



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLA DE MORAES SALGADO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA
SOBRE A ATIVIDADE PLACENTÁRIA DE RATAS PORTADORAS DE TUMOR DE
WALKER 256 AO LONGO DA PRENHEZ.

Campinas
2021

CARLA DE MORAES SALGADO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA
SOBRE A ATIVIDADE PLACENTÁRIA DE RATAS PORTADORAS DE TUMOR DE
WALKER 256 AO LONGO DA PREENHEZ

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Fisiologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA
CARLA DE MORAES SALGADO E
ORIENTADA PELA MARIA
CRISTINA CINTRA GOMES
MARCONDES.

Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Coorientadora: Laís Rosa Viana

Campinas
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sa32a Salgado, Carla de Moraes, 1982-
Avaliação dos efeitos da suplementação nutricional com leucina sobre a atividade placentárias de ratas portadoras de tumor de Walker 256 ao longo da gestação / Carla de Moraes Salgado. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes.

Coorientador: Laís Rosa Viana.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Câncer. 2. Placenta - Metabolismo. 3. Gravidez - Metabolismo. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Viana, Laís Rosa, 1988-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Leucine nutritional supplementation effects on placental activity of Walker 256 tumour bearing pregnancy rats in time-course

Palavras-chave em inglês:

Cancer

Placenta - Metabolism

Pregnancy - Metabolism

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular **Banca examinadora:**

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Estela Maris Andradre Forell Bevlacqua

Maria Laura Costa do Nascimento

Data de defesa: 20-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3042-3787>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9918357156133490>

Campinas, 20 de setembro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Prof.^a Dr.^a. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Prof.^a Dr.^a. Maria Laura Costa do Nascimento

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna

AGRADECIMENTO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2018/20637-7, pelo apoio financeiro do qual tornou possível a realização desse trabalho.

Agradeço à CAPES pelo financiamento dessa pesquisa, “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

Agradeço a todos meus familiares, em especial a minha mãezinha querida, ao Roberto, a meu irmão e à Cibele, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem.

A todos os meus amigos e colegas da Unicamp que estiveram presentes durante minha jornada. Em especial aos meus amigos de São Paulo, Daniela, Sadan e Abate, gosto muito de vocês!

Agradeço a todos que conheci no Laboratório Nutrição e Câncer por compartilharem comigo seus conhecimentos, Bread, Emilliane, Bianca, André, Sarah, Melina e Luís. Aos ICs Beatriz, Thiago, Ana e Laura. Aos que continuam presentes e me ensinando cada vez mais, Maiara, Natália, Gabriela, Leisa e Rogério. Em especial a Laís que sempre foi minha inspiração! E principalmente à Maria Cristina, a quem admiro muito, obrigada por toda sua dedicação, apoio e ensinamentos!

Em especial, agradeço ao Marcos Roberto que se tornou meu maior companheiro!

RESUMO

O câncer durante a gestação tem se tornado cada vez mais frequente, o que traz maiores desafios à equipe médica. Na presença de tumor, o metabolismo materno pode ser alterado, levando ao prejuízo da atividade placentária, comprometendo o crescimento fetal. Nesse contexto, uma dieta rica em leucina pode modular o metabolismo materno e reduzir os danos à placenta. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo investigar se a dieta rica em leucina modulou as alterações metabólicas maternas causadas pelo crescimento tumoral e como essa modulação materna refletiu na função placentária e no crescimento fetal. Ratas Wistar prenhes foram distribuídas em quatro grupos experimentais (n = 10): dois grupos alimentados com dieta controle - Controle (C) e Tumor (W); dois grupos alimentados com uma dieta rica em leucina, Leucina (L) e Leucina Tumoral (LW). O tumor de Walker 256 foi implantado nos grupos W e LW no 2º dia de prenhez. As fêmeas prenhes foram eutanasiadas em diferentes momentos da gravidez: com 12, 16, 19 e 21 dias de prenhez. Soro materno, placentas e fetos foram coletados para análises morfométricas, metabólicas e expressão gênica, a partir de rt-PCR. A dieta rica em leucina modulou os parâmetros morfométricos do grupo LW, o peso corporal materno, o peso fetal e a área placentária foram preservados ao longo da prenhez. No entanto, os metabólitos séricos maternos alterados em função do tumor não foram modulados pela dieta rica em leucina. No 12º dia de prenhez, embora nenhuma alteração tenha sido encontrada nos metabólitos placentários, a dieta rica em leucina diminuiu lactato, fenilalanina, tirosina, uracila, triptofano, isoleucina e valina nos fetos do grupo LW. Aos 16 dias, houve mudanças principalmente nos metabólitos placentários relacionados ao metabolismo energético, havendo também redução da glicina, leucina e valina placentária, as quais não foram refletidas nos fetos no grupo LW. Aos 19 dias de prenhez, o tumor proporcionou o aumento de NADP⁺, AMP e ADP fetal, sendo que a dieta rica em leucina não modulou esses metabólitos. Os parâmetros morfométricos mostraram resultados positivos devido à suplementação de leucina. Em relação ao perfil metabólico, a dieta rica em leucina modulou a creatina placentária e os aminoácidos fetais aos 12 dias de gestação; modulou alguns aminoácidos da placenta aos 16 dias de gravidez, mas não modulou o metabolismo energético da placenta alterado devido ao crescimento do tumor. No final da gravidez, embora a dieta rica em leucina não tenha modulado os metabólitos fetais, teve influência positiva em modular alguns aminoácidos da placenta, como também a expressão de genes da via da Nodal, assim como preservou a expressão do gene *Tpbpa* refletindo em melhor atividade da placenta.

Palavras-chaves: câncer, metabolismo placentário, placenta, metabolismo materno

ABSTRACT

Cancer during pregnancy is increasing and poses challenges to the medical team. The tumour evolution could lead to alterations in maternal metabolism, impaired placental function, and compromise foetal growth. In this context, a leucine-rich diet could modulate maternal metabolism and reduce damage to the placenta. Thus, in this study, we investigated whether the leucine-rich diet modulated maternal metabolic changes caused by tumour growth and how maternal modulation reflected placental function and foetal growth. Pregnant Wistar rats were distributed into four experimental groups (n=10): two groups fed a control diet – Control (C) and Tumour (W); two groups fed a diet rich in leucine, Leucine (L) and Tumour Leucine (LW). The tumour implant occurred on the 2nd day of pregnancy in W and LW groups. The euthanasia occurred on different days of pregnancy (12th, 16th, 19th, and 21st days). Maternal serum, placentas and foetuses were collected for morphometric, metabolomic and rt-PCR analyses. The leucine-rich diet modulated the morphometric parameters of the LW group, preserving the maternal body weight, foetal weight, and placental area in a pregnancy time-course. However, the tumour-induced maternal serum metabolites alterations were not modulated by the leucine-rich diet. Although no changes happened in placental metabolites at 12 days, the leucine-rich diet decreased lactate, phenylalanine, tyrosine, uracil, tryptophan, isoleucine, and valine in LW foetuses. On the 16th day, the changed placental metabolites, mainly related to energy metabolism, showed a reduction in the LW group's placental glycine, leucine, and valine. However, these changes did not affect the 16-day-old foetuses. On the 19th day of pregnancy, the tumour increased foetal NADP⁺, AMP and ADP, which were not modulated by a leucine-rich diet. In conclusion, the morphometric parameters showed positive results due to leucine supplementation. Regarding the metabolic profile, leucine-rich diet modulated placental creatine and foetal amino acids at 12 days of pregnancy; modulated some placental amino acids at 16 days of pregnancy but did not modulate altered placental energy metabolism due to tumour growth. At the end of pregnancy, leucine-rich diet modulated did not modulate foetal metabolites but affected modulating some placental amino acids and also modulated the placental expression of some genes of Nodal pathway and preserved Tpbpa gene expression in LW group.

Keywords: Cancer, Placental metabolism, Placenta, Maternal metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da via de sinalização da Nodal.....	20
Figura 2. Esquema via de sinalização da mTOR.....	23
Figura 3. Peso corpóreo materno relativo no momento final da prenhez.....	32
Figura 4. Variação – delta – do peso corpóreo materno e peso absoluto do tumor.....	33
Figura 5. Metabolólitos séricos maternos no final da prenhez.....	34
Figura 6. Número de fetos por fêmea; Peso relativo de placentas; Peso relativo de fetos e Razão peso fetal pelo peso placentário.....	41
Figura 7. Histologia dos tecidos placentários.....	42
Figura 8. Expressão de genes placentários.....	43
Figura 9. Metabólitos placentários no final da prenhez.....	47
Figura 10. Evolução do peso corpóreo materno em time-course.....	55
Figura 11. Evolução dos parâmetros morfométricos maternos em time-course.....	56
Figura 12. Imagens representativas das placentas.....	59
Figura 13. Evolução do crescimento placentário em time-course.....	60
Figura 14. Evolução do crescimento fetal em time-course.....	61
Figura 15. Metabólitos relacionados ao metabolismo energético de placenta em time-course.....	64
Figura 16. Metabólitos de aminoácidos de placenta em time course.....	66
Figura 17. Metabólitos de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada placentários de placenta em time-course.....	68
Figura 18. Metabólitos relacionados ao metabolismo energético de fetos em time-course.....	71
Figura 19. Metabólitos de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada placentários de fetos em time-course.....	72
Figura 20. Metabólitos de aminoácidos de fetos em time-course.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes das dietas controle e rica em leucina	32
Tabela 2: Vias metabólicas impactadas a partir dos metabólitos séricos materno no período final de prenhez para a comparação dos grupos W e C.....	42
Tabela 3: Vias metabólicas impactadas a partir dos metabólitos séricos materno no período final de prenhez para a comparação entre os grupos LW e W.....	43
Tabela 4. Parâmetros histológicos das células placentárias dos diferentes grupos experimentais.....	45
Tabela 5. Vias metabólicas placentárias impactadas a partir dos metabólitos placentários no 3º terço da prenhez para os grupos W e C.....	51
Tabela 6. Vias metabólicas placentárias impactadas a partir dos metabólitos placentários no 3º terço da prenhez para os grupos LW e W.....	52
Tabela 7. Perfil metabolômico de soro materno no momento final da prenhez	90
Tabela 8. Perfil metabolômico de placenta no momento final da prenhez	91
Tabela 9. Perfil metabolômico de placenta com 12 dias de prenhez.....	92
Tabela 10. Perfil metabolômico de placenta com 16 dias de prenhez.....	93
Tabela 11. Perfil metabolômico de placenta com 19 dias de prenhez	94
Tabela 12. Perfil metabolômico de feto com 12 dias de prenhez.....	95
Tabela 13. Perfil metabolômico de feto com 16 dias de prenhez.....	96
Tabela 14. Perfil metabolômico de feto com 19 dias de prenhez.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1 - Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

acetil-CoA – Acetil coenzima A

ACTRII – Activin receptor type 2

ACTRIIB – Activin receptor type 2B

AKT – Protein kinase B

ALK4 – Activin receptor type-1B

B1-AR – beta-1 adrenergic receptor

BCAA – Branched-chain amino acids

BH4 - cofactor 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin

BMP – Bone morphogenetic protein

CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

EGF-CFC - Epidermal growth factor - Crypto, Frl-1, and Cryptic

FoxH1 – Forkhead box protein H1

FOXO – Forkhead box protein O

HIF – Hypoxia-inducible factor

IFN- γ – Interferon-gamma

IGF-1 – Insulin-like growth factor I

IGF-II – Insulin-like growth factor II

IL-6 – Interleucin-6

LdHA – Lactato desidrogenase

l-DOPA -Levodopa

LNBio – Laboratório Nacional de Biociências

MAC16 – Murine adenocarcinoma 16

MAFbx - Muscle Atrophy F-box gene

mTOR – Mechanistic target of rapamycin

MuRF1 – Muscle RING Finger-1

NF- κ B - Nuclear factor kappa B

P70S6K - Ribosomal protein S6 kinase beta-1

PHD – Proteínas de domínio prolil hidroxilase

PI3K - Phosphoinositide 3-kinases

RMN – Ressonância magnética nuclear

ROS – Reactive oxygen species

SMAD2 – Mothers against decapentaplegic homolog 2

SMAD 3 – Mothers against decapentaplegic homolog 3

SMAD4 – Mothers against decapentaplegic homolog 4

TGF- β – Transforming growth factor beta

TNF- α – Tumor necrosis factor alfa

Tpbpa – Trophoblast-specific protein alpha

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	ASPECTOS GERAIS E MOTIVAÇÃO	14
1.2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.2.1.	CÂNCER DURANTE A GESTAÇÃO	15
1.2.2.	GESTAÇÃO	16
1.2.3.	PLACENTA	17
1.2.4.	AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DE CADEIA RAMIFICADA	21
1.2.5.	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	24
1.2.6.	JUSTIFICATIVA	26
1.3.	OBJETIVO GERAL	26
1.4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2.	CAPÍTULO 1: ELABORAÇÃO DE ARTIGO INTITULADO: “A DIETA RICA EM LEUCINA MODULOU O METABOLISMO MATERNO E A EXPRESSÃO DE NODAL PLACENTÁRIA EM RATAS PRENHES PORTADORAS DE TUMOR DE WALKER 256”	28
2.1.	RESUMO	28
2.2.	INTRODUÇÃO	29
2.3.	OBJETIVO	31
2.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
2.5.1.	<i>DIETA RICA EM LEUCINA MODULA OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS MATERNS, ALTERADOS EM FUNÇÃO DA EVOLUÇÃO TUMORAL</i>	35
2.5.2.	<i>A DIETA RICA EM LEUCINA NÃO MODULOU AS ALTERAÇÕES DO PERFIL METABOLÔMICO SÉRICO MATERNO EM FUNÇÃO DA EVOLUÇÃO TUMORAL</i>	37
2.5.3.	<i>A DIETA RICA EM LEUCINA RECUPEROU O PESO DOS FETOS E MODULOU PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE PLACENTAS.</i>	43
2.5.4.	<i>A EVOLUÇÃO TUMORAL ALTEROU O PERFIL METABOLÔMICO DE TECIDO PLACENTÁRIO.</i>	48
2.6.	CONCLUSÃO	52
3.	CAPÍTULO 2: ELABORAÇÃO DE ARTIGO INTITULADO: “NA ANÁLISE DO CURSO TEMPORAL DA GESTAÇÃO, A DIETA RICA EM LEUCINA MODULOU O PERFIL METABOLÔMICO PLACENTÁRIO E FETAL DE RATAS WISTAR GRÁVIDAS PORTADORAS DO TUMOR DE WALKER-256”	53
3.1.	RESUMO	53
3.2.	INTRODUÇÃO	54
3.3.	OBJETIVO	55
3.4.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.5.1.	<i>A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA MINIMIZOU AS ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS MATERNS, INDUZIDAS PELA EVOLUÇÃO DO TUMOR.</i>	58
3.5.2.	<i>A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA MINIMIZOU AS ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DAS PLACENTAS E DO DESENVOLVIMENTO FETAL ALTERADOS DEVIDO AOS EFEITOS DO TUMOR</i> 62	

3.5.3. A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA MODULOU O PERFIL METABOLÔMICO DO TECIDO PLACENTÁRIO ALTERADO EM FUNÇÃO DA EVOLUÇÃO TUMORAL.	66
3.5.4. A SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA MODULOU O PERFIL METABOLÔMICO DO TECIDO FETAL ALTERADO DEVIDO AOS EFEITOS DELETÉRIOS DO CRESCIMENTO TUMORAL	73
3.6. CONCLUSÃO.....	80
4. REFERÊNCIAS	81
5. APÊNDICES.....	89
5.1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA REALIZADA DURANTE O MESTRADO	89
5.2. MATERIAL SUPLEMENTAR	90
6. ANEXOS	98
6.1. ANEXO 1: DECLARAÇÃO DE QUE A DISSERTAÇÃO NÃO INFRINGE OS DISPOSITIVOS DA LEI Nº 9610/98, NEM O DIREITO AUTORAL DE QUALQUER EDITORA.	98
6.2. ANEXO 2: TERMO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CEUA/UNICAMP.....	99

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais e motivação

A placenta, devido à sua importância para o desenvolvimento da gestação e do feto, é objeto de estudo de vários trabalhos, principalmente em função da sua alteração frente às patologias. Toda adaptação materna necessária para sustentar a gestação e todo suporte para atender a demanda do desenvolvimento fetal é gerenciada pela placenta. A placenta é capaz de regular seu próprio desenvolvimento, pois atua como órgão endócrino, do qual secreta mais de 100 peptídeos e hormônios esteroides. A placenta também possui capacidade considerável de adaptar suas estruturas e funções para proteger o feto, quando exposta a eventos maternos adversos como privação de nutrientes, exposição a drogas, toxinas ou hipóxia.

No entanto, a ocorrência de algumas patologias durante a gestação pode exceder a capacidade do órgão em adaptar-se, levando a perturbações no seu funcionamento que estão associadas a resultados nocivos ao desenvolvimento do feto. Alterações na expressão gênica, na proliferação ou diferenciação celular placentárias, induzidas pela patologia, podem levar à alterações na programação do desenvolvimento do feto, predispondo-o a uma variedade de disfunções que podem manifestar-se na vida futura da criança.

A ocorrência do câncer durante a gestação tem se tornado cada vez mais frequente pois, além do aumento da incidência da patologia na população, as mulheres estão esperando por mais tempo para terem seus filhos. Em consequência, o crescimento tumoral durante a gestação pode promover o desbalanço energético materno, aumentando o catabolismo e a degradação proteica, que levam a alterações no funcionamento da placenta e comprometem o suprimento nutricional ao feto. Uma vez que a leucina atua como molécula sinalizadora celular para síntese de proteína, favorecendo o anabolismo, torna-se importante compreender se a dieta materna rica em leucina também é capaz de modular os efeitos deletérios do tumor à placenta e, conseqüentemente, ao feto.

Assim, associando a dieta rica em leucina com a ocorrência de câncer durante a gestação, este trabalho avaliou a funcionalidade da placenta de duas formas: i) como alterações no metabolismo materno (avaliada através de metabolômica de soro materno) modula a funcionalidade da placenta (avaliando-se os resultados morfométricos, histologia, expressão de genes placentários e metabolômica de placenta); ii) como a dieta rica em leucina modula os metabólitos placentário em time-course (avaliada através de metabolômica de placenta em momentos diferentes da prenhez), e quais são as conseqüências para o metabolismo do feto (avaliada através de metabolômica de fetos em momentos diferentes da prenhez).

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Câncer durante a gestação

O câncer é a principal causa de morte nos países com maior índice de desenvolvimento humano, e a segunda principal na maioria dos países, seguido de mortes por problemas cardiovasculares. As projeções para 2040 são de ~2,17 milhões de novos casos entre mulheres de 15 a 49 anos (BERNARD; CHRISTOPHER, 2020). Devido à prática cada vez mais frequente do planejamento familiar, as mulheres estão postergando a concepção, o que eleva a propensão de diagnósticos de patologias e intercurtos anormais durante a gestação. Como por exemplo, o câncer diagnosticado durante a gestação tem se tornado mais frequente, sendo que 30% dos casos de câncer ocorrem em mulheres em idade reprodutiva, mais jovens que 45 anos, com incidência de 0,1% em gestantes, com maior prevalência para o câncer de mama e cânceres ginecológicos (LOIBL et al., 2015; ZAGOURI et al., 2016).

A delicada coexistência do câncer durante a gravidez impõe desafios éticos e profissionais e requer uma equipe multidisciplinar e altamente qualificada, uma vez que as opções de tratamento são restritas e há necessidade de cuidado para dois pacientes: a mãe e feto (ZAGOURI et al., 2016). Alguns autores definem câncer durante a gestação quando o diagnóstico é realizado durante o período gestacional, a lactação, ou até um ano após o parto (KNABBEN; MUELLER, 2017; MCCORMICK; PETERSON, 2018; STRULOV SHACHAR et al., 2018). Complementarmente, o diagnóstico para alguns tipos de câncer durante a gravidez, como o câncer de mama, costuma ser tardio, principalmente, por ser mascarado devido às alterações fisiológicas da gestação (FROEHLICH et al., 2019). Logo, há necessidade da avaliação precisa para identificar, o mais cedo possível e com exatidão, o tipo e tamanho da neoplasia, o acesso à sua localização, para possível realização de cirurgia, além da investigação se há ocorrência de metástases. Assim como, é necessário considerar o período gestacional e os parâmetros fisiológicos da mãe e do feto para a escolha ideal do tratamento (ODUNCU et al., 2003).

As células tumorais têm ilimitado potencial de divisão celular, portanto, depende da aquisição de nutrientes, que são usados para manutenção da sua atividade e proliferação (REINA-CAMPOS; MOSCAT; DIAZ-MECO, 2017). Assim, para garantir substrato para seu constante crescimento, as células tumorais apresentam flexibilidade metabólica determinada pela sua habilidade em reprogramar o balanço entre as vias anabólicas e catabólicas, através de alterações na expressão gênica (MIN; LEE, 2018). Muitos tipos de cânceres super expressam enzimas que degradam proteínas, aumentando principalmente a oxidação de aminoácidos de

cadeia ramificada dos tecidos musculares (ANANIEVA; WILKINSON, 2018). Dessa forma, o desenvolvimento do câncer pode promover alterações metabólicas e fisiológicas significativas no hospedeiro conhecida como caquexia, uma síndrome que afeta múltiplos órgãos e promove a perda da massa muscular esquelética, bem como do tecido adiposo, devido à combinação da diminuição do anabolismo com aumento do catabolismo (ELEY; RUSSELL; TISDALE, 2007). Cerca de 80% dos pacientes com câncer em estado avançado são acometidos pela caquexia, sendo é responsável pela morte de cerca de 30% destes pacientes, além de promover prejuízo na qualidade de vida e baixo prognóstico (ARGILÉS et al., 2014, 2018; TISDALE, 2010a).

1.2.2. **Gestação**

Para que a gestação aconteça de forma saudável, o organismo materno precisa encontrar-se em condições adequadas para que as alterações endócrinas e metabólicas resultem em mudanças fisiológicas complexas e altamente organizadas (BURTON; JAUNIAUX, 2015). A gestação compreende no período pelo qual o embrião forma-se e, então feto, cresce dentro do útero materno até o nascimento; em humanos, dura cerca de 40 semanas, sendo dividida em três trimestres. O 1º trimestre (0 a 13 semanas) compreende a embriogênese e organogênese, caracterizado por intensa proliferação, migração e diferenciação celular. Durante o 2º trimestre (14 a 26 semanas), os órgãos e sistemas fetais, passam por desenvolvimento e crescimento para que no 3º trimestre (27 à ~40 semanas), o feto já está totalmente formado, passa por intenso crescimento e terá o completo desenvolvimento de seus órgãos e sistemas, para que esteja preparado para o nascimento. Todos os órgãos começam a se desenvolver durante a embriogênese e dependem da placenta para exercerem suas funções completamente. Ou seja, durante toda a gestação, o feto depende do bom funcionamento da placenta e apenas no momento do parto esses órgãos estão aptos a exercerem suas funções independentemente (BURTON; FOWDEN, 2015).

Ratos são comumente usados como modelo animal em estudos experimentais sobre órgãos e sistemas, proporcionando assim amplo conhecimento da pesquisa básica, os quais ampliam do ponto de vista translacional para a clínica. A prenhez em ratas dura 21 dias. Em diagnóstico de prenhez com ultrassonografia, os conceptos de ratos foram detectados como vesículas embrionárias cheias de líquido com 9 dias pós o coito, os embriões e seus batimentos cardíacos foram identificados a partir de 12 dias pós o coito; e as placentas foram diferenciadas nas imagens a partir de 13 dias pós o coito, como estrutura em formato elipsoidal (YPSILANTIS et al., 2009). O período de organogênese em ratos dura de 6 a 16 dias pós o coito (CHRISTIE, 1964), sendo que com 17 dias pós o coito, inicia-se o período fetal, que dura

até o 21º dia. Nesse período, a placenta tem seu desenvolvimento máximo e o feto passa por maturação dos órgãos e sistemas; sendo que especialmente entre o 19º. e 21º. dias após o coito, o feto apresenta intenso crescimento (MARKEE, 1951).

1.2.3. Placenta

A placenta é um órgão transitório exclusivo dos mamíferos que faz a comunicação entre mãe e feto e exerce papel imprescindível no desenvolvimento fetal. Durante toda a sua existência intrauterina, o feto depende do funcionamento adequado da placenta que fornece todo o aporte necessário (BURTON; JAUNIAUX; CHARNOCK-JONES, 2010; MALTEPE; FISHER, 2015). Mossman foi um dos primeiros estudiosos sobre a placenta, descrevendo-a como um órgão onde ocorrem as trocas de O₂, CO₂ e nutrientes e eliminação de excretas fetais (MOSSMAN, 1991). A placenta é altamente ativa na seleção de substâncias, capaz de modificar moléculas de origem materna para sintetizar uma gama de hormônios essenciais para o crescimento fetal (BURTON; JAUNIAUX, 2015; KNÖFLER et al., 2019; LONGO; REYNOLDS, 2010; MALTEPE; FISHER, 2015). Assim, a placenta é o maior órgão produtor e secretor de hormônios esteroides e proteicos, pois atua como órgão endócrino, substituindo o eixo hipotálamo-hipófise materno e também fetal, até que esse seja completamente formado no feto; a placenta também é responsável por adaptar o organismo materno para a gestação, além de atuar como barreira imunológica ao sistema imune materno (YUNG et al., 2008).

A placenta é formada a partir das células do concepto denominadas trofoblastos. A camada de trofoblastos mais externa forma a cobertura epitelial da placenta, dando origem à subpopulação de células trofoblásticas invasivas, que irão formar os vilos placentários. As células trofoblásticas mais internas, no mesoderma extraembrionário, formam o núcleo do estroma da placenta, de onde se originam os fibroblastos e a rede vascular (BURTON; FOWDEN, 2015). A placenta madura é composta por duas faces, uma voltada para o feto e contém a placa coriônica, a qual está ligada ao cordão umbilical; e a outra face que está voltada para o organismo materno e contém a placa basal. Entre as duas faces há o espaço interviloso. A partir da placa coriônica projetam-se vilosidades fetais, que saem de um caule principal e ramificam-se, como uma árvore, até atingirem a placa basal. Os ramos finais dessas vilosidades, inseridos na placa basal, são ricamente vascularizadas por uma rede capilar fetal e o sincitiotrofoblasto faz a cobertura epitelial das vilosidades (BURTON; FOWDEN, 2015; CARTER; ENDERS, 2010). A placa basal contém aberturas, onde a partir das artérias maternas circula o sangue materno, nos espaços vilosos. Nessa interface, o sincitiotrofoblasto sintetiza e secreta grandes quantidades de hormônios esteroides e proteicos, peptídeos e fatores de

crescimento, faz o transporte ativo de nutrientes (como cálcio, aminoácidos, fósforo e lactato), além de prevenir a transmissão vertical de patógenos do sangue materno para o fetal (LAGER; POWELL, 2012). Assim, o sinciotrofoblasto compõe o principal sítio placentário de biossíntese e tem ampla área superficial de troca que se alinha com o espaço intervilo (BURTON; FOWDEN, 2015). Alterações na formação e função da placenta podem comprometer a síntese e liberação de hormônios placentários, os quais são imprescindíveis para o desenvolvimento fetal e curso normal da gestação (MATHESON et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2021; SFERRUZZI-PERRI; CAMM, 2016). Ratos apresentam placentas hemocorial, ou seja, a invasão das células trofoblásticas no tecido materno resulta no contato direto do trofoblasto com o sangue materno. A placenta de ratos é dividida em duas estruturas: coriovitelina e corioalantoide. A placenta coriovitelina consiste nas células trofoblásticas aderidas na membrana basal, em associação com a decídua e desaparece com 14 dias de gestação. Com 16 dias de prenhez, a placenta de ratos atinge seu tamanho máximo, no entanto, ainda passa por alterações até o período final da prenhez (YPSILANTIS et al., 2009). A placenta corioalantoide desenvolve-se antes da degeneração da placenta coriovitelina e é composta por duas zonas: i) juncional, que é composta por células trofoblásticas e canais vasculares maternos, estando localizada adjacente ao tecido materno; ii) labirinto, que é composta por células trofoblásticas, canais vasculares maternos e vasos fetais e está localizada adjacente ao embrião (MARKEE, 1951; SOARES et al., 1998).

A placenta atua com órgão endócrino, liberando hormônios e fatores que exercem função no organismo materno para sustentar a gestação, bem como regular o próprio desenvolvimento placentário (BURTON; FOWDEN, 2015). Os fatores de transformação de crescimento beta (TGF- β) são fatores liberados pela placenta, importantes para sinalização da diferenciação celular, do controle da invasão do trofoblasto no endométrio e da proliferação celular (CIARMELA et al., 2011; CRITCHLEY et al., 2001). Uma vez que, o bom desenvolvimento fetal depende da disponibilidade de nutrientes fornecidos pela placenta, a rápida invasão do trofoblasto no endométrio e, conseqüentemente, sua proliferação e diferenciação celular são importantes para o rápido estabelecimento da placenta e da circulação útero-placentária (BURTON; JAUNIAUX, 2015; MAGGEN et al., 2020; VAN CALSTEREN et al., 2010). No entanto, a ocorrência do câncer durante a gestação pode alterar o metabolismo materno e comprometer importantes vias de sinalização para o estabelecimento da placenta e por conseqüência a circulação útero-placentária (BURTON; JAUNIAUX, 2015). Igualmente importante, alterações no metabolismo materno, quando em associação com o câncer, também

podem variar a concentração dos substratos e nutrientes disponíveis na circulação materna e com isso limitando tal suprimento ao feto (BURTON; FOWDEN, 2015). Resumindo, a ocorrência do câncer durante a gestação pode alterar o balanço metabólico e fisiológico materno, que resultam em alterações no funcionamento da placenta, prejudicando o crescimento fetal (CARBO et al., 1996; TOLEDO; GOMES MARCONDES, 2004).

Como mostrado por nossos estudos anteriores, fetos de ratas prenhes portadoras de tumor de Walker 256 apresentaram pesos reduzidos e aumento da reabsorção fetal, representando assim danos severos ao desenvolvimento do feto (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Nas placentas das ratas portadoras de tumor, observou-se redução da camada da decídua basal e do labirinto em comparação às placentas controles, sugerindo menor superfície materno/fetal de troca de substratos (TOLEDO; GOMES MARCONDES, 2004). Esses estudos mostraram que houve comprometimento das vias de proliferação celular placentária devido ao crescimento do tumor durante a prenhez neste modelo animal. Dessa forma, o comprometimento da placenta devido ao tumor, pode levar ao prejuízo da síntese e liberação de importantes hormônios e peptídeos. No entanto, estudos que avaliaram o efeito da dieta rica em leucina em placenta de animais portadores de tumor, mostraram que a leucina parece modular favoravelmente os efeitos deletérios do desenvolvimento tumoral sobre a placenta e também sobre as proles (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; CRUZ et al., 2016; DE MORAES SALGADO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015, 2013).

Dentre os peptídeos liberados pela placenta, encontram-se alguns membros da superfamília dos TGF- β , como activina, BMP (bone morphogenetic protein) e nodais, que são altamente conservados, sendo encontrados em uma ampla variedade de espécies, principalmente em roedores e humanos (LIFSHITZ; FRENKEL, 2013). São importantes reguladores da maioria das atividades celulares, incluindo crescimento celular, apoptose, diferenciação, adesão, migração, produção de matriz extracelular, função imune, hematopoese, angiogênese, organogênese e embriogênese (SANTIBAÑEZ; QUINTANILLA; BERNABEU, 2011). Os TGF- β são fatores importantes para o sucesso da embriogênese, pois iniciam a sinalização da implantação, regulam o processo de transformação do disco embrionário e coordenam a migração de células do epiblasto para o centro do disco embrionário, para formar a linha primitiva que, posteriormente, dará origem à notocorda. Os TGF- β também são responsáveis pela diferenciação das células que formarão as camadas germinativas (NORRIS et al., 2017).

Alguns membros dos TGF- β são expressos no endométrio e têm funções associadas à remodelação celular do próprio endométrio, que promove a implantação do blastocisto, decidualização e estabelecimento da placenta (JONES et al., 2006). A proteína Nodal em especial, é um importante membro dos TGF- β , sendo reguladora da embriogênese. No início da gestação, a Nodal, expressa pelo endométrio, desempenha papel importante na sinalização da implantação e estabelecimento da placenta (CHUVA DE SOUSA LOPES; ALEXDOTTIR; VALDIMARSDOTTIR, 2020). Após a implantação, a placenta passa a expressar a Nodal que participa de processos essenciais da embriogênese, como a padronização do eixo anteroposterior do embrião, migração celular e diferenciação das camadas germinativas mesoderme e endoderme (SHEN, 2007). No estágio mais avançado da organogênese, a Nodal é responsável por formar a assimetria do eixo direito-esquerdo (MILLER; HILL, 2016), e no final da gestação, a queda na concentração da Nodal está associada com o início do processo de parto (HILL, 2018).

Como todos os membros dos TGF- β , a Nodal depende da interação com correceptores EGF-CFC para ativar os receptores serina-treonina-quinase do tipo I (ALK4 e ALK7) e do tipo II (ACTRII e ACTRIIB). Uma vez ativados, os ALK4 fosforilam a SMAD2/3, formando complexo com a SMAD4, sendo então translocado para o núcleo da célula (MILLER; HILL, 2016; SHEN, 2007). No núcleo, os fatores de transcrição FoxH1 e Mixer medeiam a ligação do complexo Nodal/SAMD2/3/4 aos genes específicos, como por exemplo, genes relacionados ao transporte de nutrientes, à maturação da região labiríntica da placenta, além de estar relacionado a própria regulação da Nodal (Figura 1) (HILL, 2018).

Estudos realizados em camundongas mostram que alterações na sinalização da Nodal promove malformação da placenta, alterações na expressão da proteína específica trofoblástica alfa (Tpbpa) – proteína liberada pelas células trofoblásticas, a qual exerce importante função da regulação da atividade das células espongiotrofoblasto – e, por consequência, causa prejuízos ao desenvolvimento fetal (HILL, 2018; MONSIVAIS et al., 2015). A sinalização da Nodal regula a invasão do trofoblasto no endométrio, pois promove o início do processo de apoptose, além de promover a interrupção do ciclo celular para controlar a proliferação do trofoblasto. A superexpressão da Nodal leva à inibição da diferenciação das células trofoblásticas (MA et al., 2001), por outro lado, quando subexpressa, ocorre aumento da invasão do trofoblasto no endométrio (MILLER; HILL, 2016; MONSIVAIS et al., 2015). Em ambos os casos, a placenta tem seu funcionamento comprometido. Da mesma forma, a ausência da sinalização via Nodal em camundongos knockout para receptores ALK4, leva ao menor número de implantes,

malformação na placenta, reabsorção fetal e fetos malformados em camundongas (MONSIVAIS et al., 2015).

