

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Gislaine Ventrucchi

“Parâmetros corporais e bioquímicos de ratas grávidas portadoras do Carcinossarcoma de Walker 256 submetidas à suplementação de leucina”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular. Área de Fisiologia.

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

Gislaine Ventrucchi

e aprovada pela Comissão Julgadora.

17/07/01

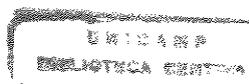
A large, stylized handwritten signature in black ink.

ORIENTADORA: Prof.a Dra Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Co-Orientadora: Prof.a Dra Maria Alice Roston de Mello

2001

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**



UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
V567p
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 46903
PROC. 16.892/04
C D
PREC. R\$ 11,00
DATA 02/11/01
N.º CPD _____

CM00161048-1

Ventrucci, Gislaine

V567p Parâmetros corporais e bioquímicos de ratas portadoras do carcinossarcoma de Walker 256 submetidas à suplementação de leucina/ Gislaine Ventrucci. -- Campinas, SP:[s.n.], 2001 81f.:ilus.

Orientadora: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Co-Orientadora: Maria Alice Roston de Mello

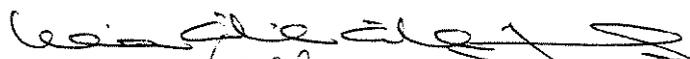
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Tumor Walker 256. 2. Gravidez. 3. Composição corpórea. 4. Suplementação de dieta. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra. II. Mello, Maria Alice Roston de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

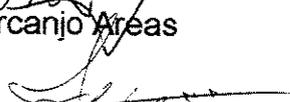
**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Fisiologia e Biofísica**

Gislaine Ventrucchi
Nível: Mestrado

Banca Examinadora


Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes


Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas


Prof. Dr. José Roberto Moreira Azevedo


Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves

À minha orientadora
Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

A mestre e a amiga se confundem em uma única pessoa...
Obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação e paciência
e por tornar um sonho possível.

Agradeço à minha co-orientadora
Maria Alice Roston de Mello

Por aceitar-me como orientada e
pela dedicação mesmo à distância.

À Mércia pelo companheirismo nos trabalhos, pela amizade e por
dividirmos o dia a dia.

Às amigas especiais Eunice, Luciana Magri, Luciane e
ao amigo Luís Otávio pelos bons momentos.

Aos alunos, funcionários e professores do departamento de
Fisiologia e Biofísica.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos meus queridos pais Odair e Ofélia,
à minha amiga-irmã Cristiane, ao meu cunhado Ari
e à minha grande amiga Karen:

Por apenas estarmos juntos,
Pelas coisas simples que tornam cada segundo maravilhoso,
Por todos os sacrifícios pessoais,
Por todos os momentos em que estiveram presente
e por todo o suporte dado sem nenhuma cobrança.

Agradeço do meu coração
por todas as coisas que vocês fizeram e fazem por mim,
e por todas as vezes que esqueci de dizer
exatamente o que sinto por vocês.

ÍNDICE

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Introdução.....	1
Objetivos.....	11
Materiais e Métodos.....	12
Resultados e Discussões.....	18
Parte 1.....	19
Conclusões.....	43
Bibliografia.....	44
Parte 2.....	57
Trabalho publicado.....	58
Trabalho submetido à publicação.....	64
Apêndice.....	82

