de proteínas tissulares e d) a formação de tecidos novos de reparo, necessita da reposição das proteínas primeiro no soro, e depois, nos tecidos.

A síntese protéica no organismo ocorre principalmente no fígado e nos linfonodos. O fígado produz quase toda a albumina, enquanto os linfonodos produzem as diversas globulinas, sendo que o fígado é o principal armazenador de proteína do plasma. Cerca de 40% das proteínas do fígado estão disponíveis para conversão em proteína do soro. Outras fontes dessas proteínas são os músculos, os tecidos conjuntivos e as fácias. Durante a síntese protéica, as proteínas do fígado são transportadas pela circulação para os vários tecidos e órgãos, para a formação de novos tecidos.

Com relação a albumina, seu mecanismo de “turnover” não é bem compreendido, entretanto sua perda está aumentada em síndrome nefrótica, enteropatia de perda-protéica, dermatite espoliativa e sangramento gastrointestinal. Sua concentração reflete no balanço entre a síntese e o catabolismo e, conseqüentemente, o estado funcional hepático (WEISIGER, 1996).

VILLA et al., (1992) verificaram redução significativa da síntese hepática de albumina (30%), bem como de sua concentração no plasma, em ratos portadores de tumor.

A resposta da fase aguda está ligado à produção de mediadores polipeptídios hormonais, denominados de citocinas. Algumas citocinas induzem alterações de fase aguda: interleucina 1, fator de necrose tumoral, interferon γ , interleucina 6 e o fator inibidor de leucemia. A interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, produzidos por certos tipos celulares, exercem seus efeitos primários nesses tecidos. Horas após o início da infecção ou do traumatismo, o fígado aumenta a velocidade de síntese da assim chamada proteína de fase aguda. A resposta inclui o aumento das proteínas normalmente encontradas em indivíduos saudáveis, assim como o aparecimento de novas proteínas que servem como marcadores de um evento patológico. A concentração de algumas proteínas plasmáticas, aumentam várias vezes durante a resposta de fase aguda, como por exemplo, as haptoglobulinas, certos inibidores de protease, componentes do complemento, ceruloplasmina e fibrinogênio. De todas as proteínas da fase aguda, a proteína C reativa e a proteína A amilóide sérica são, clinicamente, as mais importantes, pois sua presença serve como um indicador de processos patológicos. A proteína C reativa é, em particular, útil como um indicador da resposta protéica da fase aguda hepática. Apesar dos processos anabólicos do fígado, a resposta da fase aguda é acompanhada por um catabolismo acentuado

das proteínas musculares, associado à perda de peso corporal e ao balanço nitrogenado negativo global.

As globulinas desempenham numerosas funções enzimáticas no plasma; entretanto, sua principal função está relacionada a imunidade natural e adquirida que o indivíduo possui contra organismos invasores (GUYTON, 1992). Foram identificadas três frações das globulinas, α , β e γ em ordem decrescente de mobilidade eletroforética (MOORE, 1964). As frações de globulinas sérica são usadas para indicar doenças hepatobiliares. Elas são heterogêneas quanto à regulação da produção, propriedades físicas e função fisiológica. Suas concentrações podem ser medidas por eletroforese de proteínas ou fracionamento, que podem ser influenciadas por uma variedade de fatores hepáticos, extra-hepáticos e estados patológicos (WEISIGER, 1996).

Os anticorpos são as γ globulinas, que são denominadas imunoglobulinas. Em geral, constituem 20% de todas as proteínas plasmáticas. Há evidências que a placenta transfira γ globulinas maternas para a circulação fetal (GUYTON, 1992). MELLO, em 1985, estudando ratas prenhes com desnutrição protéico calórica, mostrou decréscimo do conteúdo sérico de proteína total, albumina e das frações de β e γ globulinas, em relação às controles sem gravidez.

b) Câncer e suas adaptações fisiopatológicas

De certo modo, o câncer tem processo semelhante à morfogênese placentária e embrionária, porém, sem o mecanismo normal de controle do crescimento celular (RAY & SAHA, 1986).

O crescimento das células neoplásicas modificam a harmonia dos processos metabólicos, através de profundas alterações no organismo. Nesses processos, vários fatores estão envolvidos: consumo de substratos específicos pelas células neoplásicas, redução do aporte de nutrientes causado pela anorexia,

estimulação das vias metabólicas, dentre outras alterações (COSTA, 1977, RUDDON, 1987). Ratos portadores de carcinossarcoma de Walker 256 mostraram redução da ingestão de alimento (GOMES-MARCONDES, 1985), podendo estar relacionada com a caquexia, que pode causar aumento de mortalidade em pacientes com câncer, causando alterações na homeostasia que levam a deficiência imunológica, falência dos órgãos e anormalidades metabólicas (KEVIN et al., 1988).

Segundo GOMES-MARCONDES (1994), ratas grávidas portadoras de câncer mostraram uma diminuição do conteúdo plasmático de proteína total (11%), albumina (13%) e globulina (20%). Redução das concentrações de proteína total e albumina sérica são, como visto anteriormente, freqüentemente observadas na gestação humana; sendo que a síntese rápida de proteínas essenciais para o crescimento e desenvolvimento do feto, seriam um dos fatores que causariam alterações nas concentrações protéicas do soro (HARAM et al, 1983). Tais alterações do metabolismo protéico, com conseqüente redução das proteínas séricas, durante a gestação em mulheres, são decorrentes, também da ação dos estrógenos (CASEY et al., 1992).

A alfafetoproteína, uma glicoproteína secretada durante a gravidez, também pode ser secretada por alguns tipos de tumores e utilizada como marcador para o diagnóstico e monitoramento de certos tipos de patologia, como carcinomas hepatocelulares e tumores de ovário (CHEN et al, 1995).

Experimentos *in vivo*, realizados com ratos portadores de tumor sólido, indicaram que a maior parte dos aminoácidos plasmáticos é utilizada pelo tecido neoplásico, tanto para os seus processos de síntese, como de oxidação (SAUER, et al., 1982; MEDINA & CASTRO, 1990).

A glutamina presente na dieta não atinge a corrente sangüínea, pois é totalmente metabolizada pelas células absortivas do intestino. (NEWSHOLME et

al.,1989). Sendo assim, músculo e fígado representam os sítios principais para o fornecimento de glutamina ao organismo, sendo responsáveis pela manutenção dos valores elevados no plasma. Quando a demanda de glutamina no organismo aumenta, o tecido muscular eleva a produção e liberação desse aminoácido (RENNIE et al., 1986). Evidência desse fato, foi recentemente obtida em experimentos com ratos portadores de tumor de Walker 256 por PARRY-BILLINGS et al., (1991). Células tumorais utilizam glutamina avidamente, servindo como substrato energético e também para a síntese de pirimidina e purinas (MATSUNO, 1987; MEDINA et al., 1988).

A anorexia e caquexia, observado na maioria dos estados de câncer maligno, são atribuídas, em parte, a liberação de *tumor necrosis factor* (TNF)- α , por macrófagos que medeiam muitas respostas não-específicas, responsáveis do estímulo inflamatório. Em alguns estudos, quando administrou-se TNF recombinante em animais saudáveis, ocorreu decréscimo da ingestão de alimento e atividade motora, degradação da proteína esquelética conectiva, perda de peso, anemia e aumento da síntese de proteína hepática (SMITH & KLUGER, 1988).

c) Câncer e Gravidez

A associação entre câncer e gravidez não é rara, e acredita-se que a gravidez possa facilitar ou mesmo inibir a evolução do câncer (ALBREKTSEN et al., 1995).

Pesquisas relacionando câncer e gravidez verificaram que, em cerca de 24% dos casos de pacientes grávidas com diferentes tipos de câncer, havia o desenvolvimento de metástases nos tecidos placentários e fetais (POTTER & SHOENEMAN, 1970).

Elevada porcentagem de reabsorções fetais, bem como baixo peso fetal, foram verificados em ratas grávidas inoculadas com o carcinossarcoma de Walker

256, sacrificadas em diversos estágios do período gestacional (GOMES-MARCONDES, 1994). A autora aventa a hipótese de que a menor disponibilidade de nutrientes, decorrentes da utilização destes pelas células neoplásicas ou, ainda, devido à substâncias produzidas pelas células cancerosas e/ou hospedeiro, que poderiam agir direta ou indiretamente no tecido placentário e/ou fetal, provocando, provavelmente, alterações irreversíveis, levando a morte celular (GOMES-MARCONDES, 1994).

OBJETIVO

A associação entre estes dois estados, gravidez e câncer, apresentam similaridades quanto a proliferação e desenvolvimento celulares, no feto e no tumor respectivamente.

Por outro lado, como exposto na introdução são poucas as pesquisas que estudam as interações fisiopatológicas que ocorrem na associação entre gravidez e câncer. Em função deste fato, temos por objetivo estudar as influências do desenvolvimento neoplásico sobre o desenvolvimento fetal avaliando:

- 1) Efeitos do crescimento neoplásico sobre o desenvolvimento placentário e fetal em ratas jovens e adultas grávidas.
- 2) Efeitos do desenvolvimento tumoral sobre parâmetros protéicos séricos de ratas jovens e adultas grávidas.

MATERIAL E MÉTODOS

1) ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 54 ratas fêmeas Wistar jovens (45 à 50 dias de idade) e 58 ratas fêmeas Wistar adultas (90 a 100 dias de idade) provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, as quais foram mantidas em sala com controle de temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (12 horas claro/12 horas escuro). Os animais receberam dieta semipurificada AIN-G1993 (REEVES,1993), e água *ad libitum*.

As ratas foram acasaladas com machos Wistar adultos (90 - 100 dias de vida) na proporção de quatro fêmeas para um macho, em gaiolas coletivas durante quatro dias consecutivos, de acordo com o método de harém, descrito por BAKER, (1991). A detecção do início da gravidez foi feita mediante a análise de esfregaços vaginais obtidos das fêmeas acasaladas. A presença de espermatozóides nos mesmos foi considerada como o primeiro dia de prenhez. Ratas virgens, da mesma linhagem e procedência, foram utilizadas como os controles.

2) IMPLANTE NEOPLÁSICO E OBTENÇÃO DE LÍQUIDO ASCÍTICO

Neste trabalho foram utilizadas células neoplásicas, obtidas do Carcinossarcoma de Walker 256, provenientes da linhagem do Banco de Tumores Christ Hospital line, Arthur D. Little, EUA.

As células do Carcinossarcoma foram mantidas *in vivo*, após a inoculação na cavidade abdominal de ratos machos a cada 7 dias.

Para a obtenção do líquido ascítico e das células neoplásicas utilizou-se a seguinte metodologia:

Após o período de aproximadamente 6 dias, o líquido ascítico foi retirado e centrifugado (2000 rpm). As células que se depositaram após centrifugação foram ressuspensas em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e colocadas em gelo sob agitação lenta. O número de células viáveis na suspensão foi avaliado pelo método de exclusão com azul de Tripán para posterior inoculação na região subcutânea do dorso lateral direito. O líquido ascítico (sem os componentes celulares) foi obtido após centrifugação e separação do sobrenadante do líquido intraperitoneal de ratos machos portadores de tumor, sendo este armazenado em freezer (-20°C) para posterior inoculação nas fêmeas não portadoras de tumor.

3) PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o cruzamento, no 2º dia experimental, parte dos grupos de ratas grávidas e não grávidas, adultas e jovens receberam inoculação de 0,5ml de suspensão de células neoplásicas (contendo aproximadamente 250.000 células viáveis), no tecido subcutâneo da região dorsal lateral (GOMES et al., 1983).

A partir do 9º dia do experimento, a outra parte dos grupos de fêmeas não grávidas e grávidas não portadoras de tumor receberam inoculação diária de 2,0 ml do líquido ascítico, via intraperitoneal, até o 21º dia de experimento ou foram distribuídas em grupos controles não submetidas aos tratamentos.

Os animais experimentais foram distribuídos em 6 grupos (9 animais por grupo) de acordo com a idade, presença de tumor e inoculação de líquido ascítico, a saber:

JOVENS (45 a 50 dias)	ADULTAS (90 a 100 dias)
1.controle (C)	1. controle (C)
2.portadora de Walker(W)	2. portadora de Walker(W)
3.inoculada com líquido ascítico(A)	3. inoculada com líquido ascítico(A)
4.controle grávida (GC)	4. controle grávida(GC)
5. portadora de Walker grávida(GW)	5. portadora de Walker grávida(GW)
6. inoculada com líquido ascítico grávida(GA)	6. inoculada com líquido ascítico grávida(GA)
SACRIFÍCIO 19º e 21º DIA	

Estas fêmeas foram mantidas em gaiolas coletivas e sacrificadas nos 19º e 21º dia de gestação.