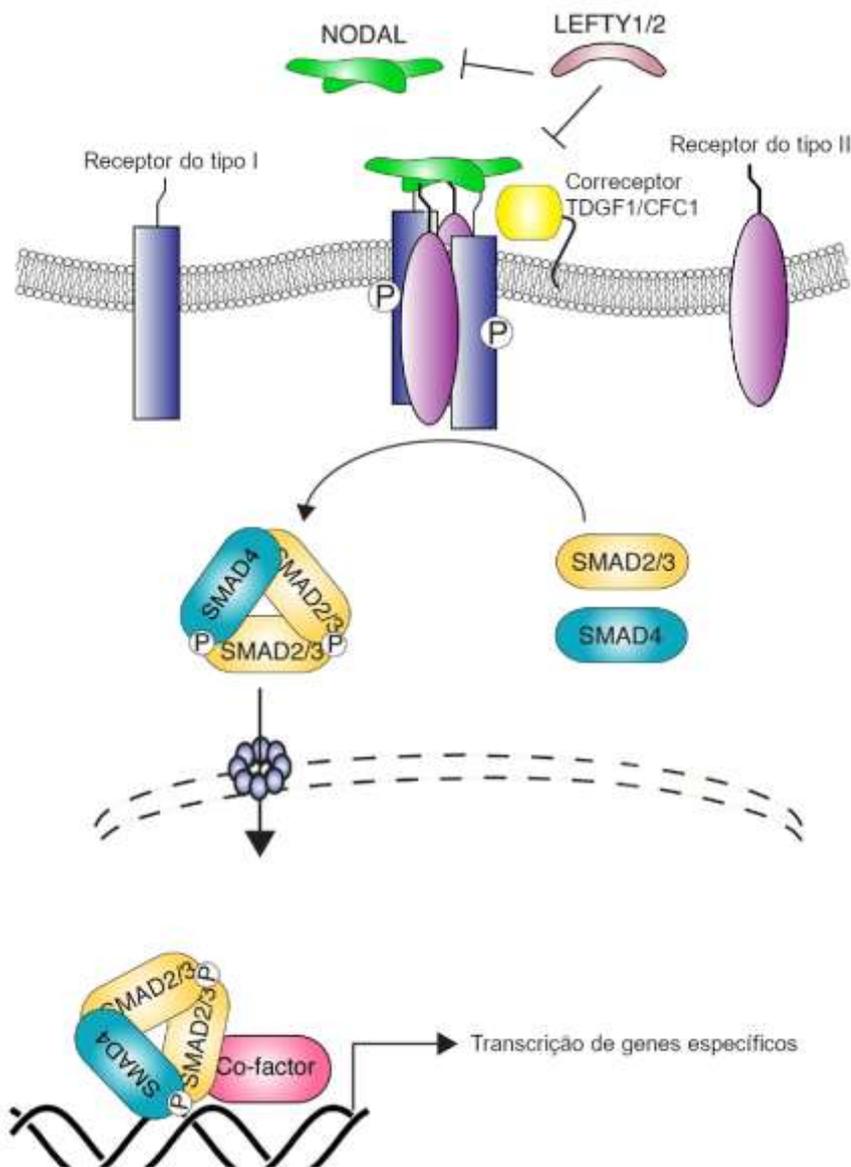


Figura 1. Esquema da via de sinalização da Nodal. A Nodal liga-se aos receptores serina-treonina-quinase do tipo I (ALK4) e do tipo II (ACTRII e ACTRIIB), em associação com o correceptor TDGF1/CFC1. O receptor do tipo I ativado fosforila as SMADs 2 e 3 que formam um complexo com a SMAD 4. O complexo de SMADs é translocado ao núcleo, onde participa da transcrição de cofatores, responsáveis por regular a transcrição de genes específicos. Left1 e 2 são inibidores extracelular da Nodal, por competirem com receptores do tipo I Adaptado: (Adaptado de HILL, 2018)

1.2.4. Aminoácidos essenciais de cadeia ramificada

Os aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (BCAA) são leucina, isoleucina e valina, sendo a leucina o aminoácido mais conhecido devido à sua abundância numa dieta rica em proteína e sua importância na formação do esqueleto para síntese proteica (WU, 2013). Assim, leucina exerce função sinalizadora para a síntese de proteínas, principalmente na musculatura esquelética, pois ativa a via de sinalização da proteína alvo mecanístico da

rapamicina (mTOR), no aumento da biogênese mitocondrial e na oxidação de ácidos graxos. Além disso, a leucina ao mesmo tempo em que fornece substrato energético para dar aporte à proliferação celular, também inibe o catabolismo (ZHANG et al., 2017). A leucina também atua no tecido adiposo, regulando a diferenciação dos pré-adipócitos através da sinalização da mTOR (LI et al., 2011; SUN; ZEMEL, 2009).

A disponibilidade de aminoácidos na circulação materna durante a gestação é importante para garantir a demanda de aminoácidos necessários para o intenso crescimento fetal (ZAUGG et al., 2021). Na placenta, há um complexo sistema de transportadores de aminoácidos que dependem do gradiente de concentração extracelular e intracelular, ou seja, do gradiente do substrato materno e do fetal (JANSSON, 2001). O complexo sistema de transportadores possibilita a eficiência de transferência materno-fetal de aminoácidos essenciais. Foi demonstrado em experimento de perfusão de placenta de cobaias e em células BeWo, que a leucina na circulação materna aumenta a capacidade da placenta em transferir aminoácidos para a circulação fetal (HILL; YOUNG, 1973; ZAUGG et al., 2021).

Além de atuar na transferência de aminoácidos pela placenta, a leucina também tem importante papel na ativação da sinalização celular da mTOR placentária, incluindo AKT1, RPS6K e RPS6 (KIM et al., 2011; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). A adequada sinalização da mTOR placentária é essencial para o desenvolvimento dos blastocistos e conceptos, pois ativam eventos relacionados à proliferação e migração celular em conceptos de ovinos durante o período peri-implantação (KIM et al., 2011). A leucina também exerce importante função em preservar as fêmeas prenhes e seus fetos dos efeitos nocivos do desenvolvimento tumoral durante a prenhez. Em experimento com ratas prenhes portadoras de tumor de Walker 256 alimentadas com dieta rica em leucina, nos fetos dessas ratas, a proteína total sérica e o hematócrito fetal estavam similar ao grupo controle e maiores que os valores dos fetos do grupo com tumor alimentadas com dieta controle (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014). Em experimentos realizados em camundongas fêmeas prenhes portadoras do adenocarcinoma MAC16, a presença do tumor durante a prenhez diminuiu o peso materno e o peso fetal, possivelmente, pela diminuição da expressão da via de sinalização PI3K / Akt / mTOR. Nas fêmeas prenhes portadoras do tumor alimentadas com dieta rica em leucina, a via de sinalização PI3K / Akt / mTOR estava semelhante ao controle e evitou a diminuição do peso materno e fetal comparados com as portadoras de tumor alimentadas com dieta controle (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Dessa forma, a leucina vem sendo amplamente estudada devido à sua importante função na preservação do peso corpóreo, por favorecer o

balanço de síntese proteica da musculatura esquelética. Assim, a sinalização da mTOR é regulada por vários sinais extracelulares, como como IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), hormônio de crescimento e insulina, sendo mediados pela ativação de PI3K (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Ambos IGF-I e IGF-II (Insulin-like growth factor 2) são reguladores chave do crescimento fetal, e estão abundantemente presentes na circulação materna e na placenta, regulando sua função (SFERRUZZI-PERRI et al., 2006). Assim como mencionado acima, a leucina atua diretamente no aumento da secreção de insulina (DOELMAN et al., 2015), que por consequência também estimula o aumento da liberação de hormônio de crescimento, assim como de IGFs (MOGAMI et al., 2009). Desse modo, a leucina também atua de forma indireta no processo de crescimento tanto placentário quanto fetal, já que ambos necessitam dos processos de sinalização da mTOR, Akt/PI3K (Figura 2) (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015).

Na vigência do câncer, há intensa regulação negativa da mTOR, que afeta o processo anabólico, como também há ativação de vias que induzem o processo catabólico (TISDALE, 2010a). Durante a atrofia muscular, duas ligantes específicas de ubiquitinas, a muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) e atrogin-1/muscle atrophy F-box (MAFbx), estão reguladas positivamente. A expressão de MuRF está sob controle de fator nuclear kappa B (NF- κ B), e MAFbx é regulada pela Forkhead box O (FOXO) (Figura 2) (LIU et al., 2007; TISDALE, 2010a). Em estudos prévios, foi verificado que a suplementação nutricional com leucina também modula negativamente os processos de espoliação de proteína. Assim, em nossos trabalhos prévios, a placenta de camundongas portadoras de tumor que receberam dieta rica em leucina apresentaram modulação do sistema de proteólise, relacionado com o sistema de ubiquitinação de proteínas, melhorando assim o curso da prenhez nessas camundongas (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Assim, alterações na síntese proteica através de mudanças na sinalização da via da mTOR pode levar ao prejuízo da síntese de peptídeos placentários importantes para o desenvolvimento do feto.

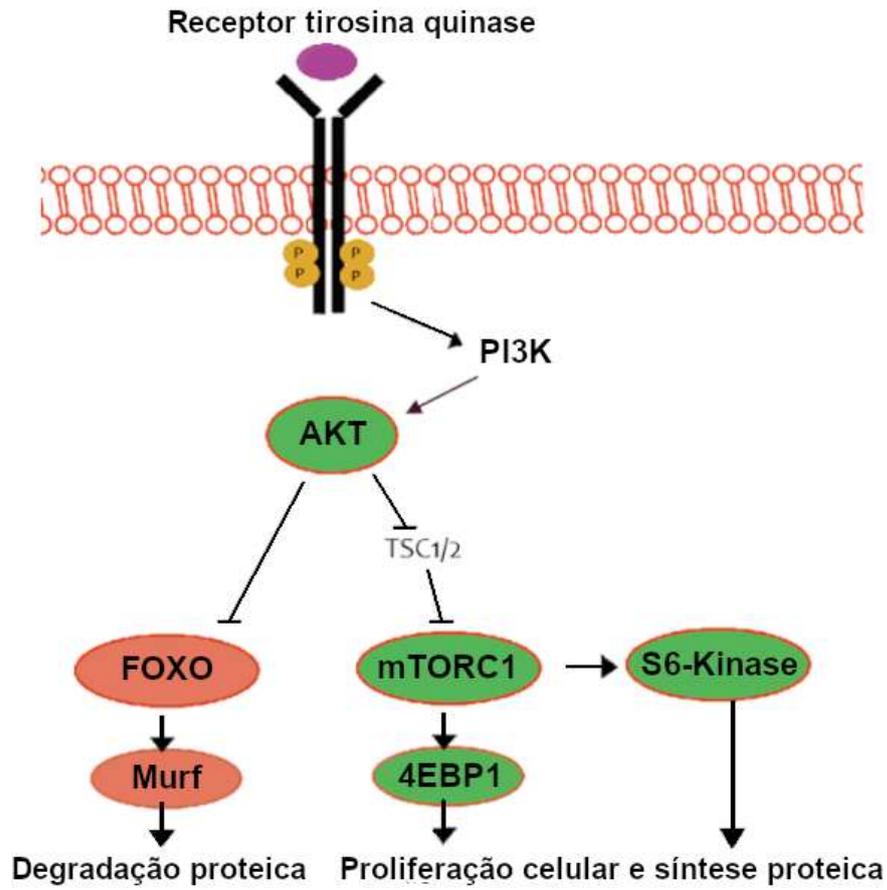


Figura 2. Esquema da via de sinalização da mTOR. Os receptores tirosina quinase, como os receptores de fatores de crescimento, são ativados por IGF-I e IGF-II. Quando ativados, os receptores ativam PI3K, seguindo a ativação de AKT. A AKT é responsável por inibir a atividade da FOXO e da TSC 1/2 que, quando inibida, libera a atividade da mTOR. Os efeitos downstream dessa cascata são ativação da 4EBP1 e P70S6 quinase (S6K) que reguam positivamente processos de iniciação da transcrição ribossomal de mRNA de proteínas necessárias para proliferação celular. Quando os receptores tirosina quinase não são ativados, a atividade da FOXO, e consequentemente da Murf estão aumentadas e levam à maior degradação proteica (Adaptado de LI; ZENG; SHEN, 2014).

1.2.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido bem sucedida para determinar o estado metabólico de um organismo. Os espectros das imagens produzidas com RMN são o resultado da interação entre núcleos atômicos dos compostos orgânicos, neste caso os metabólitos, com o campos magnéticos gerados pelo equipamento; ou seja, alterações no campo magnético quando entram em ressonância com compostos químicos diferentes da água, geram uma representação química em imagens (MARKLEY et al., 2017; SHAH et al., 2006).

Uma vez que a RMN oferece informações sobre um grande número de metabólitos e possibilita análises estatística multivariável, a RMN tem sido amplamente utilizada como técnica de análise e quantificação do perfil metabolômico do organismo para estudos sobre doenças que promovem tal distúrbio metabólico (LE BELLE et al., 2002). Essa abordagem permite a comparação do perfil de metabólitos entre indivíduos saudáveis ou com patologias,

como por exemplo, o câncer. Assim, a metabolômica tem se tornado uma importante ferramenta para os estudos sobre alterações metabólicas promovidas pelo câncer, pois traça o perfil de metabólitos e identifica possíveis biomarcadores. O estado metabólico do organismo depende de seu genoma, transcriptoma e epigenoma, associado ao ambiente e estados da microbiota e estímulos ambientais (MARKLEY et al., 2017). Assim, alterações na expressão gênica, ou regulação de proteína podem promover alterações metabólicas específicas, sendo que o perfil metabolômico pode fornecer informações com alto potencial para descrever com precisão o estado fisiológico e patológico do organismo (MARKLEY et al., 2017; SHAH et al., 2006).

Estudo utilizando a RMN, comparou as alterações metabólicas entre o músculo gastrocnêmio de animais recém desmamados e de jovens adultos, ambos portadores de tumor de Walker 256 (DE MATUOKA E CHIOCCHETTI et al., 2021). Análises dos metabólitos da musculatura esquelética pode direcionar à biomarcadores a serem aplicados para detecção dos momentos iniciais da síndrome de caquexia. Os resultados de metabolômica mostraram que as alterações na perda de peso dos animais, devido à caquexia do câncer, foram acompanhadas por alterações no metabolismo de aminoácidos. Variações na concentração de glutamato, glutamina, glicina e metilhistidina, associadas às variações no succinato e citidina, apontam alterações específicas na fase inicial do crescimento tumoral, que podem estar relacionadas ao início da proteólise muscular e redução da produção de energia pelo músculo (DE MATUOKA E CHIOCCHETTI et al., 2021).

Explorar o perfil metabólico durante a gestação também oferece informações poderosas sobre o sistema que refletem as influências genéticas e ambientais maternas, ajudando a elucidar distúrbios metabólicos e das vias associados às alterações no desenvolvimento normal dos fetos, como complicações pré-natal, pré-eclâmpsia, malformação fetal, desordens cromossômicas, parto prematuros, diabetes gestacional e fetos pequenos para idade gestacional (MAITRE et al., 2016; PINTO et al., 2015). Estudo com sangue e urina de gestantes saudáveis em vários momentos do curso da gestação providenciou grande discernimento sobre as mudanças metabólicas ao longo da gestação (PINTO et al., 2015). No primeiro trimestre, foram identificados 7 aminoácidos diminuídos na circulação materna (valina, alanina, glutamina, tirosina, histidina e citrulina), dos quais são bem documentados e explicados em termos de aumento da transferência placentária de aminoácidos para o feto, favorecendo a conservação de nitrogênio para o crescimento fetal. No 2º trimestre, os aminoácidos alanina e tirosina parecem ter sido menos requeridos, uma vez que os níveis na circulação materna estavam parcialmente recuperados. Outros aminoácidos foram mantidos em níveis baixos até o final da gravidez, como a intensa captação e metabolização da glutamina (PINTO et al., 2015). Assim,

o balanço dos metabólitos maternos circulantes é essencial para o desenvolvimento ideal do feto. A presença do tumor durante a gestação, pode promover alterações no metabolismo materno e levar a deficiência na concentração dos metabólitos essenciais para o desenvolvimento normal do feto.

1.2.6. Justificativa

A placenta é um órgão endócrino imprescindível para gestação, pois gerencia toda adaptação materna necessária para sustentar a gestação e todo suporte nutricional e hormonal necessários para demanda fetal. Além disso, a placenta possui capacidade considerável de adaptar suas atividades e funções para preservar o desenvolvimento fetal de possíveis alterações no organismo materno, como privação nutricional, patologias, exposição a drogas ou toxinas.

No entanto, a ocorrência de algumas patologias durante a gestação pode exceder sua capacidade de adaptar-se. Quando isso ocorre, perturbações no funcionamento da placenta estão associadas a alterações na programação do desenvolvimento do feto, predispondo-o a uma variedade de disfunções, como prematuridade, pré-eclâmpsia, restrição de crescimento e prejuízos na saúde na vida futura da criança.

O câncer durante a gestação é uma delicada condição para a paciente e traz desafios à equipe médica tornando-se, então, uma importante questão de saúde pública. O aumento da incidência do câncer em mulheres, associada a condição de postergar a concepção, está aumentando o número de diagnósticos de câncer durante a gestação. O desenvolvimento do tumor durante a gestação promove alterações metabólicas materna que podem comprometer o funcionamento adequado da placenta e, conseqüentemente, prejudicar o desenvolvimento fetal. No entanto, a suplementação materna com leucina tem se demonstrado uma aliada poderosa para mitigar os efeitos deletérios do câncer durante a gestação.

Considerando o exposto acima, torna-se importante obter um panorama dos metabólitos placentários alterados devido à presença do tumor e modulados pela suplementação com leucina. A funcionalidade da placenta também pôde ser investigada através das alterações em sua morfologia, alterações na expressão de genes importantes para a síntese de proteínas (via da mTOR) e para o desenvolvimento do feto e de sua própria regulação (via da Nodal).

1.3. Objetivo geral

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar se a dieta rica em leucina foi capaz de modular a atividade placentária de ratas prenhes portadoras de tumor de Walker 256.

1.4. Objetivos específicos

CAPÍTULO 1. Hipótese: A dieta rica em leucina modula o perfil metabolômico materno de ratas portadoras de tumor de Walker 256, no final da prenhez, e exerce efeito favorável à atividade placentária, preservando os fetos

- Avaliar os parâmetros morfométricos maternos de fêmeas portadoras de tumor alimentadas com dieta rica em leucina.
- Traçar o perfil metabolômico de soro maternos.
- Avaliar os parâmetros morfométricos dos fetos e placentas.
- Avaliar a expressão gênica placentária das proteínas Nodal, ALK4 e Tpbpa.
- Avaliar a expressão gênica placentária das proteínas relacionadas às vias de síntese e degradação placentárias: mTOR, P70, 4EBP1, AKT, FOXO1 e Murf.
- Avaliar a expressão gênica placentárias de LdHA, B1-AR e HIF.
- Traçar o perfil metabolômico das placentas no final da prenhez e correlacionar com as alterações maternas.

CAPÍTULO 2. Hipótese: A dieta rica em leucina modula o perfil metabolômico placentário de ratas prenhes portadoras de tumor de Walker 256 e promove alterações benéficas ao perfil metabolômico fetal ao longo de toda prenhez.

- Avaliar, em time-course, os parâmetros morfométricos materno de fêmeas portadoras de tumor alimentadas com dieta rica em leucina.
- Avaliar, em time-course, o perfil metabolômico de placentas de fêmeas portadoras de tumor alimentadas com dieta rica em leucina.
- Avaliar, em time-course, o perfil metabolômico de fetos de fêmeas portadoras de tumor alimentadas com dieta rica em leucina.

2. CAPÍTULO 1: Elaboração de artigo intitulado: “A dieta rica em leucina modulou o metabolismo materno e a expressão de Nodal placentária em ratas prenhes portadoras de tumor de Walker 256”

Este artigo será submetido no periódico *Cancers*, Special Issue Cancer and Pregnancy, fator de impacto 6.126

2.1. Resumo

Introdução: A presença do tumor durante a gestação pode levar a alterações metabólicas maternas que promovem danos à placenta. A leucina é um aminoácido essencial de cadeia ramificada conhecida pelos seus efeitos benéficos, inclusive ao tecido placentário, principalmente quando concomitantemente ao crescimento tumoral. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar como a dieta rica em leucina modulou as alterações metabólicas materna e como essas alterações refletiram na atividade placentária. Metodologia: Ratas Wistar prenhes foram distribuídas em quatro grupos experimentais (n=10): dois grupos alimentados com dieta controle – Controle (C) e Tumor (W); dois grupos alimentados com dieta rica em leucina, Leucina (L) e Tumor Leucina (LW). Ambos os grupos W e LW receberam implante tumoral no 2º dia de prenhez. Resultados: A dieta rica em leucina foi capaz de recuperar os pesos corpóreos das ratas LW, bem como o peso dos seus fetos, e diminuiu o peso do tumor em relação ao grupo W. No entanto, a dieta rica em leucina não modulou os metabólitos séricos maternos, como triptofano, fenilalanina, tirosina, glicina, creatina, hidroxibutirato e uracila, dos quais estavam aumentados devido à presença do tumor (W e LW, > C). Os metabólitos séricos fenilalanina, glicina, glutamina e taurina estavam diminuídos no grupo L em comparação com C. As concentrações séricas de serina, glutamina e taurina do grupo LW estavam semelhantes a L, porém diferentes de C. A leucina também pareceu influenciar a expressão gênica da Nodal nos grupos L e LW, mostrando-se reduzida em relação ao grupo C. No entanto, a expressão gênica da proteína específica trofoblástica não reduziu nestes grupos (L, LW), podendo ser um indicativo de que, apesar da redução da expressão gênica da Nodal, não houve comprometimento da atividade das células trofoblásticas. Na análise do perfil metabolômico da placenta, observou-se alterações no grupo W em relação ao C principalmente em metabólitos relacionados ao metabolismo energético. Apesar do grupo LW também estar diferente do C, este manteve-se semelhante ao L. Conclusão: A dieta rica em leucina foi capaz de recuperar os pesos corpóreos das ratas e dos fetos do grupo LW e não comprometeu a atividade das células trofoblásticas mesmo apresentando redução de expressão gênica da Nodal. Também, a leucina modulou vias do metabolismo energético e preservou o

metabolismo de creatina e histidina nos tecidos placentários. Assim, dieta rica em leucina pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos deletérios do câncer sobre a prenhez, principalmente no tecido placentário.

2.2. Introdução

O câncer foi a segunda principal causa de mortes nos países com índice de desenvolvimento humano mais baixos em 2020 (BERNARD; CHRISTOPHER, 2020). Entre as mulheres, a incidência do câncer durante a gestação tem aumentado, porque estão esperando por mais tempo para terem filhos (WEISZ; SCHIFF; LISHNER, 2001; ZAGOURI et al., 2016). Alguns autores definem o câncer durante a gestação quando o diagnóstico é feito durante o período gestacional, durante a lactação, ou até um ano após o parto (MCCORMICK; PETERSON, 2018; STRULOV SHACHAR et al., 2018; ZAGOURI et al., 2016).

As células tumorais apresentam flexibilidade metabólica determinada pela sua habilidade em reprogramar o balanço entre as vias anabólicas e catabólicas (MIN; LEE, 2018). Assim, através de alterações na expressão gênica, células tumorais controlam quais fatores/citocinas serão liberados na circulação sanguínea. Esses fatores são capazes de ativar vias de degradação e apoptose celular e inibir vias de síntese e proliferação celular dos demais tecidos do hospedeiro (ARGILÉS et al., 2014). Dessa forma, o desenvolvimento da patologia câncer durante a gestação pode promover alterações metabólicas significativas no hospedeiro que podem alterar o balanço energético materno resultando em disfunções da placenta e consequente prejuízos ao desenvolvimento fetal (CARBO et al., 1996; TOLEDO; GOMES MARCONDES, 2004).

Estudos realizados em placentas de ratas portadoras de tumor de Walker 256 mostraram que a presença do tumor promoveu danos irreversíveis à placenta. Foram encontradas alterações morfológicas (TOLEDO; GOMES-MARCONDES, 1999); diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, aumentando a quantidade de produtos da peroxidação lipídica nas células placentárias (TOLEDO; VENTRUCCI; GOMES-MARCONDES, 2011); e alterações na síntese proteica total e na expressão da mTOR placentária que acarretaram o desbalanço entre metabolismo de síntese e degradação proteica e comprometeram a proliferação e atividade celular do tecido placentário (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013). Adicionalmente, alguns estudos mostraram que a dieta rica em leucina durante a gestação pode favorecer o desenvolvimento fetal e diminuir os efeitos nocivos do

tumor sobre a placenta. (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; CRUZ et al., 2016; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015, 2013).

A leucina é um aminoácido essencial de cadeia ramificada capaz de modular positivamente, minimizando os efeitos nocivos do tumor tanto no organismo materno como na placenta. A disponibilidade de leucina na circulação materna melhora a transferência de aminoácidos pela placenta para suprir o feto (HILL; YOUNG, 1973; ZAUGG et al., 2021). De igual importância, a leucina atua como molécula sinalizadora celular da mTOR, incluindo AKT1, RPS6K e RPS6, que são essenciais para o desenvolvimento do blastocistos e conceptos em ovinos, ativando eventos relacionados ao desenvolvimento que afetam a proliferação e migração celular durante o período peri-implantação (KIM et al., 2011). Estudos realizados em ratas prenhes portadoras de tumor de Walker 256, alimentadas com dieta rica em leucina, mostrou que a proteína total sérica e o de hematócrito dos fetos estavam similar ao grupo controle e maiores que os fetos do grupo com tumor alimentado com dieta controle (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014). Em experimentos realizados em camundongas prenhes portadoras do adenocarcinoma MAC16, a presença do tumor durante a prenhez diminuiu os pesos materno e fetal, possivelmente, pela diminuição da expressão da via de sinalização PI3K / Akt / mTOR. Nas fêmeas prenhes portadoras do tumor alimentadas com dieta rica em leucina, a via de sinalização PI3K / Akt / mTOR estava semelhante ao controle e evitou a diminuição dos pesos materno e fetal, comparados com as portadoras de tumor alimentadas com dieta controle (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Dessa forma, a leucina vem sendo amplamente estudada devido à sua importante função na preservação do peso corpóreo, por favorecer o balanço de síntese proteica.

Explorar o perfil sérico metabólico durante a gestação, já que o balanço dos metabólitos maternos circulantes é essencial para o desenvolvimento do feto, oferece informações poderosas, ajudando a elucidar distúrbios metabólicos maternos, principalmente durante patologias como o câncer. Esses distúrbios podem levar a danos na placenta que resultam em complicações e prejuízos fetais (MAITRE et al., 2016; PINTO et al., 2015).

A placenta, como órgão endócrino imprescindível para a gestação e crescimento fetal, precisa ser melhor estudada quando em associação ao câncer durante a gestação. Uma vez que, alterações na sua função também pode comprometer a síntese e liberação de hormônios e peptídeos placentário importante para a gestação e desenvolvimento fetal (MATHESON et al., 2016; SFERRUZZI-PERRI; CAMM, 2016). No entanto, ainda são poucos os trabalhos que

investigam como as alterações metabólicas maternas, devido ao crescimento do tumor, afetam a função da placenta e como a dieta rica em leucina pode modular positivamente esses efeitos.

2.3. Objetivo

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar como a dieta rica em leucina modula os metabólitos séricos maternos e como essas alterações refletem na atividade da placenta.

2.4. Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar com aproximadamente 90 dias de idade foram obtidos no Centro de Bioterismo da UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório/ UNICAMP) e submetidos à cruza pelo método de harém (BAKER, 1991), quatro fêmeas para um macho. O dia zero da prenhez foi determinado pela detecção da cruza pelo método de esfregaço vaginal ou plug vaginal. As ratas prenhes foram mantidas em gaiolas coletivas, nas condições controladas do Biotério de claro/escuro 12hs, umidade de 60%, temperatura 22° C, com dieta e a água ad libitum.

As fêmeas foram randomizadas aleatoriamente em 4 diferentes grupos experimentais, sendo dois grupos receberam dieta controle e dois receberam dieta rica em leucina. As ratas prenhes foram distribuídas nos dois seguintes grupos:

Controle (C): alimentadas com dieta controle (n = 10);

Walker (W): alimentadas com dieta controle e implantadas com células tumorais (n = 10);

Leucina (L): alimentadas com dieta rica em leucina (n = 10);

Leucina Walker (LW): alimentadas com dieta rica em leucina e implantadas com células tumorais (n = 7).

As ratas foram mantidas em gaiolas, com 2 animais cada, durante todo o período experimental, e aferido o peso 3 vezes por semana. Para todos os grupos descritos acima, as ratas foram eutanasiadas no momento final da prenhez, entre 19 e 21 dias. Foram coletados soro materno (após centrifugação do sangue materno coletado por decapitação), tecidos placentários (placenta com a decídua materna) e fetal para análises bioquímicas e moleculares. Também foram coletados baço, músculo esquerdo e tumor para análises morfométricas.

O desenho experimental com uso animal deste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/Unicamp sob número 5316-1/2019 (Anexo 6.2)

Dieta

As dietas semi-purificadas seguiram os padrões estabelecidos pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta controle foi composta de 18% proteína e a dieta rica em leucina, por 18% de proteína com adição de 3% L-leucina (Tabela 1). As dietas foram compostas de quantidades similares de nitrogênio (aproximadamente 13,2 mg N2/100g dieta). O ajuste calórico da dieta leucina foi feito com redução da quantidade equivalente de carboidrato, correspondendo assim à dieta isocalórica. Os demais ingredientes das duas dietas – controle e leucina – foram equivalentes às quantidades de gordura, fibra, mistura de sais e vitaminas, colina e cisteína.

Tabela 1: Componentes das dietas controle e rica em leucina

Componentes	Dietas	
	Controle (%)	Leucina (%)
Amido de milho	39,7	38,7
Caseína*	20,0	20,0
Dextrina	13,2	12,2
Açúcar	10,0	9,0
Fibra de celulose	5,0	5,0
Mistura de sais	3,5	3,5
Mistura de vitaminas	1,0	1,0
Cisteína	0,3	0,3
Colina	0,3	0,3
Gordura (óleo de soja)	7,0	7,0
Leucina 3% **	0,0	3,0

Os valores apresentados na tabela correspondem a % que cada ingrediente representa na dieta. * Contém 85% de proteína, ** Fornecido pela empresa Ajinomoto Interamericana Ind. & Com. Ltda.

Procedimento experimental

Após detectada a cruzada, as ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais, como descrito a seguir: grupo controle (C) correspondeu as ratas prenhes que receberam dieta controle e sem implante tumoral; grupo W, correspondeu as ratas prenhes que receberam dieta controle e implante tumoral Walker 256; grupo L, as ratas prenhes que receberam dieta rica em leucina sem implante tumoral e grupo LW, as ratas que receberam dieta rica em leucina e implante tumoral Walker 256. No 2º dia de prenhez, as ratas dos grupos W e LW receberam implante tumoral. Ao longo do período experimental, foi aferido o peso das ratas

e ingestão alimentar das mesmas três vezes por semana. As ratas foram eutanasiadas por decapitação no 3º terço da prenhez. Foram pesados todos os órgãos, carcaça materna, assim como coletados e pesados os fetos correspondentes às respectivas placentas. Também foram coletados soro materno para dosagem sérica e metabólica, assim como os tecidos placentários foram analisados quanto à histologia, rt-PCR, Western blot e metabólica.

Implante tumoral

O implante do tumor foi realizado a partir de suspensão de células do tumor Walker 256 (cerca de 5×10^6 células viáveis por 0.5mL de inóculo), injetadas no flanco direito dos grupos W e LW (GOMES-MARCONDES et al., 1998). Os animais injetados com células do tumor de Walker 256 têm sobrevivência aproximada de 21 dias, que coincide com o período de prenhez. Assim, para que as fêmeas conseguissem chegar ao final da prenhez, as células tumorais foram implantadas no 2º dia de prenhez. Além disso, aos 10 dias de implante tumoral, ou correspondente 12º. dia de prenhez, o tumor tornou-se palpável, como massa sólida de aproximadamente 1,00 cm³, período esse com liberação dos fatores tumorais.

Histologia

Amostras de placentas foram coletadas e fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10%, por aproximadamente 24 horas, seguindo-se então a inclusão em parafina e confecção das lâminas com cortes histológicos de 5µm de espessura, obtidos com auxílio do micrótomo, fixadas e desidratadas em graus crescentes de álcool, limpas em xileno e embebidas em parafina (CHANDLER; ROBERSON, 2009) e então feita a coloração de hematoxilina-eosina (HE), de ácido periódico-Schiff (PAS).

Para determinar o número de células do labirinto, assim como de células trofoblásticas gigantes, foram identificados e contados os núcleos, fazendo-se a média de 5 quadrantes aleatórios, com área aproximada de 100 µm x 100 µm por quadrante, em aumento de 40x, por animal; o resultado foi expresso como número de núcleos por área de placenta por grupo. Para determinar a área das células trofoblásticas gigantes, utilizamos o software Image Pro-Plus Premium (v.3.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) em microscópio Leica (Leica DMLM, Wetzlar, Germany); as áreas foram calculadas a partir do perímetro celular medidos nas células contidas em 5 quadrantes aleatórios, com área aproximada de 100 µm x 100 µm por placenta por animal, em aumento de 40x; os resultados foram expressos como área em µm², calculada pela média do número de células por quadrante por placenta por grupo.

Metabolômica

A análise de metabolômica foi realizada com técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A metabolômica do soro das ratas prenhes foi analisada através da filtragem de 450 µL de soro em coluna Microcon 3YM (Amicon Ultra 0.5mL, Sigma-Aldrich®), excluindo-se moléculas maiores que 3 kDa. Ao soro filtrado foram adicionados água MilliQ, tampão contendo 10% de água deuterada (D2O) e tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) contendo Sal de sódio do ácido 3- (trimetilsilil) propiônico-2,2,3,3-d4 (controle interno/referência) à concentração de 0,5mM. Essa mistura foi então transferida para tubo de RMN (Norell® Standard Series™ 5 mm, Sigma-Aldrich®). Os espectros unidimensionais de 1H foram obtidos a 600 MHz, utilizando o espectrômetro Varian do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), integrante do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), com sequências de pulso tradicionais otimizadas para supressão do sinal da água.

A metabolômica do tecido placentário foi processada após pesagem de aproximadamente 0,3g, do qual foi homogeneizado em 250uL de solução contendo metanol e clorofórmio, na proporção de 2:1, respectivamente, conforme protocolo proposto por Le Belle e colaboradores (LE BELLE et al., 2002). Após homogeneização, acrescentou-se às amostras 250uL de solução de clorofórmio com água Milli-Q na proporção de 1:1. Em seguida, foram centrifugadas à 3700 rpm por 20 minutos, para separação em duas fases. A fase do metanol contém os metabólitos polares e a fase do clorofórmio, os metabólicos apolares. Ambas as fases foram coletadas separadamente, armazenadas em eppendorfs e liofilizadas no speedvac (Speedvac Eppendorf Concentration, Eppendorf, Maryland, USA). Após liofilizadas, a porção contendo os metabólitos polares foi ressuspensa em 600uL de água deuterada (D2O), tampão fosfato (10 X) com $2,8 \times 10^{-1}$ mol/L de NaH₂PO₄ e $7,2 \times 10^{-1}$ mol/L de Na₂HPO₄. As amostras atingiram valores de pH próximos a 7,40-7,45, e 50mM de TSP (ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetra deuteropropiônico). Para a identificação e quantificação dos metabólitos polares, foi utilizado o software Chenomx RMN (Suite 7.6 Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada), utilizando-se a metodologia de “targeted profiling” (Chenomx NMR Suite, Canada; KnowItAll, Bio-Rad, EUA) para a análise dos espectros de RMN, os quais foram processados para análise e determinação das concentrações dos diversos metabólitos a partir de biblioteca de dados espectrais dos metabólitos isolados.

rt-PCR

Para esse tópico, as amostras de placenta foram processadas quanto à extração do RNA total, utilizando-se Tri-reagente – Sigma, seguindo especificações do fabricante. O RNA foi

quantificado por espectrofotômetro a 260/280 nm e pureza determinada por eletroforese em gel de agarose 1% em Tris borato, pH 8,3 e coloração com brometo de etídio (MEADUS, 2014). Após a extração, 5 µg do RNA total foi combinado com 0,5 µg de oligo-dT, 200 µM de dNTPs e H₂O, pré-aquecido a 65°C por 2 minutos para a desnaturação. A mistura foi então esfriada rapidamente a 20°C e adicionados 10 µL de tampão para transcriptase reversa (5X), 10 mM de DTT e 200 unidades de Transcriptase Reversa MMLV, num volume final de 50 µL. A reação foi realizada inicialmente em temperatura a 37°C durante 90 minutos, seguida por aquecimento por 5 minutos a 95°C. O cDNA obtido (2 µL) foi amplificado por PCR, na presença da enzima Taq polimerase. Os primers (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) analisados foram Nodal (forward: 5' CTA GAC TCA GCC TCT GTA TC 3', reverse: 5' ACC TTA AGA ACC TAT AAC ACC C 3'), ALK4 (forward: 5' CAC TGA CAC CAT AGACAT TG3', reverse: 5' CAC ACT TGA AGG AGT CAAAG3'), Prl3b1 (forward: 5' CTA CAC TCA TGA TCT TGC TTC3', Reverse: 5' GCC AGG CTT GTA AAA TAG TG3'), Tpbpa (forward: 5' CCT ATA CAG GAA CAG CTA GAG3', reverse: 5' TCT TCT TTT TCA CCA TCA GG3') e controle interno GAPDH (forward: 5' CCA TGG AGA AGG CTG GG 3', reverse: 5' CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC 3').

Estatística

Todos os resultados foram expressos como médias e desvio padrão das médias. A normalização dos tecidos para os resultados morfométricos foi feita dividindo-se o peso do tecido (g) pelo peso corpóreo materno no dia 0 de prenhez (g). O delta – variação do peso corpóreo materno – corresponde à: $\Delta = \text{peso corpóreo materno no dia da eutanásia(g)} - [\text{peso corpóreo materno no dia 0 de prenhez (g)} + \text{peso dos fetos} + \text{peso das placentas} + \text{peso do tumor (g)}]$; Todas as análises de comparação entre os grupos foram realizadas utilizando-se ANOVA two-way, seguido de teste de comparação de múltiplos grupos teste de Tukey's HSD, para probabilidade inferior a 5% (Gad and Weil 1994) usando o Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software, Inc, version 7.00). As análises de discrepância entre vias metabólicas foram realizadas por teste de distribuição hipergeométrica, através da plataforma MetaboloAnalyst (CHONG; YAMAMOTO, 2019; PANG et al., 2020).