RESUMO

O desenvolvimento de câncer dá-se de forma mais agressiva e severa em pacientes jovens. Porcentagem pequena, porém significativa, de pacientes acometidos pelo crescimento de neoplasia maligna concomitante à gravidez sofrem da mesma agressividade desta doença, com um agravante pois se trata de dois pacientes: mãe e feto. A mãe sofre alterações fisiológicas e a nutrição materna é de extrema importância para o curso normal da gravidez e ao desenvolvimento fetal. Este último possui aspectos similares ao crescimento neoplásico, porém com complexos mecanismos de controle do crescimento celular e ambos dependem de glicose e aminoácidos. A leucina é um importante combustível metabólico da musculatura esquelética atuando na síntese e degradação protéica, podendo melhorar o estado caquético presente no câncer. Neste trabalho analisamos os efeitos de uma dieta semipurificada contendo alto teor de leucina sobre o metabolismo protéico em animais jovens portadores ou não do carcinossarcoma de Walker 256. Ratas Wistar jovens (45 dias, prenhes ou não) foram distribuídas em grupos experimentais de acordo com inoculação ou não do carcinossarcoma de Walker 256 ($2,5 \times 10^6$ células neoplásicas viáveis) e submetidos ou não a dieta com alto teor de leucina. Após 21 dias de experimento foi feita perfusão intestinal e coletada amostra do sangue; após sacrifício coletou-se amostras de tecidos, a carcaça foi analisada quanto a composição corpórea química. Os grupos inoculados com tumor apresentaram, i) redução do peso corpóreo e da ingestão alimentar no final dos experimentos e redução do balanço nitrogenado, ii) redução dos teores séricos de glicose, proteína total e albumina; iii) maior peso hepático iv) menor peso do músculo gastrocnêmio e redução do seu teor protéico. Verificamos alterações na composição corpórea química (elevado conteúdo de água corpórea, redução da gordura total e decréscimo de nitrogênio colágeno da carcaça) e na absorção intestinal (redução da taxa de absorção de leucina e metionina) de ratas portadoras de carcinossarcoma de Walker 256 submetidas à dieta normoprotéica. Essas alterações ocorreram, provavelmente,

pelos efeitos do crescimento tumoral, causando espoliações no organismo hospedeiro e, conseqüentemente, comprometendo a homeostasia; porém a suplementação de leucina na dieta atenuou alguns desses efeitos promovendo aumento da taxa de absorção intestinal de metionina e leucina, aumento do teor protéico do músculo gastrocnêmio e tendeu a melhora do balanço nitrogenado preservando conseqüentemente a carcaça desses animais.

Auxílio Financeiro: FAPESP (processos n. 98/16022-1 e 96/09463-6), Faep-Unicamp e CNPq.

Agradecimentos à Roche Químicos e Farmacêuticos, Refinações de Milho Brasil e Ajinomoto Interamericana Ltda pelo apoio recebido para realização deste trabalho.

ABSTRACT

The cancer's development can be severe in young patients and a low cancer incidence, but significant, can be found in pregnant patients. In fact, the tumor effects in association with the pregnancy are more aggressive because there are two patients: mother and fetus. In addition the fetal's growth and development have a lot of similarities to the neoplastic cells growth; the main difference between these two cells is the fetal cells are under complex mechanisms which control cellular growth. The physiological changes occurring during the pregnancy and the maternal nutrition are very important to the normal course of the pregnancy, providing nutritional and hormonal supports to the fetal development that it has similar aspects to the neoplastic growth. In the present study we analyzed the effects of a semipurified diet contented leucine excess on the biochemical and body changes in young female rats bearing Walker 256 tumor. Pregnant or non pregnant rats (45 days old) were distributed into experimental groups in according to the inoculation of the carcinosarcoma Walker 256 ($2,5 \times 10^6$ viable neoplastic cells) or not injected into the subcutaneous tissue and receiving or not leucine diet. The experimental groups were followed during 21 days, analyzing the body weight gain, food intake and nitrogen balance. After this period the animal were submitted to intestinal perfusion. The animal's carcass were analyzed as water and fat content, and total collagen and non collagen nitrogen content. Blood samples were taken to measure glucose, total protein, albumin and globulin serum. The wellnourished tumor-bearing groups data showed: i) body weight, food intake and nitrogen balance decrease; ii) reduction in glucose, total protein and albumin serum rates, iii) increase in hepatic weight, iv) small gastrocnemius muscle weight and less protein content. We observed changes on chemical body composition such as increase in water body content, decrease in fat and collagen nitrogen body and changes in intestinal absorption such as smaller rates in methionine and leucine absorption. Probably this changes occurred due to the effects of tumor growth, causing damage to the host and, consequent, impairment of the homeostasis; in spite of being tumor-bearing rats possibly the leucine supplementation diet could improve these effects promoting increase in the rates of methionine and leucine intestinal absorption, increase in the gastrocnemius muscle protein content and improving the nitrogen balance preserving the host carcass.