O sacrifício foi feito por concussão e foram coletados amostras de soro materno, por punção cardíaca, os quais foram armazenados em freezer, para posterior análise eletroforética.

Parte do soro materno foi utilizado para determinação de proteína total (BRADFORD, 1976) e dosagem de hematócrito.

O cálculo da relação peso fetal/ peso placentário foi feito para cada rata grávida. Para análise estatística foi utilizada média obtida por grupo.

4) ELETROFORESE DE PROTEÍNAS TOTAIS (SDS-PAGE)

A análise das proteínas do soro materno foram realizadas através de eletroforese em mini-gel acrilamida-SDS 10%.

Na eletroforese vertical SDS-PAGE foi utilizado o sistema descontínuo de géis a 10% de concentração. O sistema Laemmli foi modificado para o mini-gel vertical.

Sendo o gel preparado da seguinte forma:

	GEL- Resolução	GEL- Empilhamento
	10%	4%
Acrilamida	10.0ml	0.67ml
(30%acrilamida/0.8%bis-acrilamida)		
TrisHCl, pH 8.8 1.5M	7.5ml	
TrisHCl, pH 6.8 0.5M		1.25ml
SDS 10%	0.3ml	0.05ml
H₂O deionizada	12.1ml	3.00ml
Persulfato de amônia 10%	150µl	25µl
TEMED	10µl	2.5µl
Volume Final	30.0ml	5.0ml

O tampão de corrida utilizado para a corrida foi 0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS, pH 8,3.

1.1 Preparo das amostras

Para separação eletroforética, foram utilizados 10µl do soro de cada animal, diluído em água destilada e tampão da amostra (diluição 1:8), onde foram fervidas em banho-maria a 100°C por 5 minutos.

O tampão da amostra foi utilizado na seguinte composição: 0.35M TrisHCl, 10% SDS, 30% Glicerol, 5% 2-Mercaptoetanol, ajustando-se o volume para 100ml.

Os pesos moleculares das bandas foram calculados pela comparação de proteína padrão, e comparados com grupos controle, através da utilização do software de análise Gel- Pró Plus.

1.2 Coloração de prata para gel de eletroforese SDS-PAGE vertical

A coloração de prata foi utilizada por apresentar uma boa definição das bandas. O método utilizado foi modificado por DION & PONENTI (1983) e por GOTTLIEB & CHAVKO (1987).

Após a corrida, o gel foi transferido para uma solução fixadora e deixado a temperatura ambiente durante a noite (aproximadamente 15 horas). A solução fixadora foi substituída pela solução incubadora.

Após 15 minutos a solução incubadora foi retirada e o gel lavado em água deionizada 3 vezes. Em seguida foi colocado a solução de prata e deixada em contato com o gel por 20 minutos. Após esse período a solução reveladora foi adicionada até o aparecimento das bandas. Após a revelação foi adicionado a solução “stop” por 10 minutos e depois deixando lavar em água corrente por 2 horas. O gel foi conservado em solução de glicerol 10% em água.

5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a determinação da área e densidade das bandas da eletroforese foi utilizado SOFTWARE de análise GEL-PRO Plus, o qual foi utilizado para marcação das bandas, a partir do marcador e determinação dos respectivos pesos moleculares.

Os resultados foram expressos como média e erro padrão, em todos os casos.

Posteriormente, foram feitos os cálculos estatísticos utilizando-se a análise não paramétrica de Kruskal Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas Dunns e análise de correlação onde adequado (WOOLSON, 1987).

RESULTADOS

1. Parâmetros Fetais e Placentários

As figuras 1, 2 e tabela 1, mostram as alterações quanto ao peso fetal de todos os grupos experimentais de ratas jovens e adultas. Verificou-se que nos grupos de adultas, o peso fetal foi significativamente reduzido, nas ratas portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico, sacrificadas no 21º dia.

Foi verificado redução do peso fetal nas fêmeas jovens portadoras do Walker e inoculadas com líquido ascítico, sacrificadas no 19º e 21º dia.

Comparativamente, as jovens apresentaram peso fetal reduzido em relação à todos os respectivos grupos de adultas.

Tabela 1: Peso Fetal (g) dos grupos de ratas adultas e jovens grávidas, inoculadas ou não com câncer e inoculadas ou não com líquido ascítico. Sacrificadas no 19º e 21º dia de experimento.

Animais	Média	Erro Padrão	Animais	Média	Erro Padrão
agc19	2,161	0,051	jgc19	3,267	0,148
agw19	1,861	0,039	jgw19	2,300	0,231*
aga19	2,251	0,043	jga19	2,421	0,086*
agc21	5,676	0,105	jgc21	3,817	0,179
agw21	4,184	0,114*	jgw21	3,316	0,095*
aga21	3,937	0,111*	jga21	3,574	0,186

Grupos experimentais: agc: adultas grávidas controle; agw: adultas grávidas com tumor de Walker; aga: adultas grávidas com ascite; jgc: jovens grávidas controle; jgw: jovens grávidas com tumor de Walker; jga: jovem grávidas com ascite. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média * $p < 0,05$, Teste de Kruskal Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle. N=9

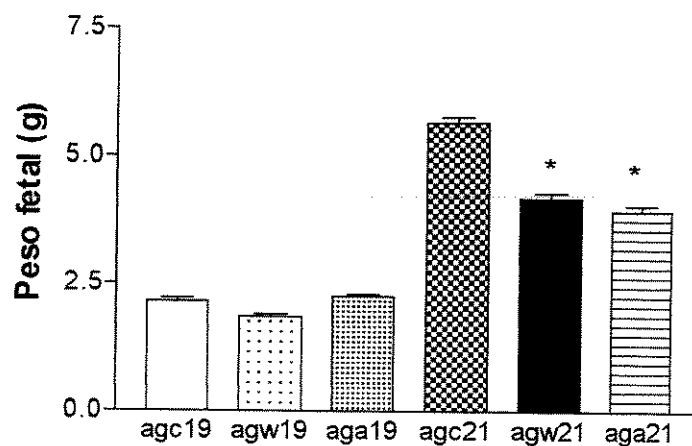


Figura 1: Peso fetal de ratas adultas controles (agc), portadoras de tumor (agw) e inoculadas com líquido ascítico (aga) sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. * $P < 0,05$, Teste de Kruskal Wallis, em comparação com respectivo grupo controle.

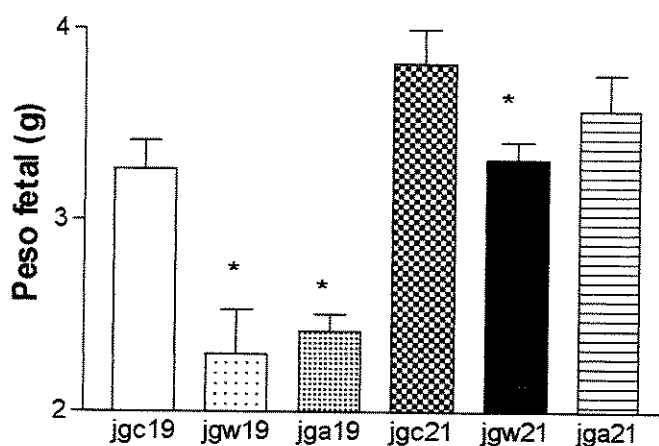


Figura 2: Peso fetal de ratas jovens controles (jgc), portadoras de tumor (jgw) e inoculadas com líquido ascítico (jga) sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. * $P < 0,05$, Teste de Kruskal Wallis, em comparação com respectivo grupo controle.

As ratas adultas apresentaram incremento de peso da placenta do 19º até o 21º dia, entretanto, não se verificaram diferenças significativas do peso placentário nos grupos portadores de tumor ou inoculados com líquido ascítico (figura 3 e tabela 2).

Nas ratas jovens, verificou-se que a presença do câncer induziu significativa redução do peso placentário, independente do dia do sacrifício. A inoculação do líquido ascítico, também, acarretou significativo decréscimo do peso placentário, principalmente no 21º dia (figura 4 e tabela 2).

Tabela 2 : Peso das placentas (g) das ratas adultas e jovens, grávidas, controle, grávidas com tumor e inoculadas com líquido ascítico

Animais	Média	Erro Padrão	Animais	Média	Erro Padrão
agc19	0.4513	0.01134	jgc19	0.523	0.014
agw19	0.5095	0.009718	jgw19	0.428*	0.021
aga19	0.4695	0.018	jga19	0.487	0.020
agc21	0.5880	0.013	jgc21	0.538	0.023
agw21	0.5625	0.014	jgw21	0.463*	0.015
aga21	0.5384	0.016	jga21	0.403*	0.012

Grupos experimentais: agc: adultas grávidas controle; agw: adultas grávidas com tumor de Walker; aga: adultas grávidas com ascite; jgc: jovens grávidas controle; jgw: jovens grávidas com tumor de Walker, jga: jovem grávidas com ascite. Sacrificadas no 19º e 21º dia de experimento. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média, *P<0,05, Teste de Kruskal Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle. N=9

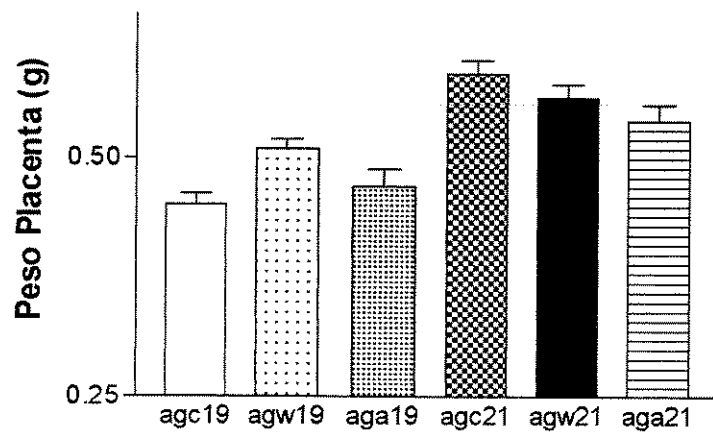


Figura 3: Peso da placenta de ratas adultas controles (agc), portadoras de tumor (agw) e inoculadas com liquido ascitico (aga) sacrificadas no 19° e 21° dia de gestação, comparação com respectivo grupo controle.

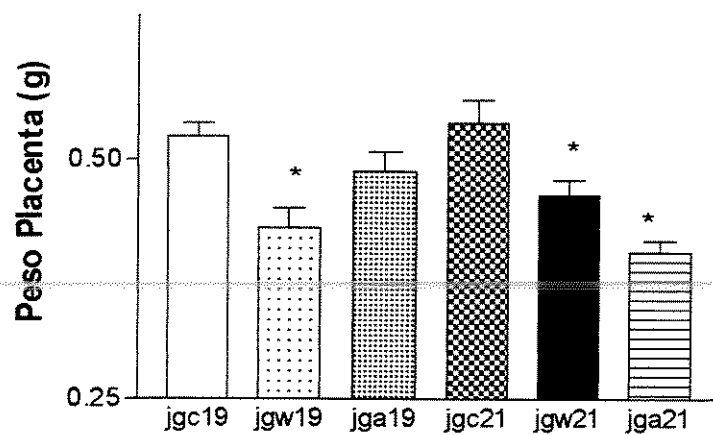


Figura 4 : Peso da placenta de ratas jovens controles (jgc), portadoras de tumor (jgw) e inoculadas com liquido ascitico (jga) sacrificadas no 19° e 21° dia de gestação, comparação com respectivo grupo controle.

Quanto a razão feto / placenta as fêmeas jovens, mostraram significativa redução no 19º dia nos grupos JW19 e JA19 (figura 5 e tabela 3), enquanto nas fêmeas adultas mostrou-se reduzido nos grupos portadores de tumor (19º e 21º dia) e nas inoculadas com líquido ascítico (21º dia) (figura 6 e tabela 3).

Comparativamente, os diferentes grupos experimentais apresentam razão feto/placenta semelhante, independente do fator idade.

Tabela 3 : Razão entre peso fetal/ placenta, dos grupos de ratas grávidas, controle, com tumor e inoculadas com líquido ascítico.