2.5. Resultados e Discussão

2.5.1. Dieta rica em leucina modula os parâmetros morfométricos maternos, alterados em função da evolução tumoral

O desenvolvimento do câncer durante a gestação pode promover alterações metabólicas e fisiológicas significativas no hospedeiro que levam à perda da massa muscular esquelética, devido à combinação do decréscimo do anabolismo com aumento do catabolismo (ELEY;

RUSSELL; TISDALE, 2007). No entanto, estudos em modelos de câncer que promovem a perda de peso associado com a suplementação com leucina têm demonstrado que a leucina modula os efeitos negativos do tumor, evitando a espoliação da musculatura esquelética preservando, então, o peso corpóreo. Neste trabalho, avaliamos os principais efeitos da leucina associada à evolução tumoral durante a gestação sobre os parâmetros morfométricos do organismo materno e suas consequências quanto à sinalização de síntese e proliferação celular e no perfil metabólico do tecido placentário.

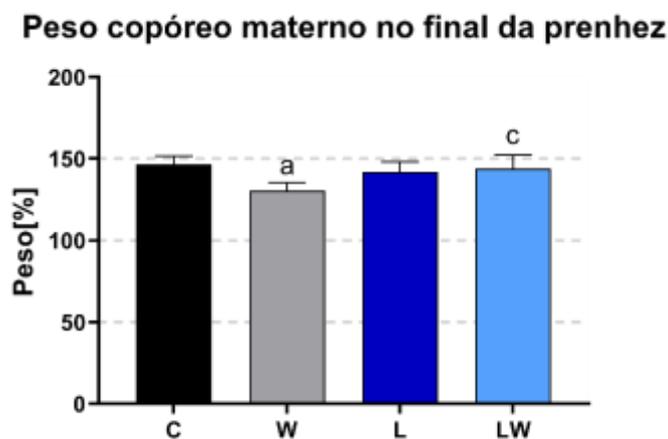


Figura 3. Peso corpóreo materno relativo, portadoras ou não de tumor e submetidas ou não a dieta rica em leucina ao final do período de prenhez. Dados apresentados como média normatizada e desvio padrão. Legenda: C, controle (n=10); W, prenhe portadora de tumor (n=12); L, prenhe alimentada com dieta rica em leucina (n=11); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (n=7). ^a, P < 0,05 comparado ao grupo C. ^c P < 0,05 comparado ao W.

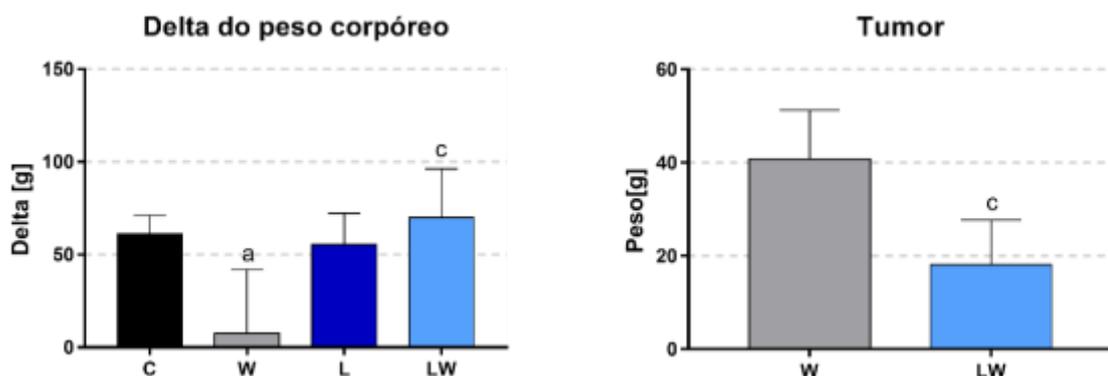


Figura 4. A, Variação – delta – do peso corpóreo materno B, peso absoluto do tumor (g) com e sem implante tumoral, sob modulação da dieta rica em leucina. Dados apresentados como média e desvio padrão. Legenda: C, controle (n=10); W, prenhe portadora de tumor (n=10); L, prenhe com dieta rica em leucina (n=10); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (n=7). ^a, P < 0,05 comparado ao grupo C. ^c P < 0,05 comparado ao W.

O crescimento tumoral durante a prenhez promoveu a diminuição do peso corpóreo materno no grupo W comparado com C (Figura 3), mostrado também pela variação – o delta – de peso corpóreo materno do grupo W ao final do período de prenhez, que foi significativamente

reduzido em relação ao grupo C. A suplementação com leucina manteve o peso corpóreo materno e o delta do peso corpóreo materno do grupo LW semelhante ao grupo C e maior que o grupo W. A leucina exerce importante função na sinalização celular de síntese proteica nos músculos esqueléticos e síntese de lipídeos no tecido adiposo (DUAN et al., 2016). Logo, observando-se as Figuras 3 e 4, notou-se o efeito da leucina em preservar o peso corpóreo materno no grupo LW. Apesar da leucina atuar no aumento da síntese proteica e proliferação celular, de alguma forma teve efeito modulatório negativo quanto à proliferação e crescimento das células tumorais, pois o peso do tumor do grupo LW apresentou-se menor em relação ao tumor do grupo W (Figura 4).

2.5.2. A dieta rica em leucina não modulou as alterações do perfil metabólico sérico materno em função da evolução tumoral

A análise do perfil metabólico dos soros maternos, onde foram perfilados 48 metabólitos para cada um dos quatro grupos experimentais – C, W, L e LW –, mostrou que o tumor afetou a concentração sérica, aumentando os metabólitos triptofano, fenilalanina, tirosina, glicina, creatina, hidroxibutirato e uracila nos grupos W e LW comparados ao grupo C; diminuiu os metabólitos glutamina nos grupos W e LW comparados com grupo C; e diminuiu taurina no grupo W comparados com grupo C. A dieta rica em leucina modulou os metabólitos séricos maternos – fenilalanina, glicina, serina, glutamina e taurina – que estavam diminuídos no grupo L, comparado ao C; e modulou o hidroxibutirato, que estava aumentado em LW em comparação ao grupo C e ao grupo W (Figura 5).

As células tumorais necessitam de aminoácidos disponíveis para sustentar sua intensa proliferação celular. Por exemplo, glutamina, glicina e ácido aspártico são usados para síntese de DNA, síntese de proteínas para estrutura celular e formação de novos vasos – angiogênese (HUANG; PLASS; GERHAUSER, 2011). Assim, o aumento da demanda de determinados aminoácidos pelas células tumorais, pode diminuir a disponibilidade de aminoácidos na circulação do paciente (BI; HENRY, 2017). No entanto, outros estudos mostraram que diferentes tipos de câncer, em diferentes estágios de desenvolvimento, podem resultar em padrões diferentes de perfil de aminoácidos séricos, elevando a concentração de determinados aminoácidos (BI; HENRY, 2017; GU et al., 2015; LAUTAOJA et al., 2019; VISSERS et al., 2005; YANG et al., 2018).

O triptofano é um aminoácido essencial na dieta humana e seu metabolismo está envolvido em duas importantes vias metabólicas, a de síntese da quinurenina e da serotonina (KANAI et al., 2009) (WIGGINS et al., 2015). O triptofano é um importante candidato a

biomarcador, pois sua concentração sérica encontra-se reduzida em vários tipos de tumor (LIESENFELD et al., 2013; WIGGINS et al., 2015). A degradação do triptofano, através das enzimas indolamine 2,3-dioxigenase e triptofano 2,3 dioxigenase, produz vários metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo ácido quinurênico, ácido antranílico e ácido 3-

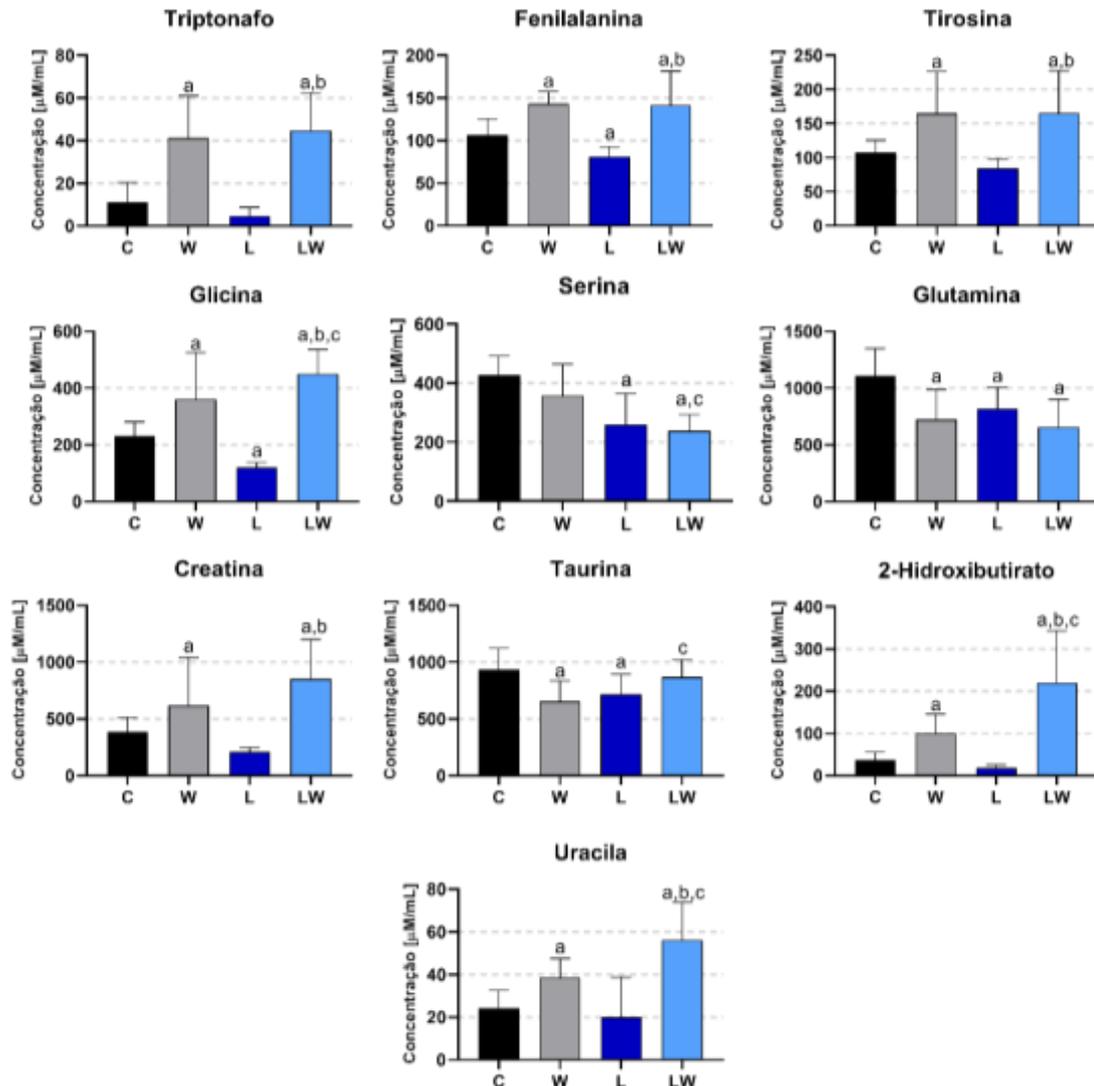


Figura 5. Metabólitos séricos maternos avaliados no último terço de prenhez, em fêmeas com e sem implante tumoral, sob modulação da dieta rica em leucina. **C**- fêmeas prenhes (n=8), **W**- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256 (n=8), **L**- fêmeas prenhes alimentadas com dieta rica em leucina (n=4), **LW**- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256 alimentadas com dieta rica em leucina (n=6). Os grupos W e LW receberam inoculação do tumor no segundo dia de prenhez. Dados apresentados como média \pm desvio padrão em $\mu\text{M/mL}$. ^a, $P < 0,05$ comparado ao grupo C. ^b $P < 0,05$ comparado ao L. ^c $P < 0,05$ comparado ao W

hidroxiantranílico (NINOMIYA et al., 2020). Esses metabólitos secundários bloqueiam a proliferação de células T específicas, além de induzirem a morte dessas células T. Adicionalmente, as citocinas inflamatórias do câncer, como o interferon- γ (IFN- γ), induzem a expressão de indolamine 2,3-dioxigenase e triptofano 2,3 dioxigenase, responsáveis pela degradação do triptofano via quinurenina, favorecendo o aumento da formação desses

metabólitos secundários que irão controlar as respostas imunológicas exacerbadas. Assim, o metabolismo de triptofano, com sua degradação, ajuda os tumores a evadirem-se das respostas imunes do hospedeiro, favorecendo de certa forma a sobrevivência das células neoplásicas (NINOMIYA et al., 2020). Entretanto, nesse estudo, observamos que as concentrações séricas de triptofano nos grupos com tumor, W e LW, estavam aumentadas em comparação com grupo C. Em estudos com camundongos, a deficiência de indolamine 2,3-dioxigeanse resultou no aumento da concentração de triptofano plasmático (KANAI et al., 2009). Assim, o aumento do triptofano na presença do tumor nos grupos W e LW pode sugerir inatividade dessas enzimas. Nesse caso, a dieta rica em leucina não alterou a concentração de triptofano, porém de certo modo modulou o crescimento tumoral (Figura 5).

O metabolismo da creatina / creatinina desempenha importante papel na produção de energia das células musculares, além de estar relacionado à carcinogênese e à progressão do câncer. A creatina junto a fosfocreatina fornecem energia por doação de ATP, sendo a creatinina um produto residual do metabolismo da creatina (LOWE; KARBAN, 2014). Estudos pré-clínicos mostraram que durante a progressão do câncer, as enzimas que sintetizam a creatina são reguladas positivamente, enquanto os níveis de creatinina estão diminuindo (FANOS et al., 2013). Assim, sugere-se que a creatina seja rapidamente utilizada pela célula neoplásica como um recurso energético, o que pode levar à creatinina como um produto residual. Portanto, níveis elevados de creatinina sérica podem estar associados a tumores altamente ativos (PINTO et al., 2015). Alterações no balanço entre creatina e creatinina sérica durante a gestação costumam estar associadas a fetos nascidos com restrição de crescimento (PINTO et al., 2015). Nesse estudo, não foram observadas alterações na concentração de creatinina sérica materna (Tabela 7, Anexo 3), embora a concentração de creatina estava aumentada nos grupos W e LW em relação ao C, possivelmente este fato pode estar relacionado ao menor peso fetal encontrado nas prenhes do grupo W. Por outro lado, embora a dieta rica em leucina não tenha modulado a creatina no grupo LW (Figura 5), o peso fetal dessas fêmeas foi preservado, assim como a razão peso feto/peso placenta, a serem abordados mais adiante (Figura 6).

A glutamina é um importante aminoácido para a transposição de carbono e nitrogênio para outros aminoácidos (HENSLEY et al., 2013; SIRNIÖ et al., 2019). Assim, a participação da glutamina em processos biológicos é grande, incluindo o uso da glutamina como substrato para síntese proteica e precursora anabólica para o crescimento da musculatura (WU et al., 2015). Pacientes em estados mais avançados de câncer apresentam concentração sérica de glutamina diminuída, devido à inflamação sistêmica causada pela presença do tumor (SIRNIÖ

et al., 2019). Nesse contexto, a baixa concentração de glutamina sérica ocorre porque as células do sistema imunológico consomem glutamina, assim como as células tumorais em pleno crescimento (SIRNIÖ et al., 2019). Durante a gestação, a glutamina, como o glutamato, são os principais combustíveis metabólicos para o rápido crescimento das células placentárias, assim como para o fígado fetal (WU et al., 2015). O crescimento do câncer durante a gestação pode competir pela disponibilidade de glutamina e, como consequência, faltar para o crescimento da placenta e feto. Foi observado que a concentração de glutamina sérica estava reduzida em todos os grupos experimentais, com e sem tumor, independente do esquema nutricional – W, LW e L – quando comparados ao grupo C. Logo, a leucina diminuiu a concentração da glutamina tanto no grupo L como no LW, mantendo a concentração sérica semelhante ao grupo W. A glutamina reduzida no grupo W pode estar relacionada ao prejuízo no desenvolvimento dos fetos. Entretanto, a redução de glutamina em L e LW (Figura 5) não resultou na diminuição do peso dos fetos para esses dois grupos, principalmente quando a prenhez e o desenvolvimento neoplásico estão associados à dieta rica em leucina (Figura 6).

Glicina e serina também são importantes aminoácidos para biossíntese de glutatona, nucleotídeos e fosfolipídios (LABUSCHAGNE et al., 2014). O estudo de Labuschagne e colaboradores sugere que a interconexão de serina e glicina faz com que sejam igualmente efetivos no suporte para proliferação celular tumoral. O mesmo estudo também sugere que as células tumorais liberam parte do excesso de glicina para limitar seu acúmulo intracelular e, assim, regular a captação de serina para conversão em glicina. Dessa forma, as células tumorais conseguem manter a síntese e proliferação máxima de nucleotídeos (LABUSCHAGNE et al., 2014). Em adição, estado mais avançado da evolução tumoral está associado a baixa concentração de alanina e alta concentração de glicina, indicando que a alteração no perfil sérico desses aminoácidos foi determinada pelo sistema inflamatório e pelo estado avançado do tumor (SIRNIÖ et al., 2019). Apesar de não termos verificado diferença na concentração de alanina sérica entre os grupos experimentais (Tabela 7, Anexo 3), foram encontradas concentrações de glicina séricas aumentada nos grupos W e LW em relação ao grupo C, sugerindo que houve alterações metabólicas influenciadas pela resposta inflamatória e pelo crescimento do tumor, sendo condizentes com a elevada proliferação das células neoplásicas, como observado nos grupos W e LW (Figura 5). Embora a concentração de glicina estivesse maior em LW em relação ao grupo W, foi correlacionada ao menor peso do tumor nesse grupo LW em relação ao W (Figura 4), sugerindo que a suplementação nutricional pôde modular outras vias para proporcionar efeito benéfico à gravidez.

A glutamina, glicina, junto à uracila, participam de vias em comum relacionadas ao metabolismo de síntese e degradação de proteínas. Alterações nesses metabólitos podem estar associadas às alterações nas vias descritas na Tabela 2. Os metabólitos glicina e uracila estavam aumentados no grupo LW em relação ao grupo C. Glicina e uracila também participam de vias em comum com glutamina, indicando possíveis alterações nas vias do metabolismo de glioxilato e dicarboxilato, metabolismo de pirimidina e biossíntese de aminoacil-tRNA (Tabela 2).

Taurina, por sua vez, é considerado um aminoácido não essencial, pois sua síntese em humanos é limitada, então, parte desse aminoácido precisa ser adquirido pela dieta para que não ocorra sua deficiência (HAYES; CAREY; SCHMIDT, 1975). A taurina é o subproduto dos aminoácidos sulfurosos metionina e cisteína e exerce uma variedade de efeitos biológicos importantes na regulação osmótica, como estabilidade da membrana, modulação da neurotransmissão de sinalização de cálcio, a atividade antiapoptótica e antioxidante (JUNG; CHOI, 2019). Estudos propõem que as alterações nos níveis sistêmicos de taurina podem ser usadas como diagnóstico e prognóstico de certos tipos de tumores (EL AGOUZA et al., 2011; TU et al., 2018). Por exemplo, a concentração sérica de taurina em pacientes com câncer de mama não avançado foi significativamente mais baixa do que em pacientes do grupo com câncer de mama de alto risco ou do grupo de controle saudável. Assim, a taurina é considerada um novo biomarcador para o diagnóstico precoce do câncer de mama (SRIVASTAVA et al., 2009). Foi demonstrado que a taurina exerce efeito inibitório no câncer de mama induzido por dimetilbenzantracina em ratos; também foi demonstrado que a taurina pode induzir apoptose e suprimir a proliferação em células colorretais e de câncer de mama (EL AGOUZA et al., 2011; TU et al., 2018). Além disso, a taurina tem importante papel na homeostase da glicose durante a gestação (LIU et al., 2021). A taurina aumenta a secreção de insulina pelas células beta, assim como modula os efeitos de genes associados ao diabetes através do aumento da sensibilidade à insulina (LIU et al., 2021). Durante a gestação, a taurina é especialmente importante, porque o feto passa por rápido desenvolvimento do cérebro, assim, a sua disponibilidade na circulação aumenta durante a gestação para atender essa demanda fetal. Para o feto, a taurina é considerada um aminoácido essencial, pois seu suprimento depende inteiramente da disponibilidade materna e do seu transporte pela placenta (HOLM et al., 2018). Em gestantes com baixa ingestão de taurina, os fetos nasceram com menor peso e estatura em relação aos fetos de gestantes com maior ingestão de taurina (JUNG; CHOI, 2019). Conforme os resultados, aqui encontrados, a taurina estava reduzida nos grupos W e L em relação ao C, porém no grupo LW,

a taurina foi semelhante ao C (Figura 5). A redução de taurina sérica materna no grupo W pode sugerir prejuízo no peso dos fetos desse grupo. Apesar do grupo L também apresentar redução de taurina, isso não afetou o peso dos fetos para esse grupo. Assim, na situação de intenso efeito deletério produzido pela evolução tumoral, a suplementação nutricional com leucina atuou de forma a preservar o grupo LW, pois a concentração de taurina também não apresentou diferença em relação ao C, e como consequência, os fetos do grupo LW também estavam com peso semelhante aos fetos de C (Figura 6).

O hidroxibutirato é formado como subproduto durante a formação de α -cetobutirato por meio da reação catalisada pela lactato desidrogenase ou α -hidroxibutirato desidrogenase. Assim, o aumento do hidroxibutirato pela atividade da lactato desidrogenase leva ao aumento do lactato sérico. Como não houve diferença na concentração de lactato para os grupos experimentais, sugere-se que o aumento do hidroxibutirato tenha ocorrido devido ao aumento da atividade da α -hidroxibutirato desidrogenase. Estudos em pacientes com câncer colorretal, também foi encontrado aumento na concentração de hidroxibutirato (NISHIUMI et al., 2012). O hidroxibutirato também pode ser usado como marcador precoce de alterações regulatórias decorrentes da glicose, ou da resistência à insulina e alterações no metabolismo de propanoato (Tabela 3). No final da prenhez, o feto já está formado e demanda grande quantidade de energia para seu intenso crescimento. Mediante ao balanço energético negativo devido aos fatores/citocinas liberados pelas células tumorais, o aumento na concentração do hidroxibutirato no grupo LW pode indicar que a leucina está participando de uma adaptação do organismo materno para tentar atender a demanda energética através de mobilização das reservas de ácidos graxos (ZENG; LIU; LI, 2017). Uma vez que a leucina também participa do aumento de síntese e estoque de lipídios, pois é convertida em acetil-CoA. No metabolismo de lipídio, o acetil-CoA formado a partir da leucina é direcionado para a síntese de ácidos graxos, levando ao aumento do nível de corpos cetônicos. Assim, esse processo pode ser justificado com o aumento do hidroxibutirato.

Tabela 2: Vias metabólicas impactadas a partir dos metabólitos séricos maternos no período final de prenhez, comparando-se o grupo W em relação ao grupo C.

Pathway	W vs C			
	Metabólitos	Match status	Regulação	P-value
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	Glicina	2/32	↑	0,002
	Glutamina		↓	
Metabolismo de pirimidina	Glutamina	2/39	↓	0,003
	Uracila		↑	

Biossíntese de Aminoacil-tRNA	Glutamina	2/48	↓	0,005
	Glicina		↑	
Metabolismo de D-glutamina e D-glutamato	Glutamina	1/6	↓	0,02
Metabolismo de nitrogênio	Glutamina	1/6	↓	0,02
Biossíntese de arginina	Glutamina	1/14	↓	0,04
Biossíntese de pantotenato e CoA	Uracila	1/19	↑	0,05

Legenda: C- fêmeas prenhes, W- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256. Os animais do grupo W receberam inoculação do tumor no segundo dia de prenhez. Valor de P para significância <0,05. ↑: upregulation; ↓: downregulation

Tabela 3: Vias metabólicas impactadas a partir dos metabólitos séricos maternos no período final de prenhez para a comparação entre o grupo LW em relação ao grupo W.

Pathway	LW vs W			
	Metabólitos	Match status	Regulação	P-value
Metabolismo de propanoato	Hidroxibutirato	1/23	↑	0,03

Legenda: W- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256. LW- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256 alimentadas com dieta rica em leucina. Os grupos W e LW receberam inoculação do tumor no segundo dia de prenhez. valor de P para significância <0,05. ↑: upregulation; ↓: downregulation

Em suma, a presença do tumor durante a prenhez, alterou o perfil metabolômico sérico materno de alguns aminoácidos (como triptofano, fenilalanina, tirosina, glicina, glutamina, creatina, taurina, hidroxibutirato e uracila, como verificado no grupo W), porém, a dieta rica em leucina em associação com a evolução tumoral (grupo LW) não modulou essas alterações no soro materno. No entanto, a suplementação nutricional isolada promoveu alterações no perfil metabolômico materno, proporcionando a diminuição de aminoácidos (como fenilalanina, glicina, serina glutamina e taurina) sem proporcionar mudanças significativas do peso corpóreo materno e do peso dos fetos, desse no grupo L comparado ao grupo C. Da mesma forma, a leucina não proporcionou modulações do perfil metabolômico para grupo LW, porém proporcionou modulação dos pesos materno e dos fetos, que foram preservados devido a essa suplementação, sugerindo que, apesar da baixa concentração desses metabólitos, não houve prejuízo ao metabolismo materno.

2.5.3. A dieta rica em leucina recuperou o peso dos fetos e modulou parâmetros morfológicos de placentas.

A presença do tumor durante a gravidez, induz à restrição de crescimento dos fetos devido aos danos causados na placenta (TOLEDO; GOMES-MARCONDES, 1999; TOLEDO;

VENTRUCCI; GOMES-MARCONDES, 2011). Nesse contexto, a suplementação com leucina tem se demonstrado importante na recuperação do peso tanto materno como dos fetos (CRUZ et al., 2016; DE MORAES SALGADO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013). Em nossas análises, os pesos das placentas e o número de fetos não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais (Figura 7). No entanto, a presença do tumor promoveu redução do peso dos fetos e a razão peso fetal/peso placentário no grupo W em relação ao grupo C. A dieta rica em leucina recuperou o peso dos fetos do grupo LW, que não apresentou diferença em relação a C. No entanto, o grupo LW também não apresentou diferença em relação ao grupo W (Figura 7). Embora as placentas não tenham apresentado diferença de peso entre os grupos experimentais, as análises de histologia de placentas, com coloração de Hematoxilina-Eosina (Figura 8), mostraram que o número de células trofoblásticas do grupo L estava maior que o grupo C e a área das células trofoblásticas das placentas do grupo W estava menor que as do grupo C (Tabela 4). Não houve diferença na contagem do número de células do labirinto (Tabela 4).

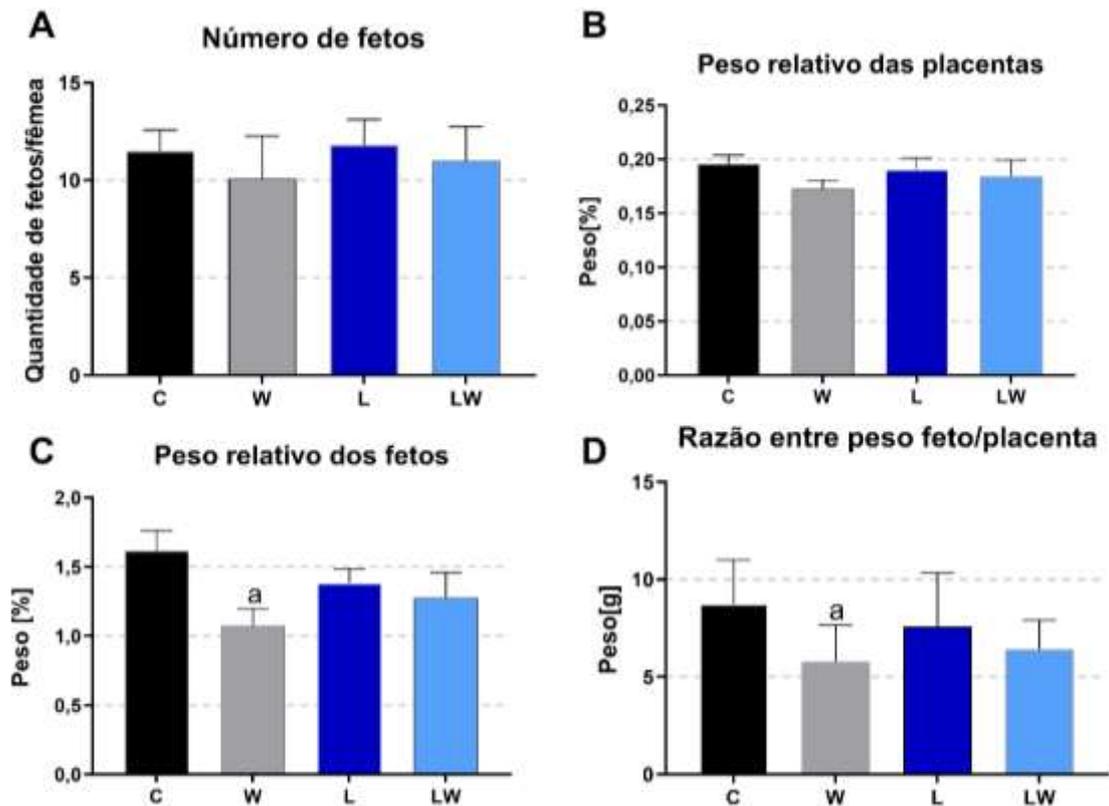


Figura 6. Dados morfométricos placentários e fetais dos diferentes grupos experimentais. A, Número de fetos por fêmeas; B, Peso relativo das placentas; C, Peso relativo dos fetos; D, Razão entre peso fetal e peso placentário, dos diferentes grupos experimentais, no final do período de prenhez. Dados apresentados como média normalizada e desvio padrão. Legenda: C, controle (n=10); W, prenhe portadora de tumor (n=10); L, prenhe alimentada com dieta rica em leucina (n=10); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (n=10). a, $P < 0,05$ comparado ao grupo C.

Tabela 4. Parâmetros histológicos das células placentárias dos diferentes grupos experimentais.

	Número células labirinto	Número células gigantes do trofoblasto	Medida das células gigantes do trofoblasto (μm^2)
C	30,3 \pm 8,4	3,5 \pm 1,9	76,1 \pm 22,0
W	26,7 \pm 6,8	4,0 \pm 0,2	52,7 \pm 8,3a
L	30,9 \pm 10,1	6,0 \pm 0,81a	64,4 \pm 21,6
LW	30,3 \pm 3,9	4,0 \pm 0,3	58,5 \pm 13,0

Parâmetros histológicos avaliados através da coloração de hematoxilina e eosina (HE) nos tecidos placentários dos diferentes grupos experimentais. Dados expressos como média \pm desvio padrão. Legenda: C, controle (n=6); W, prenhe portadora de tumor (n=6); L, prenhe alimentada com dieta rica em leucina (n=6); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (n=6). a, $P < 0,05$ comparado ao grupo C.

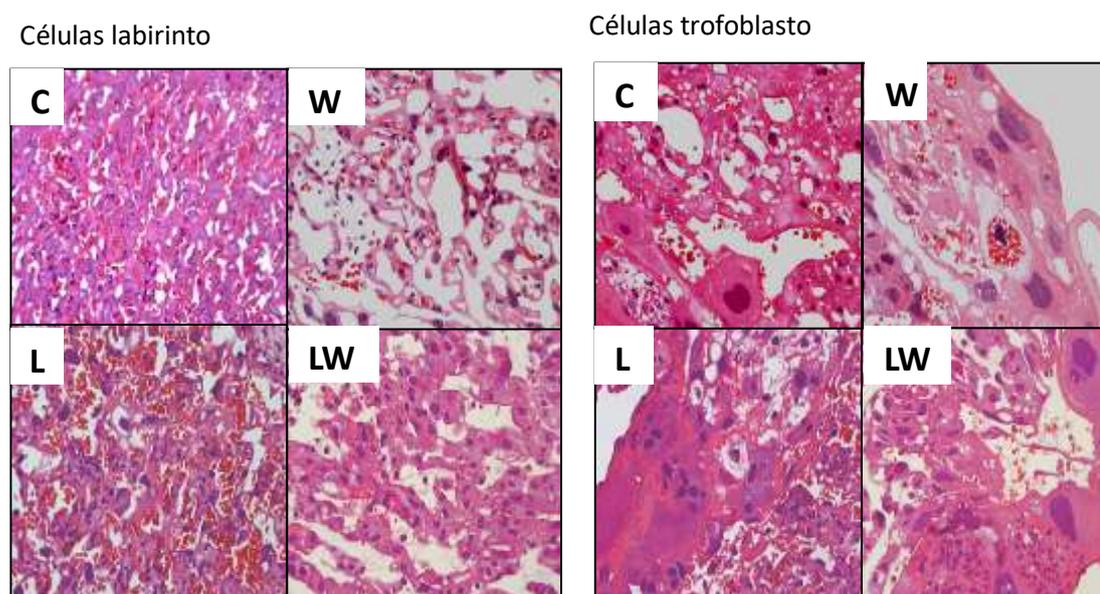


Figura 7. Histologia em coloração hematoxilina/eosina (HE) dos tecidos placentários dos diferentes grupos experimentais. Legenda: C- prenhes, W- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256, L- fêmeas prenhes alimentadas com dieta rica em leucina, LW- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 2 alimentadas com dieta rica em leucina-. Microscopia de luz, aumento de 40X

A proteína Nodal é um importante regulador da proliferação e da atividade das células trofoblásticas (SCHIER, 2009). Assim, a expressão de ALK4, que é o receptor da Nodal, também reporta a atividade celular placentária. No presente trabalho, observamos que a expressão de Nodal estava reduzida nos grupos W, L e LW em relação ao grupo C, porém esses grupos não apresentaram diferença na expressão do receptor ALK4, mas a expressão da Tpbpa reduziu somente no grupo W em relação ao grupo C (Figura 8 A). Diminuição na sinalização da Nodal está associada ao descontrole na proliferação das células trofoblásticas, levando ao

aumento da perfusão do trofoblasto no endométrio e à deficiência na síntese de proteínas específica trofoblástica (Tpbpa) (MA et al., 2001; MONSIVAIS et al., 2015). A redução da expressão da Nodal, no grupo W, não promoveu aumento na contagem dos trofoblastos, mas reduziu a área dessas células, estando possivelmente associada à redução da Tpbpa, pois outras vias de sinalização de síntese proteica e proliferação celular podem provavelmente não ter provido a demanda de proliferação do trofoblasto e com isso diminuindo sua atividade celular. Esses achados podem estar diretamente relacionados aos prejuízos encontrados quanto ao desenvolvimento fetal no grupo W, com diminuição do peso e reabsorção fetal como já verificado também em trabalhos prévios (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013).

Por outro lado, a suplementação nutricional com leucina pôde modular alguns parâmetros, como expressão reduzida da Nodal no grupo L associada ao maior número de trofoblastos para esse grupo em relação ao C. Uma vez que a Nodal reduz a proliferação e invasão dessas células no endométrio, podemos sugerir que a manutenção do receptor ALK4 e da Tpbpa, no grupo L, comparado com grupo C, assim como a mTOR aumentada, possivelmente atendeu a demanda de síntese proteica e proliferação dos trofoblastos nesse grupo L, mantendo sua atividade celular restrita à região do espongio-trofoblasto. Da mesma forma, apesar da Nodal também estar reduzida no grupo LW, a expressão da Tpbpa não estava reduzida em relação ao C, mas também não estava aumentada em relação ao W; no entanto, o grupo LW não apresentou alterações na contagem, bem como na área dessas células trofoblásticas comparadas ao grupo C. Dessa forma, podemos sugerir que no grupo com tumor suplementado – LW – a diminuição da expressão da mTOR, em relação ao grupo L, além da redução da 4EBP1 e elevação da p70S6K provavelmente foi suficiente para manter a atividade das células trofoblásticas, alteradas pela evolução tumoral, garantindo então a manutenção da Tpbpa e garantindo a manutenção do peso fetal, que seria prejudicado pela evolução tumoral, assim como os resultados já demonstrados previamente (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013) (Figuras 6 A, B).