INTRODUÇÃO

O câncer é um processo de várias etapas que pode demorar para ser diagnosticado e por isso estima-se que um grande número de indivíduos apresentam-se em alto risco (WATTENBERG, 1997). Sendo assim, o câncer é considerado a maior causa de morbidade e mortalidade ao longo da história humana. Em países desenvolvidos e no Brasil, segundo dados recentes, o câncer é a segunda causa morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (BUCHALLA et al., 2001). Apesar do risco de alguns tipos de câncer ter declinado em países desenvolvidos, a incidência das formas mais significativas desta doença, como o câncer de próstata, pulmão e mamário, tem aumentado nos últimos anos (OLIVEIRA et al., 1997).

Por outro lado, a maioria dos casos de câncer são diagnosticados quando já estão em estado avançado. O mais preocupante é o crescimento acelerado do processo tumoral e sua resposta aos tratamentos clínicos (TANNOCK, 1983).

O crescimento tumoral sempre envolve a espoliação do hospedeiro acarretando o desenvolvimento do estado caquético e, assim, diminuindo a performance física, a resposta à quimioterapia e encurtando o tempo de sobrevivência do indivíduo, pois a perda de cerca de 30% do peso corpóreo é invariavelmente fatal (TISDALE, 2000).

O câncer mamário é, hoje em dia, o câncer mais freqüente em pacientes mulheres e um fator de risco elevado com o avanço de idade (MARTINEZ-LACACI & DICKSON, 1996).

Algumas pesquisas sobre a associação entre câncer e gravidez

mostram que a incidência de câncer de mama em mulheres gestantes é cerca de 2,8% (GALLENBERG & LOPRINZI, 1989), enquanto PARENTE et al. (1988) verificam que 2 a 5% das pacientes com câncer de mama apresentam gravidez concomitante. Estudos realizados, por KING et al. (1985) em pacientes com câncer de mama mostraram que 40% das gestações foram interrompidas; cerca de 12% por aborto espontâneo e o restante por ablação do útero e/ou ovariectomia, as grávidas restantes foram acompanhadas até o final da gestação; cerca de 45% delas tiveram parto normal, ou por cesariana, com recém-nascidos normais; em 48% dos casos ocorreu morte fetal e em 7% verificou-se morte perinatal. Estudos experimentais mostram que ratas portadoras de carcinossarcoma apresentaram cerca de 70% de reabsorção e 50% de morte fetal (GOMES-MARCONDES, 1994 e 1998; CERVELLO et al., 1992).

Dependendo do estágio de desenvolvimento do câncer e quando há demora no estabelecimento do diagnóstico é difícil prever qual será a duração, evolução e termo da gravidez (ABRÃO, 1988; LIBERMAN et al., 1994; PETREK, 2000).

Durante a gravidez ocorrem mudanças do estado fisiológico da mãe preparando seu organismo para suprir as necessidades do desenvolvimento e crescimento fetal. A associação entre gravidez e câncer não é rara. O organismo materno tende, também, a sustentar os processos de crescimento tumoral dando suporte nutricional. O feto pode ser comparado ao rápido crescimento tumoral, porque suas taxas de crescimento são exponenciais e ambos dependem de glicose e aminoácidos (CARBO et al., 1996). O crescimento tumoral causa alterações no metabolismo tanto materno quanto fetal, comprometendo o curso da

gestação e podendo levar à morte feto e/ou mãe.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1. Câncer-caquexia

O câncer produz várias alterações no hospedeiro como anorexia e caquexia que culminam em febre, infecções, anemia e vários distúrbios hormonais e neurológicos. Além de alterações metabólicas e hormonais, o câncer pode afetar, também, as funções do hospedeiro pela compressão, invasão e destruição do tecido normal (ARGILES, 1997). Ocorre ainda no hospedeiro progressiva perda de peso que pode ser decorrente da redução/deprivação alimentar e do aumento do gasto energético levando o paciente a apresentar caquexia, entrando em balanço nitrogenado negativo, deixando-o mais susceptível a infecções (TISDALE, 2001).

A caquexia, presente na maioria dos hospedeiros com câncer, é um estado caracterizado pela perda involuntária de peso, instalando-se com a evolução da doença maligna. Durante a caquexia, a perda de tecido adiposo e massa muscular leva a depleção da reserva lipídica e espoliação protéica da massa corpórea, alterando o metabolismo homeostático desses dois substratos: gordura e proteína (INUI, 1999).