Animais	Média	Erro Padrão	Animais	Média	Erro Padrão
AGC19	4,488	0,123	JGC19	6,727	0,,332
AGW19	3,978*	0,118	JGW19	5,059*	0,484
AGA19	4,997	0,168	JGA19	5,064*	0,196
AGC21	10,00	0,326	JGC21	7,434	0,533
AGW21	7,350*	0,265	JGW21	7,525	0,316
AGA21	7,579*	0,234	JGA21	8,867	0,410

Grupos experimentais: agc: adultas grávidas controle; agw: adultas grávidas com tumor de Walker; aga: adultas grávidas com ascíte, jgc: jovens grávidas controle; jgw: jovens grávidas com tumor de Walker, jga: joven grávidas com ascíte. Sacrificadas no 19º e 21º dia de experimento. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média, * $P < 0,05$, Teste de Kruskall Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle. N=9

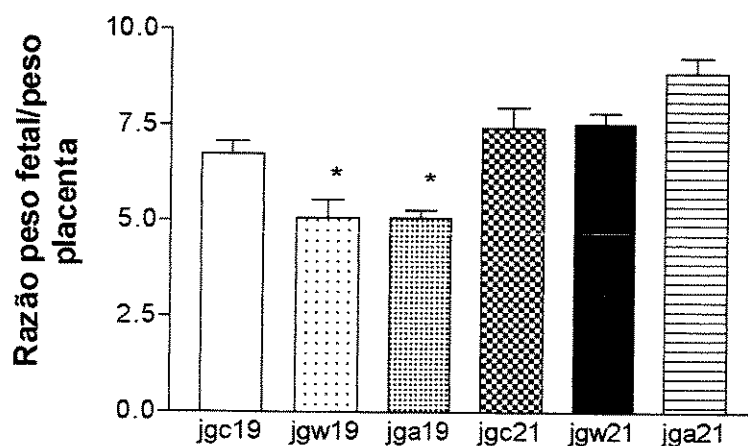


Figura 5 : Razão entre peso fetal e peso da placenta de ratas jovens controles (jgc), portadoras de tumor (jgw) e inoculadas com liquido ascitico (jga) sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. * $P < 0,05$, Teste de Kruskall Wallis, em comparação com respectivo grupo controle.

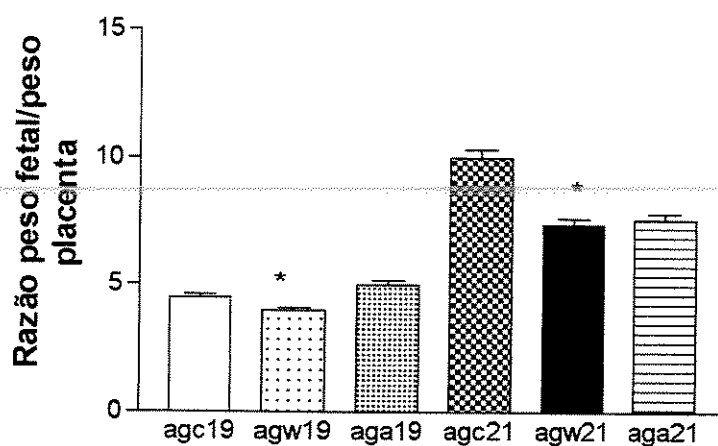


Figura 6: Razão entre o peso fetal e peso da placenta de ratas adultas controles (agc), portadoras de tumor (agw) e inoculadas com liquido ascitico (aga) sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. * $P < 0,05$, Teste de Kruskall Wallis, em comparação com respectivo grupo controle.

Não houve correlação positiva nos grupos JC21 e JW21, confirmando que a estabilização do desenvolvimento placentário, nesta fase gestacional, não influenciou no incremento de peso fetal. Estes dados mostraram que independente do peso da placenta no grupo de jovens com tumor houve redução do peso fetal (figura 7). Quando se avaliou a correlação entre peso fetal e peso placentário, verificou-se que houve correlação significativa entre os grupos JC19, JW19, JA19 e JA21. Estes dados indicam que o menor peso placentário induziria à menor peso fetal. Portanto no 19º dia, quando há estabilização da evolução placentário, o tamanho placentário determinou o tamanho fetal (figura 7)

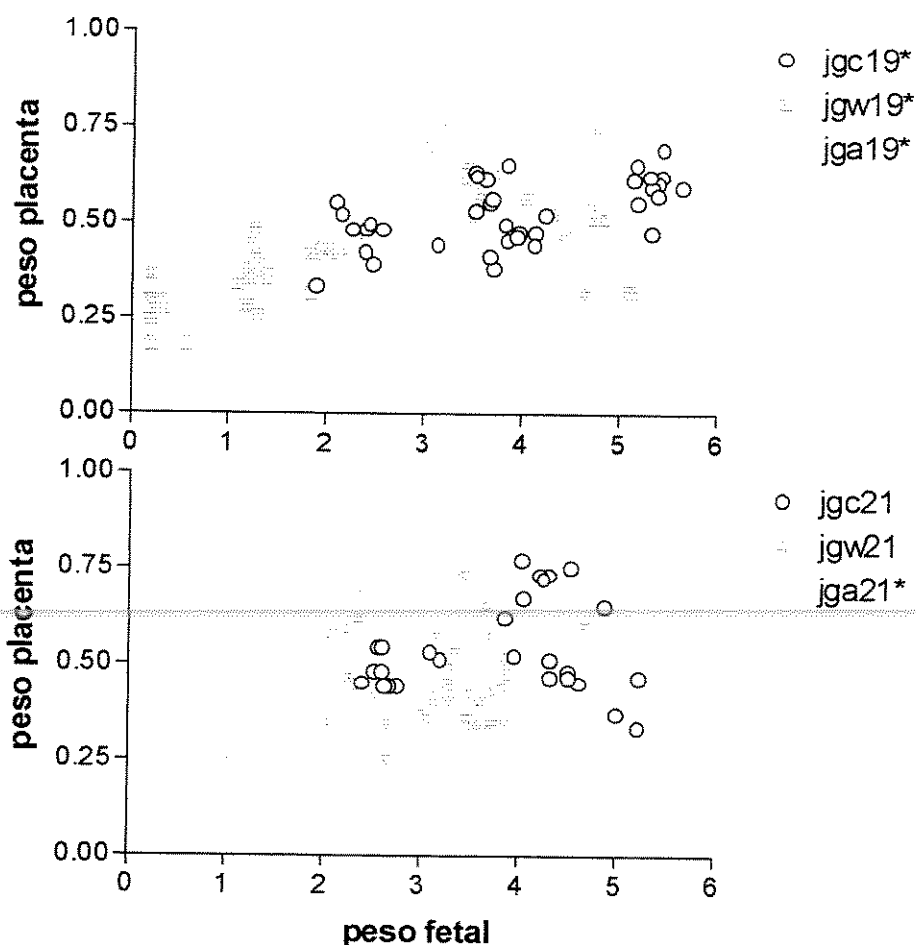


Figura 7 : Correlação entre peso fetal e o peso da placenta de ratas jovens controles (jgc), portadoras de tumor (jgw) e inoculadas com liquido ascitico (jga) sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. $P < 0,05$, Teste de Kruskal Wallis, correlação significativa, comparação com respectivo grupo controle.

Avaliando-se a correlação entre peso placentário e fetal dos grupos de ratas adultas, verificamos que, após teste de correlação, houve correlação nos grupos AGC19, AGA19 e AGA21, indicando que o peso fetal variou diretamente com o tamanho placentário (figura 8). Por outro lado, as ratas adultas com câncer (19º e 21º dia) mostraram que a manutenção do peso placentário não atenuou a redução do peso fetal, observado no 21º dia, não havendo correlação positiva nestas fêmeas.

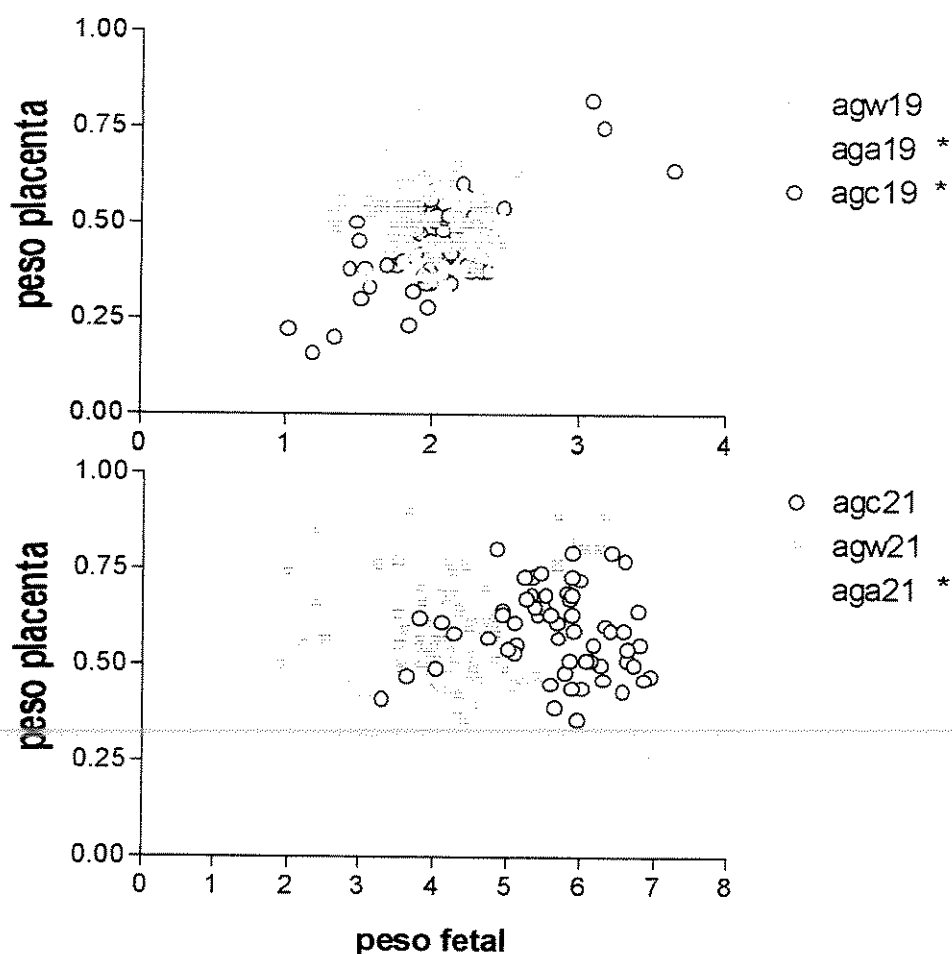


Figura 8 : Correlação entre peso fetal e o peso da placenta de ratas adultas controles (agc), portadoras de tumor (agw) e inoculadas com líquido ascítico (aga) sacrificadas no 19º e 21º dia de gestação. $P < 0,05$, Teste de Kruskal Wallis, correlação significativa.

2. Parâmetros Séricos

2.1- Hematócrito

A análise da tabela 4 e figura 9 mostra que houve redução significativa do hematócrito nas fêmeas adultas portadoras de tumor grávidas e não grávidas.

Quanto as fêmeas jovens (tabela 4 e figura 10) o hematócrito foi reduzido significativamente nas ratas portadoras de câncer

Tabela 4 :Hematócrito(%), dos grupos de ratas grávidas ou não, inoculadas, ou não com câncer e inoculadas ou não com líquido ascítico.

Animais	Média	Erro Padrão	Animais	Média	Erro Padrão
AGC21	37,670	0,610	JGC21	38,270	1,583
AGW21	28,880 *	1,538	JGW21	28,760 *	1,109
AGA21	39,890	2,731	JGA21	39,670	2,208
AC	41,310	1,282	JC	41,570	0,721
AW	35,110 *	0,738	JW	34,580 *	1,320
AA	42,370	1,457	JA	37,610	0,997

Grupos experimentais: agc: adultas grávidas controle; agw: adultas grávidas com tumor de Walker; aga: adultas grávidas com ascite; jgc: jovens grávidas controle; jgw: jovens grávidas com tumor de Walker; jga: jovens grávidas com ascite. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média
*p<0,05, Teste de Kruskal Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle.N=9

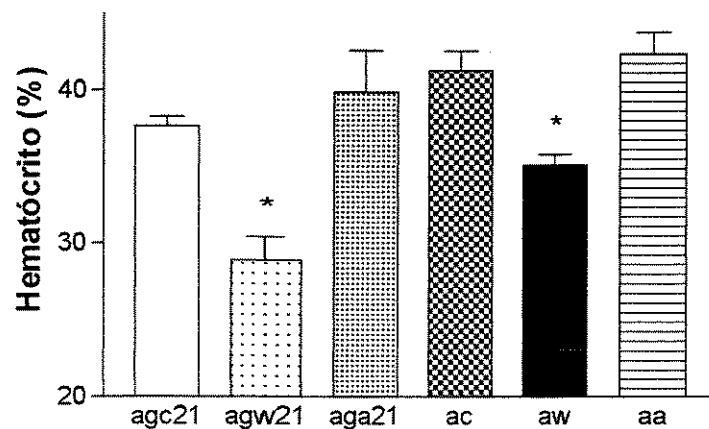


Figura 9 : Hematócrito das ratas adultas grávidas controle(agc21), adultas grávidas com tumor (agw21), adultas grávidas inoculadas com ascite (aga21), adultas controle(ac), adultas com tumor (aw), adultas inoculadas com ascite (aa). Sacrificadas no 21^o dia de gestação, *P<0,05, Teste de Kruskall Wallis.