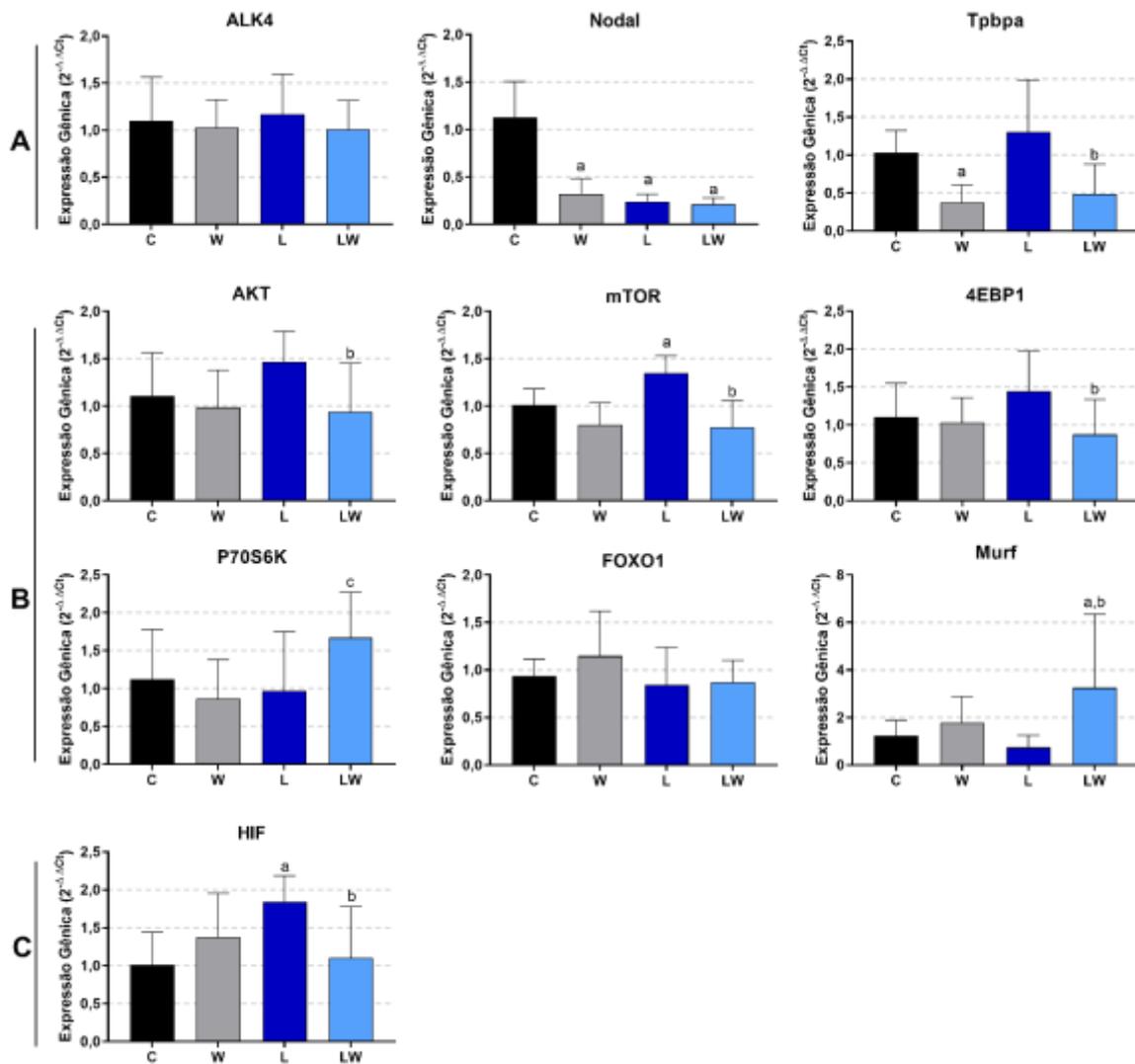


Figura 8. Expressão de genes do tecido placentários, A, relacionados à via da Nodal; B, relacionados às vias de síntese e degradação proteica. C, HIF. Dados apresentados como média e desvio padrão. Legenda: C, controle (n=7); W, prenhe portadora de tumor (n=6); L, prenhe com dieta rica em leucina (n=8); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (n=6). ^a P < 0,05 comparado ao grupo C. ^b P < 0,05 comparado ao L. ^c P < 0,05 comparado ao W.

A presença do tumor não proporcionou alteração na expressão dos genes placentários relacionados a via da mTOR nos grupos W e LW, mantendo os valores da mTOR, AKT, 4EBP1 e p70S6K semelhantes aos valores do grupo C (Figura 8 B). No entanto, a associação da dieta rica em leucina com o crescimento tumoral durante a prenhez não preveniu a diminuição da expressão da AKT, mTOR e da 4EBP1 no grupo LW em relação ao L, com exceção para p70S6K que foi aumentada no grupo LW em relação ao W (Figura 8 B). Com relação a via de degradação, verificamos que a expressão da FOXO permaneceu semelhante entre todos os grupos e houve aumento da expressão da Murf no grupo LW em relação ao grupo W (Figura 8 B). A regulação negativa da AKT libera a atividade do inibidor da mTOR e compromete o processo anabólico e ativa vias do processo catabólico (TISDALE, 2010a). Nesse processo,

MuRF1 e FOXO costumam estar reguladas positivamente (LIU et al., 2007; TISDALE, 2010a). No entanto, em nossos resultados, não houve diferença na expressão de FOXO (Figura 8B), que poderia ser translocado para o núcleo ativando a via de degradação proteica através da NFκB (LIU et al., 2007), onde geralmente está regulada positivamente na situação de evolução de neoplasia (TISDALE, 2010b). Por outro lado, embora o aumento da expressão da Murf pode estar indicando aumento da degradação de proteínas, possivelmente para o grupo LW esse processo foi direcionado para reorganização de proteínas placentárias e consequentemente manutenção do número e área das células trofoblásticas e do peso placentário, logo preservando o peso fetal, minimizando os prejuízos proporcionados pelo crescimento tumoral (Figuras 6, 7 e 8B; Tabela 4).

Fatores induzíveis por hipóxia (HIF) são responsáveis por promover alteração da transcrição de genes, que adaptarão a placenta de forma a combinar a demanda com a disponibilidade do oxigênio (BURTON; JAUNIAUX; MURRAY, 2017). Em condições de hipóxia, ocorre acúmulo de HIF que são translocados ao núcleo, onde se dimerizam com HIF-1β, atuando como fator de transcrição (BURTON; JAUNIAUX; MURRAY, 2017). Apenas o grupo L apresentou HIF aumentado em relação ao grupo C (Figura 8C).

2.5.4. A evolução tumoral alterou o perfil metabolômico de tecido placentário.

A análise do perfil metabolômico do tecido placentário foi de suma importância para que pudéssemos avaliar os efeitos deletérios da evolução tumoral sobre a placenta. Assim, nos espectros obtidos das placentas dos diferentes grupos, encontramos 49 metabolitos perfilados, conforme apresentados no Anexo 3. Nos ensaios de perfil metabolômico das placentas, foram encontrados 8 metabolitos com diferença significativa dentre o total de metabolitos perfilados para os quatro grupos experimentais C, W, L e LW (Tabela 8, Anexo 3).

A presença do tumor durante a prenhez, promoveu diminuição da concentração de glicose, glicose-6-fosfato, ascorbato, e da razão fosfocreatina/creatina, além de induzir o aumento da concentração de creatina e metilhistidina no grupo W (Figura 9 e Tabela 5). A dieta rica em leucina modulou o pantotenato, que estava diminuído no grupo L comparado ao C. Assim, na presença do tumor e suplementação nutricional, o grupo LW apresentou alteração no perfil metabolômico placentário, com diminuição também na concentração de glicose, glicose-6-fosfato e ascorbato; aumento na concentração de fosfocreatina, lisina e metilhistidina e modulação do pantotenato, quando comparado aos grupos C e L (Figura 9 e Tabela 6).

O processo da glicólise – conversão da glicose a piruvato – é a principal fonte de energia para a demanda da placenta e do feto, sendo que somente 20% da glicose capturada pela placenta é transferida para o feto (AYE et al., 2020). A transferência de glicose da circulação materna para a placenta pode ser regulada de três formas i) pela quantidade de glicose materna; ii) pelo metabolismo de glicose da placenta; iii) pela densidade de transportadores de glicose (GLUT) na membrana dos trofoblastos (BAUMANN; DEBORDE; ILLSLEY, 2002). Considerando que não houve diferença na disponibilidade de glicose materna, a diminuição da glicose no tecido placentário no grupo W pode estar relacionado com alteração no metabolismo de glicose placentário ou também pela alteração na densidade de transportadores de glicose (GLUT). Na primeira etapa da glicólise, a glicose é convertida à glicose-6-fosfato, que também exerce importante função no metabolismo da placenta, pois pode ser desviada para a via da pentose fosfato para gerar a ribose 5-fosfato, precursor de nucleotídeos (AYE et al., 2020; BURTON; JAUNIAUX; MURRAY, 2017). Podemos sugerir que a baixa concentração de glicose, glicose-6-fosfato e ascorbato, verificada nos grupos W e LW, indicaria que a glicose não foi captada pela placenta em função de uma possível diminuição da presença do transportador, ou possível alteração da característica do transportador, além do processo de glicólise estar direcionado à menor conversão a piruvato. Nesse último caso, por consequência, a glicólise estaria aumentando a conversão à lactato e, com isso, a disponibilização de ATP diminuiria, gerando menor aporte de energia à placenta. Apesar dos resultados de concentração de ATP, ADP e NAD⁺ (Anexo 3, Tabela 8) não terem apresentado diferença entre os grupos experimentais, alterações no metabolismo de energia e nas concentrações de glicose podem comprometer o funcionamento da placenta (ALBERS et al., 2018). Por outro lado, a suplementação nutricional com leucina não foi capaz de modular a diminuição de glicose, glicose-6-fosfato e ascorbato no grupo com tumor, LW (Figura 9), porém nesse grupo essas concentrações não foram diferentes do grupo L, que por sua vez não apresentou prejuízos no curso da prenhez. Assim, podemos sugerir que, embora tivéssemos alterações nas concentrações dos principais substratos relacionados ao fornecimento de energia, o grupo LW ainda manteve o peso fetal similar ao grupo C, mantendo, assim, a modulação dos efeitos adversos do crescimento tumoral sobre a placenta e fetos.

Ainda abordando os aspectos energéticos do tecido placentário, a creatina quinase retira o grupamento fosfato da fosfocreatina, transferindo-o para o ADP, e convertendo-o em ATP, assim, a creatina está envolvida na homeostase de ATP e desempenha um papel crítico no metabolismo energético placentário (ELLERY et al., 2017). Além disso, estudo realizado com

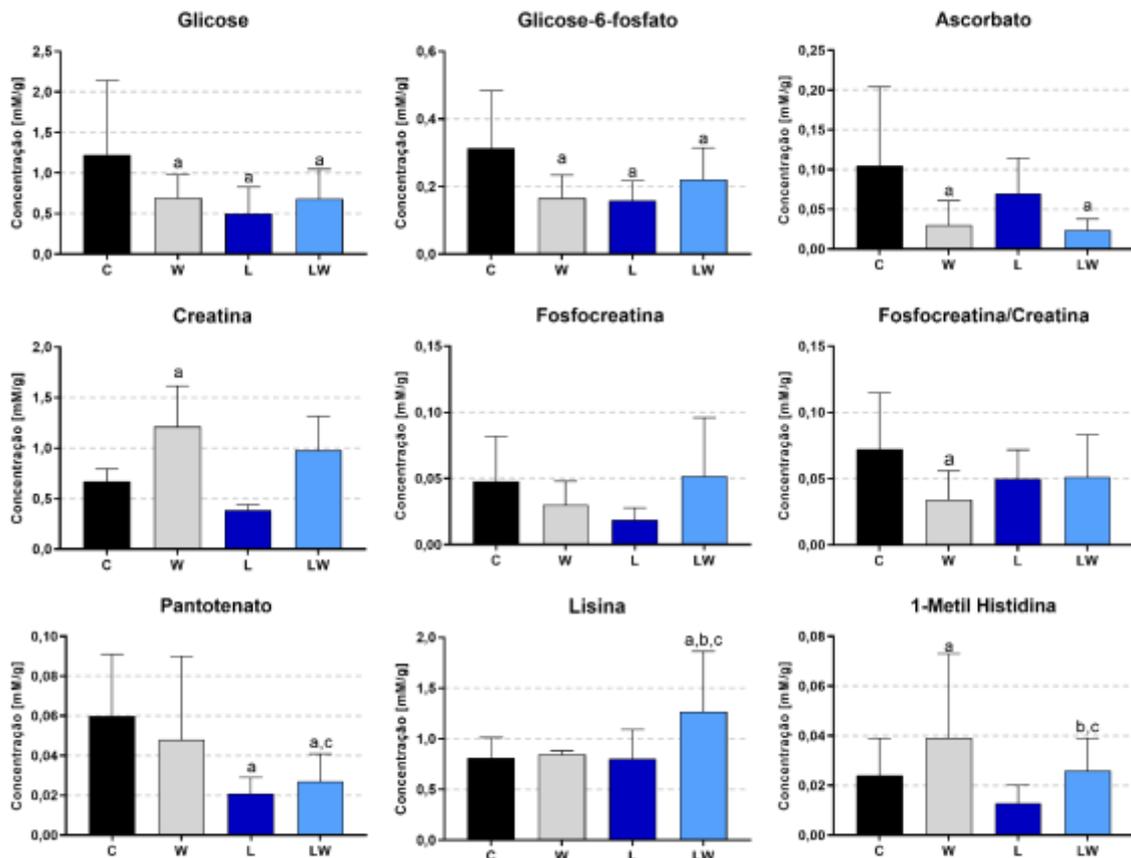


Figura 9. Metabólitos placentários no 3º terço de prenhez, com e sem implante tumoral. **Legenda:** C- fêmeas prenhes (n=11), W- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256 (n=8), L- fêmeas prenhes alimentadas com dieta rica em leucina (n=11), LW- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256 alimentadas com dieta rica em leucina (n=10). Os grupos W e LW receberam inoculação do tumor no segundo dia de prenhez. Dados apresentados em Média \pm Desvio Padrão (DP) em mM. ^a, P < 0,05 comparado ao grupo C. ^b, P < 0,05 comparado ao L. ^c P < 0,05 comparado ao W.

placentas de fetos humanos mostrou que a concentração de creatina estava aumentada nas placentas dos fetos que apresentaram restrição de crescimento intrauterino em relação a fetos que não apresentaram restrição de crescimento (ELLERY et al., 2019). Assim, o aumento de creatina placentária no grupo W sugere que essas placentas podem ter sofrido danos causados pelo crescimento tumoral, estando diretamente relacionado com o menor peso fetal e menor razão feto/placenta do grupo W (Figura 7 e 9), além da menor área das células trofoblásticas (Tabela 4), sugerindo alterações da unidade materno fetal e no curso da gestação. Por outro lado, apesar de LW não ter apresentado diferença em relação ao grupo W, também não apresentou diferença em relação ao C, assim, o aumento da fosfocreatina somente no grupo LW comparado ao grupo C, possivelmente aumentou a disponibilidade de fosfato para a conversão de ADP em ATP, já que a razão fosfocreatina/creatina no grupo LW estava semelhante ao C. Desse modo, pôde-se sugerir que a suplementação nutricional com leucina modulou a creatina e a

fosfocreatina placentária do grupo LW quando comparado ao C, favorecendo possivelmente o aporte energético as placentas desse grupo LW (Figura 9 e Tabela 5).

Por outro lado, o aumento da 1-metil-histidina placentária em função da evolução do tumor, no grupo W, sugere que pode estar associado à degradação proteica (WELJIE; JIRIK, 2011). No final da prenhez, o aumento de metilhistidina materna sugere a hidrólise de proteínas devido à adaptação do metabolismo materno para suprir a alta demanda do intenso crescimento fetal por proteínas e aminoácidos (NAPSO et al., 2018). No entanto, o aumento de 1-metil-histidina placentário devido à presença do tumor, pode sugerir que essa placenta esteja em catabolismo. Dessa forma, alterações no metabolismo de proteínas e aminoácidos placentários, pode acarretar prejuízos ao funcionamento da placenta, como já verificado previamente nas placentas de ratas portadoras de tumor de Walker (CRUZ et al., 2016). Embora também tenha havido alteração da 1-metilhistidina no grupo LW, possivelmente essa variação não estava relacionada à degradação de proteínas como verificado no grupo W. A partir dos metabólitos que apresentaram diferença entre LW e W, observou-se que o metabolismo de biotina pode estar impactado devido à alteração na concentração de lisina, assim como no metabolismo de histidina, devido à alteração na concentração de 1-metilhistidina (Figura 9).

A suplementação com leucina promoveu a diminuição do pantotenato nos dois grupos suplementados (L e LW) quando comparados ao C (Figura 9). O pantotenato compõe a proteína carreadora CoA e acila na síntese de ácidos graxos em muitas vias metabólicas (CHEN; SONG; SONG, 1996). Assim, sua redução nos dois grupos, e especialmente no grupo LW, possivelmente estava associado à adaptação materna para mobilização das reservas de ácidos graxos. No entanto, estudo realizado em ratas prenhes mostrou que a deficiência de pantotenato na circulação materna, promoveu menor produção de ácido pantotênico pela placenta. Assim, a diminuição do pantotenato levou a restrição de crescimento dos fetos e maior número de reabsorção (CHEN; SONG; SONG, 1996). Contrariamente, em nossos resultados não foram encontradas variações para os pesos dos fetos e das placentas dos grupos L e LW, mostrando assim que foram similares ao desenvolvimento placentário e fetal do grupo controle (Figura 9 e Tabela 6).

Tabela 5. Vias metabólicas placentárias impactadas a partir dos metabólitos placentários no 3º terço da prenhez para os grupos W e C.

Pathway	W vs C			
	Metabólitos	Match status	Regulação	P-value
Metabolismo de ascorbato e aldarato	Ascorbato	1/10	↓	0,03

Metabolismo de histidina	1-Metilhistidina	1/16	↑	0,04
--------------------------	------------------	------	---	------

Legenda: C- fêmeas prenhes; W- fêmeas prenhes portadoras de tumor de Walker 256. OS animais do grupo W receberam inoculação do tumor no segundo dia de prenhez ↑: upregulation; ↓: downregulation

Tabela 6. Vias metabólicas placentárias impactadas a partir dos metabólitos placentários no 3º terço da prenhez para os grupos LW e W.

Pathway	Metabólitos	LW vs W		
		Match status	Regulação	P-value
Metabolismo de biotina	Lisina	1/ 10	↑	0,03
Metabolismo de histidina	1-Metilhistidina	1/16	↓	0,05

Legenda: W- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256, LW- fêmeas prenhes portadoras do tumor de Walker 256 alimentadas com dieta rica em leucina. OS animais dos grupos W e LW receberam inoculação do tumor no segundo dia de prenhez. ↑: upregulation, ↓: downregulation

2.6. Conclusão

O desenvolvimento do tumor durante a prenhez promoveu alterações no metabolismo materno que possivelmente estão relacionados às conseqüentes alterações morfométricas maternas, como menor peso corpóreo, e às alterações no metabolismo placentário. A dieta rica em leucina não modulou os metabólitos de soro materno, apesar de ter preservado na perda de peso corpóreo materno e ter diminuído o peso do tumor. Em função da associação entre câncer e gravidez, nas placentas, foi observado diminuição da área das placentas e dos trofoblastos e diminuição da expressão gênica da Tpbpa, mostrando que a presença do tumor promoveu danos à atividade placentária e restrição de crescimento fetal. A suplementação com leucina preservou as áreas das placentas e o peso dos fetos, bem como modulou a creatina e o pantotenato e aumentou a concentração de lisina no tecido placentário.

3. CAPÍTULO 2: Elaboração de artigo intitulado: “Na análise do curso temporal da gestação, a dieta rica em leucina modulou o perfil metabólico placentário e fetal de ratas Wistar grávidas portadoras do tumor de Walker-256”

Esse artigo será submetido no periódico *Cancers, Special Issue Cancer and Pregnancy*, fator de impacto 6.126

3.1. Resumo

Introdução: O câncer é uma das principais causas de morte prematuras no mundo e quando a paciente é diagnosticada durante a gestação, as opções de tratamento são ainda mais delicadas, pois requer tratamento que cure a mãe e proteja o feto. A delicada coexistência de gravidez e câncer pode trazer consequências ao desenvolvimento do feto, como restrição de crescimento intrauterino (RCIU), parto prematuro ou morte prematura devido a danos na placenta causados pela presença de fatores tumorais. No entanto, estudos com leucina mostraram que esse aminoácido pode modular os efeitos deletérios do crescimento tumoral causados na placenta. Alterações no funcionamento da placenta são determinantes para o desenvolvimento do feto. Esse trabalho teve como objetivo avaliar em *time-course* como a dieta rica em leucina modulou o perfil metabólico placentário e fetal em ratas Wistar prenhes portadoras de tumor de Walker 256. Metodologia: Ratas Wistar prenhes distribuídas em quatro grupos experimentais (n=10 por grupo): Controle (C) e Tumor (W), alimentados com dieta controle; Leucina (L) e Tumor Leucina (LW), alimentados com dieta rica em leucina (3% L-leucina). Ambos os grupos W e LW receberam implante tumoral no 2º dia de prenhez. Para obtenção dos tecidos, foram feitas eutanásias em 4 momentos diferentes da prenhez, no 12º, 16º, 19º e 21º dias de prenhez. Resultados: Alguns parâmetros morfométricos materno do grupo W estavam reduzidos ao final da prenhez e a dieta rica em leucina foi capaz de manter os parâmetros de LW semelhantes ao C. O padrão de crescimento dos fetos e da placenta de W estavam alterados em relação ao C, sendo que ao final da prenhez, estavam menores que C. Apesar do padrão de crescimento de LW também estar alterado, os fetos e as placentas de LW estavam maiores que os de W com 21 dias de prenhez. Em relação as análises do perfil metabólico da placenta e dos fetos, foram identificadas alterações principalmente nas vias metabólicas relacionadas à síntese e degradação e ao metabolismo energético. O desenvolvimento do tumor durante a prenhez foi responsável por trazer prejuízo ao organismo materno, placenta e feto, principalmente ao final da prenhez e a dieta rica em leucina foi capaz de modular alguns desses prejuízos induzidos pela evolução tumoral.

3.2. Introdução

A delicada coexistência de câncer durante a gravidez impõe desafios éticos e profissionais à paciente e toda a equipe médica, pois além dos cuidados maternos, a presença do tumor pode trazer consequências ao desenvolvimento do feto, como a restrição de crescimento intrauterino (RCIU), parto prematuro ou morte perinatal (ZAGOURI et al., 2016). A gestação em si envolve complexa sequência de alterações fisiológicas para adaptar o organismo materno à gestação (TAL; TAYLOR, 2000). No entanto, devido à presença do tumor, mudanças no perfil sérico materno podem acarretar prejuízos na função da placenta e no desenvolvimento do feto (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013)

Está bem estabelecido que o crescimento tumoral acarreta mudanças no perfil sérico dos pacientes (BI; HENRY, 2017; GU et al., 2015; VISSERS et al., 2005). Por exemplo, as células tumorais precisam de grandes quantidades de glutamina, glicina, ácido aspártico e serina para manter a intensa proliferação celular (HUANG; PLASS; GERHAUSER, 2011). Isso pode levar a diminuição desses aminoácidos disponíveis na circulação materna (VIANA et al., 2016). Além da intensa utilização dos aminoácidos para o seu próprio desenvolvimento, as células tumorais podem liberar citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que são responsáveis por alterar o equilíbrio entre as vias de apoptose e regeneração celular (ARGILÉS et al., 2014).

Estudo realizado com camundongas, prenhes portadoras de tumor MAC16, mostrou que fetos apresentaram restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e aumento de reabsorção fetal, devido aos danos na placenta causados pela presença de fatores tumorais, como citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IFN- γ e TNF- α (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013). Além disso, o crescimento tumoral durante a gestação prejudicou o transporte de nutrientes pela placenta, assim como as vias de síntese de proteínas placentárias, devido à regulação negativa das vias de sinalização da MAPK/ERK e PI3K/Akt/mTOR (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; ROOS; POWELL; JANSSON, 2009; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Os mesmos estudos também mostraram que ratas Wistar prenhes alimentadas com dieta rica em leucina obtiveram melhora na ativação da sinalização da via da mTOR no tecido placentário e aumento na síntese de proteínas placentárias (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; CRUZ et al., 2016; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013).

Leucina é um aminoácido essencial de cadeia ramificada (BCAA – Branched-Chain Amino Acids), que desempenha importante função na sinalização de síntese de proteínas no músculo esquelético e também nas células placentárias (CRUZ et al., 2016; LI et al., 2011;

VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013). Logo, a dieta rica em leucina foi capaz de melhorar o balanço entre síntese e degradação de proteínas placentárias; além de induzir o aumento de síntese de proteínas da musculatura esquelética dos fetos, recuperando o peso do feto e das mães portadoras de tumor (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; CRUZ et al., 2016; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido bastante utilizada para determinar o estado metabólico de um organismo. O estudo de pequenas moléculas (<1500 Da) em sistemas vivos, fornece informações com alto potencial para descrever com precisão o estado fisiológico do organismo (SHAH et al., 2006). As imagens produzidas com RMN são resultados da interação entre núcleos atômicos dos compostos químicos que entram em ressonância diferente da água, gerando uma representação química em imagens a qual permite a identificação desses compostos (MARKLEY et al., 2017; SHAH et al., 2006). Assim, devido às alterações promovidas pelo tumor em metabólitos energéticos (como glicose, lactato, succinato) e em aminoácidos (como BCAAs, glutamina, creatina, alanina), a metabolômica tem sido utilizada em estudos sobre câncer para traçar os perfis dos metabólitos e identificar possíveis biomarcadores.

3.3. Objetivo

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar, em time-course, como a dieta rica em leucina modulou o perfil metabólico placentário e como essas alterações refletiram sobre o perfil metabólico fetal.

3.4. Materiais e métodos

Animais e Procedimentos experimentais

Ratas Wistar adultas (90 dias de idade) foram obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da UNICAMP (CEMIB-UNICAMP) e mantidas em nossas condições de Biotério, com dieta e a água ad libitum e condições de luz e temperatura controladas. As ratas foram submetidas à cruza com machos adultos, com mesma linhagem e idade. Foi seguida a proporção de quatro fêmeas para um macho segundo método de harém durante 4 dias subsequentes (BAKER, 1991). O dia zero da prenhez foi considerado a partir da presença de espermatozoides por análise de esfregaço vaginal ou plug vaginal.

O preparo das dietas foi realizado no nosso laboratório, seguindo os padrões estabelecidos pelo Instituto Americano de Nutrição para dieta de roedores (AIN-93) (REEVES;

NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta controle é composta de 18% proteína e a dieta rica em leucina, por 18% de proteína com adição de 3% L-leucina. Componentes das dietas: amido de milho (~39,2%), caseína (20%)(Contém 85% de proteína), dextrina (13,2%), açúcar (~9,5%), fibra de celulose (5%), mistura de sais (1%), cisteína (0,3%), colina (0,3%), gordura (7%) e leucina (controle: 1,6%; rica em leucina: +3% totalizando 4,6%) (Gentilmente doado pela empresa Ajinomoto Interamericana Ind. & Com. Ltda). As dietas são compostas de quantidades similares de nitrogênio (aproximadamente 13,2 mg N₂/100 g dieta). O ajuste calórico da dieta leucina foi feito com redução da quantidade equivalente de carboidrato, correspondendo assim à dieta isocalórica. Os demais ingredientes da dieta leucina equivalem à mesma quantidade de gordura, fibra, mistura de sais e vitaminas, colina e cisteína, quando comparada com a dieta controle.

As fêmeas foram randomizadas aleatoriamente em 4 diferentes grupos experimentais, sendo dois grupos receberam dieta controle e dois receberam dieta rica em leucina. As ratas prenhes foram distribuídas nos dois seguintes grupos:

Controle (C): alimentadas com dieta controle; (com 12 dias n = 8; com 16 dias n = 6, com 19 dias n = 8; com 21 dias n = 6)

Walker (W): alimentadas com dieta controle e implantadas com células tumorais; (com 12 dias n = 10; com 16 dias n = 7, com 19 dias n = 8; com 21 dias n = 6)

Leucina (L): alimentadas com dieta rica em leucina; (com 12 dias n = 6; com 16 dias n = 6, com 19 dias n = 8; com 21 dias n = 5)

Leucina Walker (LW): alimentadas com dieta rica em leucina e implantadas com células tumorais (com 12 dias n = 10; com 16 dias n = 7, com 19 dias n = 5; com 21 dias n = 5).

As ratas foram mantidas em gaiolas, com 2 animais cada, durante todo o período experimental, e aferido o peso corpóreo 3 vezes por semana. Para todos os grupos descritos acima, as ratas foram eutanasiadas em 4 momentos diferentes de prenhez: 12º, 16º, 19º e 21º dias, a fim de obter-se as análises em time-course. Foram coletados soro materno (após centrifugação do sangue materno coletado por decapitação), tecidos placentários (placenta com a decídua materna) e fetos para análises bioquímicas e moleculares. Também foram coletados baço, músculo esquerdo e tumor para análises morfológicas.

O desenho experimental com uso animal deste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp sob número 5316-1/2019 (Anexo 6.2)

Implante tumoral

Conforme descrito em Materiais e métodos do Capítulo 1, o implante de células tumorais nos grupos W e LW foi feito em inoculação única de suspensão de células do tumor de Walker 256, com de 5 milhões de células neoplásicas viáveis, em aproximadamente 0,3mL de inóculo (soro fisiológico), implantado no subcutâneo da região do flanco direito (GOMES-MARCONDES et al., 1998). Os animais injetados com células de tumor de Walker 256 têm sobrevivência de cerca de 21 dias, que coincide com o período de prenhez. Assim, para que as fêmeas conseguissem chegar ao final da prenhez, as células tumorais foram implantadas no 2º dia de prenhez. Além disso, aos 10 dias de implante tumoral, o tumor torna-se palpável, com massa sólida de aproximadamente 1,00 cm³, sendo que nesse período já libera os fatores tumorais. Esse momento corresponde ao primeiro período de eutanásia das fêmeas, no 12º dia de prenhez.

Metabolômica

A análise de metabolômica foi realizada com técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os tecidos placentário e fetal foram pesados em cerca de 0,3g e homogeneizados em 250uL de solução contendo metanol e clorofórmio, na proporção de 2:1, respectivamente, conforme protocolo proposto por J. E. Le Belle (LE BELLE et al., 2002). Após homogeneização, acrescentou-se às amostras 250uL de solução de clorofórmio com água Milli-Q na proporção de 1:1. Em seguida, foram centrifugadas à 3700 rpm por 20 minutos, para separação em duas fases. A fase do metanol contém os metabólitos polares e a fase do clorofórmio, os metabólitos apolares. Ambas as fases foram coletadas separadamente, armazenadas em eppendorfs e liofilizadas na speedvac (a Eppendorf Concentration). Após liofilizadas, a porção contendo os metabólitos polares foi ressuspensa em 600uL de água deuterada (D₂O), tampão fosfato (10 X) com 2,8 x 10⁻¹ mol/L de NaH₂PO₄ e 7,2 x 10⁻¹ mol/L de Na₂HPO₄. As amostras atingiram valores de pH próximos a 7,40-7,45, e 50mM de TSP (ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetradeuteropropiônico).

Para a identificação e quantificação dos metabólitos polares, foi utilizado o software Chenomx RMN (Suite 7.6 Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada). que utiliza a metodologia de “targeted profiling” (Chenomx NMR Suite, Canada; KnowItAll, Bio-Rad, EUA) para a análise dos espectros de RMN, os quais são decompostos em concentrações dos diversos metabólitos a partir de biblioteca de dados espectrais dos metabólitos isolados (CHONG; YAMAMOTO, 2019; PANG et al., 2020).

A identificação e quantificação dos metabólitos para os ensaios de perfil metabolômico de placenta foram realizadas pelo software Chenomx (Suite 7.6 Chenomx Inc., Edmonton, AB, Canada).

Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como médias e desvio padrão. Os resultados morfométricos foram normalizados dividindo-se o peso do tecido pelo peso corpóreo materno no dia 0 de prenhez. O delta do peso corpóreo materno foi calculado como $\text{delta} = \text{peso corpóreo materno no dia da eutanásia(g)} - [\text{peso corpóreo materno no dia 0 de prenhez(g)} + \text{peso dos fetos} + \text{peso das placentas} + \text{peso do tumor (g)}]$. As análises de comparação morfométricas entre os grupos foram realizadas utilizando-se ANOVA two-way seguido de teste de comparação de múltiplos grupos utilizando-se o teste de Fisher LSD, para probabilidade igual e inferior a 5% Gad & Weil (1994), utilizando-se software Prism 7.0 (Version 7.00, março 31,2016).

Para análise de discrepâncias entre os metabólitos identificados e suas concentrações, foi utilizada a plataforma online MetaboAnalyst 4.0 (a statistical, functional, and integrative analysis of metabolomic data) (Chong and Xia 2018).

3.5. Resultados e Discussão

3.5.1. A suplementação nutricional com leucina minimizou as alterações dos parâmetros morfométricos maternos, induzidas pela evolução do tumor.

Durante a gestação, as adaptações fisiológicas materna garantem o suporte nutricional ao feto (BURTON; JAUNIAUX, 2015). Essas adaptações são mediadas pela placenta que promove alterações da composição corpórea materna, além do milieu hormonal especificamente direcionado a essas adaptações. No início da gestação, a musculatura esquelética e tecido adiposo têm maior sensibilidade à insulina que promove maior estoque de glicogênio e reserva de lipídio nos tecidos, respectivamente. Ao final da gestação, a musculatura esquelética e tecido adiposo apresentam resistência à insulina, com isso menor captação de glicose pelos tecidos periféricos e maior lipólise para liberação de lipídio. Assim, os nutrientes ficam disponíveis ao feto em intenso crescimento (NAPSO et al., 2018). Como observado ao longo de toda a prenhez, houve aumento no peso materno devido tanto ao crescimento dos fetos, quanto ao próprio ganho de peso materno (Figura 10). O aumento de peso materno e do delta do peso corpóreo materno, no grupo C, indicam que o ganho de peso materno ocorreu de forma crescente até o final da prenhez (Figura 11 B). No entanto, não houve diferença no ganho de peso da carcaça e do músculo gastrocnêmio dos 12 aos 19 dias de prenhez, porém ocorreu

diminuição significativa no peso da carcaça e do gastrocnêmio aos 21 dias no grupo C, mostrando que o suprimento energético para os tecidos maternos estavam diminuídos no final da prenhez em relação ao início do período gestacional, indicando, assim, que os nutrientes ficaram direcionados aos fetos (Figura 11 A e C). No entanto, o aumento do delta de peso corpóreo mostrou que o organismo materno ainda conseguiu garantir reserva energética necessária, que favorece a disponibilidade de nutrientes ao feto e, posteriormente para a amamentação (Figura 11 B).

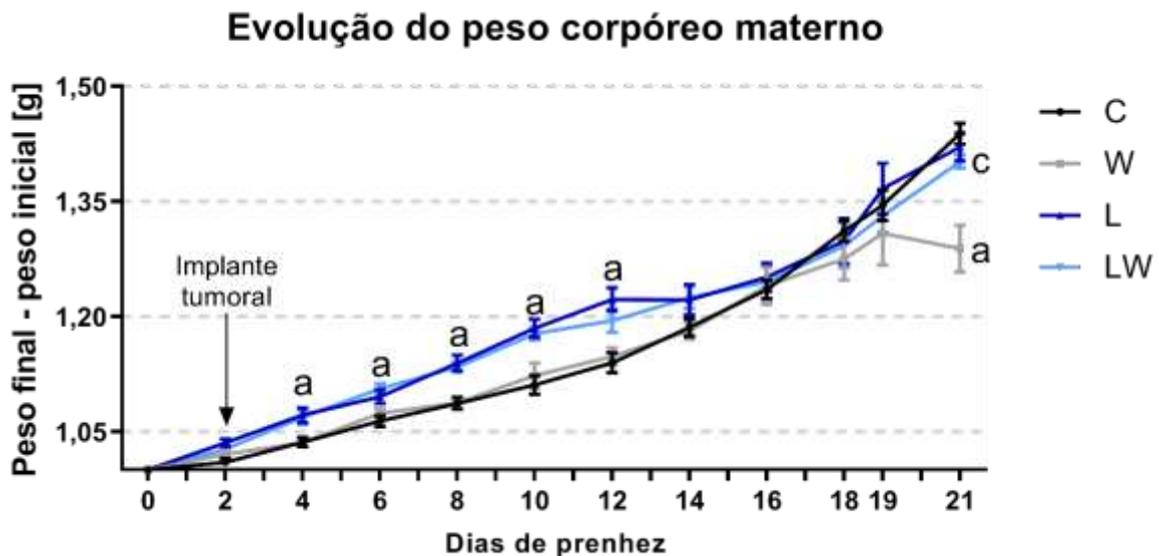


Figura 10. Evolução do peso corpóreo materno dos diferentes grupos portadores ou não de tumor e submetidos ou não a dieta rica em leucina. Resultados expressos como média normalizada \pm desvio padrão (DP). Legenda: C, controle (12 dias de prenhez, n= 21; 16 dias de prenhez, n= 17; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=6); W, prenhe portadora de tumor (12 dias de prenhez, n=30; 16 dias de prenhez, n=19; 19 dias de prenhez, n=10; 21 dias de prenhez, n=6); L, prenhe com dieta rica em leucina (12 dias de prenhez, n=18; 16 dias de prenhez, n=14; 19 dias de prenhez, n=9; 21 dias de prenhez, n=11); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (12 dias de prenhez, n=23; 16 dias de prenhez, n=15; 19 dias de prenhez, n=5; 21 dias de prenhez, n=5); ^a: $p < 0,05$ quando comparados com o grupo C. ^c: $p < 0,05$ quando comparado com o grupo W.