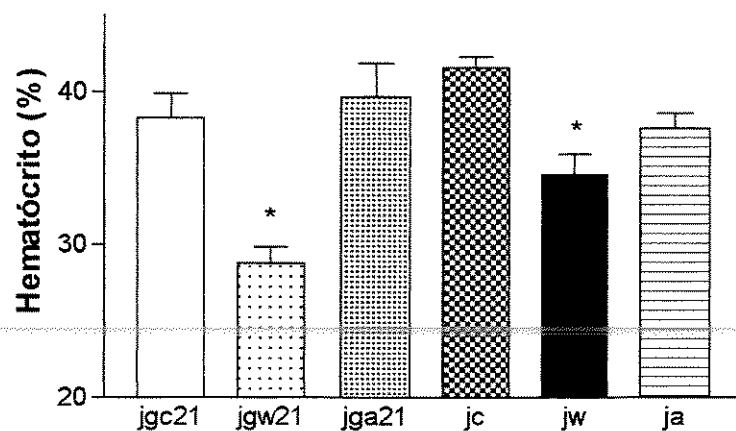


Figura 10 : Hematócrito das ratas jovens grávidas controle (jgc21), jovens grávidas com tumor (jgw21), jovens grávidas inoculadas com ascite (jga21), jovens controle(jc), jovens com tumor (jw), jovens inoculadas com ascite (ja). Sacrificadas no 21^o dia de gestação, *P<0,05, Teste de Kruskall Wallis.

2.2- Concentração Protéica Sérica

A tabela 5 e figura 11 mostra que as variações do teor de proteína sérica foi significativamente reduzida nas adultas com câncer, tanto grávidas como não grávidas, comparativamente à concentração protéica dos grupos controles e inoculadas com líquido ascítico.

Com relação as ratas jovens (tabela 5 e figura 12) verificou-se que a concentração de proteína sérica foi significativamente reduzida na presença do tumor de Walker, mais acentuadamente nas jovens grávidas.

Tabela 5: Concentração sérica de proteína total (g/dl), dos grupos de ratas jovens e adultas, grávidas ou não, inoculadas ou não com câncer e inoculadas ou não com líquido ascítico.

Animais	Média	Erro Padrão	Animais	Média	Erro Padrão
agc21	6,066	0,2933	jgc21	6,050	0,3052
agw21	4,793	0,3419*	jgw21	3,458	0,4541*
aga21	6,010	0,2768	jga21	5,260	0,9392
ac	5,612	0,3714	jc	5,940	0,6410
aw	4,682	0,3195**	jw	4,012	0,4583*
aa	5,776	0,2148	ja	5,228	0,7546

Grupos experimentais: agc: adultas grávidas controle; agw: adultas grávidas com tumor de Walker; aga: adultas grávidas com ascite; jgc: jovens grávidas controle; jgw: jovens grávidas com tumor de Walker; jga: jovens grávidas com ascite. Resultados expressos em médias $\pm$ erro padrão da média * $p < 0,05$, Teste de Kruskal Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle. ** $P < 0,01$ em comparação ao respectivo grupo controle. N=9

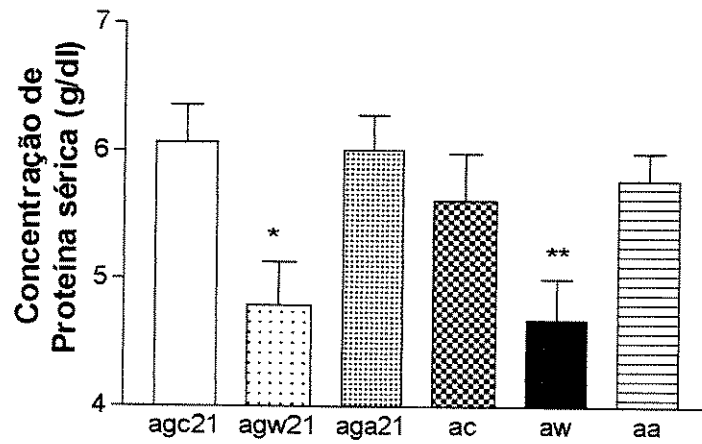


Figura 11 : Concentração de proteína total sérica de ratas adultas controles (agc21), portadoras de tumor (agw21) e inoculadas com liquido ascitico (aga21) sacrificadas no 21º dia de gestação. * $P < 0,05$, Teste de Kruskall Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle; ** $P < 0,10$, Teste de Kruskall Wallis, em comparação ao respectivo grupo controle.

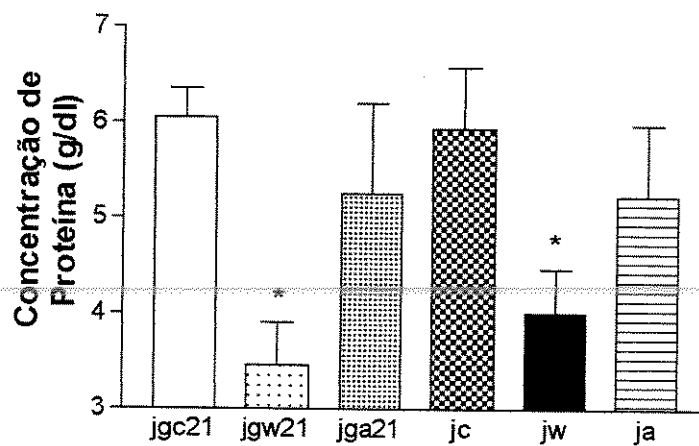


Figura 12 : Concentração de proteína total sérica de ratas jovens controles (jgc21), portadoras de tumor (jgw21) e inoculadas com liquido ascitico (jga21) sacrificadas no 21º dia de gestação. * $P < 0,05$, Teste de Kruskall Wallis.

2.3.- Perfil Eletroforético das Proteínas Séricas

A Figura 13 e 14 do perfil sérico dos diferentes grupos de fêmeas adultas grávidas e não grávidas sacrificadas no 21^o dia de experimento. Nestas figuras, fotocópia da corrida eletroforética de géis SDS, mostram alterações na expressão das bandas dos diferentes frações de proteínas dos grupos de fêmeas não grávidas.

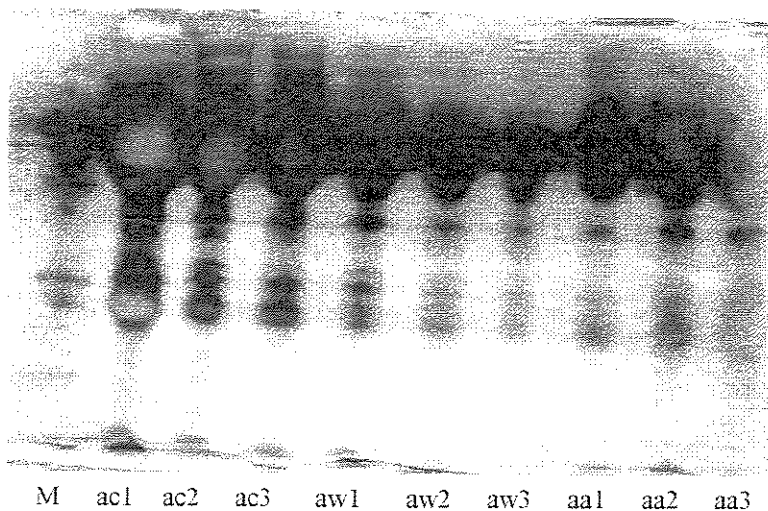


Figura 13: Perfil protéico eletroforético das ratas adultas não grávidas (AC), portadoras do carcinossarcoma (AW) ou inoculadas com liquido ascitico (AA), sacrificadas no 21^o dia de experimento.

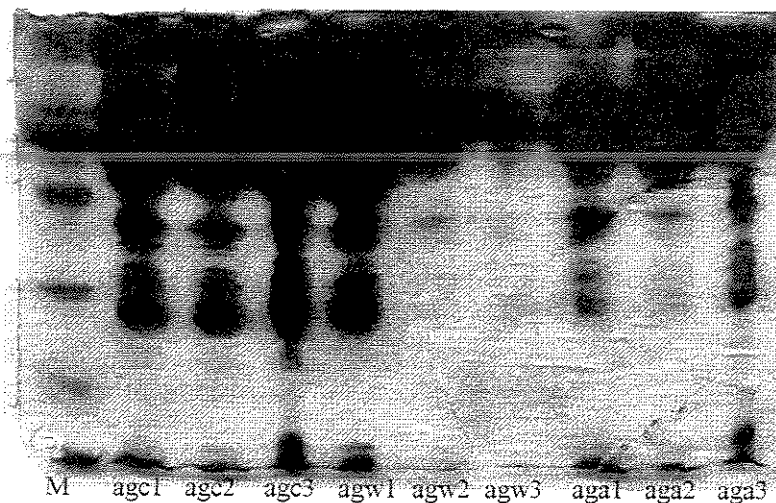


Figura 14: Perfil protéico eletroforético das ratas adultas grávidas (agc), portadoras do carcinossarcoma (agw) ou inoculadas com liquido ascitico (aga), sacrificadas no 21^o dia de experimento.

A análise da figura 15 mostram as curvas de densidade ótica das diferentes frações protéicas a partir de eletroforese do soro do grupo de ratas adultas não grávidas. Nestas curvas (média por grupo, n=9), verificou-se que a expressão das de peso molecular de cerca de 116 Kda e entre 32 a 26 Kda apresentaram-se reduzidas nas fêmeas com câncer, em relação às fêmeas controle (ac). Elevada densidade ótica nas frações protéicas entre 70 e 43 Kda foi verificada nas AW em relação às AC.

As fêmeas não grávidas inoculadas com líquido ascítico apresentaram elevada densidade ótica nas frações protéicas entre 70 à 43 Kda, em relação as fêmeas controle. Observou-se redução na expressão das proteínas de 32 a 26 Kda nas fêmeas AA em relação à do respectivo grupo controle (AC).

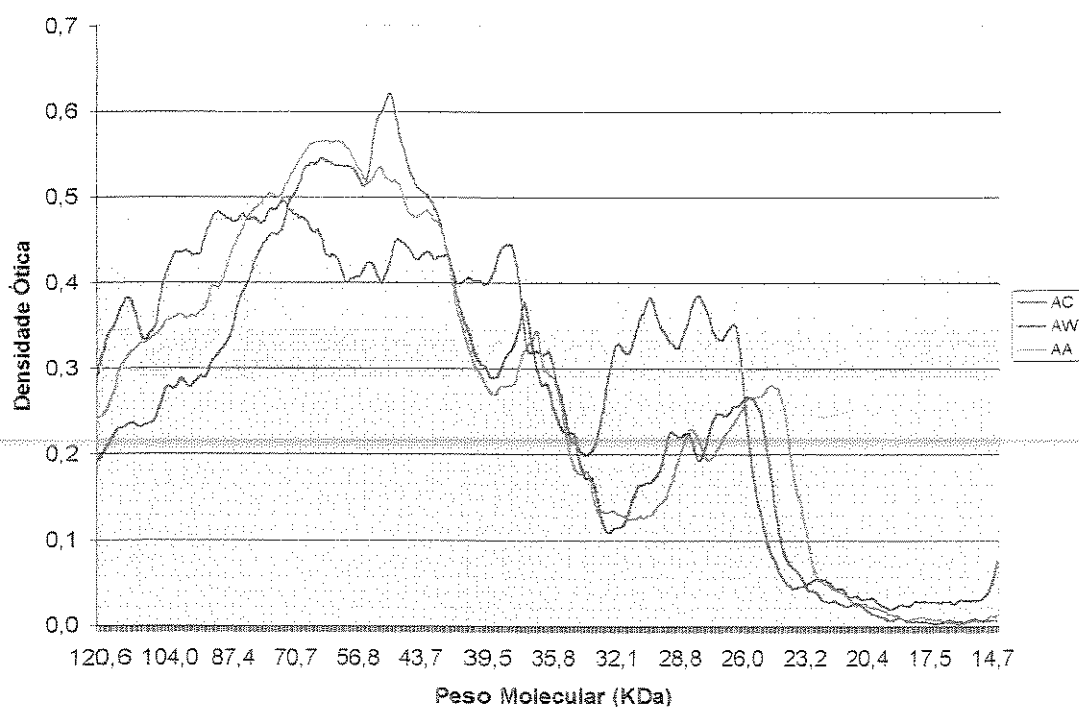


Figura 15: Densidade Ótica obtida através da análise do Perfil Eletroforético das ratas adultas não grávidas controle (ac), adultas portadoras de tumor (aw) e inoculadas com líquido ascítico (aa). Resultados expressos como médias de densidade ótica, dos diferentes grupos de adultas, número de 9 animais por grupo.

A análise do perfil eletroforético sérico das ratas adultas grávidas, sacrificadas no 21^o dia de experimento (figura 16), mostrou que houve aumento da expressão de algumas frações protéicas nas ratas AW entre as zonas de 94 a 67 Kda. Entretanto, as frações protéicas entre 40 a 24 Kda apresentou-se significativamente reduzida em relação as fêmeas controles. Contrariamente às fêmeas inoculadas com líquido ascítico mostraram -se redução da densidade ótica de algumas frações protéicas principalmente nas faixas de 116 Kda a 43 KDa, e 30kda a 20 Kda em relação aos outros grupos experimentais.

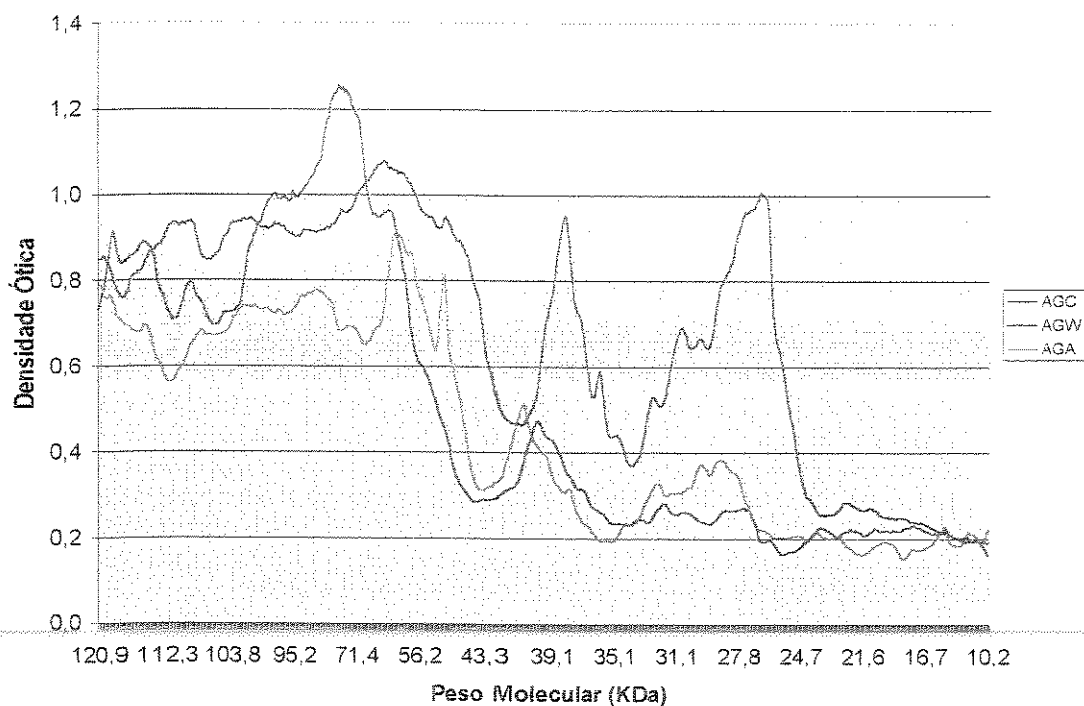


Figura 16 : Densidade Ótica obtida através da análise do Perfil protéico eletroforético de ratas adultas grávidas controle (agc), grávidas com tumor (agw) e grávidas inoculadas com ascite (aga), sacrificadas no 210 dia de experimento. Resultados expressos como média de densidade ótica dos diferentes grupos de adultas. Número de 9 animais por grupo.

As figuras 17 e 18 mostram fotocópia da corrida eletroforética de géis SDS dos diferentes grupos de jovens grávidas e não grávidas sacrificadas no 21^o dia de experimento.

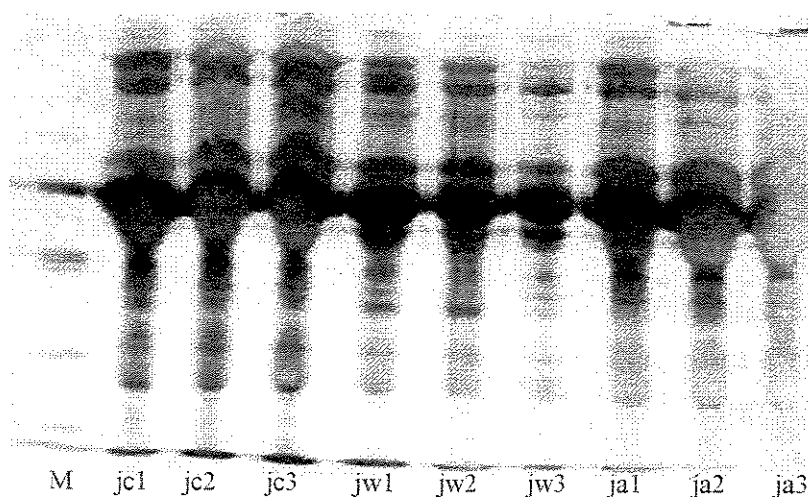


Figura 18: Perfil protéico eletroforético das ratas jovens não grávidas controle (jc), portadoras do carcinossarcoma (jw) ou inoculadas com líquido ascítico (ja), sacrificadas no 21^o dia de experimento.

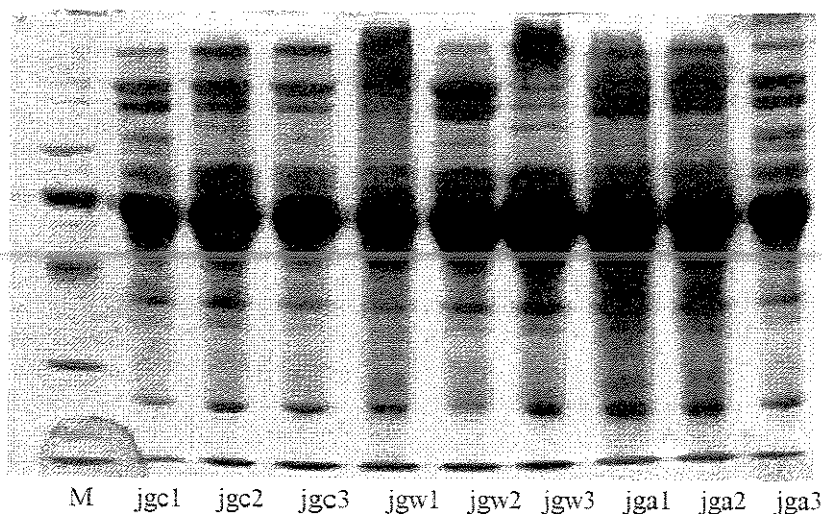


Figura 19: Perfil protéico eletroforético das ratas jovens grávidas controle (jgc), grávidas portadoras do carcinossarcoma (jgw) ou grávidas inoculadas com líquido ascítico (jga), sacrificadas no 21^o dia de experimento.

A figura 19 mostram a expressão das diferentes frações de proteínas dos grupos de fêmeas não grávidas

Verificou-se que as fêmeas jovens com tumor ou inoculadas com líquido ascítico apresentaram menor densidade ótica da expressão das frações protéicas entre 94 a 67 Kda. As ratas com câncer apresentaram elevação de expressão de proteínas em 36kda.

Foi observado redução da expressão das frações protéicas na faixa entre 30 e 26kda nas fêmeas jovens inoculadas com líquido ascítico.

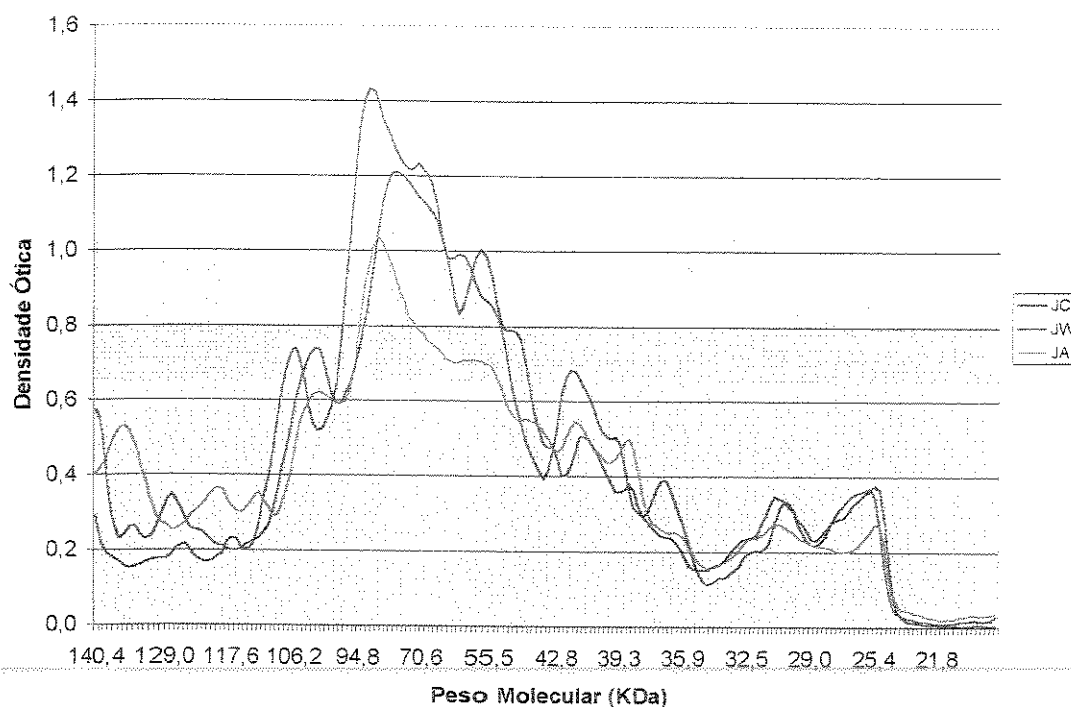


Figura 19: Densidade Ótica obtida através da análise do Perfil eletroforético das proteínas séricas dos diferentes grupos de ratas jovens não grávidas (jc), portadoras de tumor (jw), e inoculadas com líquido ascítico (ja), sacrificadas no 21^o de experimento. Resultados expressos como média da densidade ótica dos diferentes grupos de jovens. Número de 9 animais por grupo.

Analisou-se o perfil protéico das ratas jovens grávidas sacrificadas no 21^o dia de experimento (Figura 20). Observou-se que o padrão do perfil foi similar entre as fêmeas controles e portadoras de tumor, diferindo apenas das frações na faixa de 140kda, 50 a 45kda e entre 36 a 20kda, e com expressão mais elevada nos grupos com câncer. As fêmeas inoculadas com líquido ascítico mostraram perfil protéico semelhante às controles com elevação das frações protéicas em 130, 117, 64 e 26 Kda.

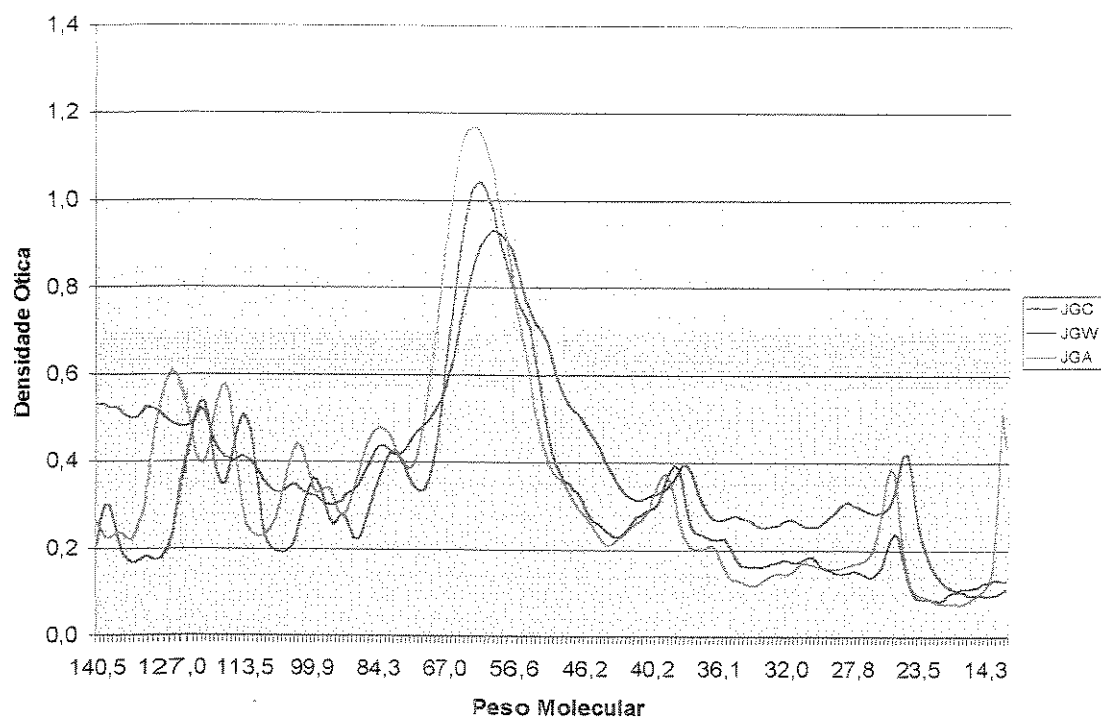


Figura 20 : Densidade Ótica obtida através da análise do Perfil eletroforético das proteínas séricas dos diferentes grupos de ratas jovens grávidas controle (jgc), portadoras de tumor (jgw), e inoculadas com líquido ascítico (jga), sacrificadas no 21^o dia de experimento. Resultados expressos como média da densidade ótica dos diferentes grupos de jovens. Número de 9 animais por grupo.