Contudo, o crescimento tumoral promove alterações metabólicas caracterizadas pela perda involuntária do peso, principalmente pela perda da massa muscular esquelética, que leva à debilidade da qualidade de vida do paciente (ARGILÉS; LÓPEZ-SORIANO; BUSQUETS, 2013; EVANS et al., 2008). Assim, condizente com os dados da literatura, no presente trabalho, a presença do tumor induziu a redução significativa de peso corpóreo materno, no final da prenhez do grupo W quando comparado com o grupo C (Figura 10). O tecido muscular esquelético é um dos mais espoliados durante a evolução do tumor (ARGILÉS et al., 2014). Corroborando esse fato, a evolução do peso da carcaça, do músculo gastrocnêmio e do delta do peso corpóreo no grupo W apresentaram-se menores em relação ao grupo C desde o início da prenhez (Figura 11 A, B e C). Porém, aos 21 dias de prenhez, não houve diferença entre a perda

do músculo gastrocnêmio entre os grupos experimentais – C, W, L e LW. A presença do tumor também promoveu a esplenomegalia no grupo W, ao longo de toda prenhez, indicando sobrecarga na função do baço, e consequentemente na ativação do sistema imunológico, desde o início da prenhez, nessas fêmeas portadoras de tumor (Figura 11 D).

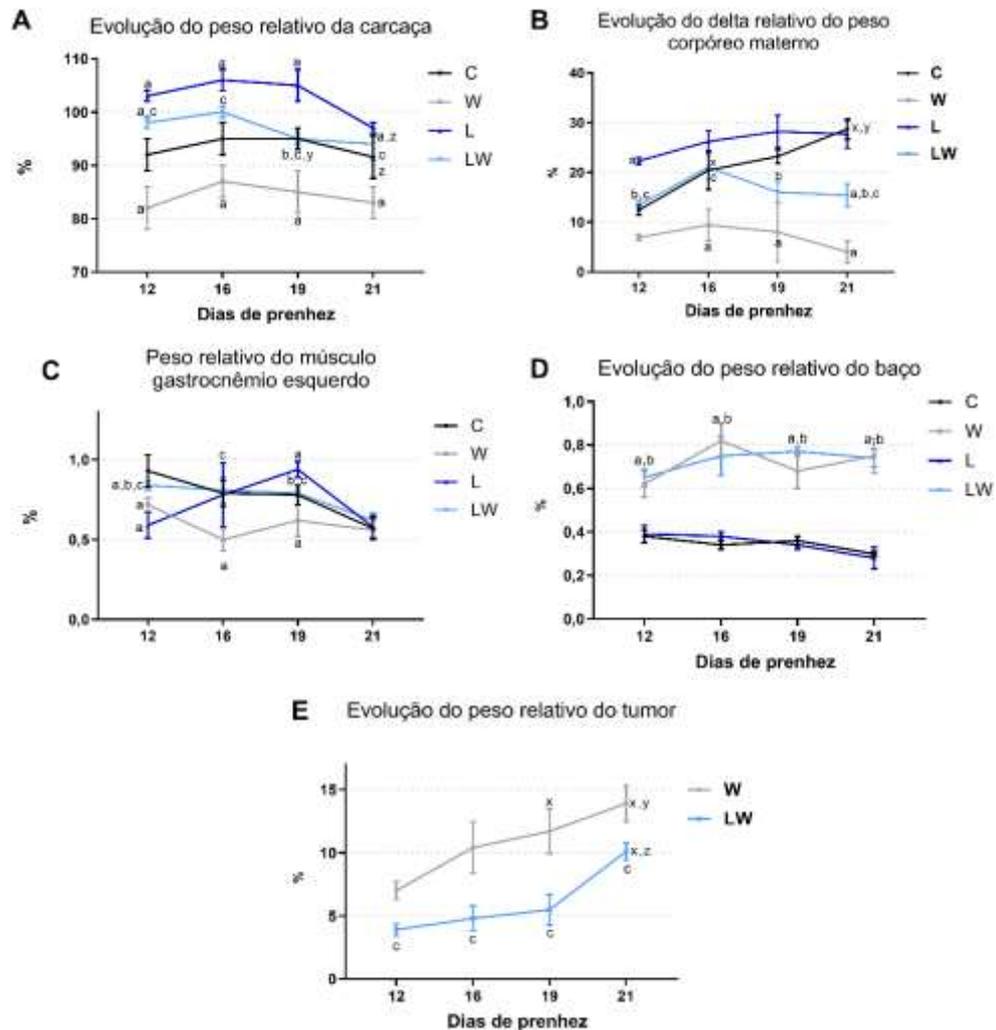


Figura 11. Evolução dos parâmetros morfométricos maternos em *time-course*, nos diferentes grupos experimentais, suplementados ou não com dieta rica em leucina. **A**, Evolução do peso relativo da carcaça (g). **B**, Evolução do peso relativo de delta corpóreo materno (g). **C**, Evolução do peso relativo do músculo gastrocnêmio; **D**, Evolução do peso relativo do baço (g). **D**, Evolução do peso relativo do tumor (g). Resultados expressos como média relativa \pm desvio padrão. **Legenda:** C, controle (12 dias de prenhez, n= 8; 16 dias de prenhez, n= 5; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=10); W, prenhe portadora de tumor (12 dias de prenhez, n= 12; 16 dias de prenhez, n= 7; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=8); L, prenhe com dieta rica em leucina (12 dias de prenhez, n= 6; 16 dias de prenhez, n= 6; 19 dias de prenhez, n= 9; 21 dias de prenhez, n=11); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina(12 dias de prenhez, n= 11; 16 dias de prenhez, n= 7; 19 dias de prenhez, n= 5; 21 dias de prenhez, n=7). ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W; ^x: P < 0,05 comparado com 12 dia de prenhez para o mesmo grupo; ^y: P < 0,05 comparado com 16 dias de prenhez para o mesmo grupo; ^z: P < 0,05 comparado com 19 dias de prenhez para o mesmo grupo.

Leucina é o aminoácido essencial de cadeia ramificada (BCAA) com maior efeito sobre a sinalização celular de síntese de proteínas e regulador do balanço energético, em relação aos

outros dois BCAAs (valina e isoleucina) (LI et al., 2011). Para uma gestação dentro dos parâmetros normais, observamos que, nesse modelo com ratas, a dieta rica em leucina não alterou o parâmetro de evolução da prenhez. Entre os dias 19 e 21, houve queda do peso da carcaça em L, comparado ao C, indicando a adaptação materna à gestação com resistência periférica à insulina, aumentando a disponibilidade de glicose circulante, e maior mobilização do tecido adiposo no final da gestação para direcionar maior provimento desses nutrientes aos fetos. Já o delta de peso corpóreo de L, apresentou-se aumentado aos 12 dias e manteve-se praticamente constante ao longo da prenhez, não apresentando diferença em relação a C. Apesar do peso do gastrocnêmio de L ser menor que C aos 12 dias de prenhez, a partir do 16º dia passou a apresentar peso semelhante ao C (Figura 11 A, B e C). Em relação à evolução do peso da carcaça, a dieta rica em leucina também manteve o ganho de peso corpóreo do grupo L, aumentando em comparação ao C ao longo de toda a prenhez. Por outro lado, quando a gravidez está associada à evolução do câncer, observamos efeitos deletérios induzidos pelo tumor, sendo que alguns parâmetros foram modulados pela suplementação nutricional com leucina. Assim, confirmando os nossos achados, estudos realizados em ratas Wistar prenhes portadoras de tumor Walker 256 mostraram que a dieta rica em leucina foi capaz de estimular a via da mTOR, preservar a síntese proteica da musculatura esquelética e evitar a perda de peso corpóreo materno com tumor e dos seus respectivos fetos (CRUZ et al., 2016; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). No presente trabalho, observamos que o peso corpóreo do grupo alimentado com dieta rica em leucina (LW) estava aumentado entre os dias 4 e 12 de prenhez; sendo que a partir do 12º dia, o grupo LW manteve-se com o peso corpóreo semelhante ao peso corpóreo do grupo C. Assim, a leucina foi capaz de evitar a perda de peso corpóreo do grupo LW, mostrando melhor parâmetro em relação ao grupo W (Figura 10). Mesmo na presença do crescimento do tumor, a dieta rica em leucina preservou a evolução do peso da carcaça e do peso do músculo gastrocnêmio do grupo LW, que estavam aumentados aos 12 dias de prenhez e mantiveram-se semelhantes ao C, entre os 16º até 21º dias. (Figura 11 A e C). No entanto, a dieta rica em leucina preservou a evolução do delta do peso corpóreo materno apenas até 16 dias de prenhez, que estava semelhante ao C. Após esse período, o delta do peso corpóreo em LW reduziu em comparação com C. Contudo, o delta de peso corpóreo no grupo LW, com 21 dias, estava maior que o delta de peso corpóreo de W com 21 dias (Figura 11 B).

A redução de peso corpóreo materno do grupo W está associada à espoliação muscular esquelética induzida pelo crescimento tumoral. Os resultados do grupo LW mostraram que a leucina foi capaz de preservar a musculatura esquelética materna da espoliação. Porém, os pesos

dos baços foram aumentados nos grupos W e LW, indicando que houve sobrecarga nesse órgão desde o 12º dia de prenhez e que a dieta rica em leucina não foi capaz de minimizar essa sobrecarga ao sistema imunológico.

Apesar da leucina atuar como molécula sinalizadora celular de síntese proteica e o tumor estar em constante divisão celular, a leucina não aumentou o peso do tumor do grupo LW. A evolução do peso do tumor aumentou, de forma crescente e exponencial, significativamente entre os dias 19 e 21 para ambos os grupos, W e LW. No entanto, o peso do tumor do grupo LW manteve-se menor que o tumor de W ao longo de toda prenhez. Assim, a dieta rica em leucina foi capaz de modular negativamente o crescimento celular no tumor e com isso reduzir a evolução do peso do tumor no grupo LW em comparação com W (Figura 11 E).

3.5.2. A suplementação nutricional com leucina minimizou as alterações dos parâmetros morfométricos das placentas e do desenvolvimento fetal alterados devido aos efeitos do tumor

Os resultados de morfologia das placentas analisadas nos diferentes momentos da prenhez no grupo C, mostraram que a área e o peso placentário aumentaram até 19º dia; e entre 19 e 21 dias, mantiveram-se constantes (Figuras 11 A e B). O grupo W teve aumento do peso das placentas até 19 dias de prenhez, semelhante ao grupo C. No entanto, o peso placentário no grupo W com 21 dias estava menor que as placentas do grupo C do mesmo período (Figura 13 B). A placenta possui característica de crescimento mais acelerado no início do desenvolvimento da gestação até estabilizar-se na metade para o final do desenvolvimento fetal (TAL; TAYLOR, 2000). No grupo W, a área das placentas aumentou até o 21º dia de prenhez. No entanto, ao longo de toda prenhez, o tumor promoveu redução da área das placentas (Figura 13 A). Além disso, as placentas do grupo W apresentaram coloração mais clara (parâmetro qualitativo) em relação do grupo C (Figura 12). Essa característica pode ser indicativa de necrose, porém, mais análises precisam ser feitas para maiores elucidações. O crescimento tumoral durante a gestação pode promover deficiências no desenvolvimento da placenta que levam à prejuízos ao desenvolvimento fetal (OLIVEIRA et al., 2021; TOLEDO; VENTRUCCI; GOMES-MARCONDES, 2011; TOLEDO; VENTRUCCI; GOMES MARCONDES, 2006). A habilidade da placenta em manter a disponibilidade de nutrientes para os fetos é determinada por vários fatores, entre eles, a área de células do sincitiotrofoblasto disponível para as trocas materno/fetal (DESFORGES; SIBLEY, 2010). Assim, a presença do tumor alterou a área e o peso das placentas do grupo W, possivelmente comprometendo a disponibilidade de nutrientes para os fetos, prejudicando o desenvolvimento fetal.

Dia	Fetos	C	W	L	LW
12		 Peso da Placenta (g) 0,12 Tumor (g) - Número de fetos 11 Peso do feto (g) 0,08 Área da placenta (cm ²) 0,81	 Peso da Placenta (g) 0,15 Tumor (g) 17,98 Número de fetos 10 Peso do feto (g) 0,10 Área da placenta (cm ²) 0,53	 Peso da Placenta (g) 0,11 Tumor (g) - Número de fetos 11 Peso do feto (g) 0,10 Área da placenta (cm ²) 0,85	 Peso da Placenta (g) 0,09 Tumor (g) 13,02 Número de fetos 11 Peso do feto (g) 0,10 Área da placenta (cm ²) 0,42
16		 Peso da Placenta (g) 0,35 Tumor (g) - Número de fetos 12 Peso do feto (g) 0,98 Área da placenta (cm ²) 1,18	 Peso da Placenta (g) 0,32 Tumor (g) 27,01 Número de fetos 9 Peso do feto (g) 0,81 Área da placenta (cm ²) 0,91	 Peso da Placenta (g) 0,26 Tumor (g) - Número de fetos 10 Peso do feto (g) 0,42 Área da placenta (cm ²) 1,31	 Peso da Placenta (g) 0,32 Tumor (g) 12,46 Número de fetos 11 Peso do feto (g) 0,47 Área da placenta (cm ²) 1,03
19		 Peso da Placenta (g) 0,47 Tumor (g) - Número de fetos 10 Peso do feto (g) 2,14 Área da placenta (cm ²) 1,50	 Peso da Placenta (g) 0,5 Tumor (g) 28,83 Número de fetos 11 Peso do feto (g) 2,56 Área da placenta (cm ²) 1,37	 Peso da Placenta (g) 0,63 Tumor (g) - Número de fetos 10 Peso do feto (g) 2,53 Área da placenta (cm ²) 1,46	 Peso da Placenta (g) 0,43 Tumor (g) 15,18 Número de fetos 11 Peso do feto (g) 2,46 Área da placenta (cm ²) 1,32
21		 Peso da Placenta (g) 0,54 Tumor (g) - Número de fetos 12 Peso do feto (g) 3,97 Área da placenta (cm ²) 1,52	 Peso da Placenta (g) 0,55 Tumor (g) 24,14 Número de fetos 10 Peso do feto (g) 3,85 Área da placenta (cm ²) 1,44	 Peso da Placenta (g) 0,49 Tumor (g) - Número de fetos 11 Peso do feto (g) 4,40 Área da placenta (cm ²) 1,46	 Peso da Placenta (g) 0,55 Tumor (g) 23,4 Número de fetos 11 Peso do feto (g) 3,17 Área da placenta (cm ²) 1,50

Figura 12. Imagens representativas das placentas (face materna) de cada um dos grupos e imagem dos fetos para cada um dos períodos de prenhez. As barras de escala correspondem a 1 cm. Os dados numéricos são parâmetros dos pesos fetais ou placentários referentes à placenta da imagem mostrada, e a dados de peso do tumor da rata correspondente. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em lucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

O peso fetal aumentou, de forma crescente e constante, ao longo de toda a prenhez no grupo C. No grupo W, o peso fetal aumentou significativamente somente a partir de 16º dia, mostrando, assim, padrão de crescimento diferente do grupo C. Além disso, com 19 e 21 dias, os pesos dos fetos do grupo W foram menores que os fetos do grupo C (Figura 14 A). Quando a placenta está estabelecida, as velocidades de crescimento da placenta e do feto são previsíveis (HAYWARD et al., 2016). Assim, a razão entre o peso do feto e o peso da placenta (F/P) é comumente usada como critério para avaliar o crescimento fetal (HAYWARD et al., 2016; MOLTENI, 1984). A razão F/P do grupo C aumentou do 12º até 19º dias de prenhez e manteve-se constante do 19º para 21º dias. Como esperado, o tumor durante a prenhez alterou o padrão de evolução da razão F/P do grupo W, não havendo diferenças dessa razão entre 12 e 16 dias, aumentando nos períodos finais da prenhez, de 19 até 21 dias. Além disso, a razão F/P do grupo W foi menor em 19 dias quando comparada ao grupo C, no mesmo período. Uma vez que o crescimento da placenta não esteja dentro do padrão esperado, sugere-se que possivelmente houve comprometimento da transferência de nutrientes para o feto e, conseqüentemente, limitando o crescimento fetal (Figura 14 B). O peso do bebê ao nascer é um fator determinante na expectativa de vida da criança (SFERRUZZI-PERRI; CAMM, 2016). Quando o feto não atinge seu potencial de crescimento, aumenta o risco de mortalidade perinatal e de complicações à saúde futura da criança como obesidade, diabetes, bem como doenças cardiovasculares, endócrinas e distúrbios no desenvolvimento neural (BURTON; JAUNIAUX, 2018; RANZIL et al., 2019). Acredita-se que a insuficiência placentária seja determinante na restrição de crescimento fetal (BURTON; JAUNIAUX, 2018; SFERRUZZI-PERRI; CAMM, 2016).

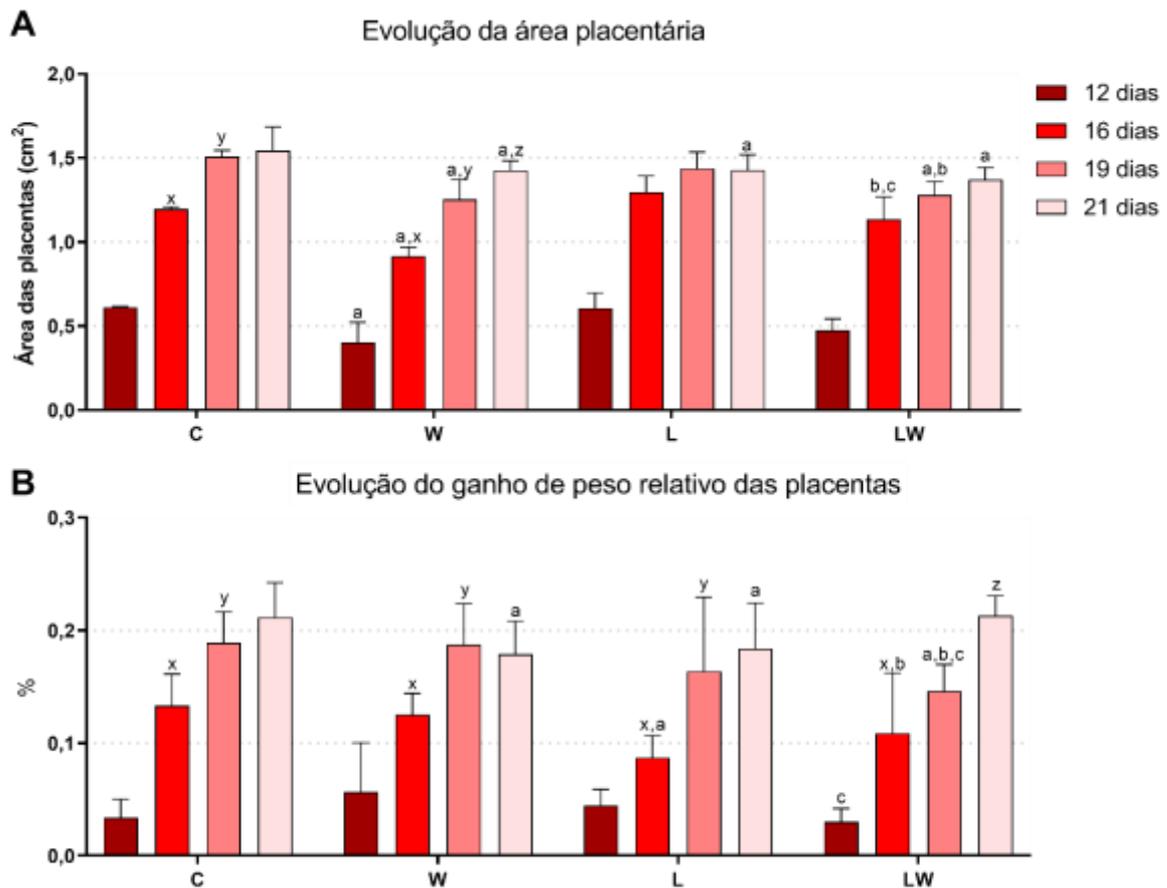


Figura 13. Evolução do crescimento placentário dos diferentes grupos experimentais, implantados ou não com tumor e submetidos ou não a suplementação nutricional. **A**, Evolução do crescimento da área da face materna das placentas. **B**, Evolução do ganho de peso placentário relativo, para os diferentes grupos experimentais. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Legenda: C, controle (12 dias de prenhez, n= 8; 16 dias de prenhez, n= 5; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=9); W, prenhe portadora de tumor (12 dias de prenhez, n= 12; 16 dias de prenhez, n= 7; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=12); L, prenhe com dieta rica em lucina (12 dias de prenhez, n= 6; 16 dias de prenhez, n= 6; 19 dias de prenhez, n= 9; 21 dias de prenhez, n=11); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (12 dias de prenhez, n= 11; 16 dias de prenhez, n= 7; 19 dias de prenhez, n= 5; 21 dias de prenhez, n=7); $P < 0,05$ quando comparado com: grupo C (a), grupo L (b), grupo W (c), correspondente ao mesmo grupo com 12º dia de prenhez (x), o 16º dia de prenhez (y); 19º dia de prenhez (z).

Quando comparamos o padrão de evolução da prenhez associado à suplementação nutricional, observamos que grupo L também apresentou o mesmo padrão de crescimento placentário que o grupo C, no entanto, as placentas estavam com menor peso com 16 e 21 dias quando comparadas com C. Além disso, o grupo L apresentou crescimento fetal significativo entre todos os períodos de prenhez, similar ao grupo C, mostrando maior taxa de crescimento fetal entre os períodos de 19º a 21º dia. O período de 19º a 21º dia corresponde ao terceiro trimestre de gestação, onde o feto está em crescimento mais acelerado (Figura 14 A). O grupo L, apesar de ter apresentado padrão de crescimento fetal diferente de C, com aumento significativo de peso apenas do 16º para 19º dias e na sequência para 21 dias, também

apresentou maior ganho de peso de feto nos períodos finais, porém ainda semelhantes ao do grupo C. Entretanto, o padrão de aumento da razão F/P do grupo L foi diferente de C, pois o grupo L não apresentou aumento expressivo da razão F/P do 12º para 16º dias, como observado no grupo C, porém teve aumento significativo do 16º para 19º dias, mantendo-se constante até 21 dias. No entanto, como mencionado, o curso da prenhez foi similar em todos os parâmetros do grupo controle, mostrando do grupo controle, mostrando que a suplementação nutricional não interferiu, aparentemente, no curso normal da prenhez.

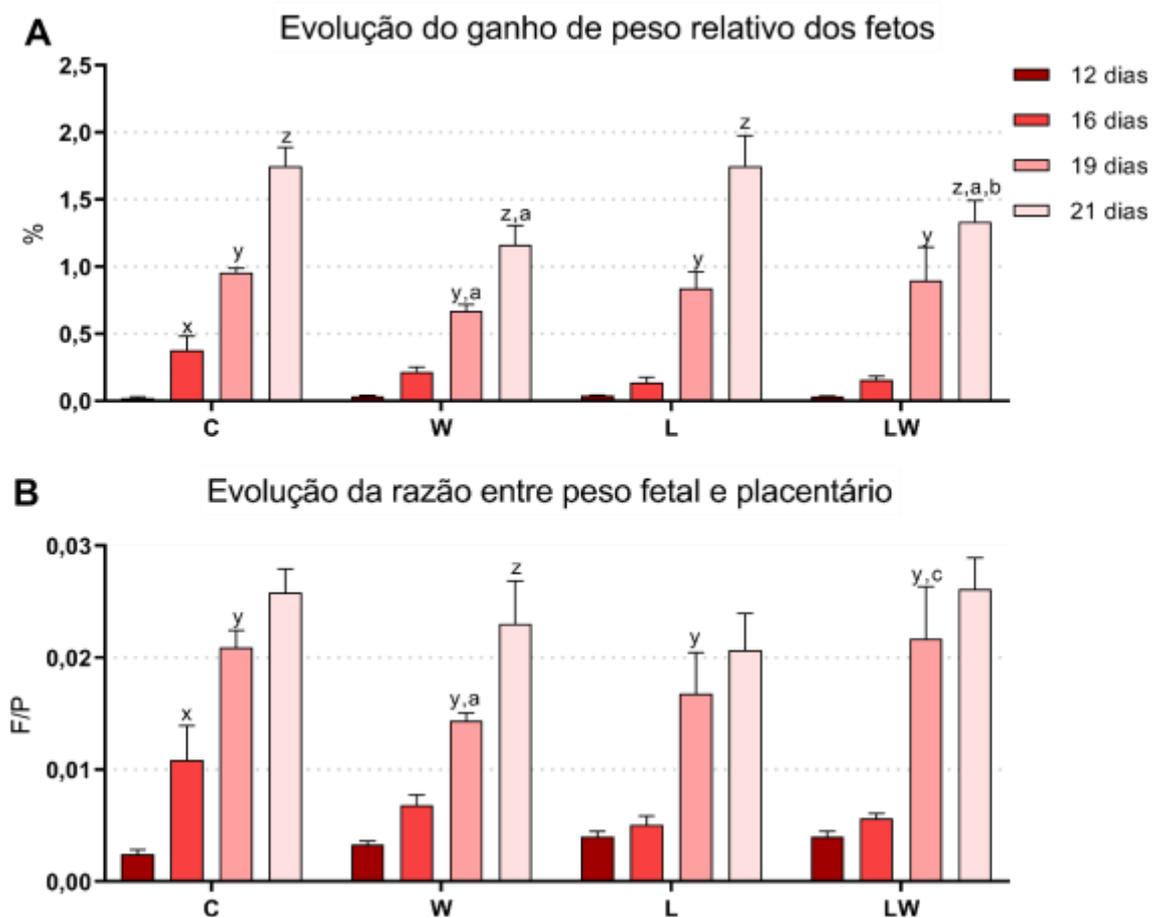


Figura 14. A, Evolução do crescimento fetal e B, Evolução do crescimento placentário normatizado. Resultados expressos como média normatizada \pm desvio padrão (DP). A média foi normatizada dividindo-se o peso dos tecidos pelo peso da rata no dia 0 de prenhez. Legenda: C, controle (12 dias de prenhez, n= 8; 16 dias de prenhez, n= 5; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=9); W, prenhe portadora de tumor (12 dias de prenhez, n= 12; 16 dias de prenhez, n= 7; 19 dias de prenhez, n= 8; 21 dias de prenhez, n=12); L, prenhe com dieta rica em lucina (12 dias de prenhez, n= 6; 16 dias de prenhez, n= 6; 19 dias de prenhez, n= 9; 21 dias de prenhez, n=11); LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina (12 dias de prenhez, n= 11; 16 dias de prenhez, n= 7; 19 dias de prenhez, n= 5; 21 dias de prenhez, n=7). ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W; ^x: P < 0,05 comparado com o 12º dia de gestação correspondente ao mesmo grupo; ^y: P < 0,05 comparado com o 16º dia de gestação correspondente ao mesmo grupo; ^z: P < 0,05 comparado com o 19º dia de gestação correspondente ao mesmo grupo

Já o grupo LW apresentou aumento significativo do peso da placenta entre o 12º para 16º dias e do 19º para 21º dias, porém esses valores do peso da placenta no grupo LW estavam

menores que a placenta do grupo C no 19º dia. Quando comparado o grupo LW ao L, o peso da placenta de LW estava reduzido entre 16 e 19 dias. Quando se comparou os grupos LW com o W, o peso placentário estava reduzido com 12 e 19 dias (Figura 13 B). Experimentos prévios do laboratório mostraram que ratas Wistar prenhes portadoras de tumor apresentaram menor número de fetos por ninhada e fetos com menor peso, maior degradação de proteína e regulação negativa MAPK / ERK e PI3K / Akt / mTOR no tecido placentário (VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Por outro lado, a dieta rica em leucina foi capaz modular esses parâmetros, demonstrando ser uma importante molécula para preservar a placenta e fetos dos efeitos nocivos no tumor (CRUZ; GOMES-MARCONDES, 2014; TOLEDO; GOMES MARCONDES, 2004; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2015). Observamos também que o LW apresentou padrão de crescimento fetal diferente de C, com aumento de peso dos fetos apenas do 16º para 19º dias e na sequência para o 21º dia. No entanto, o padrão de crescimento fetal estava semelhante ao do grupo L. O grupo LW estava com peso de fetos menor que os grupos C e L com 21 dias, porém maior que W com 21 dias (Figura 14 A).

O grupo LW apresentou o mesmo padrão de crescimento fetal que o do grupo L, com aumento significativo do peso fetal apenas com 19 dias e nesse período, a razão de F/P, no grupo LW, estava aumentada em relação ao grupo W (Figura 14 B). Assim, esses resultados mostraram que embora o crescimento do tumor tenha induzido alterações quanto aos parâmetros morfométricos da placenta e fetal do grupo LW, a suplementação nutricional com leucina proporcionou resultados similares ao do grupo L, sugerindo que a suplementação nutricional pôde modular, aparentemente, os efeitos deletérios induzidos pelo tumor.

3.5.3. A suplementação nutricional com leucina modulou o perfil metabolômico do tecido placentário alterado em função da evolução tumoral.

O crescimento tumoral durante a prenhez pode promover a restrição de crescimento fetal devido a danos causados à placenta e a dieta rica em leucina pode modular alguns dos efeitos prejudiciais do tumor e, dessa forma, preservar o peso dos fetos e aumentar a síntese proteica placentária (CRUZ et al., 2016; DE MORAES SALGADO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013). Esclarecer quais são os mecanismos placentários que estão alterados devido ao crescimento tumoral, bem como descobrir quais seriam os possíveis tratamentos para mitigar esses efeitos nocivos, é de extrema importância, uma vez que a placenta é o principal órgão responsável pela manutenção da gestação (BURTON; FOWDEN, 2015). Dentro desse contexto, esse estudo avaliou em time-course quais foram os

metabólitos placentários alterados em função do crescimento tumoral e como a dieta rica em leucina foi capaz de preservar a funcionalidade da placenta.

Dentre os 49 metabólitos identificados no tecido placentário, 20 metabólitos apresentaram diferenças significativas entre os quatro grupos experimentais. Os metabólitos alterados foram agrupados em três categorias – relacionados ao metabolismo energético (Figura 15), aminoácidos e derivados (Figuras 16 e 17) e aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (Figuras 18).

A presença do tumor promoveu alterações em 9 metabólitos relacionados ao metabolismo energético da placenta somente a partir do 16º dia de prenhez. Assim, nas análises do perfil metabolômico do tecido placentário, observou-se que lactato e succinato estavam aumentados no grupo W com 16 e 19 dias de prenhez em comparação ao grupo C; os metabólitos AMP, GTP, NAD⁺ e ADP estavam aumentados em W apenas no 16º dia de prenhez em comparação ao grupo C. Assim como, os metabólitos ADP, ATP e fumarato estavam aumentados em W aos 19 dias de prenhez em comparação ao C (Figura 15).

A glicólise é fonte principal de energia pela placenta, com a participação do piruvato no ciclo do ácido cítrico, através da formação de acetil-CoA, para que seja produzido ATP via fosforilação oxidativa (AYE et al., 2020). Além disso, a conversão de piruvato a lactato no metabolismo energético da placenta também está presente como fonte de energia tanto para a placenta quanto para o feto (KAY; ZHU; TSOI, 2007). No entanto, em situação de hipóxia, a glicólise placentária encontra-se aumentada para a formação de lactato, através da atividade da lactato desidrogenase, que favorece a conversão do piruvato a lactato. Assim, na ausência de oxigênio, a placenta consegue adaptar seu metabolismo para garantir a demanda energética para o feto. No entanto, não se sabe quais são as consequências da alta concentração de lactato para a placenta por longo período (AYE et al., 2020). Em condições fisiológicas, as reações do ciclo do ácido cítrico levam ao equilíbrio entre as concentrações de α -cetoglutarato, succinato e fumarato. Dentro desse contexto, o aumento do succinato e fumarato, bem como aumento da hipóxia e, assim formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), promovem a inibição de proteínas de domínio proil hidroxilase (PHD), consequentemente estabilizam a atividade da HIF, que é translocada ao núcleo e promove a transcrição de seus respectivos genes para suprir a falta de oxigênio (BURTON; JAUNIAUX; MURRAY, 2017). Assim, o aumento de lactato e succinato placentário no grupo W, a partir do 16º dia de prenhez (Figura 15), sugere que, possivelmente, essas placentas possam adaptar seu metabolismo energético para atender a demanda do feto, que por sua vez, foi aquém, já que houve redução do crescimento fetal.

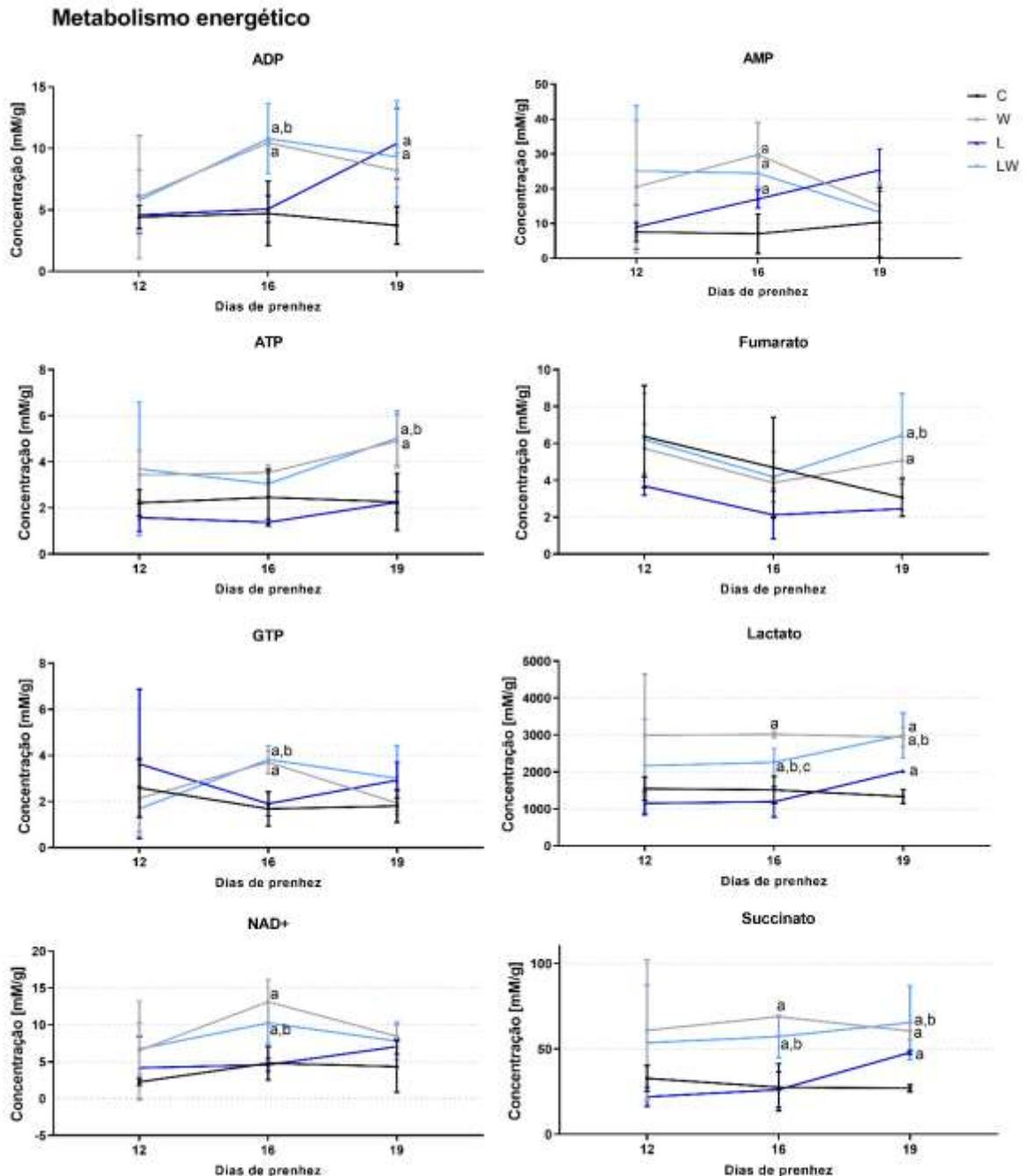


Figura 15. Metabólitos relacionados ao metabolismo energético de placenta em *time-course* dos diferentes grupos experimentais, portadores ou não do tumor de Walker e submetidos ou não à suplementação nutricional com leucina. Resultados apresentados como média (mM/g) e desvio padrão. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina. ^a: $P < 0,05$ comparado com o grupo C; ^b: $P < 0,05$ comparado com o grupo L; ^c: $P < 0,05$ comparado com o grupo W.