DISCUSSÃO

Durante a gravidez as alterações metabólicas que ocorrem, visam prover substratos adequados para o desenvolvimento fetal e preservar o curso normal da gestação tanto fetal quanto o materno, principalmente. Por outro lado, o desenvolvimento da neoplasia maligna causam alterações que provêm o aporte de nutrientes, a partir de mobilização dos tecidos do hospedeiro, para garantir a proliferação das células neoplásicas.

Condições adversas, durante o curso da gravidez, podem acarretar prejuízo ao desenvolvimento fetal bem como para o organismo materno.

O retardo do crescimento fetal, segundo GLUCKMAN (1989), está freqüentemente, associado à diminuição do aporte de oxigênio ou de substratos ao feto, decorrente de alterações do fluxo sanguíneo uterino, ou de modificações no crescimento e nas funções da placenta.

Em resultados prévios, verificamos intensas alterações no conteúdo de proteína plasmática e, principalmente, na concentração protéica da unidade feto/placentária em animais com tumor. Esses resultados foram similares aos obtidos em ratas inoculadas com líquido ascítico (FEDRIZZI & GOMES-MARCONDES, 1998). Neste estudo, observou-se redução do peso placentário e fetal no grupo de fêmeas jovens portadoras do carcinossarcoma de Walker, em ambos os períodos de sacrifício 19° e 21° dia. As ratas adultas portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico mostraram redução do peso fetal no 21° dia de experimento. Estes dados sugerem que, em função do crescimento do tumor, bem como fatores produzidos pelo tumor e/ou hospedeiro, verificados pela inoculação do líquido ascítico, acarretaram prejuízo ao desenvolvimento fetal, provavelmente, decorrente da menor oferta de substratos ao feto e placenta ou ainda pela atuação direta e/ou indireta sobre a unidade feto placentária, hipótese coerente com a proposição de

MATTHEWS et al. (1998) e GLUCKMAN (1989).

As alterações no crescimento fetal promovido pela influência do crescimento neoplásico ou por fatores indiretos, como observados nas fêmeas inoculadas com líquido ascítico, refletiu diretamente na razão entre o peso fetal/peso placentário, que foi significativamente menor nas fêmeas adultas com câncer (AW19 e AW21), inoculadas com líquido ascítico (AA21), e nas ratas jovens dos grupos JW19 e JA19 e JW21.

O crescimento do feto segue uma relação logarítmica com a idade gestacional (RENFREE et al, 1975; STEER, 1997), e é, em termos de peso, afetado localmente pelo meio uterino e sistemicamente pelo organismo materno (BRUCE & NORMAN, 1975; WILLIAMS et al., 1997). Analisando-se a relação peso placentário/peso fetal nas ratas portadoras de câncer e inoculadas com líquido ascítico, tanto jovens como adultas, verificamos que houve correlação positiva nas ratas controles, JGC19 e AGC19, levando-nos a proposição de que o tamanho placentário determina o peso fetal; correlação positiva entre peso placentário e peso fetal foi observado nas jovens e adultas inoculadas com líquido ascítico (JGA19, JGA21, AGA19 e AGA21, respectivamente). Por outro lado, as fêmeas jovens e adultas portadoras de câncer (JGW21, AGW19 e AGW21) não mostraram correlação positiva significativa entre o peso placentário e fetal, sugerindo que as alterações produzidas direta ou indiretamente pelo desenvolvimento do câncer, culminaram em efeitos deletérios aos fetos. Esta correlação não foi significativa nestas ratas JW21 e AW21, sugerindo que os efeitos produzidos pela evolução do câncer atuaram sobre crescimento fetal, independente do desenvolvimento placentário. Assim, além do que foi sugerido por GLUCKMAN (1989), o menor peso dos fetos e placenta e o número elevado de morte e reabsorção fetais poderiam ser, em parte, devido a menor

disponibilidade de nutrientes, que estariam também sendo utilizados pelo câncer (LEVIN & GEVERS, 1981a,b; KALKHOLFF, 1991; LANGSTEIN & NORTON, 1991).

Por outro lado, estudos prévios demonstraram que fêmeas jovens ou adultas, implantadas com tumor de Walker, apresentaram alterações morfológicas estruturais da placenta destas ratas, principalmente presença de edema e pontos hemorrágicos (TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999). Desse modo, estes fatos sugerem que houve menor aporte de substratos ao feto através da placenta.

Em pacientes com câncer, a anemia é uma das complicações mais comuns e indicativa de pior prognóstico (KELLEHER et al., 1996; GAGIC et al., 1997). GAGIC et al. (1997) verificaram que ratos implantados com carcinossarcoma de Walker apresentaram inibição da hematopoiese. SASAMURA et al. (1998) verificaram que ratos portadores de hepatoma AH109A apresentaram redução do hematócrito e hemoglobina, indicando anemia.

Provavelmente o menor aporte de oxigênio, que pode ser sugerido pelo decréscimo do hematócrito verificado nas fêmeas com câncer (JGW21 e AGW21), causou processos de hipóxia fetal levando a morte fetal ou placentária. Por outro lado, não foi verificada redução do hematócrito nas fêmeas, jovens ou adultas, inoculadas com líquido ascítico. Este fato, sugere que as respostas fisiopatológicas decorrentes da presença do câncer, provavelmente, causaram efeitos deletérios ao feto, devido a atuação direta e/ou indireta sobre a unidade materno fetal, causando falha de *feed back* entre feto/placenta e conseqüente redução de peso e morte fetal (GOMES-MARCONDES et al., 1998; TOLEDO & GOMES-MARCONDES, 1999).

Vários estudos mostram que durante a gravidez normal, em mulheres,

há decréscimo da concentração protéica sérica total e de albumina ao longo do período gestacional (HYTTEN & LEICH, 1971; HYTTEN, 1990). Por outro lado, com relação as globulinas séricas, as frações α_1 , α_2 e β globulinas estão aumentadas, enquanto que as γ globulinas podem estar reduzidas ou, ainda, variar muito pouco ao longo do período gestacional (HYTTEN & LEICH, 1971). Estudos realizados com ratas jovens, mostram que o decréscimo das concentrações das proteínas, são similares ao encontrados em outros trabalhos, porém poucas mudanças foram verificadas no padrão protéico total (AREEKUL & ROSTREICHERT, 1997). Estudos comparativos obtidos por eletroforese de agarose mostraram que há diferenças entre as diferentes espécies de mamíferos comparados aos humanos; em ratos, a alfa 2 globulina é uma glicoproteína termolábil comparada à α_2 globulina humana; há apenas uma haptoglobulina similar e comparável ao tipo 1-1 humano, além disso, há mobilidade variável da albumina sérica em ratos, comparativamente as variações humanas (KRZALIC & MIHAIOVIC, 1971; SASSEN et al., 1972; TAYLOR, 1973).

As mudanças no padrão protéico sérico, podem refletir um estado patológico do desenvolvimento (SOETERS et al., 1990). Segundo, TAM & CHAIN (1977), durante o período do 13º para 21º dia de gestação houve uma diminuição na concentração da proteína total, porém, poucas mudanças foram observadas no padrão protéico total. Neste estudo verificamos que não houve diferenças significativas na concentração total de proteínas plasmáticas, nos grupos de ratas portadoras do tumor de Walker. A proporção albumina : globulina encontra-se elevada no plasma materno, comparado às não grávidas e/ou soro fetal, por causa da presença de 2 α -fetoproteína e 4 transferrinas.

DHARMARAJAM et al. (1986), estudando ratas grávidas no 16º dia de gestação, verificaram que a concentração de albumina e transferrina foram

similarmente baixas na linfa em relação ao plasma, porém essa diferença foi significativa apenas para a transferrina. Por outro lado, YEOH & MORGAN (1974) analisando a incorporação de [14C]Leucina na albumina e transferrina nos fetos, no período a termo, verificaram que houve síntese elevada de transferrina em relação à albumina quando comparado com animais de 10 dias.

Neste estudo, verificou-se tendência à queda das proteínas totais plasmáticas, porém não estatisticamente significativa, ocasionada pela gestação associada ao desenvolvimento do câncer. De acordo com alguns autores, a queda do teor de proteína séricas está diretamente relacionada à redução do nível de albumina, que é desviada para síntese protéica tecidual, materna e fetal (FISHER & LEATHEM, 1965; SHULMAN, 1976). Segundo estes autores, a albumina plasmática serviria como “reserva protéica lábil”, que manteria os níveis de proteína dos órgãos vitais durante os períodos de menor aporte protéico, ou mesmo fornecendo aminoácidos para síntese de proteínas fetais (FASMAN, 1986). Em ratos com hepatoma, a síntese de albumina, e de transferrina foram 75% e 45%, respectivamente, da secreção normal dos hepatócitos (IMMENSCHUH et al., 1993). Segundo CAIRO & LUCCHINE (1993) o decréscimo da secreção de albumina pelos hepatócitos de animais portadores de tumor estaria relacionada à diminuição ou ausência de transcrição do gene de albumina. Os autores verificaram, em análise de *southern blot* que a estrutura do gene albumina estava preservada, porém houve diferentes estágios de metilação do gene de albumina, que podem estar correlacionadas com a expressão gênica.

GOMES-MARCONDES et al. (1998) observaram diminuição do conteúdo plasmático de proteína total, albumina e globulina mais acentuada nas ratas grávidas portadoras de câncer, do que nas ratas grávidas controles.

No entanto, com a inoculação diária de líquido ascítico não houve alteração destes parâmetros, mostrando comportamento semelhante ao das ratas controles. MOLDAWER et al. (1988) mostram elevação da síntese de proteína plasmática total em camundongos, que foram inoculados com extrato de monócitos, como interleucina 1 alfa e beta ou TNF. Os autores mostraram, ainda, que houve redução significativa da concentração de albumina plasmática nestes animais, que receberam infusão de citocinas. Camundongos implantados com sarcoma, induzidos por metilcolantreno, apresentaram hipoalbuminemia e conteúdo sérico elevado de proteína C reativa de fase aguda, associados à perda de massa corporal magra e do conteúdo de gordura (LÖNNROTH et al., 1990). Estudos feitos com coelhos, que receberam dose única de TNF, mostraram redução acentuada da albumina sérica, após 8 a 25 horas da inoculação intraperitoneal (HENNING et al., 1988). Segundo PERIMUTTER et al. (1986) células de hepatoma humano não alteraram a biossíntese de proteína C2 e C4 complemento e α 1 inibidora de proteinase em resposta à administração de TNF.

GOMES-MARCONDES (1985) avaliando ratos jovens e adultos, controles e desnutridos com carcinossarcoma, verificou redução na concentração de proteínas totais, principalmente devido a diminuição da concentração de albumina plasmática, os quais tem sido verificado, em ratos e em pacientes com neoplasia maligna (CLARK & GOODLAD, 1960; WANNEMACHER & YATVIN, 1965; DALY E, 1980; LUNDHOLM et al., 1980). A redução da albumina plasmática é comumente encontrada em pacientes com câncer e está frequentemente associada a gravidade da doença; possivelmente este decréscimo seria devido ao aumento do volume plasmático, alterações na distribuição de albumina entre os compartimentos intra e extravasculares, diminuição de sua síntese e/ou aumento de seu

catabolismo, ou combinação dos vários fatores (BRENNAN & BURT, 1981). WANNER & YATVIN (1965) verificaram que a meia vida da albumina sérica estava significativamente reduzida em ratos, com carcinossarcoma de Walker em relação aos controles sem neoplasia; o decréscimo da meia vida da albumina estava associada ao aumento significativo de seu catabolismo. Segundo os autores, os aminoácidos provenientes do catabolismo da albumina seriam utilizados para a síntese de glicose, via gliconeogênese ou ainda diretamente pelas células neoplásicas. A manutenção da globulina sérica dentro dos limites normais, seria decorrente do aumento concomitante de seu catabolismo e de sua síntese. VILLA et al (1992) verificaram queda significativa da síntese hepática (30%) de albumina em ratos portadores de tumor, bem como de sua concentração no plasma, quando comparados aos animais controles submetidos a dieta ad libitum ou pair fed.

A resposta da fase aguda está ligada à produção de mediadores polipeptídios hormonais, denominados citocinas (WAITES et al, 1983). Algumas citocinas induzem alterações de fase aguda: interleucina 1, fator de necrose tumoral, interferon γ , interleucina 6 e o fator inibidor de leucemia. A interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, produzidos por certos tipos celulares, exercem seus efeitos primários nesses tecidos. Horas após o início da infecção ou do traumatismo, o fígado aumenta a velocidade de síntese da assim chamada proteína de fase aguda. WAITES et al, (1983), demonstraram que na gravidez em camundongos estava associada ao aumento das concentrações de duas proteínas da fase aguda, haptoglobulinas e o componente amilóide P sérico (SAP). Os autores sugerem que os estudos das proteínas da fase aguda, propõem mecanismos elucidativos aos mecanismos de síntese dos reativos de fase aguda e o papel destas proteínas na gravidez. A resposta da fase aguda, inclui o aumento das proteínas normalmente

encontradas em indivíduos saudáveis, assim como o aparecimento de novas proteínas, que servem como marcadores de um evento patológico.

Neste estudo, verificou-se que o perfil eletroforético das fêmeas, tanto jovens quanto nas adultas, portadoras de tumor e inoculadas com líquido ascítico apresentaram alterações em relação à expressão das frações protéicas entre os pesos moleculares de 116 KDa (correspondendo às proteínas de fase aguda) e entre 30 e 20 KDa (correspondendo às frações protéicas gama-globulinas, beta glicoproteínas e proteína C reativa). Segundo SUDBURY et al (1976), a concentração protéica sérica, analisadas em gel de poliacrilamida, gradualmente decresceram com o crescimento de hepatoma Morris 7777, após 30 dias de transplante. Os autores relataram a presença de fator sérico com peso molecular de 39 Kda, em separação com gel SDS em uma única banda com peso molecular de 39KDa, que foi verificado em animais com câncer e também em fêmeas grávidas (SUDBURY et al, 1976). Estes pesquisadores propõe que a resposta do hospedeiro ao câncer estimularia a produção deste fator protéico sérico pelo fígado; os autores relacionaram este estímulo ao processo de intensa proliferação celular, como ocorre na neoplasia. Em fêmeas prenhes este fator protéico sérico seria sintetizado em resposta ao crescimento fetal. A concentração de algumas proteínas plasmáticas normais aumenta várias vezes durante a resposta de fase aguda. Essas incluem as haptoglobulinas, certos inibidores de protease, componentes do complemento, ceruloplasmina e fibrinogênio, entre outras. De todas as proteínas da fase aguda, a proteína C reativa e a proteína amilóide sérica são clinicamente as mais importantes, pois sua presença serve como um indicador de processos patológicos e estão relacionadas à resposta protéica de fase aguda hepática (ALAVA et al, 1999). Apesar dos processos anabólicos do fígado, a resposta de fase aguda é acompanhada por um catabolismo

acentuado de proteínas musculares associado à perda de peso corporal e ao balanço nitrogenado negativo global, os quais foram, também, verificados em resultados prévios, em nosso laboratório (GOMES et al, 1991; GOMES-MARCONDES et al 1998).

A síntese da maioria das proteína plasmáticas, incluindo albumina, fatores de coagulação, transferrina, são controladas por mecanismos reguladores específicos. GENTILI et al (1998) verificaram que durante a gravidez em ratos, o processo de secreção de várias imunoglobulinas e proteínas séricas estavam relacionadas há existência de fatores, provavelmente citocinas, produzidas pelas células da placenta, que modulariam a resposta imune e hepática durante a prenhez. Apesar dessas características comuns, as proteínas séricas individuais são afetadas diferentemente com a evolução do neoplasia maligna (SASAMURA et al, 1998, FEISE et al, 1999). Além disso, a cinética de síntese e de renovação de determinadas proteínas são determinantes essenciais da resposta de sua concentração plasmática à lesão patológica aguda (TISDALE, 1997). Em geral, é mais provável que as concentrações plasmáticas das proteínas séricas, cuja renovação é rápida, sejam deprimidas por uma lesão aguda grave em relação às proteínas, que são renovadas mais lentamente (p. ex., albumina). Finalmente, o catabolismo de certas proteínas plasmáticas pode ser acelerado, principalmente na presença de neoplasia maligna.

Desse modo, as alterações encontradas no presente estudo foram provavelmente devido a influência de vários fatores diretos e/ou indiretos, produzidos pelo tumor e células do hospedeiro que induzem alterações na homeostasia do organismo, efeitos, estes, que puderam ser reproduzidos pela inoculação do líquido ascítico e que assim propõe uma ampla linha de pesquisa para futuras investigações.

CONCLUSÕES

Alterações metabólicas que ocorrem durante a gravidez, visando prover os substratos adequados para o desenvolvimento fetal, podem ser alterados com o desenvolvimento de uma neoplasia maligna, que alteram esse quadro, pela mobilização de nutrientes à partir dos tecidos do hospedeiro, para garantir a proliferação das células neoplásicas, acarretando então prejuízo na unidade feto/placentária.

O crescimento neoplásico acarretou prejuízo ao desenvolvimento fetal, tanto nas ratas jovens como nas ratas adultas. A relação peso placentária/peso fetal nas ratas portadoras de câncer, tanto jovens e adultas, mostrou que o tamanho placentário não determinou o peso fetal.

O desenvolvimento tumoral causou redução do hematócrito, e alterações no conteúdo de proteína total sérica e do perfil eletroforético das grávidas, tanto jovens, como adultas, portadoras de tumor.

Os efeitos do desenvolvimento neoplásicos proporcionaram alterações na expressão das frações protéicas, nas regiões correspondentes às proteínas da fase aguda e as frações protéicas gama-globulinas, beta-globulinas e proteína C reativa.

Esses efeitos deletérios sobre os fetos e alterações nos parâmetros séricos, foram reproduzidos pela inoculação do líquido ascítico nas ratas jovens e adultas grávidas.

Concluiu-se que as alterações encontradas nesse estudo, que culminaram com os efeitos deletérios aos fetos, foram provavelmente influenciadas pela presença do tumor, de forma direta e/ou indireta, uma vez que estes efeitos foram reproduzidos pela inoculação do líquido ascítico.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAM, P.A.J. & FELIG, P.: Carbohydrate, fat, and amino acid metabolism in the pregnant woman and fetus. **In: FALKNER, F. & TANNER, J.M. eds. Human growth-1. Principles and pregnant growth.** New York, Plenum Press, p.461-547, 1978.
2. AREEKUL S, ROSTREICHERT I. Alteration of serum protein concentrations in pregnancy. **Southeast Asian J Trop Med Public Health Sep;8(3):413-4, 1977.**
3. ALAVA MA, ET AL. Specific uptake of alpha-fetoprotein and albumin by rat Morris 7777 hepatoma cells. **Tumour Biol. Jan-Feb;20(1):52-64, 1999.**
4. ALBREKTEN, G., HEUCH, I., TRETLLI, S., KVALE, G.. Is the risk of cancer of the corpus uteri reduced by a recent pregnancy? A prospective study of 765,756 Norwegian women. **Int. J. Cancer 61: 485-490, 1995.**
5. BAKER, H.L.: Reproduction and breeding. **In. BAKER, H.L.; LINDSEYL, J.R.; WEISBROTH, S.H.: The laboratory rat.** New York, Academic Press, 1991, v. 1, cap. 7, p. 153-168.
6. BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem May 7:248-54, 1976.**
7. BRUCE N.W, NORMAN N. Influence of sexual dimorphism on foetal and placental weights in the rat. **Nature Sep 4;257(5521):62-3, 1975.**
8. BEATON, G. H.; BEARE,J.; HEH RYU, M.; McHENRY, E. W.; Protein metabolism in the pregnant rat; **J. Nutr., 54: 291-304, 1954.**
9. BURT M.E, HANIN I, BRENNAN M.F. Choline deficiency associated with total parenteral nutrition. **Lancet Sep 20; 2(8195pt1):638-9, 1980.**

- 10.CAIRO G. Molecular basis of reduced albumin gene expression in hepatoma cell lines with different growth rates. **Exp Cell Res. Jun;206(2):255-60, 1993.**
- 11.CASEY, M.L.; MACDONALD, P.C.; SIMPSON, E.R.: Endocrinological changes of pregnancy. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W.. **WILLIAMS Textbook of endocrinology**. 8th ed. Philadelphia, saunders, cap.16. p.977-91, 1992.
- 12.CHEN, R. J.; CHEN, C. K.; CHANG,D. Y.; CHOW, S. N.; HUANG, S. C.; HSIEH, C. Y.; LIN, M. C.; HSU, H. C.. Immune eletrophoretic differentiation of alpha fetoprotein in disorders with elevated serum alpha fetoprotein levels during pregnancy. **Acta Oncol.** 34(7): 931-935, 1995.
- 13.CLARK, C.M. & GOODLAD, G.A.J. The influence of diet on the action of the Walker 256 carcinossarcoma on liver protein and nucleic acids. **Br. J. Cancer, 14:** 327-34, 1960.
- 14.COSTA, G.; Cachexia. The metabolic component of neoplastic diseases. **Cancer Res., 37:** 2327-35, 1977.
- 15.DALY N.J, VOIGT J.J, COMBES P.F. Diagnosis and treatment of olfactory neuroblastomas in seven patients. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys Dec; 6(12):1735-8, 1980.**
- 16.DeMARCO, V., McCAIN, M. D., STRAUSS, D., CHAKRABARTI, R., NEU, J.; Characterization of glutamine synthetase transcript, protein, and enzyme activity in the human placenta. **Placenta,18:** 541-545,1997.
- 17.DHARMARAJAN, A.M., BRUCE, N.M., MCAREDLE,H.J.; Comparison of flow rates and composition of ovarian lymph and blood in the day-16 pregnant rat. **J Reprod Fertil.** May; 77(1): 169-176, 1986.
- 18.DION, A.S. & PONENTI, A. A. Ammoniacal silver staining of proteins: mechanism of glutaraldehyde enhancement. **Analytical Biochem., 129:** 490-496, 1983.

- 19.FASMAN, G. D. The road from poly(alpha-amino acids) to the prediction of protein conformation. **Biopolymers**;26 Suppl:S59-79, 1987
- 20.FEDRIZZI, S.M.G. & GOMES-MARCONDES, M.C.C.; Serum Protein of young pregnant rats bearing Walker 256 Carcinoma. **Biology of Reproduction**, vol 58, suppl 1, 1998.
- 21.FISHER, C.J. & LEATHEM, J.H.; Effect of protein- free diet on protein metabolism in the pregnant rat. **Endocrinology**, 76: 454-462, 1965.
- 22.FREINKEL, N. & METZGER, B. E.; Metabolic changes in pregnancy. In: WILSON, J. D. & FOSTER, D. W. **WILLIAMS Textbook of endocrinology**. 8th ed. Philadelphia, Saunders, 1992, cap. 17, p. 993-1006.
- 23.FUSE E. Altered pharmacokinetics of a novel anticancer drug, UCN-01, caused by specific high affinity binding to alpha1-acid glycoprotein in humans. **Cancer Res. Mar 1;59(5):1054-60**, 1999.
- 24.GAGIC K, CAMPAGNARO E, LABORDE C.J, EDAVETAL M, LEVINE E.A, POTTER B.J, RACEY BURNS L.A, BURNS A.H. The effect of clenbuterol and recombinant erythropoietin on tumor growth and the anemia caused by the Walker 256 carcinosarcoma. **Life Sci;61(25):2475-84**, 1997.
- 25.GENTILE T, DOKMETJIAN J, GARRIDO D, MARGNI R.A.Incidence of rat-soluble placental factors on IgE and IgG2a synthesis. **Am J Reprod Immunol Jan;39(1):58-63**, 1998.
- 26.Gluckman E, Esperou H, Devergie A, Traineau, R; Leverger, G.; Schaison, G.. Pediatric bone marrow transplantation for leukemia and aplastic anemia. Report of 222 cases transplanted in a single center. **Nouv Rev Fr Hematol;31(2):111-4**, 1989.