Apesar da conversão de piruvato a lactato formar NADH, fornecendo elétrons para cadeia transportadora e, assim, formar ATP, essa fonte de energia é menos eficiente que as reações de oxirredução do ciclo do ácido cítrico. Portanto, diminuindo essas reações, o NAD⁺ fica mais

disponível e as concentrações de ADP e AMP aumentam, pois não estão recebendo o grupamento fosfato para formação de ATP (BURTON; JAUNIAUX; MURRAY, 2017). Conforme foi observado em nossos resultados, o aumento de ADP, AMP e NAD⁺ placentários, bem como o aumento do lactato e succinato, sugerem que o ciclo do ácido cítrico placentário aos 16 dias de prenhez, no grupo W, possivelmente foi desviado para a formação do lactato (sempre aumentado, em relação ao C) (Figura 15) e o rendimento energético dessas placentas provavelmente foi comprometido com esse processo. Desse modo, esse processo de déficit de energia possivelmente comprometeu o desenvolvimento dessas placentas e conseqüentemente diminuição da área da placenta do grupo W com 16 dias, comparados ao C, alterando o padrão de crescimento dos fetos do grupo W entre 12 e 16 dias, que foi menor do que do grupo C, no mesmo período (Figuras 13)

A presença do tumor proporcionou também alteração na concentração de 12 aminoácidos placentários a partir do 16º dia de prenhez. Alterações nas concentrações de aminoácidos placentários pode indicar deficiência na atividade placentária em relação ao transporte de aminoácidos, à síntese de proteínas e a diversas vias metabólicas associadas a esses aminoácidos, que por sua vez favorecem o crescimento e atividade da proliferação celular placentária (BAHADO-SINGH et al., 2020). A presença do tumor no grupo W induziu o aumento da glicina e da alanina no 16º e 19º dias de prenhez; aumentou o glutamato aos 16 dias de prenhez; e aumentou a creatina, a taurina, a fenilalanina, o triptofano, a leucina e a valina aos 19 dias de prenhez, quando comparados ao grupo C nos respectivos períodos (Figura 16). Dessa forma, o tumor possivelmente induziu essas alterações placentárias que podem ter impactado as vias metabólicas relacionadas a esses aminoácidos, como biossíntese de aminoAcil-tRNA, biossíntese e degradação de leucina, isoleucina e valina, metabolismo de glicina, serina e treonina, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato e biossíntese fenilalanina, tirosina e triptofano.

Aminoacil-tRNA são responsáveis pela tradução dos tRNAs para formação de proteínas específicas, logo, são essenciais para a viabilidade celular. Assim, alterações na biossíntese de aminoacil-tRNA podem levar a prejuízos específicos à atividade celular (IBBA; DIETER, 2000). Nossos resultados sugerem que a atividade placentária, no grupo W, entre 16º e 19º dia de prenhez, possivelmente foi prejudicada devido às alterações na biossíntese de aminoacil-tRNA

Da mesma forma, os prejuízos placentários proporcionados pela evolução tumoral puderam ser observados pelo aumento da concentração de glicina placentária, sugerindo-se que

esse aminoácido possivelmente não foi metabolizado pela placenta devido à deficiência no metabolismo de glicina, serina e treonina. Assim, o metabolismo de glicina, serina e treonina, que é importante para biossíntese de nucleotídeos e fosfolípidios, imprescindíveis para proliferação celular e, nesse caso, para placenta, quando deficiente possivelmente proporcionou o comprometimento de vias que foram responsáveis pela menor área placentária e consequente e consequente prejuízo fetal (BAHADO-SINGH et al., 2020).

Aminoácidos e seus derivados

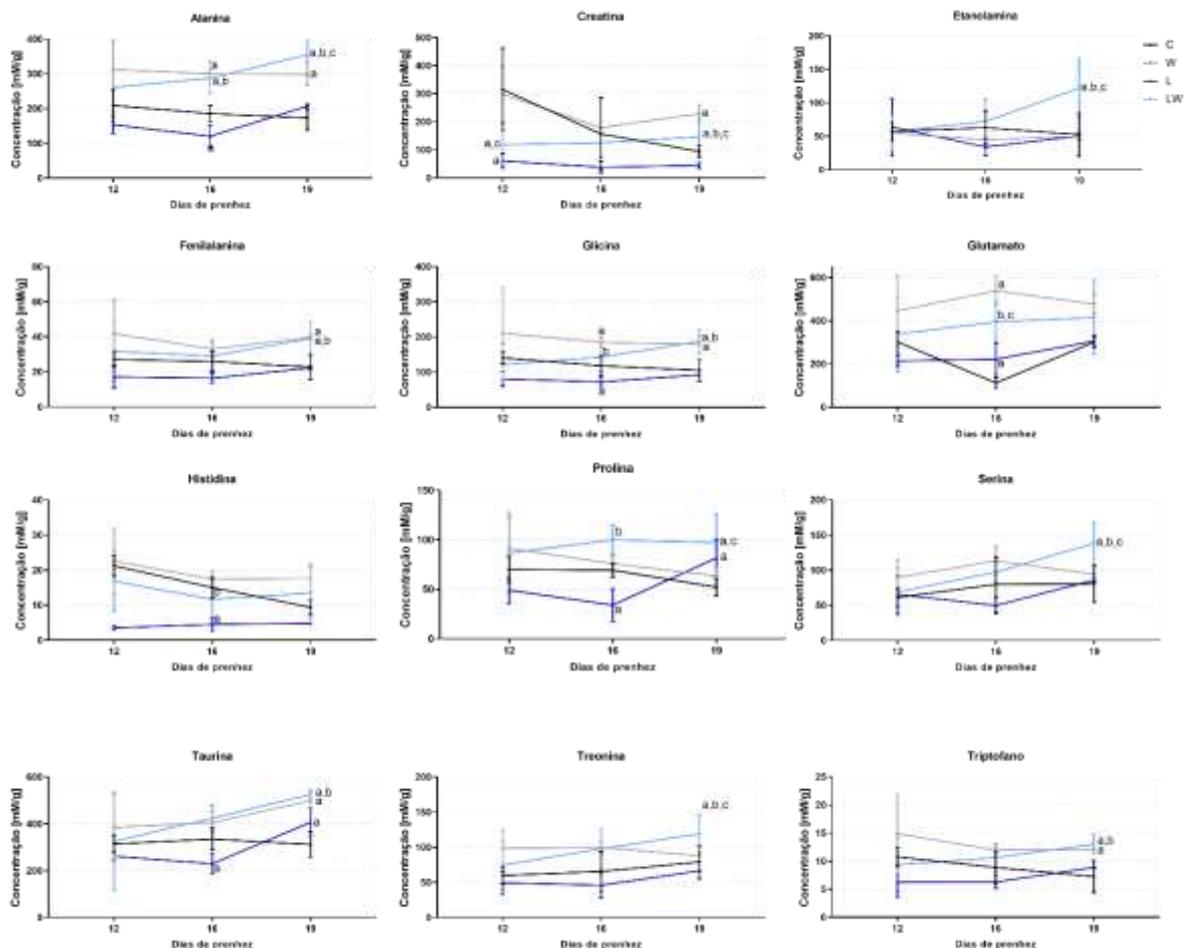


Figura 16. Aminoácidos de placenta em *time course*. Resultados apresentados como média (mM/g) e desvio padrão. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina. ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W.

O triptofano é metabolizado na placenta para formar a serotonina, aminoácido essencial para o neurodesenvolvimento e programação fetal (KARAHODA et al., 2020; STAUD; KARAHODA, 2018). Em condições maternas adversas, como inflamação, estresse, depressão, polimorfismos e xenobióticos, a atividade enzimática da indoleamina 2,3-dioxigenase pode afetar o metabolismo e levar ao aumento do triptofano (SEDLMAYR; BLASCHITZ; STOCKER, 2014). Assim, o triptofano placentário aumentado sugere que a metabolização

desse aminoácido pela placenta foi direcionada para menor produção de serotonina e, conseqüentemente, afetou o desenvolvimento e a programação do cérebro fetal, que possivelmente pôde refletir no menor peso e desenvolvimento fetal.

Também foi observado que o tumor proporcionou aumento de leucina e valina no tecido placentário a partir do 16º dia de prenhez e aumentou a isoleucina aos 19 dias de prenhez. Por outro lado, a dieta rica em leucina modulou a leucina e valina apenas no 16º dia de prenhez, que estavam reduzidas em relação ao grupo W, porém semelhantes ao grupo C. A dieta rica em leucina também modulou a isoleucina do grupo LW aos 19 dias de prenhez, que estava aumentada em relação ao grupo C (Figura 17). Os aminoácidos placentários podem ser utilizados no processo de síntese proteica, com direcionamento para proliferação celular placentária, ou serem direcionados para o ciclo do ácido cítrico, para fornecimento de energia. Além do processo de transaminação, o grupamento amina será utilizado por atividade celular, para síntese de outros aminoácidos necessários à atividade celular placentária. Assim, possivelmente a evolução tumoral proporcionou redirecionamento dos aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, valina e isoleucina) para o fornecimento de energia placentária no caso das fêmeas com tumor (Figura 17).

O efeito da dieta rica em leucina sobre a associação da evolução tumoral durante a prenhez não modulou os metabólitos relacionados ao metabolismo energético placentário. Lactato e succinato no grupo LW estavam semelhantes ao grupo W e aumentados em comparação ao grupo C nos 16º e 19º dias de prenhez. Da mesma forma, AMP, GTP, NAD⁺ e UDP-glicose do grupo LW estavam semelhantes ao do grupo W e aumentados em relação ao grupo C em 16 dias de prenhez. Os metabólitos ATP e fumarato do grupo LW também estavam semelhantes ao do grupo W e aumentados em relação ao grupo C em 19 dias de prenhez (Figura 15). Dessa forma, sugere-se que as placentas do grupo LW também estavam adaptando seu metabolismo energético para atender a demanda do feto, e que a suplementação de aminoácidos, em especial a leucina, pôde por sua vez também favorecer o fornecimento de energia, já que pôde ter sido convertida em cetoácido, o qual favoreceria à demanda do ciclo do ácido cítrico placentário nesse grupo LW. Desse modo, como observado no grupo W que teve redução da área da placenta com 16 dias (Figura 13) e do crescimento fetal entre 12 e 16 dias em relação ao crescimento dos fetos do grupo C (Figura 14), mostrando que os efeitos deletérios da evolução tumoral começaram ainda no primeiro e segundo terço da prenhez. Por outro lado, apesar da dieta rica em leucina não ter modulado o metabolismo energético placentário, a suplementação com leucina favoreceu a área das placentas do grupo LW, já que com 16 dias estava semelhante ao

grupo C e maior que o grupo W. No entanto, aos 19º e 21º dias de prenhez, a área da placenta do grupo LW estava menor que o grupo C e semelhante ao grupo W (Figura 14). Logo, a leucina não conseguiu preservar a área da placenta de LW até o final da prenhez. O tamanho da placenta está diretamente relacionado ao bom e normal desenvolvimento fetal (DESFORGES; SIBLEY, 2010), assim no grupo LW provavelmente o favorecimento da suplementação com leucina pôde direcionar para a manutenção da atividade placentária como demonstrada pelas proteínas relacionadas a via da Nodal e da mTOR (Salgado et al, 2021 – Capítulo 1), assim como manutenção do número de células, razão entre peso fetal e placentário e peso dos fetos, pelo menos quando comparadas ao grupo L.

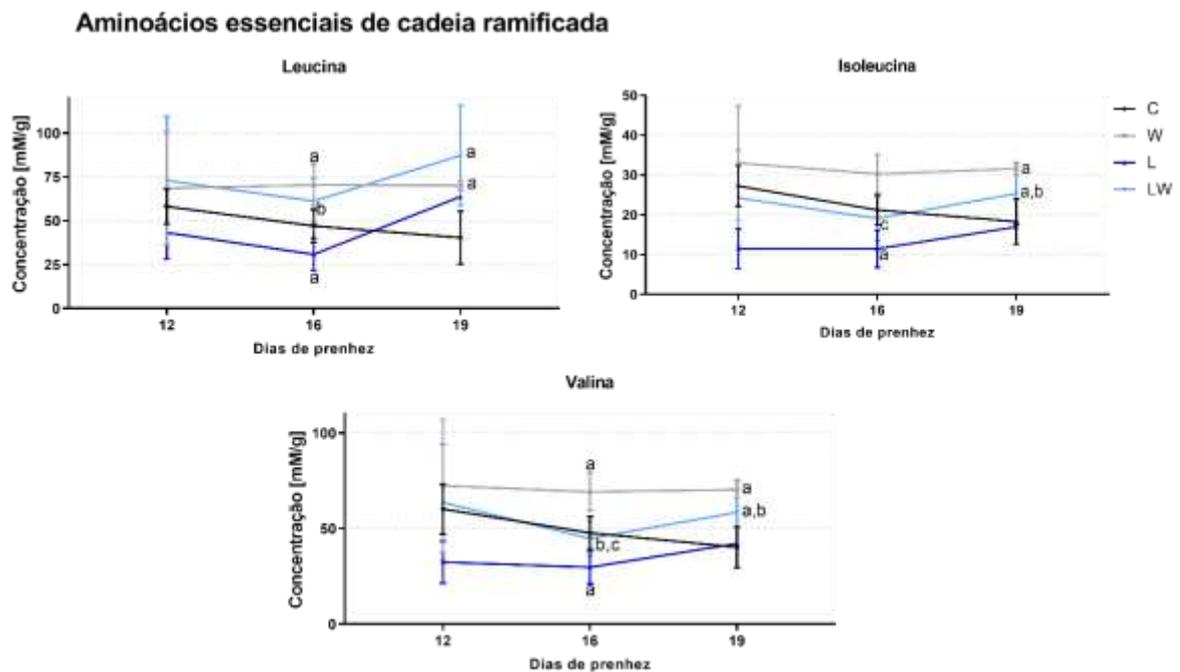


Figura 17. Aminoácidos essenciais de cadeia ramificada de placenta em *time course*. Resultados apresentados como média (mM/g) e desvio padrão. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina. ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W.

A dieta rica em leucina modulou a creatina placentária nos grupos L e LW, em relação ao grupo C no 12º dia de prenhez. No entanto, a creatina estava aumentada no grupo LW aos 19 dias de prenhez em comparação ao grupo C. Logo, a leucina não manteve a concentração de creatina placentária mais baixa até o final da prenhez. De forma semelhante, a dieta rica em leucina também não modulou a concentração de glicina, alanina, fenilalanina, taurina e triptofano no grupo LW com 19 dias, os quais estavam aumentados em relação aos grupos C e L e semelhantes ao grupo W no mesmo período. Por outro lado, a suplementação nutricional com leucina exerceu efeito modulatório para os aminoácidos prolina, etanolamina, treonina, serina

e isoleucina, que estavam aumentados no grupo LW com 19 dias de prenhez em relação ao grupo C no mesmo período. Esses aminoácidos estão relacionados às vias de biossíntese de valina, leucina e isoleucina e biossíntese de aminoacil-tRNA, vias essas diretamente relacionadas aos processos de proliferação celular e/ou ao provimento de substrato para direcionamento das vias relacionadas ao fornecimento de energia para essas placentas.

Apesar da dieta rica em leucina não ter modulado muitos dos metabólitos placentários, as áreas das placentas do grupo LW apresentaram redução apenas com 19 e 21 dias de prenhez, contrapondo-se ao padrão observado nas fêmeas do grupo W, onde a área das placentas estavam menores que a das placentas do grupo C desde o início do primeiro terço até o 21º dias de prenhez. O mesmo foi observado com os fetos do grupo W, que estavam menores que o grupo C a partir de 19 dias de prenhez, e os fetos do grupo LW estavam menores que o grupo C somente aos 21 dias de prenhez (Figura 15). Assim, novamente pôde-se sugerir que a suplementação nutricional possivelmente modulou alguns parâmetros, direcionando a atividade placentária para que o curso da prenhez fosse de certo modo preservado.

3.5.4. A suplementação nutricional com leucina modulou o perfil metabolômico do tecido fetal alterado devido aos efeitos deletérios do crescimento tumoral

A avaliação do tecido fetal, assim como o seu desenvolvimento quanto ao perfil metabolômico, poderá trazer aumento do conhecimento quanto à situação de associação entre câncer durante a gestação. Assim, dentre os 51 metabólitos identificados no tecido fetal, 24 apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais – C, W, L e LW – ao longo da prenhez. Da mesma forma que o tecido placentário, os metabólitos dos tecidos fetais foram categorizados em grupos: relacionados ao metabolismo energético (Figura 18), aminoácidos de cadeia ramificada (Figura 19) e aminoácidos e seus derivados (Figura 20).

O crescimento fetal demanda de alto aporte energético, ao longo da gestação e principalmente no último terço da prenhez (TAL; TAYLOR, 2000), proporcionando assim o processo de maturação das funções fisiológicas que darão suporte para sobrevivência pós-parto. Desse modo, no presente trabalho, a análise do perfil metabolômico fetal, e em especial relacionado ao metabolismo energético, 9 metabólitos apresentaram diferença entre os quatro grupos experimentais. Apesar das placentas não terem apresentado diferenças significativas aos 12 dias de prenhez no grupo W, o crescimento tumoral proporcionou aumento do lactato e NADP⁺ fetal em comparação ao C no mesmo período. Aos 16 dias de prenhez, a presença do tumor induziu elevação do AMP, succinato, acetato, UDP-glicose e pantotenato no grupo W, em comparação ao grupo C, no mesmo período. Aos 19 dias de prenhez, os efeitos do

crescimento tumoral acarretaram elevada concentração do lactato, NADP⁺, AMP e ADP no grupo W em comparação ao grupo C no mesmo período (Figura 18). Assim, pôde-se observar que durante o desenvolvimento da prenhez do grupo W, os fetos apresentaram elevação dos metabólitos que direcionam à menor produção de ATP, através do aumento e direcionamento do processo glicolítico para formação de lactato que, por sua vez, pode elevar o processo de neoglicogênese fetal, hepática, como também renal, com grande sobrecarga a esses tecidos fetais (Figura 18). Adicionalmente, sugere-se que houve aumento do transporte desses metabólitos pela placenta, possivelmente refletindo os efeitos deletérios do crescimento tumoral sobre os fetos. Por outro lado, a dieta rica em leucina modulou o lactato fetal no grupo LW, que estava semelhante ao grupo C e reduzido em relação ao grupo W em 12 e 19 dias de prenhez. Também modulou o pantotenato do grupo LW, que estava semelhante ao grupo C e reduzido em relação do grupo W em 16 dias de prenhez (Figura 18). Como já mencionado, o crescimento e desenvolvimento fetal depende de intenso aporte energético. Para atender a essa demanda, a glicose, através do processo de glicólise, fornece grande quantidade de ATP para os processos de proliferação, diferenciação e crescimento do feto. A manutenção do peso dos fetos e da razão F/P do grupo LW (Figura 14 B), sugere melhor aproveitamento de energia, através do provimento placentário, possivelmente fornecido pela suplementação nutricional com leucina. Logo, a dieta rica em leucina poderia modular os processos de obtenção e utilização de energia dos tecidos fetais, assim como melhorar da atividade mitocondrial, como apontada por alguns estudos da literatura (LIANG et al., 2014).

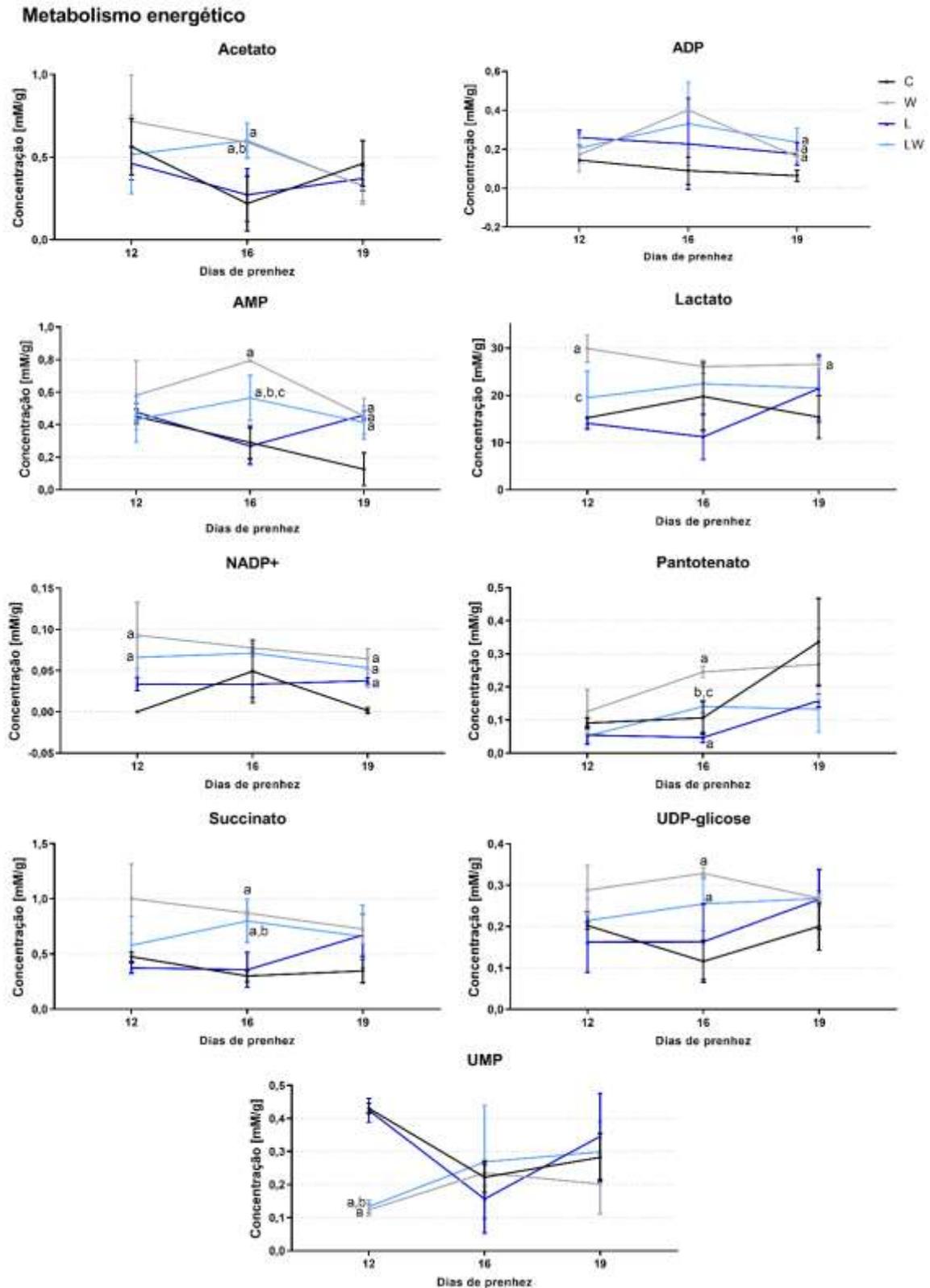


Figura 18. Metabólitos relacionados ao metabolismo energético de fetos em *time-course* dos diferentes grupos experimentais, portadores ou não do tumor de Walker e submetidos ou não à suplementação nutricional com leucina. Resultados apresentados como média (mM/g) e desvio padrão. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina. ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W.

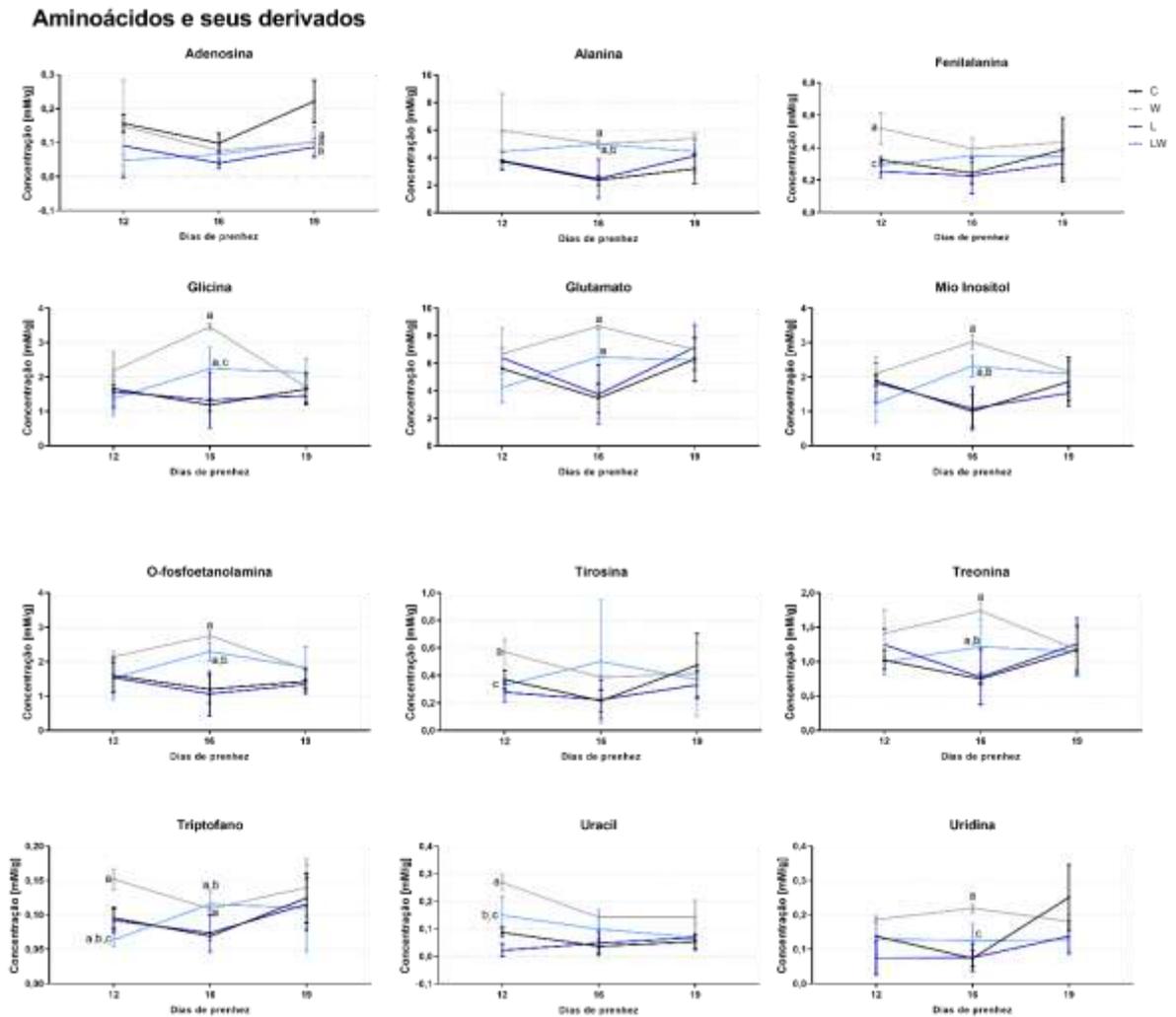


Figura 19. Aminoácidos de fetos em *time-course* dos diferentes grupos experimentais, portadores ou não do tumor de Walker e submetidos ou não à suplementação nutricional com leucina. Resultados apresentados como média (mM/g) e desvio padrão. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina. ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W.

No início do curso da prenhez, ou seja, com 12 dias, as placentas não apresentaram alterações na concentração de aminoácidos devido à presença do tumor. Porém, os tecidos fetais do grupo W apresentaram aumento da fenilalanina, tirosina, uracila, triptofano, isoleucina e valina, em relação ao grupo C. Já no segundo terço da prenhez, no 16º dia, o crescimento tumoral também induziu alterações nos aminoácidos fetais com elevação do triptofano, alanina, o-fosfoetanolamina, mio-inositol, treonina, glutamato, glicina, uridina, adenosina e leucina no grupo W em relação ao grupo C; entretanto, não houve alterações nos aminoácidos fetais nesse grupo W com 19 dias de prenhez (Figura 19 e Figura 20). O crescimento e desenvolvimento fetal demanda grande suprimento de aminoácidos principalmente para os tecidos nervoso, hepático e muscular, bem como para maturação das funções de cada tecido e órgão. Essa demanda está diretamente relacionada ao adequado provimento desses aminoácidos pela

placenta. Por outro lado, no caso das prenhes com tumor – grupo W – verificou-se que a evolução tumoral proporcionou alterações nas placentas que podem ter refletido diretamente nos suprimentos aos fetos. Embora a concentração de alguns aminoácidos estivesse elevada nos tecidos fetais do grupo W, não significa que está associada ao melhor desenvolvimento desses fetos.

Aminoácidos essenciais de cadeia ramificada

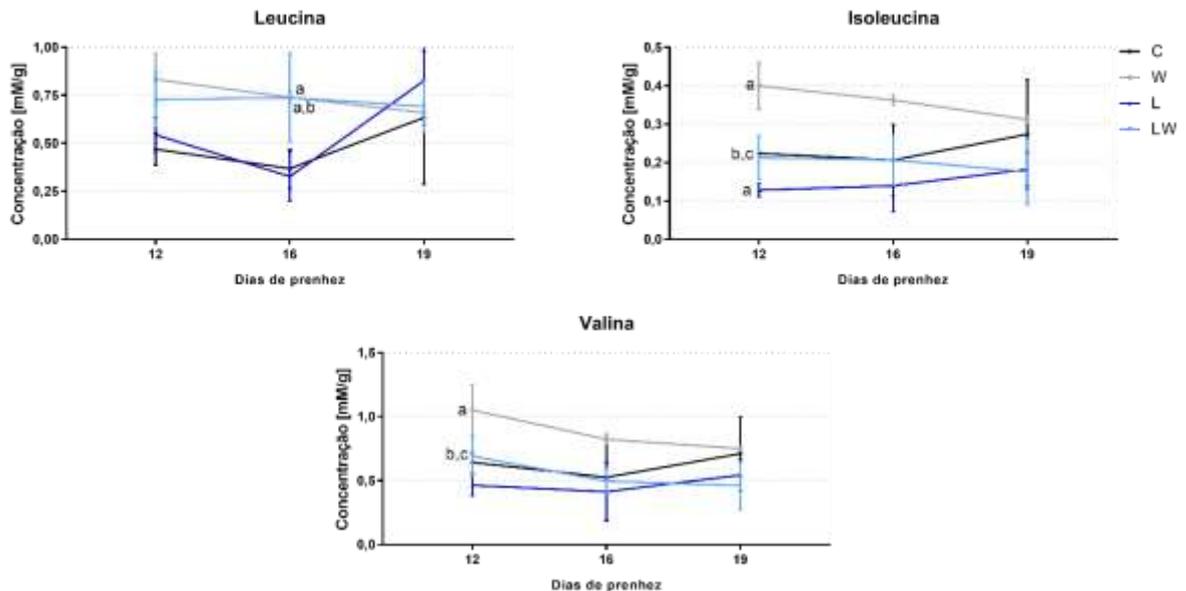


Figura 20. Aminoácidos essenciais de cadeia ramificada de fetos em *time-course* dos diferentes grupos experimentais, portadores ou não do tumor de Walker e submetidos ou não à suplementação nutricional com leucina. Resultados apresentados como média (mM/g) e desvio padrão. Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina. ^a: P < 0,05 comparado com o grupo C; ^b: P < 0,05 comparado com o grupo L; ^c: P < 0,05 comparado com o grupo W.

Por outro lado, no início da prenhez (primeiro terço – 12 dias) das fêmeas alimentadas com a dieta rica em leucina, observamos que houve modulação dos aminoácidos dos tecidos fetais quanto às concentrações de fenilalanina, tirosina, uracila, triptofano, isoleucina e valina no grupo LW, as quais estavam semelhantes ao grupo C e reduzidas em relação ao grupo W. Já no segundo terço, aos 16 dias de prenhez, a dieta rica em leucina modulou somente a uridina do grupo LW, que estava semelhante ao grupo C, porém reduzida em relação ao grupo W. Os aminoácidos triptofano, alanina, o-fosfoetanolamina, mio-inositol, treonina, glutamato, glicina e adenosina no grupo LW com 16 dias de prenhez também estavam aumentados quando comparados ao grupo C (Figura 19 e Figura 20). Assim, avaliando-se sob a perspectiva da evolução da prenhez associada ao crescimento neoplásico, a suplementação com leucina proporcionou modulação da maioria dos aminoácidos, sendo que os valores teciduais foram na maioria dos casos similares aos grupos C e L. As principais modulações dos metabólitos fetais foram no

início da prenhez para o grupo LW, levando-nos a sugerir que a suplementação nutricional poderia proporcionar minimização dos processos deletérios aos fetos precocemente em relação ao grupo W.

O crescimento do tumor durante a prenhez trouxe severas alterações para o organismo materno, como espoliação da musculatura esquelética, observadas pela redução do peso corpóreo e redução do peso do músculo gastrocnêmio ao longo de toda prenhez (como descrito acima no Capítulo 1 e início deste Capítulo 2). Da mesma forma, a placenta apresentou redução da área ao longo de toda prenhez. Apesar da placenta com 12 dias não apresentar alterações metabólicas devido à presença do tumor, os fetos com 12 dias tiveram alterações nos aminoácidos fenilalanina, tirosina, uracila e triptofano. Esse resultado sugere que a diminuição da área da placenta pode ter impactado no transporte e na transferência desses aminoácidos pela placenta para o feto, e assim diminuindo peso fetal, e razão feto/placenta assim como indução de reabsorção fetal, corroborando com outros estudos (CRUZ et al., 2016; DESFORGES; SIBLEY, 2010; TOLEDO; VENTRUCCI; GOMES-MARCONDES, 2011; VIANA; GOMES-MARCONDES, 2013).

Com o curso da prenhez, aos 16 dias, a placenta apresentou alterações nos metabólitos relacionados ao metabolismo energético e associado às alterações em relação aos aminoácidos placentários. Esse resultado sugere que o metabolismo energético placentário foi o primeiro a sofrer alteração devido aos efeitos deletérios do tumor e possivelmente houve tentativa de ajustes e adaptação do metabolismo energético placentário. Como observado nos fetos com 16 dias, em função dos efeitos induzidos pelo tumor, também ocorreram alterações no metabolismo energético dos fetos. No entanto, na sequência do curso da prenhez, aos 19 dias, o aumento dos aminoácidos placentários sugere que ocorreu comprometimento de importantes vias metabólicas placentárias relacionadas a síntese e proliferação celular, somadas às alterações do metabolismo energético placentário. Entretanto, nos fetos com 19 dias, poucas alterações do ponto de vista do perfil metabolômico foram encontradas, mesmo diante as alterações placentárias, porém prejuízos morfométricos mostraram os efeitos danosos produzidos pela evolução tumoral.

Como objetivo principal do presente trabalho, a dieta rica em leucina apresentou efeito positivo ao organismo materno, contra os efeitos danosos do tumor, evitando a perda de peso corpóreo materno, bem como preservando o peso corpóreo fetal, além de reduzir o tamanho do tumor. Para a placenta, dieta rica em leucina teve efeito modulatório, reduzindo a creatina aos 12 dias de prenhez, reduzindo a glicina, leucina e valina aos 16 dias de prenhez e aumentando

a prolina, treonina, serina, etanolamina e isoleucina aos 19 dias de prenhez. Essas modulações ao tecido placentário, possivelmente refletiram para o feto, onde a dieta rica em leucina teve importante efeito modulatório aos 12 dias de prenhez, diminuindo o lactato, fenilalanina, tirosina, uracila, triptofano, isoleucina e valina dos fetos, restabelecendo aos valores próximos dos grupos controles, ou seja, dentro dos padrões normais. No entanto, aos 16 dias, a dieta rica em leucina não foi capaz de modular as variações dos metabólitos fetais, possivelmente, porque o metabolismo energético placentário estava comprometido. Porém, de alguma forma, poucas alterações nos metabólitos fetais foram encontradas com 19 dias de prenhez, apenas NADP⁺, AMP e ADP estavam aumentados devido a presença do tumor, sendo que a dieta rica em leucina não modulou esses metabólitos. De certa forma, como mencionado, as alterações decorrentes da evolução tumoral sobre a placenta e o feto, mostraram que esses prejuízos conduzem para perda de peso fetal e déficit na atividade placentária. Porém, diante da suplementação com leucina, embora ainda tivéssemos alterações em alguns parâmetros, de um modo geral, houve direcionamento para modulação dos prejuízos causados, os quais refletiram no final do curso da prenhez.

3.6. Conclusão

O desenvolvimento do tumor durante a prenhez foi responsável por trazer prejuízos ao organismo materno, alterações ao metabolismo da placenta e do feto. A suplementação com dieta rica em leucina preservou o peso corpóreo materno e fetal, modulou alguns aminoácidos placentários principalmente no 16º dia de prenhez e modulou aminoácidos fetais principalmente com 12 dias de prenhez que, ao final da gestação, manteve o peso placentário e minimizou a perda de peso fetal.

4. Referências

- ALBERS, R. E. et al. Gestational differences in murine placenta: Glycolytic metabolism and pregnancy parameters. *Theriogenology*, v. 107, p. 115–126, 2018.
- ANANIEVA, E. A.; WILKINSON, A. C. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 21, n. 1, p. 64–70, 2018.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nature reviews. Cancer*, v. 14, n. 11, p. 754–62, 9 out. 2014.
- ARGILÉS, J. M. et al. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 1, p. 9–20, 2018.
- ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BUSQUETS, S. Mechanisms and treatment of cancer cachexia. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 23, n. SUPPL1, p. 4–9, 2013.
- AYE, I. L. M. H. et al. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2020.
- BAHADO-SINGH, R. O. et al. Metabolomic identification of placental alterations in fetal growth restriction. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v. 7058, 2020.
- BAKER, H. J. Reproduction and breeding. In: BAKER, H.J.; LINDSEY, R; WEISBROTH, S.H. *The laboratory rat*. New York, Academic Press. p. 153–168, 1991.
- BAUMANN, M. U.; DEBORDE, S.; ILLSLEY, N. P. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*, v. 19, n. 1, p. 13–22, 2002.
- BERNARD, W. S.; CHRISTOPHER, P. W. *World cancer report 2020*. [s.l: s.n.].
- BI, X.; HENRY, C. J. Plasma-free amino acid profiles are predictors of cancer and diabetes development. *Nutrition and Diabetes*, v. 7, n. 3, 2017.
- BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 370, n. 1663, 2015.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 213, n. 4, p. S6.e1-S6.e4, 2015.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. *Expert Reviews Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction*. n. February, p. 745–761, 2018.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.; CHARNOCK-JONES, D. S. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2–3, p. 303–311, 2010.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.; MURRAY, A. J. Oxygen and placental development; parallels and differences with tumour biology. *Placenta*, v. 56, p. 14–18, 2017.
- CARBO, N. et al. Tumour growth results in changes in placental amino acid transport in the rat: a tumour necrosis factor alpha-mediated effect. *Biochem J*, v. 313 (Pt 1, p. 77–82, 1 jan. 1996.
- CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Placentation in mammals once grouped as insectivores. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2–3, p. 483–493, 2010.
- CHANDLER, D. E.; ROBERSON, R. W. *Bioimaging: Current Concepts in Light & Electron*

Microscopy. 1st. ed. [s.l.] Jones & Bartlett Publishers, 2009.

CHEN, M. C.; SONG, Y.; SONG, W. O. Fetal growth retardation and death in pantothenic acid-deficient rats is due to impaired placental function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 7, n. 8, p. 451–456, 1996.

CHONG, J.; YAMAMOTO, M. *MetaboAnalystR 2.0: From Raw Spectra to Biological Insights*. 2019.

CHRISTIE, G. A. Developmental stages in somite and post-somite rat embryos, based on external appearance, and including some features of the macroscopic development of the oral cavity. *Journal of Morphology*, v. 114, n. 2, p. 263–286, 1964.

CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; ALEXDOTTIR, M. S.; VALDIMARSDOTTIR, G. The TGF β Family in Human Placental Development at the Fetal-Maternal Interface. *Biomolecules*, v. 10, n. 3, p. 1–20, 2020.

CIARMELA, P. et al. Growth factors and myometrium: Biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*, v. 17, n. 6, p. 772–790, 2011.

CRITCHLEY, H. O. D. et al. Estrogen receptor β , but not estrogen receptor α , is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 86, n. 3, p. 1370–1378, 2001.

CRUZ, B.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. C. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, n. 1, p. 2, 2014.

CRUZ, B. L. G. et al. Dietary leucine supplementation minimises tumour-induced damage in placental tissues of pregnant, tumour-bearing rats. *BMC cancer*, v. 16, n. 1, p. 58, 4 fev. 2016.

DE MATUOKA E CHIOCCHETTI, G. et al. A time-course comparison of skeletal muscle metabolomic alterations in walker-256 tumour-bearing rats at different stages of life. *Metabolites*, v. 11, n. 6, 2021.

DE MORAES SALGADO, C. et al. Chapter 12 - Cancer during pregnancy. Maternal, placenta, and fetal damage. Nutrition, antioxidant defenses, and adult offspring tumor-bearing. In: PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. B. T.-C. (SECOND E. (Eds.). . San Diego: Academic Press, 2021. p. 121–129.

DESFORGES, M.; SIBLEY, C. P. Placental nutrient supply and fetal growth. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2–3, p. 377–390, 2010.

DOELMAN, J. et al. Branched-chain amino acid and lysine deficiencies exert different effects on mammary translational regulation. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 11, p. 7846–7855, 2015.

DUAN, Y. et al. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids*, 2016.

EL AGOUZA, I. M. et al. Taurine: A novel tumor marker for enhanced detection of breast cancer among female patients. *Angiogenesis*, v. 14, n. 3, p. 321–330, 2011.

ELEY, H. L. L.; RUSSELL, S. T. T.; TISDALE, M. J. J. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J*, v. 407, n. 1, p. 113–120, out. 2007.

ELLERY, S. J. et al. Creatine biosynthesis and transport by the term human placenta. *Placenta*, v. 52, p. 86–93, 2017.

ELLERY, S. J. et al. Placental creatine metabolism in cases of placental insufficiency and

- reduced fetal growth. *Molecular Human Reproduction*, v. 25, n. 8, p. 495–505, 2019.
- EVANS, W. J. et al. Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition*, v. 27, n. 6, p. 793–799, 2008.
- FANOS, V. et al. Metabolomics application in maternal-fetal medicine. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.
- FROEHLICH, K. et al. Breast cancer, placenta and pregnancy. *European Journal of Cancer*, v. 115, p. 68–78, 2019.
- GOMES-MARCONDES, M. C. C. et al. Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 10, p. 1345–1348, 1998.
- GU, Y. et al. Perioperative dynamics and significance of amino acid profiles in patients with cancer. *Journal of Translational Medicine*, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2015.
- HAYES, K. C.; CAREY, R. E.; SCHMIDT, S. Y. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science*, v. 188, n. 4191, p. 949–951, 1975.
- HAYWARD, C. E. et al. Placental adaptation: What can we learn from Birthweight:placental weight ratio? *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. FEB, p. 1–13, 2016.
- HENSLEY, C. T. et al. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. Find the latest version: Review series Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The journal of clinical investigation*, v. 123, n. 9, p. 3678–3684, 2013.
- HILL, C. S. Spatial and temporal control of NODAL signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 51, p. 50–57, 2018.
- HILL, P. M. M.; YOUNG, M. Net placental transfer of free amino acids against varying concentrations. *The Journal of Physiology*, v. 235, n. 2, p. 409–422, 1 dez. 1973.
- HOLM, M. B. et al. Placental release of taurine to both the maternal and fetal circulations in human term pregnancies. *Amino Acids*, v. 50, n. 9, p. 1205–1214, 2018.
- HUANG, J.; PLASS, C.; GERHAUSER, C. Cancer Chemoprevention by Targeting the Epigenome. *Current Drug Targets*, v. 12, n. 13, p. 1925–1956, 1 dez. 2011.
- IBBA, M.; DIETER, S. a Minoacyl - T Rna S Ynthesis. 2000.
- JANSSON, T. Reviews of Placental Amino Acid Transport and Metabolism Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatric Research*, v. 49, n. 2, p. 141–147, 2001.
- JONES, R. L. et al. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*, v. 132, n. 2, p. 217–232, 2006.
- JUNG, Y.-M.; CHOI, M.-J. Relation of Taurine Intake During Pregnancy and Newborns' Growth. In: *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. [s.l.] Diabetes India, 2019. v. 9p. 283–292.
- KANAI, M. et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Molecular Brain*, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2009.
- KARAHODA, R. et al. Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin by human and rat term placenta. *Acta Physiologica*, v. 229, n. 4, p. 1–16, 2020.

- KAY, H. H.; ZHU, S.; TSOI, S. Hypoxia and Lactate Production in Trophoblast Cells. *Placenta*, v. 28, n. 8–9, p. 854–860, 2007.
- KIM, J. Y. et al. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophoblast cell signaling, proliferation, and migration. *Biology of Reproduction*, v. 84, n. 1, p. 62–69, 2011.
- KNABBEN, L.; MUELLER, M. D. Breast cancer and pregnancy. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, v. 32, n. 1, p. 1–7, 2017.
- KNÖFLER, M. et al. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 18, p. 3479–3496, 2019.
- LABUSCHAGNE, C. F. et al. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Reports*, v. 7, n. 4, p. 1248–1258, 2014.
- LAGER, S.; POWELL, T. L. Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of pregnancy*, v. 2012, p. 179827, jan. 2012.
- LAUTAOJA, J. H. et al. Muscle and serum metabolomes are dysregulated in colon-26 tumor-bearing mice despite amelioration of cachexia with activin receptor type 2B ligand blockade. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 316, n. 5, p. E852–E865, 2019.
- LE BELLE, J. E. et al. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, v. 15, n. 1, p. 37–44, 2002.
- LI, F. et al. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids*, v. 41, n. 5, p. 1185–1193, 20 nov. 2011.
- LI, H. X.; ZENG, J. F.; SHEN, K. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 290, n. 6, p. 1067–1078, 2014.
- LIANG, C. et al. Leucine modulates mitochondrial biogenesis and SIRT1-AMPK signaling in C2C12 myotubes. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2014.
- LIESENFELD, D. B. et al. Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 22, n. 12, p. 2182–2201, 2013.
- LIFSHITZ, V.; FRENKEL, D. Tgf-β. *Handbook of Biologically Active Peptides*, p. 1647–1653, 2013.
- LIU, C.-M. et al. Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer gene therapy*, v. 14, n. 12, p. 945–52, 21 dez. 2007.
- LIU, P. J. et al. The relationship between plasma taurine levels in early pregnancy and later gestational diabetes mellitus risk in Chinese pregnant women. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.
- LOIBL, S. et al. Breast cancer diagnosed during pregnancy adapting recent advances in breast cancer care for pregnant patients. *JAMA Oncology*, v. 1, n. 8, p. 1145–1153, 2015.
- LONGO, L. D.; REYNOLDS, L. P. Some historical aspects of understanding placental development, structure and function. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2–3, p. 237–255, 2010.
- LOWE, W. L.; KARBAN, J. Genetics, genomics and metabolomics: new insights into maternal metabolism during pregnancy. *Diabetic Medicine*, v. 31, n. 3, p. 254–262, mar. 2014.

- MA, G. T. et al. Nodal regulates trophoblast differentiation and placental development. *Developmental Biology*, v. 236, n. 1, p. 124–135, 2001.
- MAGGEN, C. et al. Gastric cancer during pregnancy: A report on 13 cases and review of the literature with focus on chemotherapy during pregnancy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 99, n. 1, p. 79–88, 2020.
- MAITRE, L. et al. Maternal urinary metabolic signatures of fetal growth and associated clinical and environmental factors in the INMA study. *BMC Medicine*, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2016.
- MALTEPE, E.; FISHER, S. J. Placenta: The Forgotten Organ. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 31, n. 1, p. 523–552, 2015.
- MARKEE, J. E. Physiology of reproduction. *Annual review of physiology*, v. 13, n. 1, p. 367–96, mar. 1951.
- MARKLEY, J. L. et al. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 43, p. 34–40, 2017.
- MATHESON, H. et al. Morphological and molecular changes in the murine placenta exposed to normobaric hypoxia throughout pregnancy. *Journal of Physiology*, v. 594, n. 5, p. 1371–1388, 2016.
- MCCORMICK, A.; PETERSON, E. Cancer in Pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, v. 45, n. 2, p. 187–200, 2018.
- MEADUS, W. J. A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression *Biological Procedures Online A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated l. n. February 2003*, 2014.
- MILLER, D. S. J.; HILL, C. S. *TGF- β Superfamily Signaling*. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016. v. 3
- MIN, H. Y.; LEE, H. Y. Oncogene-driven metabolic alterations in cancer. *Biomolecules and Therapeutics*, v. 26, n. 1, p. 45–56, 2018.
- MOGAMI, H. et al. Isocaloric high-protein diet as well as branched-chain amino acids supplemented diet partially alleviates adverse consequences of maternal undernutrition on fetal growth. *Growth Hormone and IGF Research*, v. 19, n. 6, p. 478–485, 2009.
- MOLTENI, R. A. Placental growth and fetal/placental weight (F/P) ratios throughout gestation-their relationship to patterns of fetal growth. *Seminars in perinatology*, v. 8, n. 2, p. 94–100, abr. 1984.
- MONSIVAIS, D. et al. Uterine Activin-Like Kinase 4 Regulates Trophoblast Development During Mouse Placentation. *Molecular Endocrinology*, v. 29, n. 12, p. 1684–1693, dez. 2015.
- MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta*, v. 12, n. 1, p. 1–5, 1991.
- NAPSO, T. et al. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. AUG, p. 1–39, 2018.
- NINOMIYA, S. et al. Low Levels of Serum Tryptophan Underlie Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 978, 1 abr. 2020.
- NISHIUMI, S. et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, p. 1–10, 2012.
- NORRIS, M. L. et al. Toddler signaling regulates mesodermal cell migration downstream of

- nodal signaling. *eLife*, v. 6, p. 1–18, 2017.
- ODUNCU, F. S. et al. Cancer in pregnancy: maternal-fetal conflict. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 129, n. 3, p. 133–46, mar. 2003.
- OLIVEIRA, M. DE M. S. et al. Pregnancy and Cancer: Cellular Biology and Mechanisms Affecting the Placenta. *Cancers*, v. 13, n. 7, p. 1667, 1 abr. 2021.
- PANG, Z. et al. *MetaboAnalystR 3 . 0*: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. 2020.
- PINTO, J. et al. Following healthy pregnancy by NMR metabolomics of plasma and correlation to urine. *Journal of Proteome Research*, v. 14, n. 2, p. 1263–1274, 2015.
- RANZIL, S. et al. The relationship between the placental serotonin pathway and fetal growth restriction. *Biochimie*, v. 161, p. 80–87, 2019.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; 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. *J. Nutr.*, v. 123, p. 1939–1951, 1993.
- REINA-CAMPOS, M.; MOSCAT, J.; DIAZ-MECO, M. Metabolism shapes the tumor microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 48, p. 47–53, 2017.
- ROOS, S.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochem Soc Trans*, v. 37, n. Pt 1, p. 295–298, 2009.
- SANTIBAÑEZ, J. F. S.; QUINTANILLA, M.; BERNABEU, C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, v. 121, n. 6, p. 233–251, 2011.
- SCHIER, A. F. Nodal morphogens. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 1, n. 5, p. 1–20, 2009.
- SEDLMAYR, P.; BLASCHITZ, A.; STOCKER, R. The role of placental tryptophan catabolism. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. MAY, p. 1–11, 2014.
- SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Maternal insulin-like growth factors-I and -II act via different pathways to promote fetal growth. *Endocrinology*, v. 147, n. 7, p. 3344–3355, 2006.
- SFERRUZZI-PERRI, A. N.; CAMM, E. J. The programming power of the placenta *Frontiers in Physiology*, 14 mar. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00033/abstract>>
- SHAH, N. et al. Magnetic resonance spectroscopy as an imaging tool for cancer: a review of the literature. *The Journal of the American Osteopathic Association*, v. 106, n. 1, p. 23–27, jan. 2006.
- SHEN, M. M. Nodal signaling: Development roles and regulation. *Development*, v. 134, n. 6, p. 1023–1034, 2007.
- SIRNIÖ, P. et al. Alterations in serum amino-acid profile in the progression of colorectal cancer: associations with systemic inflammation, tumour stage and patient survival. *British Journal of Cancer*, v. 120, n. 2, p. 238–246, 2019.
- SOARES, M. J. et al. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 2, p. 273–284, 1998.
- SRIVASTAVA, S. et al. Taurine - A possible fingerprint biomarker in non-muscle invasive bladder cancer: A pilot study by 1H NMR spectroscopy. *Cancer Biomarkers*, v. 6, n. 1, p. 11–

20, 2009.

STAUD, F.; KARAHODA, R. Trophoblast: The central unit of fetal growth, protection and programming. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 105, n. September, p. 35–40, 2018.

STRULOV SHACHAR, S. et al. Multidisciplinary Management of Breast Cancer During Pregnancy. *The Oncologist*, v. 23, n. 6, p. 746–746, 2018.

SUN, X.; ZEMEL, M. B. Leucine modulation of mitochondrial mass and oxygen consumption in skeletal muscle cells and adipocytes. *Nutrition and Metabolism*, v. 6, p. 1–8, 2009.

TAL, R.; TAYLOR, H. S. *Endocrinology of Pregnancy*. South Dartmouth (MA): [s.n.].

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 26, n. 2, p. 146–151, mar. 2010a.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 26, n. 2, p. 146–151, mar. 2010b.

TOLEDO, M. T.; GOMES-MARCONDES, M. C. Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. *Oncology research*, v. 11, n. 8, p. 359–66, 1999.

TOLEDO, M. T.; GOMES MARCONDES, M. C. C. C. Placental glycogen metabolism changes during walker tumour growth. *Placenta*, v. 25, n. 5, p. 456–462, 2004.

TOLEDO, M. T. T.; VENTRUCCI, G.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. C. Increased oxidative stress in the placenta tissue and cell culture of tumour-bearing pregnant rats. *Placenta*, v. 32, n. 11, p. 859–864, nov. 2011.

TOLEDO, M. T.; VENTRUCCI, G.; GOMES MARCONDES, M. C. C. Cancer during pregnancy alters the activity of rat placenta and enhances the expression of cleaved PARP, cytochrome-c and caspase 3. *BMC Cancer*, v. 6, p. 1–10, 2006.

TU, S. et al. Effect of taurine on cell proliferation and apoptosis human lung cancer A549 cells. *Oncology Letters*, v. 15, n. 4, p. 5473–5480, 2018.

VAN CALSTEREN, K. et al. Cancer during pregnancy: An analysis of 215 patients emphasizing the obstetrical and the Neonatal outcomes. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 4, p. 683–689, 2010.

VIANA, L. R. et al. Leucine-rich diet alters the (1)H-NMR based metabolomic profile without changing the Walker-256 tumour mass in rats. *BMC cancer*, v. 16, n. 1, p. 764, 3 out. 2016.

VIANA, L. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. A leucine-rich diet modulates the tumor-induced down-regulation of the MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways and maintains the expression of the ubiquitin-proteasome pathway in the placental tissue of NMRI mice. *Biology of Reproduction*, v. 92, n. 2, p. 49, fev. 2015.

VIANA, L. R. L. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Leucine-Rich Diet Improves the Serum Amino Acid Profile and Body Composition of Fetuses from Tumor-Bearing Pregnant Mice1. *Biology of Reproduction*, v. 88, n. 5, p. 1–8, 1 maio 2013.

VISSERS, Y. L. J. et al. Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: Evidence for arginine deficiency? *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, n. 5, p. 1142–1146, 2005.

WEISZ, B.; SCHIFF, E.; LISHNER, M. Cancer in pregnancy: Maternal and fetal implications. *Human Reproduction Update*, v. 7, n. 4, p. 384–393, 2001.

- WELJIE, A. M.; JIRIK, F. R. Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: Moving beyond the Warburg effect. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 43, n. 7, p. 981–989, 2011.
- WIGGINS, T. et al. Tyrosine, phenylalanine, and tryptophan in gastroesophageal malignancy: A systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 24, n. 1, p. 32–38, 2015.
- WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*, v. 45, n. 3, p. 407–411, 2013.
- WU, X. et al. Glutamate-glutamine cycle and exchange in the placenta-fetus unit during late pregnancy. *Amino Acids*, v. 47, n. 1, p. 45–53, 2015.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, v. 124, n. 3, p. 471–84, fev. 2006.
- YANG, Q. J. et al. Serum and urine metabolomics study reveals a distinct diagnostic model for cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 9, n. 1, p. 71–85, 2018.
- YPSILANTIS, P. et al. Ultrasonographic diagnosis of pregnancy in rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 48, n. 6, p. 734–739, 2009.
- YUNG, H. W. et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *American Journal of Pathology*, v. 173, n. 2, p. 451–462, 2008.
- ZAGOURI, F. et al. Cancer in pregnancy: Disentangling treatment modalities. *ESMO Open*, v. 1, n. 3, p. 1–6, 1 abr. 2016.
- ZAUGG, J. et al. Counter-directed leucine gradient promotes amino acid transfer across the human placenta. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 96, p. 108760, 2021.
- ZENG, Z.; LIU, F.; LI, S. Metabolic Adaptations in Pregnancy: A Review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 70, n. 1, p. 59–65, 2017.
- ZHANG, S. et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 4–15, 2017.

5. Apêndices

5.1. Produção científica realizada durante o mestrado

- Publicação do artigo “A Time-Course Comparison of Skeletal Muscle Metabolomic Alterations in Walker-256 Tumour-Bearing Rats at Different Stages of Life” no periódico *Metabolites* (fator de impacto 4,932) em 2021. Autores: Gabriela de Matuoka e Chiocchetti, Leisa Lopes-Aguiar, Natália Angelo da Silva Miyaguti, Lais Rosa Viana, Carla de Moraes Salgado, Ophelie Ocean Orvoën, Derli Florindo, Rogério Willians dos Santos, Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes.
- Publicação do artigo “Pregnancy and Cancer: Cellular Biology and Mechanisms Affecting the Placenta.” No periódico *Cancers* (fator de impacto 6,639) em 2021. Autores, Melina De Moraes Santos Oliveira, Carla de Moraes Salgado, Lais Rosa Viana, Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes.
- Capítulo de livro publicado “Cancer during pregnancy. Maternal, placenta, and fetal damage. Nutrition, antioxidant defenses, and adult offspring tumor-bearing” no livro *Cancer* em 2021. Autores: Carla de Moraes Salgado, Natália da Silva Miyaguti, Sarah Christine Pereira de Oliveira, Bianca Cristine Favero-Santos, Lais Rosa Viana, Melina de Moraes Santos Oliveira, Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes

5.2. Material suplementar

Tabela 7. Perfil metabólico de soro materno no momento final da prenhez.

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
2-Aminobutyrate	32,34 ± 17,34	42,91 ± 16,72	22,00 ± 16,76	50,22 ± 23,12
2-Hydroxybutyrate	36,78 ± 19,06	99,53 ± 45,91	18,67 ± 7,11	220,13 ± 122,80
Acetate	195,35 ± 111,34	213,23 ± 151,65	54,33 ± 27,06	121,72 ± 41,47
Acetone	33,50 ± 13,42	3468,15 ± 6418,52	17,00 ± 6,50	1597,53 ± 3130,08
Alanine	1181,54 ± 298,97	1497,74 ± 777,49	823,33 ± 168,48	1546,27 ± 728,19
Allantoin	108,95 ± 77,31	688,84 ± 935,10	95,83 ± 83,51	379,52 ± 234,49
Arginine	333,95 ± 84,45	258,86 ± 118,89	225,17 ± 91,23	296,28 ± 130,93
Asparagine	111,54 ± 32,23	93,31 ± 29,20	69,83 ± 7,91	99,25 ± 45,83
Aspartate	69,35 ± 27,97	66,19 ± 10,60	52,67 ± 22,25	58,15 ± 16,18
Betaine	178,93 ± 82,74	349,41 ± 387,48	84,83 ± 26,28	317,32 ± 187,83
Choline	58,80 ± 13,29	63,24 ± 26,00	53,33 ± 10,98	65,55 ± 9,90
Citrate	678,49 ± 236,60	676,51 ± 247,09	345,67 ± 38,92	674,98 ± 259,96
Creatine	383,74 ± 131,00	615,84 ± 427,46	209,17 ± 38,93	854,48 ± 347,17
Creatinine	53,70 ± 9,41	63,53 ± 37,70	33,50 ± 14,55	57,92 ± 9,62
Dimethylamine	6,21 ± 2,57	12,33 ± 8,12	4,67 ± 1,76	10,18 ± 4,33
Formate	108,51 ± 80,22	113,46 ± 16,02	57,33 ± 5,39	183,85 ± 81,62
Fumarate	12,18 ± 5,19	6,46 ± 4,49	8,67 ± 7,65	7,10 ± 1,56
Glucose	5591,29 ± 1293,98	5708,73 ± 2543,65	3299,33 ± 547,75	4495,35 ± 3102,90
Glutamate	373,95 ± 114,17	342,48 ± 71,77	257,17 ± 33,13	342,18 ± 99,48
Glutamine	1107,81 ± 241,11	723,58 ± 263,74	820,17 ± 188,16	656,03 ± 246,70
Glycerol	1747,51 ± 711,25	2095,59 ± 1258,41	1418,33 ± 317,52	1737,67 ± 518,68
Glycine	232,54 ± 48,08	360,84 ± 165,04	121,00 ± 17,02	450,43 ± 85,53
Histidine	85,90 ± 11,15	114,74 ± 59,83	103,50 ± 66,50	112,02 ± 23,33
Isoleucine	152,53 ± 49,88	163,14 ± 44,73	69,50 ± 17,54	108,25 ± 41,36
Lactate	21877,99 ± 6128,38	18823,59 ± 5263,38	16244,50 ± 4301,39	28502,92 ± 8837,77
Leucine	222,58 ± 42,47	246,24 ± 46,60	279,17 ± 36,75	251,77 ± 53,39
Lysine	1411,78 ± 403,08	1178,18 ± 321,21	1024,50 ± 318,26	1555,07 ± 498,32
Methionine	121,06 ± 50,45	137,78 ± 43,64	60,67 ± 21,83	106,20 ± 29,08
Pantothenate	15,13 ± 10,10	18,58 ± 8,42	8,00 ± 1,80	17,58 ± 5,32
Phenylalanine	106,59 ± 19,06	143,35 ± 14,16	81,00 ± 11,72	141,50 ± 39,90
Proline	410,65 ± 134,48	525,93 ± 292,05	294,00 ± 59,09	454,45 ± 178,46
Pyruvate	280,68 ± 175,52	304,54 ± 157,20	296,33 ± 143,58	392,12 ± 115,40
Serine	427,05 ± 64,78	356,60 ± 107,44	259,17 ± 105,40	278,27 ± 108,52
Succinate	228,51 ± 84,03	201,15 ± 128,59	188,67 ± 40,57	357,88 ± 298,11
Taurine	935,30 ± 187,56	653,58 ± 181,44	717,00 ± 176,24	868,13 ± 154,45
Threonine	773,69 ± 213,13	570,56 ± 306,03	409,83 ± 72,71	350,80 ± 208,05
Tryptophan	11,10 ± 9,34	41,28 ± 19,79	4,67 ± 4,04	44,68 ± 17,87
Tyrosine	107,76 ± 17,79	164,75 ± 61,44	84,33 ± 14,01	165,20 ± 62,32
Uracil	24,36 ± 8,27	38,66 ± 8,85	20,00 ± 18,87	56,20 ± 17,61
Urea	2145,81 ± 429,16	5123,94 ± 5620,26	1065,67 ± 1568,70	2707,62 ± 1013,77
Valine	326,24 ± 113,42	312,13 ± 77,96	172,33 ± 29,86	205,72 ± 66,79
myo-Inositol	232,14 ± 77,93	473,43 ± 383,27	128,67 ± 21,94	434,25 ± 138,61
π -Methylhistidine	10,95 ± 11,89	38,16 ± 32,05	0,00 ± 0,00	57,45 ± 38,30

Resultados apresentados como média ($\mu\text{M/mL}$) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 8. Perfil metabólico de placenta no momento final da prenhez

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
ADP	0,021 ± 0,020	0,033 ± 0,042	0,045 ± 0,037	0,048 ± 0,056
AMP	0,099 ± 0,150	0,075 ± 0,109	0,120 ± 0,118	0,084 ± 0,104
ATP	0,015 ± 0,014	0,019 ± 0,026	0,018 ± 0,010	0,031 ± 0,028
Acetate	0,235 ± 0,080	0,261 ± 0,112	0,205 ± 0,076	0,366 ± 0,180
Adenine	0,579 ± 0,242	0,499 ± 0,135	0,347 ± 0,092	0,481 ± 0,100
Adenosine	0,296 ± 0,121	0,226 ± 0,162	0,311 ± 0,137	0,296 ± 0,202
Alanine	1,676 ± 0,347	2,501 ± 1,347	1,580 ± 0,491	2,426 ± 1,173
Asparagine	0,404 ± 0,111	0,386 ± 0,139	0,291 ± 0,057	0,438 ± 0,117
Aspartate	1,091 ± 0,358	1,085 ± 0,901	1,016 ± 0,240	1,070 ± 0,893
Betaine	4,601 ± 2,012	4,289 ± 3,718	5,973 ± 3,460	5,113 ± 4,123
Carnitine	0,313 ± 0,128	0,385 ± 0,195	0,354 ± 0,182	0,399 ± 0,282
Choline	0,651 ± 0,278	0,526 ± 0,168	0,583 ± 0,135	0,593 ± 0,240
Creatine	0,673 ± 0,297	1,212 ± 0,987	0,387 ± 0,132	0,978 ± 0,826
Formate	0,139 ± 0,097	0,207 ± 0,149	0,190 ± 0,151	0,238 ± 0,139
Fumarate	0,027 ± 0,010	0,037 ± 0,016	0,025 ± 0,008	0,043 ± 0,026
GTP	0,019 ± 0,027	0,011 ± 0,010	0,017 ± 0,008	0,019 ± 0,015
Glucose	1,227 ± 0,913	0,693 ± 0,286	0,499 ± 0,328	0,686 ± 0,362
Glucose-6-phosphate	0,314 ± 0,170	0,166 ± 0,068	0,159 ± 0,058	0,221 ± 0,094
Glutamate	2,686 ± 0,687	2,570 ± 1,641	2,357 ± 0,851	2,947 ± 1,954
Glutamine	1,431 ± 0,362	1,443 ± 0,556	1,141 ± 0,318	1,653 ± 1,086
Glycine	1,196 ± 0,397	1,401 ± 0,549	0,858 ± 0,166	1,475 ± 0,585
Guanidoacetate	0,305 ± 0,115	0,238 ± 0,202	0,290 ± 0,109	0,227 ± 0,145
Guanosine	0,037 ± 0,031	0,032 ± 0,041	0,053 ± 0,029	0,061 ± 0,066
Histidine	0,059 ± 0,019	0,071 ± 0,033	0,041 ± 0,013	0,063 ± 0,026
IMP	0,035 ± 0,022	0,021 ± 0,015	0,032 ± 0,013	0,023 ± 0,016
Inosine	0,301 ± 0,135	0,271 ± 0,207	0,339 ± 0,149	0,363 ± 0,275
Isoleucine	0,199 ± 0,061	0,231 ± 0,093	0,137 ± 0,031	0,218 ± 0,088
Lactate	12,108 ± 1,869	17,587 ± 10,695	12,880 ± 5,584	19,307 ± 12,906
Leucine	0,466 ± 0,177	0,486 ± 0,202	0,549 ± 0,151	0,713 ± 0,274
Lysine	0,811 ± 0,199	0,846 ± 0,342	0,800 ± 0,290	1,266 ± 0,597
Methionine	0,176 ± 0,049	0,136 ± 0,040	0,140 ± 0,043	0,184 ± 0,057
NADP+	0,031 ± 0,036	0,030 ± 0,043	0,043 ± 0,031	0,043 ± 0,041
Nicotinurate	0,117 ± 0,036	0,123 ± 0,045	0,093 ± 0,015	0,116 ± 0,053
O-Phosphocholine	0,389 ± 0,174	0,415 ± 0,359	0,504 ± 0,277	0,423 ± 0,331
O-Phosphoethanolamine	1,427 ± 0,536	1,528 ± 0,993	1,462 ± 0,710	1,826 ± 1,348
Pantothenate	0,060 ± 0,031	0,048 ± 0,042	0,021 ± 0,008	0,027 ± 0,014
Phenylalanine	0,264 ± 0,085	0,297 ± 0,125	0,198 ± 0,040	0,340 ± 0,133
Proline	0,623 ± 0,155	0,660 ± 0,244	0,560 ± 0,216	0,756 ± 0,394
Pyruvate	0,040 ± 0,019	0,038 ± 0,019	0,030 ± 0,007	0,041 ± 0,015
Serine	0,949 ± 0,323	0,922 ± 0,314	0,827 ± 0,195	1,208 ± 0,423
Succinate	0,215 ± 0,071	0,267 ± 0,285	0,272 ± 0,168	0,419 ± 0,381
Taurine	3,251 ± 0,836	3,321 ± 1,299	3,072 ± 0,803	3,664 ± 1,824
Threonine	0,850 ± 0,210	0,783 ± 0,337	0,726 ± 0,196	0,910 ± 0,390
Tryptophan	0,078 ± 0,024	0,088 ± 0,036	0,065 ± 0,020	0,101 ± 0,043
Tyrosine	0,246 ± 0,073	0,291 ± 0,132	0,191 ± 0,055	0,357 ± 0,201
UDP-glucose	0,086 ± 0,083	0,101 ± 0,132	0,115 ± 0,075	0,133 ± 0,137
UMP	0,030 ± 0,041	0,027 ± 0,038	0,046 ± 0,036	0,038 ± 0,049
Uracil	0,266 ± 0,144	0,291 ± 0,063	0,185 ± 0,086	0,249 ± 0,066
Uridine	0,142 ± 0,076	0,123 ± 0,058	0,135 ± 0,050	0,134 ± 0,071
Valine	0,429 ± 0,110	0,504 ± 0,219	0,335 ± 0,086	0,486 ± 0,200
myo-Inositol	0,796 ± 0,302	1,090 ± 0,849	0,559 ± 0,245	1,078 ± 0,696
Methylhistidine	0,024 ± 0,015	0,039 ± 0,034	0,013 ± 0,007	0,026 ± 0,013

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 9. Perfil metabólico de placenta com 12 dias de prenhez