27. GOMES, M.C.C.; BEVILACQUA, R.G.; LIMA-GONALVES, E.; RESENDE, L.: Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. **Cien. Cult.**, **35(7)**: 736, 1983.
28. GOMES-MARCONDES, M.C.C.; Desnutrição proteico-calórica, desenvolvimento corporal e crescimento do Carcinossarcoma de Walker 256. Alterações metabólicas e morfológicas em ratas jovens, 1985 [**Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biomédicas, da Uni. de São Paulo].
29. GOMES-MARCONDES, M.C.C.; Influência da Gestação sobre o crescimento do câncer e deste sobre o desenvolvimento Feto Placentário- Estudo experimental em ratas Wistar inoculadas com Carcinossarcoma de Walker 256, 1994 [**Dissertação de Doutorado**, Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
30. GOMES-MARCONDES, M.C.C.; CURY, L.; CURI, R. Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. **Cancer Research Therapy and Control** **5**: 277-283, 1998.
31. GOMES-MARCONDES, M.C.C.; CURY, PARREIRA, M.R., ELIAS, C.F., AREAS, M.A. Effects of Walker 256 carcinoma on metabolic alterations during the evolution of pregnancy. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **23**:909-913, 1990
32. GOODMAN M.N. Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Am J. Physiol.** **260(Endocrinol. Metab. 23)**:E727-E730, 1991.
33. GOTTLIEB M, CHAVKO M. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. **Anal. Biochem** Aug **15**; **165(1)**:33-37, 1987.
34. GUYTON, A. C.; Metabolismo de proteínas, cap. 69. In: **TRATADO DE FISILOGIA MÉDICA**, ed. Guanabara Koogan, 8º ed., R.J, 1992.

- 35.HARAM, K.,AUGENSEN, K.; ELSAYED, S.; Serum protein pattern in normal pregnancy with special reference to acute-phase reactants. **Br. J. Obstet. Gynecol.** **90**: 139-145, 1983.
- 36.HAY,J.R. W. W.. The placenta. Not just a conduit for maternal fuels. **Diabetes**, **40(suppl.2)**: 44-50, 1991.
- 37.HENNING, B., HONCHEL, R.,GOLBLUM, S.E.; MACCLAIN, C.J.; Tumor necrosis factor-mediated hypoalbuminemia in rabbits. **J.Nutri**, **118**:1586-1590,1988.
- 38.HERRERAS, E., LASUNCIÓN, M.A., PALACÍN, M., ZORZANO,A., BONET, B.; Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel Era. **Diabetes**, **40 (Suppl 2)**: 83-8, 1991.
- 39.HYTTE F.E. Long term consequences of fetal deprivation. **Br J Obstet Gynaecol Aug**;97(8):665-6, 1990.
- 40.Hytten, F.E; LEICH, E.G. Maternal water metabolism in pregnancy. **Proc R Soc Med Oct**;64(10):1072, 1971.
- 41.KELLEHER D.K, MATTHEINSEN U, THEWS O, VAUPEL P. Blood flow, oxygenation, and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. **Cancer Res Oct 15**;56(20):4728-34, 1996.
- 42.KALKOFF, R.K.. Impact of maternal fuels and nutritional state on fetal growth. **Diabetes 40(suppl 2)**: 61-65, 1991.

43. LANGLEY E. S. C., GARDNER D. S. and JACKSON A. A.; Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life.; **J. Repr. Fertil.** **106**: 307-312; 1996.
44. LEVIN L, GEVERS W. Metabolic alterations in cancer Part II- Protein and fat metabolism. **S. Afr. Med. J** **Apr 11, 59(16)**:553-6, 1981.
45. LUNDHOLM K, EDSTROM S, KARLBERG I, EKMAN L, SCHERSTEN T. Relationship of food intake, body composition, and tumor growth to host metabolism in non growing mice with sarcoma. **Cancer Res** **Jul; 40(7)**:2516-22, 1980.
46. IMMENSCHUH S. Secretion of plasma proteins and its insulin-dependent regulation in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. **Eur J Cell Biol.** **Apr;60(2)**:256-60, 1993.
47. JUDAH J.D., NICHOLLS M.R. Biosynthesis of rat serum albumin. **Biochem. J.** **123**: 649-655, 1971.
48. KRZALIC L.J, MIHAJLOVIC L.J. Prealbumin proteins in serum. **Clin Chim Acta Jun;33(1)**:91-4, 1971.
49. LÖNNROTH, C.; MOLDAWER, L.L; GELIN, S., KINDBLOM, L; SHERRY, B.; LUNDHOM, K.; Tumor necrosis factor α and interleukin-1 α production in cachectic, tumor bearing mice. **Int J. Câncer** **46**, 89-896, 1990.
50. LORENZI, T.F.; Introdução à fisiologia hematológica, cap.12 e Eritrócitos, cap.13., In: AIRES M.M.; Fisiologia; ed. Guanabara Koogan; 1991.
51. MATTHEWS J.C, BEVERIDGE M.J, MALANDRO M.S, KILBERG M.S and NOVAK D.A. Response of placental amino acid transport to gestational age and intrauterine growth retardation. **Proc. Nutr. Soc.** **57**: 257-263, 1998.

- 52.MATSUNO T. Bioenergetics of tumor cells: glutamine metabolism in tumor cell mitochondria. **Int. J. Biochem** 19(4):303-7, 1987.
- 53.MAYEL-AFSHAR,S. & GRIMBLE, R. F. : Tyrosine oxidation and protein turnover in maternal tissues and the fetus during pregnancy in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, 716: 201-7, 1982.
- 54.MEDINA & CASTRO, I. N.: Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. **Int. J. Biochem.**, 22(7): 681-3, 1990.
- 55.MELLO,M.A.R.; Desnutrição Protéico-Calórica, Gravidez e Desenvolvimento Materno:Estudo comparativo de alterações corporais e metabólicas entre ratas jovens e adultas.; São Paulo, 1985, 12p.[Tese Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
- 56.MILLICAN, P. E.; VERNON, R.G.; PAI, V. M.; Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. **Biochem. J.**, 248: 251-7, 1987.
- 57.MILLICAN, P. E.; VERNON, R.G.; PAIN, V. M.; Protein synthesis *in vivo* during pregnancy and lactation in the mouse.; **Biochem. Soc. Trans.**; 870-1; 1985.
- 58.MOLDAWER L.L; ANDERSON C; GELIN J; LUNDHOLM K.; Regulation of food intake and hepatic protein synthesis by recombinant-derived cytokines. **Am. J. Physiol.** 254 (Gastrointest. Liver Physiol. 17), G450-456, 1988.
- 59.MOORE, D.H.; Clinical and Physiological Applications of electrophoresis; cap.9.; In: BIER M.; **Electrophoresis**; ed. Academic Press INC; London; 1964.
- 60.NAISMITH, D.J.; Adaptations in the metabolism of protein during pregnancy and their nutritional implications. **Nutr. Rep. Int.** 7: 383-90, 1973.

61. NAISMITH, D.J.; The requirement for protein, and the utilization of protein and calcium during pregnancy. **Metabolism**, **15**: 582-95, 1966.
62. NEWSHOLME, E.A., NEWSHOLME, P., CURI, R., CRABTREE, B., ARDAWI, M. S. M. Glutamine metabolism in different tissues its physiological and pathological importance. Em: J.M. KINNEY & P.R. BORUM. (ed) Baltimore - Munich: **Perspectives in Clinical Nutrition**, ed. J. M. KINNEY & P.R. BORUM, Urban & Schwarzenberg, p. 71-98, 1989.
63. PARRY-BILLINGS M, NEWSHOLME, E.A. The possible role of glutamine substrate cycles in skeletal muscle. **Biochem J** Oct1; **279**(Pt1):327-8, 1991.
64. PERIMUTTER D.H, DINARELLO C.A, PUNSAI P.I and COTTEN H.R. Cachectin/Tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. **J. Clin. Invest** **78**: 1349-54, 1986.
65. PHILLIPS A, SHAPER A.G, WHINCUP P.H. Serum proteins and mortality. **Lancet** Apr 7; **335**(8693):858, 1990.
66. POTTER, J.F. & SCHOENEMAN, M.; Metastasis of maternal cancer to the placenta and fetus. **Cancer**, **25** (2): 380-8, 1970.
67. RAY, P.K. and SAHA, S.; Tumor Growth Versus Fetal Development-Similarities and Confusions; **Adv. Immune Cancer**; vol. 2: 155-187, 1986.
68. REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., and FAHEY, Jr.G.C.. AIN-93 purified diets for laboratory rodents, final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal Nutrition**, **123**, 1939-1951.
69. RENFREE M.B, HENSLEIGH H.C, MCLAREN. A Developmental changes in the composition and amount of mouse fetal fluids. **J Embryol Exp Morphol** Apr; **33**(2):435-46, 1975.

70. RUDDON, R.W.; Nature of malignant tumors; **In: Cancer Biology**, New York; Oxford University Press. 1987. cap.1. p. 3-24.
71. SASSEN A, KENNES F, REUTER A, TELIA M. Catabolism of serum albumin in x-irradiated mice. **Radiat Res Oct;52(1):197-203**, 1972.
72. SAUER, L.A. & DAUCHER, R.T.: Amino acid, glucose, lactic acid utilization in vivo by rat tumors. **Cancer Res., 42: 3497-503**, 1983.
73. SHUMAN G. The value of quantitative protein electrophoresis. **S. Afr. Med. J. Dec4; 50(52):2059-63**, 1976.
74. SMITH B.K, BARKER K, SCHORK M.A, KLUGER M.J. Development of altered taste preferences in tumor-bearing rats. **Appetite Dec; 23(3):219-30**, 1988.
75. SHULMAN G. The value of quantitative protein electrophoresis. **S Afr Med J Dec 4;50(52):2059-63**, 1976.
76. SOETERS P.B, MEYENFELDT M.F, MEIJERINK W.J.H, FREDIX E.W.H, WOUTERS E.F.M, SCHOLS A.M.W. Serum albumin mortality. **The Lancet 335: 348-351**, 1990.
77. SUDBURY, B., DOLAN, M.L., KLEIN, K., OVE, P. Evaluation of a serum protein in a pregnant rats. **Clin. Chim. Acta, 71: 81-88**, 1971.
78. STEER P. Factors influencing relative weights of placenta and newborn infant. Maternal haemoglobin and blood pressure should have been regarded as continuous variables. **BMJ Jan 17;316(7126):234**, 1998.
79. TAM, P.P. & CHAIN, S.T.H. Changes in the composition of maternal plasma, fetal plasma and fetal extraembryonic fluid during gestation in the rat. **J Reprod Fertil. Sep; 51(1): 41-51**, 1977.

- 80.TAYLOR D.G. Serum protein electrophoresis. **J Tenn Med Assoc** Dec;**66(12):1144**, 1973.
- 81.TISDALE, M.J. Wasting in cancer. **J. Nutr.** **129(1S):243S-246S**, 1999.
- 82.TOLEDO, M.T.T. & GOMES- MARCONDES, M.C.C., Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. **Oncology Res**, submetido.
- 83.VERKESTE C.M, SLANGEN B.F, DUBELAAR M.L, VAN KREEL B.K, PEETERS L.L. Mechanism of volume adaptation in the awake early pregnant rat. **Am J Physiol** 1998 May;274(5 Pt 2):H1662-6.
- 84.VILLA L.L, VIEIRA K.B, PEI X.F, SCHLEGEL R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. **Mol Carcinog**; **6(1):5-9**, 1992.
- 85.WAITS, J.O; DOZOIS, R.R.; KELLY, K.A. Primary closure and continuous irrigation of the perineal wound after proctectomy. **Mayo Clin. Proc.**, mar; **57(3): 185-8**, 1983.
- 86.WANNEMACHER, R.W. & YATIVIN, M.B. Protein reserves and growth of the Walker carcinoma in rats. **J. Nutr.**, **85:393-9**, 1965.
- 87.WEISIGER, R.A., Laboratory Tests in Liver Disease, cap.116., In: BENNETT and PLUM, **CECIL Textbook of Medicine**, ed. W.B. Saunders Company, 20thed., USA, 1996.
- 88.WEJS, P.J.M., SCHREURS, V.V.A.M., GROOTEN, H.N.A.. Meal feeding and leucine utilization in pregnant rats. **British Journal of Nutrition**, **75: 253-258**, 1995.

89. WILLIAMS L. _____ A, EVANS S.F, NEWNHAM J.P. Prospective cohort study of factors influencing the relative weights of the placenta and the newborn infant. **BMJ Jun 28;31** _____ **4(7098):1864-8, 1997.**
90. WOOLSON, R _____ .F. Statistical methods for the analysis of biomedical data, USA, p. 513.
91. YEOH, G.C. & _____ MORGAN, E.H.; Albumin and transferrin synthesis in the liver of rats in the immediate postnatal period. **Biochim Biophys Acta.** 1973 Dec 21; **331(3):** _____ 421-429.