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
ADP	4,42 ± 0,94	6,04 ± 5,01	4,59 ± 1,54	5,78 ± 2,47
AMP	7,58 ± 2,71	20,53 ± 19,01	9,02 ± 6,31	25,12 ± 18,74
ATP	2,19 ± 0,62	3,42 ± 1,06	1,58 ± 0,60	3,70 ± 2,89
Acetate	51,20 ± 16,97	43,91 ± 20,43	40,73 ± 22,90	62,58 ± 38,76
Adenine	47,30 ± 11,70	42,43 ± 4,80	24,81 ± 3,72	33,19 ± 18,47
Adenosine	2,42 ± 1,05	1,51 ± 0,82	5,57 ± 8,52	1,65 ± 1,05
Alanine	209,39 ± 44,62	312,37 ± 121,83	153,91 ± 24,13	261,24 ± 134,76
Asparagine	41,14 ± 5,17	42,02 ± 11,81	21,94 ± 11,76	32,90 ± 16,45
Aspartate	183,44 ± 46,92	298,20 ± 113,44	138,25 ± 36,47	221,64 ± 126,84
Betaine	665,08 ± 182,26	842,76 ± 274,81	337,06 ± 128,44	542,19 ± 362,87
Carnitine	43,96 ± 10,54	49,91 ± 11,30	22,59 ± 3,26	23,35 ± 14,05
Choline	69,31 ± 4,00	76,99 ± 12,33	64,03 ± 10,89	77,62 ± 36,20
Creatine	315,19 ± 146,15	297,95 ± 98,87	60,60 ± 25,65	118,40 ± 73,85
Ethanolamine	57,03 ± 13,58	54,99 ± 26,95	63,83 ± 42,24	57,43 ± 23,37
Formate	27,05 ± 14,24	54,14 ± 52,74	27,11 ± 22,26	56,00 ± 26,57
Fumarate	6,37 ± 2,77	5,72 ± 1,33	3,69 ± 0,51	6,21 ± 2,53
GTP	2,59 ± 1,26	2,14 ± 1,62	3,63 ± 3,24	1,69 ± 0,99
Glucose	42,98 ± 18,87	44,68 ± 35,55	61,10 ± 25,10	27,90 ± 22,83
Glutamate	302,13 ± 50,25	446,81 ± 164,46	214,45 ± 24,41	338,11 ± 171,88
Glutamine	101,52 ± 30,76	111,67 ± 40,77	86,94 ± 57,66	95,77 ± 45,56
Glycine	140,43 ± 16,44	210,56 ± 130,29	80,40 ± 20,42	121,21 ± 59,22
Guanidoacetate	123,20 ± 66,57	73,86 ± 12,12	24,88 ± 14,90	45,62 ± 24,58
Guanosine	3,84 ± 1,25	5,96 ± 2,32	6,18 ± 4,51	4,47 ± 2,27
Histidine	21,21 ± 2,93	22,58 ± 9,25	3,54 ± 0,53	16,85 ± 8,57
IMP	3,09 ± 1,04	2,71 ± 0,39	2,34 ± 0,74	3,00 ± 1,46
Inosine	55,33 ± 3,71	60,65 ± 16,64	35,21 ± 5,36	50,69 ± 27,30
Isoleucine	27,28 ± 5,11	33,08 ± 14,29	11,48 ± 5,00	24,26 ± 12,03
Lactate	1549,20 ± 310,85	2995,28 ± 1655,41	1150,94 ± 305,25	2168,96 ± 1252,20
Leucine	58,16 ± 9,96	68,58 ± 32,14	43,28 ± 15,04	72,94 ± 36,65
Lysine	87,91 ± 3,54	111,79 ± 41,66	91,62 ± 42,66	118,02 ± 61,25
Methionine	22,12 ± 1,98	18,15 ± 4,48	15,54 ± 7,15	12,19 ± 7,58
NAD+	2,26 ± 0,46	6,53 ± 6,70	4,17 ± 4,27	6,73 ± 3,52
Nicotinurate	13,15 ± 1,20	14,33 ± 2,07	8,55 ± 1,37	13,25 ± 8,74
O-Phosphocholine	64,60 ± 7,55	105,87 ± 52,85	35,16 ± 10,65	92,47 ± 50,07
O-Phosphoethanolamine	213,53 ± 36,91	254,54 ± 84,61	98,18 ± 33,23	207,82 ± 122,40
Phenylalanine	27,10 ± 4,17	41,87 ± 19,09	17,22 ± 6,46	31,69 ± 16,71
Proline	70,08 ± 13,17	91,38 ± 30,65	49,06 ± 13,04	86,73 ± 40,84
Pyruvate	7,65 ± 2,07	6,22 ± 1,39	3,65 ± 0,63	4,31 ± 1,56
Serine	61,17 ± 12,67	89,50 ± 25,92	65,51 ± 26,65	69,07 ± 34,26
Succinate	32,75 ± 7,49	60,86 ± 41,29	22,00 ± 5,53	53,56 ± 33,73
Taurine	314,48 ± 36,91	385,17 ± 145,09	261,72 ± 17,72	324,63 ± 209,50
Threonine	59,93 ± 11,99	98,33 ± 25,05	49,38 ± 16,20	74,80 ± 34,47
Tryptophan	10,76 ± 1,68	14,89 ± 6,99	6,27 ± 2,71	9,35 ± 4,73
Tyrosine	27,76 ± 8,51	38,32 ± 20,80	17,59 ± 4,41	32,06 ± 17,28
UDP-glucose	8,97 ± 2,62	24,38 ± 12,52	11,52 ± 4,08	21,05 ± 14,35
UMP	8,25 ± 2,80	6,63 ± 2,09	8,31 ± 4,13	8,05 ± 4,71
Uracil	25,13 ± 6,05	35,97 ± 5,57	11,98 ± 5,92	26,31 ± 14,80
Uridine	34,18 ± 11,37	17,95 ± 7,90	14,80 ± 4,13	12,09 ± 5,96
Valine	60,14 ± 13,06	72,36 ± 34,68	32,42 ± 10,97	63,53 ± 30,51

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 10. Perfil metabólico de placenta com 16 dias de prenhez

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
ADP	4,71 ± 2,62	10,465 ± 0,183	5,068 ± 1,070	10,80 ± 2,85
AMP	7,06 ± 5,68	29,773 ± 9,261	17,000 ± 2,566	24,44 ± 4,54
ATP	2,28 ± 1,28	3,534 ± 0,325	1,375 ± 0,151	3,05 ± 0,55
Acetate	37,95 ± 23,85	53,905 ± 0,600	22,655 ± 2,581	53,47 ± 13,81
Adenine	41,07 ± 11,30	40,436 ± 7,729	15,245 ± 1,354	33,10 ± 4,50
Adenosine	2,13 ± 0,80	0,817 ± 0,261	1,413 ± 0,479	2,80 ± 1,23
Alanine	185,69 ± 23,32	300,795 ± 11,452	120,723 ± 32,515	288,00 ± 45,92
Asparagine	37,92 ± 10,79	38,749 ± 8,647	17,618 ± 4,258	33,96 ± 7,46
Aspartate	158,13 ± 50,73	280,606 ± 8,168	113,737 ± 51,787	170,36 ± 100,68
Betaine	701,85 ± 312,97	787,046 ± 222,816	378,902 ± 90,450	640,56 ± 299,46
Carnitine	42,04 ± 12,78	47,354 ± 5,187	19,948 ± 3,154	47,47 ± 17,13
Choline	61,64 ± 9,38	66,300 ± 8,738	41,912 ± 10,292	61,92 ± 13,71
Creatine	156,88 ± 128,46	178,933 ± 4,467	38,258 ± 20,149	125,35 ± 51,81
Ethanolamine	62,85 ± 25,03	44,600 ± 1,391	34,033 ± 12,622	72,31 ± 32,70
Formate	21,15 ± 14,49	38,831 ± 0,314	16,249 ± 1,044	32,34 ± 7,91
Fumarate	4,69 ± 2,73	3,870 ± 0,285	2,122 ± 1,300	4,19 ± 1,37
GTP	1,68 ± 0,74	3,701 ± 0,493	1,900 ± 0,519	3,82 ± 0,61
Glucose	52,71 ± 42,06	36,288 ± 0,810	24,037 ± 5,100	25,08 ± 12,55
Glutamate	312,94 ± 70,86	538,466 ± 68,505	222,582 ± 72,242	395,23 ± 88,40
Glutamine	112,39 ± 25,45	159,144 ± 27,622	74,839 ± 13,506	150,05 ± 40,91
Glycine	118,03 ± 27,61	184,800 ± 13,302	72,244 ± 14,097	142,42 ± 40,64
Guanidoacetate	40,84 ± 19,15	64,278 ± 10,226	18,938 ± 16,609	41,74 ± 22,37
Guanosine	7,82 ± 4,50	6,431 ± 1,374	3,200 ± 0,535	7,43 ± 3,36
Histidine	15,06 ± 3,02	17,424 ± 2,406	4,551 ± 1,863	11,67 ± 5,42
IMP	3,62 ± 1,78	3,536 ± 0,287	1,801 ± 0,554	3,76 ± 0,73
Inosine	65,41 ± 21,97	79,439 ± 12,003	31,965 ± 3,038	64,60 ± 19,58
Isoleucine	21,21 ± 3,72	30,316 ± 4,855	11,489 ± 4,671	19,12 ± 5,60
Lactate	1515,37 ± 364,93	3016,987 ± 91,409	1192,166 ± 411,634	2259,04 ± 374,47
Leucine	47,05 ± 9,32	70,427 ± 11,773	30,897 ± 9,134	61,24 ± 12,99
Lysine	86,52 ± 20,18	129,819 ± 11,468	76,193 ± 22,551	150,51 ± 31,55
Methionine	18,38 ± 4,25	20,897 ± 5,002	10,931 ± 2,611	18,22 ± 1,74
NAD+	4,80 ± 2,27	13,125 ± 3,008	4,589 ± 0,883	10,27 ± 2,75
Nicotinurate	11,85 ± 2,35	12,598 ± 2,978	5,684 ± 1,517	11,25 ± 1,29
O-Phosphocholine	46,22 ± 13,47	70,065 ± 12,474	32,055 ± 2,855	53,10 ± 16,86
O-Phosphoethanolamine	194,01 ± 18,33	252,075 ± 7,400	109,925 ± 28,017	261,43 ± 49,45
Phenylalanine	25,99 ± 5,62	33,133 ± 4,843	16,414 ± 2,810	29,14 ± 7,80
Proline	69,32 ± 6,92	75,898 ± 7,457	34,066 ± 16,436	99,94 ± 14,82
Pyruvate	5,27 ± 2,25	3,586 ± 0,033	2,198 ± 0,680	3,95 ± 1,37
Serine	79,94 ± 38,78	113,262 ± 20,183	49,947 ± 12,020	97,22 ± 14,73
Succinate	27,58 ± 13,68	68,878 ± 0,105	26,158 ± 10,330	57,27 ± 12,44
Taurine	335,34 ± 46,43	405,940 ± 47,258	229,825 ± 42,955	424,91 ± 53,94
Threonine	65,52 ± 28,18	99,776 ± 7,250	45,921 ± 17,999	97,83 ± 28,99
Tryptophan	8,88 ± 2,78	11,991 ± 0,663	6,301 ± 1,142	10,64 ± 2,48
Tyrosine	21,90 ± 4,35	31,168 ± 3,606	14,922 ± 2,290	35,66 ± 24,58
UDP-glucose	12,59 ± 8,37	28,562 ± 0,674	10,869 ± 4,473	21,69 ± 7,05
UMP	5,71 ± 2,80	12,798 ± 4,884	7,067 ± 1,647	10,75 ± 4,31
Uracil	21,23 ± 6,20	34,699 ± 5,687	12,082 ± 5,258	24,47 ± 4,67
Uridine	25,47 ± 9,52	12,544 ± 0,511	6,521 ± 0,727	13,63 ± 6,95
Valine	47,67 ± 8,60	69,176 ± 9,847	29,745 ± 8,722	44,79 ± 8,88

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 11. Perfil metabólico de placenta com 19 dias de prenhez

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
ADP	3,74 ± 1,52	8,21 ± 1,42	10,38 ± 2,87	9,32 ± 4,56
AMP	10,36 ± 9,98	15,07 ± 6,76	25,35 ± 6,06	13,23 ± 7,78
ATP	2,26 ± 1,24	4,89 ± 1,15	2,24 ± 0,45	5,03 ± 1,19
Acetate	25,88 ± 10,93	30,74 ± 11,92	30,82 ± 1,55	48,79 ± 12,32
Adenine	46,47 ± 32,37	48,69 ± 7,19	33,08 ± 2,22	54,12 ± 11,05
Adenosine	2,10 ± 1,95	1,106 ± 0,25	2,16 ± 0,91	2,08 ± 1,48
Alanine	173,33 ± 35,04	298,70 ± 32,83	207,04 ± 8,19	355,55 ± 62,08
Asparagine	31,45 ± 4,63	47,63 ± 4,52	30,13 ± 3,67	49,17 ± 15,82
Aspartate	130,65 ± 16,83	181,087 ± 74,12	118,3 ± 10,45	164,69 ± 104,11
Betaine	629,29 ± 123,39	836,78 ± 52,24	1002,14 ± 249,17	856,14 ± 363,60
Carnitine	40,62 ± 13,89	62,41 ± 2,89	58,36 ± 12,48	63,98 ± 25,35
Choline	69,18 ± 33,76	66,43 ± 6,06	72,37 ± 5,20	77,92 ± 23,92
Creatine	94,25 ± 21,94	228,82 ± 30,76	44,35 ± 10,44	147,02 ± 63,84
Ethanolamine	52,48 ± 32,45	50,11 ± 2,00	50,21 ± 5,31	121,79 ± 43,97
Formate	19,80 ± 12,08	32,63 ± 8,75	40,79 ± 0,94	35,23 ± 5,55
Fumarate	3,07 ± 1,03	5,07 ± 1,27	2,45 ± 0,03	6,45 ± 2,27
GTP	1,80 ± 0,70	1,93 ± 0,51	2,92 ± 0,77	3,01 ± 1,40
Glucose	79,75 ± 61,80	39,97 ± 9,87	9,78 ± 0,58	40,88 ± 15,49
Glutamate	301,62 ± 23,94	477,35 ± 42,17	305,70 ± 24,62	415,41 ± 172,09
Glutamine	119,48 ± 16,01	163,31 ± 0,24	113,19 ± 2,77	218,92 ± 91,68
Glycine	104,88 ± 30,37	179,22 ± 24,55	92,14 ± 1,37	187,09 ± 32,70
Guanidoacetate	38,59 ± 11,82	49,30 ± 8,37	29,96 ± 11,78	33,82 ± 16,51
Guanosine	6,40 ± 1,77	8,00 ± 2,56	7,51 ± 0,96	12,08 ± 4,87
Histidine	9,37 ± 2,04	17,65 ± 4,06	4,85 ± 0,20	13,48 ± 7,47
IMP	4,88 ± 1,73	3,36 ± 0,15	2,96 ± 1,08	2,72 ± 1,06
Inosine	60,74 ± 11,35	72,55 ± 10,69	65,06 ± 2,07	85,41 ± 23,97
Isoleucine	18,31 ± 5,66	31,59 ± 1,54	16,98 ± 0,47	25,36 ± 7,57
Lactate	1334,19 ± 186,61	2944,76 ± 256,15	2028,61 ± 6,68	2990,36 ± 604,55
Leucine	40,36 ± 15,04	70,162 ± 2,42	63,74 ± 0,01	87,27 ± 28,58
Lysine	80,95 ± 11,01	120,773 ± 20,76	113,79 ± 5,32	188,66 ± 41,74
Methionine	17,16 ± 6,03	14,840 ± 3,12	16,69 ± 0,73	21,93 ± 7,50
NAD+	4,34 ± 3,47	8,45 ± 1,50	7,05 ± 0,99	7,82 ± 2,57
Nicotinurate	11,08 ± 4,03	13,27 ± 0,54	10,32 ± 0,36	15,36 ± 3,90
O-Phosphocholine	51,22 ± 14,12	82,74 ± 12,39	82,81 ± 14,28	66,73 ± 27,76
O-Phosphoethanolamine	170,15 ± 32,10	243,81 ± 6,94	216,79 ± 22,98	276,75 ± 99,94
Phenylalanine	22,83 ± 7,06	39,71 ± 1,27	22,29 ± 0,88	39,06 ± 9,69
Proline	52,18 ± 8,62	63,56 ± 7,95	81,73 ± 18,24	97,20 ± 28,45
Pyruvate	4,22 ± 0,85	3,94 ± 0,61	1,93 ± 1,15	5,02 ± 1,78
Serine	80,58 ± 26,03	94,32 ± 1,54	85,87 ± 2,36	138,57 ± 29,36
Succinate	27,01 ± 2,04	60,42 ± 4,97	47,869 ± 1,19	65,38 ± 21,56
Taurine	311,96 ± 54,21	499,48 ± 36,36	406,638 ± 60,48	525,63 ± 18,39
Threonine	79,16 ± 23,73	87,85 ± 1,50	66,637 ± 0,04	119,28 ± 26,68
Tryptophan	7,26 ± 2,85	12,04 ± 0,04	8,895 ± 0,11	13,03 ± 1,73
Tyrosine	18,62 ± 7,38	34,52 ± 0,59	22,117 ± 1,11	39,53 ± 14,96
UDP-glucose	12,38 ± 7,95	23,73 ± 7,45	18,140 ± 3,73	25,15 ± 9,06
UMP	5,76 ± 4,22	7,17 ± 2,29	7,781 ± 1,677	7,68 ± 5,87
Uracil	22,02 ± 13,45	30,14 ± 1,85	22,381 ± 1,575	29,56 ± 9,02
Uridine	17,00 ± 8,38	14,60 ± 1,65	14,420 ± 2,010	19,58 ± 5,86
Valine	40,19 ± 10,65	70,39 ± 4,37	42,166 ± 0,720	58,42 ± 17,14

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 12. Perfil metabólico de feto com 12 dias de prenhez

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Acetate	0,56 ± 0,17	0,716 ± 0,280	0,462 ± 0,100	0,52 ± 0,24
Adenine	0,28 ± 0,01	0,374 ± 0,071	0,137 ± 0,075	0,19 ± 0,09
Adenosine	0,16 ± 0,02	0,147 ± 0,136	0,090 ± 0,093	0,05 ± 0,02
ADP	0,14 ± 0,01	0,172 ± 0,086	0,260 ± 0,038	0,21 ± 0,08
Alanine	3,72 ± 0,10	5,961 ± 2,652	3,772 ± 0,660	4,43 ± 1,34
AMP	0,45 ± 0,05	0,580 ± 0,212	0,478 ± 0,054	0,43 ± 0,14
Ascorbate	0,37 ± 0,19	0,423 ± 0,302	0,173 ± 0,132	0,08 ± 0,03
Aspartate	1,29 ± 0,23	1,591 ± 0,796	1,045 ± 0,160	0,73 ± 0,22
ATP	0,12 ± 0,05	0,074 ± 0,029	0,165 ± 0,119	0,09 ± 0,06
Betaine	0,82 ± 0,46	3,720 ± 5,443	0,341 ± 0,155	0,55 ± 0,61
Carnitine	0,10 ± 0,03	0,263 ± 0,247	0,104 ± 0,015	0,12 ± 0,08
Choline	0,50 ± 0,10	0,607 ± 0,219	0,269 ± 0,147	0,39 ± 0,17
Creatine	1,34 ± 0,06	2,460 ± 1,096	1,426 ± 0,201	1,11 ± 0,29
Ethanolamine	0,50 ± 0,02	0,436 ± 0,035	0,324 ± 0,039	0,29 ± 0,06
Ethylene glycol	0,06 ± 0,04	0,080 ± 0,031	0,047 ± 0,018	0,07 ± 0,02
Formate	0,49 ± 0,13	0,643 ± 0,173	0,354 ± 0,058	0,57 ± 0,21
Fumarate	0,05 ± 0,03	0,065 ± 0,012	0,044 ± 0,000	0,05 ± 0,02
Glucose	0,19 ± 0,00	0,155 ± 0,080	0,476 ± 0,092	0,17 ± 0,15
Glutamate	5,61 ± 0,02	6,689 ± 1,896	6,385 ± 0,711	4,22 ± 1,10
Glutamine	1,89 ± 0,20	2,412 ± 0,783	2,215 ± 0,279	1,67 ± 0,45
Glycine	1,66 ± 0,12	2,184 ± 0,562	1,574 ± 0,465	1,37 ± 0,50
GTP	0,04 ± 0,03	0,044 ± 0,017	0,074 ± 0,015	0,04 ± 0,01
Guanosine	0,02 ± 0,02	0,028 ± 0,019	0,032 ± 0,021	0,01 ± 0,00
Histidine	0,23 ± 0,01	0,238 ± 0,171	0,069 ± 0,033	0,20 ± 0,05
IMP	0,18 ± 0,05	0,059 ± 0,047	0,182 ± 0,140	0,04 ± 0,01
Inosine	0,18 ± 0,04	0,186 ± 0,179	0,111 ± 0,111	0,08 ± 0,02
Isoleucine	0,22 ± 0,00	0,399 ± 0,060	0,128 ± 0,017	0,21 ± 0,06
Lactate	15,25 ± 0,21	29,871 ± 2,881	14,076 ± 1,191	19,48 ± 5,59
Leucine	0,47 ± 0,08	0,832 ± 0,134	0,544 ± 0,090	0,73 ± 0,14
Lysine	1,17 ± 0,13	1,632 ± 0,169	1,298 ± 0,104	1,42 ± 0,22
Maltose	0,15 ± 0,07	0,114 ± 0,053	0,169 ± 0,118	0,08 ± 0,04
Methionine	0,21 ± 0,03	0,172 ± 0,045	0,150 ± 0,027	0,11 ± 0,04
Methylsuccinate	0,07 ± 0,01	0,111 ± 0,025	0,096 ± 0,023	0,10 ± 0,02
myo-Inositol	1,89 ± 0,16	2,100 ± 0,490	1,832 ± 0,565	1,23 ± 0,56
NADP+	0,00 ± 0,00	0,093 ± 0,040	0,034 ± 0,008	0,07 ± 0,02
Nicotinurate	0,13 ± 0,03	0,130 ± 0,072	0,095 ± 0,031	0,07 ± 0,01
O-Phosphocholine	1,70 ± 0,08	2,033 ± 0,792	1,685 ± 0,830	1,70 ± 0,61
O-Phosphoethanolamine	1,60 ± 0,51	2,134 ± 0,143	1,532 ± 0,436	1,52 ± 0,63
Pantothenate	0,09 ± 0,02	0,126 ± 0,066	0,054 ± 0,027	0,05 ± 0,03
Phenylalanine	0,32 ± 0,02	0,518 ± 0,096	0,252 ± 0,038	0,29 ± 0,05
Serine	0,87 ± 0,02	1,188 ± 0,350	0,986 ± 0,256	0,82 ± 0,21
Succinate	0,48 ± 0,04	1,002 ± 0,315	0,375 ± 0,044	0,58 ± 0,26
Taurine	5,09 ± 0,56	5,279 ± 1,472	5,236 ± 1,427	4,39 ± 1,49
Threonine	1,02 ± 0,14	1,409 ± 0,339	1,245 ± 0,229	1,00 ± 0,19
Tryptophan	0,10 ± 0,02	0,152 ± 0,015	0,092 ± 0,017	0,06 ± 0,01
Tyrosine	0,37 ± 0,07	0,570 ± 0,086	0,277 ± 0,068	0,33 ± 0,04
UDP-glucose	0,20 ± 0,01	0,288 ± 0,060	0,162 ± 0,073	0,21 ± 0,05
UMP	0,43 ± 0,02	0,123 ± 0,018	0,425 ± 0,036	0,13 ± 0,02
Uracil	0,09 ± 0,02	0,268 ± 0,027	0,022 ± 0,023	0,15 ± 0,07
Uridine	0,14 ± 0,00	0,187 ± 0,010	0,075 ± 0,048	0,13 ± 0,05
Valine	0,64 ± 0,08	1,050 ± 0,196	0,463 ± 0,080	0,69 ± 0,15
m-Methylhistidine	0,01 ± 0,01	0,125 ± 0,166	0,019 ± 0,005	0,02 ± 0,01

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 13. Perfil metabólico de feto com 16 dias de prenhez

	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Acetate	0,220 ± 0,166	0,590 ± 0,001	0,272 ± 0,160	0,600 ± 0,108
Adenine	0,123 ± 0,056	0,265 ± 0,051	0,097 ± 0,062	0,183 ± 0,116
Adenosine	0,098 ± 0,029	0,077 ± 0,020	0,040 ± 0,016	0,066 ± 0,024
ADP	0,089 ± 0,070	0,402 ± 0,010	0,227 ± 0,234	0,331 ± 0,213
Alanine	2,359 ± 0,343	4,992 ± 0,188	2,463 ± 1,430	4,967 ± 0,270
AMP	0,291 ± 0,102	0,794 ± 0,006	0,269 ± 0,111	0,564 ± 0,139
Ascorbate	0,570 ± 0,365	1,002 ± 0,112	0,227 ± 0,076	0,171 ± 0,046
Aspartate	0,572 ± 0,144	1,256 ± 0,124	0,626 ± 0,475	1,067 ± 0,484
ATP	0,149 ± 0,081	0,183 ± 0,016	0,136 ± 0,175	0,171 ± 0,100
Betaine	0,203 ± 0,086	0,357 ± 0,098	0,205 ± 0,127	0,302 ± 0,100
Carnitine	0,154 ± 0,111	0,139 ± 0,047	0,075 ± 0,006	0,144 ± 0,039
Choline	0,302 ± 0,089	0,355 ± 0,010	0,194 ± 0,099	0,262 ± 0,125
Creatine	6,844 ± 6,410	1,960 ± 0,086	0,991 ± 0,271	1,771 ± 0,425
Ethanolamine	0,136 ± 0,110	0,295 ± 0,016	0,211 ± 0,095	0,386 ± 0,038
Ethylene glycol	0,350 ± 0,252	0,052 ± 0,003	0,026 ± 0,014	0,058 ± 0,002
Formate	0,175 ± 0,171	0,434 ± 0,030	0,258 ± 0,108	0,386 ± 0,024
Fumarate	0,046 ± 0,031	0,073 ± 0,005	0,025 ± 0,015	0,048 ± 0,013
Glucose	0,759 ± 0,404	0,507 ± 0,127	0,273 ± 0,175	0,417 ± 0,175
Glutamate	3,461 ± 1,056	8,690 ± 0,059	3,742 ± 2,147	6,456 ± 1,984
Glutamine	2,219 ± 0,632	3,609 ± 0,166	1,717 ± 0,825	2,769 ± 1,150
Glycine	1,185 ± 0,176	3,458 ± 0,098	1,327 ± 0,814	2,243 ± 0,625
GTP	0,031 ± 0,022	0,060 ± 0,006	0,042 ± 0,042	0,063 ± 0,032
Guanosine	0,006 ± 0,005	0,017 ± 0,006	0,025 ± 0,032	0,010 ± 0,005
Histidine	0,262 ± 0,142	0,177 ± 0,008	0,065 ± 0,050	0,129 ± 0,043
IMP	1,258 ± 1,284	0,089 ± 0,008	0,094 ± 0,102	0,130 ± 0,057
Inosine	0,092 ± 0,027	0,095 ± 0,025	0,050 ± 0,020	0,090 ± 0,018
Isoleucine	0,206 ± 0,092	0,363 ± 0,013	0,139 ± 0,068	0,206 ± 0,065
Lactate	19,744 ± 7,164	26,047 ± 1,373	11,220 ± 4,791	22,450 ± 4,447
Leucine	0,368 ± 0,100	0,739 ± 0,030	0,327 ± 0,129	0,737 ± 0,231
Lysine	1,094 ± 0,441	1,457 ± 0,026	0,957 ± 0,383	1,486 ± 0,393
Maltose	0,152 ± 0,051	0,072 ± 0,005	0,067 ± 0,032	0,249 ± 0,071
Methionine	0,170 ± 0,040	0,206 ± 0,004	0,147 ± 0,102	0,226 ± 0,050
Methylsuccinate	0,057 ± 0,035	0,084 ± 0,008	0,062 ± 0,039	0,122 ± 0,082
myo-Inositol	1,006 ± 0,461	3,017 ± 0,204	1,086 ± 0,616	2,317 ± 0,309
NADP+	0,049 ± 0,038	0,078 ± 0,005	0,033 ± 0,016	0,071 ± 0,004
Nicotinurate	0,141 ± 0,090	0,128 ± 0,012	0,045 ± 0,029	0,109 ± 0,025
O-Phosphocholine	0,782 ± 0,094	1,664 ± 0,164	1,073 ± 0,729	1,403 ± 0,330
O-Phosphoethanolamine	1,196 ± 0,407	2,754 ± 0,112	1,063 ± 0,647	2,290 ± 0,262
Pantothenate	0,107 ± 0,049	0,245 ± 0,016	0,047 ± 0,015	0,141 ± 0,020
Phenylalanine	0,244 ± 0,066	0,393 ± 0,007	0,227 ± 0,110	0,349 ± 0,109
Serine	0,648 ± 0,134	1,383 ± 0,040	0,741 ± 0,400	1,124 ± 0,343
Succinate	0,301 ± 0,052	0,872 ± 0,023	0,357 ± 0,159	0,799 ± 0,197
Taurine	6,979 ± 3,718	6,625 ± 0,145	3,491 ± 2,009	5,726 ± 0,827
Threonine	0,748 ± 0,074	1,736 ± 0,120	0,773 ± 0,403	1,215 ± 0,515
Tryptophan	0,069 ± 0,005	0,109 ± 0,003	0,074 ± 0,027	0,116 ± 0,017
Tyrosine	0,215 ± 0,080	0,386 ± 0,015	0,223 ± 0,138	0,502 ± 0,445
UDP-glucose	0,116 ± 0,050	0,329 ± 0,013	0,163 ± 0,091	0,255 ± 0,065
UMP	0,223 ± 0,046	0,235 ± 0,040	0,156 ± 0,102	0,268 ± 0,171
Uracil	0,037 ± 0,024	0,142 ± 0,004	0,048 ± 0,043	0,099 ± 0,071
Uridine	0,074 ± 0,023	0,219 ± 0,013	0,076 ± 0,040	0,126 ± 0,049
Valine	0,526 ± 0,339	0,824 ± 0,040	0,413 ± 0,227	0,496 ± 0,103
m-Methylhistidine	1,311 ± 1,469	0,031 ± 0,012	0,021 ± 0,008	0,057 ± 0,049

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP). Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

Tabela 14. Perfil metabólico de feto com 19 dias de prenhez

	C	W	L	LW
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Acetate	0,461 ± 0,138	0,329 ± 0,114	0,372 ± 0,075	0,325 ± 0,091
Adenine	0,441 ± 0,186	0,257 ± 0,006	0,160 ± 0,052	0,183 ± 0,082
Adenosine	0,222 ± 0,062	0,101 ± 0,047	0,087 ± 0,026	0,103 ± 0,043
ADP	0,064 ± 0,030	0,162 ± 0,027	0,176 ± 0,058	0,236 ± 0,071
Alanine	3,191 ± 1,058	5,372 ± 0,410	4,112 ± 1,214	4,457 ± 1,204
AMP	0,127 ± 0,100	0,452 ± 0,109	0,459 ± 0,025	0,414 ± 0,101
Ascorbate	0,180 ± 0,164	0,267 ± 0,083	0,404 ± 0,043	0,378 ± 0,172
Aspartate	0,999 ± 0,360	1,122 ± 0,109	0,998 ± 0,297	0,949 ± 0,244
ATP	0,077 ± 0,054	0,106 ± 0,022	0,047 ± 0,010	0,132 ± 0,057
Betaine	0,276 ± 0,055	0,290 ± 0,074	0,338 ± 0,135	0,410 ± 0,402
Camitine	0,117 ± 0,010	0,127 ± 0,010	0,096 ± 0,015	0,125 ± 0,034
Choline	0,311 ± 0,064	0,311 ± 0,042	0,291 ± 0,056	0,218 ± 0,100
Creatine	2,697 ± 1,330	1,859 ± 0,420	2,118 ± 0,642	2,350 ± 0,672
Ethanolamine	0,422 ± 0,166	0,280 ± 0,007	0,212 ± 0,080	0,379 ± 0,045
Ethylene glycol	0,267 ± 0,369	0,054 ± 0,001	0,018 ± 0,018	0,057 ± 0,027
Formate	0,307 ± 0,116	0,391 ± 0,031	0,491 ± 0,023	0,297 ± 0,068
Fumarate	0,050 ± 0,023	0,060 ± 0,002	0,044 ± 0,018	0,062 ± 0,008
Glucose	0,622 ± 0,448	0,453 ± 0,073	0,267 ± 0,011	0,454 ± 0,104
Glutamate	6,304 ± 1,600	7,008 ± 0,738	7,160 ± 1,643	6,213 ± 0,230
Glutamine	2,584 ± 0,630	2,779 ± 0,335	2,472 ± 0,618	2,388 ± 0,460
Glycine	1,648 ± 0,449	1,706 ± 0,000	1,455 ± 0,197	2,130 ± 0,395
GTP	0,040 ± 0,017	0,035 ± 0,004	0,045 ± 0,021	0,040 ± 0,010
Guanosine	0,034 ± 0,017	0,016 ± 0,004	0,010 ± 0,004	0,016 ± 0,006
Histidine	0,133 ± 0,036	0,186 ± 0,052	0,060 ± 0,008	0,119 ± 0,050
IMP	0,661 ± 0,369	0,329 ± 0,285	0,612 ± 0,285	0,274 ± 0,156
Inosine	0,263 ± 0,076	0,128 ± 0,061	0,107 ± 0,037	0,146 ± 0,059
Isoleucine	0,273 ± 0,142	0,312 ± 0,010	0,182 ± 0,043	0,176 ± 0,086
Lactate	15,395 ± 4,524	26,551 ± 0,953	21,436 ± 7,134	21,507 ± 6,682
Leucine	0,633 ± 0,346	0,659 ± 0,048	0,826 ± 0,233	0,692 ± 0,133
Lysine	1,146 ± 0,444	1,264 ± 0,340	1,157 ± 0,394	1,263 ± 0,290
Maltose	0,982 ± 0,362	0,202 ± 0,138	0,200 ± 0,079	0,212 ± 0,103
Methionine	0,257 ± 0,098	0,138 ± 0,010	0,157 ± 0,056	0,247 ± 0,076
Methylsuccinate	0,056 ± 0,030	0,103 ± 0,010	0,075 ± 0,015	0,075 ± 0,048
myo-Inositol	1,866 ± 0,724	2,168 ± 0,037	1,532 ± 0,200	2,088 ± 0,370
NADP+	0,002 ± 0,003	0,064 ± 0,013	0,038 ± 0,003	0,054 ± 0,023
Nicotinurate	0,141 ± 0,036	0,112 ± 0,024	0,089 ± 0,029	0,089 ± 0,013
O-Phosphocholine	0,906 ± 0,225	1,273 ± 0,349	1,123 ± 0,233	1,154 ± 0,400
O-Phosphoethanolamine	1,425 ± 0,350	1,783 ± 0,003	1,334 ± 0,137	1,824 ± 0,601
Pantothenate	0,336 ± 0,132	0,268 ± 0,108	0,158 ± 0,020	0,132 ± 0,069
Phenylalanine	0,386 ± 0,198	0,433 ± 0,066	0,302 ± 0,092	0,343 ± 0,155
Serine	0,894 ± 0,484	0,982 ± 0,035	1,019 ± 0,366	1,174 ± 0,145
Succinate	0,346 ± 0,106	0,726 ± 0,131	0,671 ± 0,190	0,659 ± 0,284
Taurine	5,413 ± 1,300	5,070 ± 0,176	4,286 ± 1,025	5,261 ± 1,254
Threonine	1,170 ± 0,349	1,174 ± 0,019	1,256 ± 0,377	1,149 ± 0,362
Tryptophan	0,124 ± 0,036	0,140 ± 0,041	0,116 ± 0,037	0,110 ± 0,063
Tyrosine	0,476 ± 0,229	0,415 ± 0,046	0,331 ± 0,100	0,370 ± 0,265
UDP-glucose	0,200 ± 0,057	0,268 ± 0,009	0,266 ± 0,072	0,268 ± 0,019
UMP	0,282 ± 0,072	0,202 ± 0,091	0,346 ± 0,131	0,299 ± 0,091
Uracil	0,054 ± 0,027	0,143 ± 0,062	0,068 ± 0,014	0,069 ± 0,049
Uridine	0,251 ± 0,095	0,182 ± 0,019	0,138 ± 0,048	0,128 ± 0,045
Valine	0,710 ± 0,286	0,750 ± 0,016	0,544 ± 0,121	0,460 ± 0,184
m-Methylhistidine	0,017 ± 0,012	0,026 ± 0,006	0,027 ± 0,011	0,046 ± 0,033

Resultados apresentados como média (mM/mL) e desvio padrão (DP) Legenda: C, controle; W, prenhe portadora de tumor; L, prenhe com dieta rica em leucina; LW, prenhe portadora de tumor e dieta rica em leucina.

6. Anexos

6.1. Anexo 1: Declaração de que a dissertação não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria, ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam na minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM LEUCINA SOBRE A ATIVIDADE PLACENTÁRIA DE RATAS PORTADORAS DE TUMOR DE WALKER 256 AO LONGO DA PREENHEZ, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de setembro de 2021

Assinatura: 

Nome do(a) autor(a): Carla de Moraes Salgado
RG n.º 29 752 944-4 – SSP/SP

Assinatura: _____

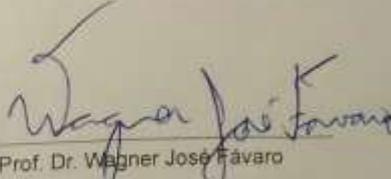

Nome do(a) orientador(a): Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes
RG n.º 10 153 517 – SSP/SP

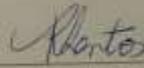
Termo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp/Folha 2

No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	6
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	6 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib:WH Wistar
No. de animais:	36
Idade/Peso:	90.00 Dias / 200.00 Gramas
Sexo:	36 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 23 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB /UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 21 de agosto de 2019


Prof. Dr. Wagner José Fávoro
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Preste atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua execução. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impede que novos protocolos sejam submetidos.