A perda de peso nos pacientes com câncer, decorrente da caquexia, difere daquela ocorrida no jejum prolongado ou anorexia nervosa; a perda de gordura corpórea e massa protéica aumenta com a evolução do estado maligno, com perda significativamente mais importante da massa muscular (TISDALE, 2000). Segundo HOLLANDER et al. (1986) o decréscimo da gordura corpórea não estava correlacionada à demanda

energética da neoplasia, mas sim ao tipo de tumor. Frequentemente, pacientes portadores de linfoma de Hodgkins apresentam decréscimo do tecido adiposo em cerca de 30% do peso corpóreo, enquanto pacientes com câncer de estômago ou pâncreas ocorre perda em cerca de 90% da gordura corporal.

Por outro lado, BECK & TISDALE (1987) mostraram que a depleção da gordura corporal, o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres e o decréscimo da atividade lipogênica estavam diretamente relacionados com o aumento da massa tumoral. Alteração no metabolismo de lipídeos, verificado no estado câncer-caquexia, tem mostrado que há aumento da mobilização e utilização de lipídeos, como aumento da oxidação de ácido graxos utilizados para suprimento energético ao ciclo de Cori (SAUER & DAUCHY, 1990) ou fornecimento de ácidos graxos essenciais, como linoléico ou araquidônico essenciais para o crescimento tumoral (HUSSEY & TISDALE, 1994). Estudos realizados com ratos portadores do carcinossarcoma de Walker apresentaram alterações no metabolismo de lipídeos como diminuição do transporte de ácidos graxos para o interior de mitocôndrias, redução de oxidação e cetogenese hepática (SEELAENDER et al., 1998).

Frequentemente, encontra-se hipoglicemia em pacientes e em animais experimentais com câncer (SVANINGER et al., 1989; SAUER & DAUCHY, 1990). Pacientes com câncer mal nutridos apresentam metabolismo de glicose reduzido, embora haja elevada taxa de oxidação de glicose e de lipídeos pelas células neoplásicas (GAMBARDELLA et al., 1993). A glicose formada no hospedeiro, a partir do lactato produzido pelas células cancerosas, é utilizada pelo próprio tumor, que a converte em mais

lactato; este processo leva a alto déficit energético no hospedeiro, agravando ainda mais o processo de caquexia (SAUER & DAUCHY, 1990; TISDALE, 1990; WOLF et al., 1993).

Pacientes caquéticos apresentam aumento da síntese de glicose, a partir de alanina e glicerol (LUNDHOLM et al., 1979) decorrente do aumento de cerca de 40% da gliconeogênese hepática verificado nestes pacientes e contrastando com pacientes portadores de anorexia ou jejum, onde a resposta hepática à produção de glicose, via neoglicogênese, está reduzida (TISDALE, 2000).

Por outro lado, estudos com câncer revelaram a intolerância à glicose decorrente à menor secreção de insulina por animais portadores do carcinoma de Walker (el RAZI NETO et al., 1996). Pacientes com câncer tem aumento do fluxo glicolítico pelo qual poderia consumir cerca de 40% do carboidrato ingerido e contribuiria para acentuar a perda de peso corpóreo do hospedeiro (BURT & BRENNAN, 1984).

Em muitos casos, a massa corporal magra, de animais portadores de carcinoma, decresce em proporção direta ao aumento da massa neoplásica sendo um dos fatores responsáveis pela redução do tempo de sobrevivência dos pacientes com câncer (TISDALE, 2000). A redução de nitrogênio total e conseqüente balanço nitrogenado negativo está diretamente correlacionado à alta demanda de nitrogênio pelas células neoplásicas; o hospedeiro perde proteína tecidual e o nitrogênio protéico é seqüestrado pelo tumor (ARGILES & LOPES SORIANO, 1999).

A perda de proteína muscular esquelética é decorrente da alteração das taxas de síntese e degradação protéica, como também do *turnover* protéico total corpóreo (INUI, 1999; TISDALE, 1999). A perda de

tecido muscular leva à fadiga, fraqueza, aumento do risco de trombose, atrofia muscular e comprometimento das funções respiratórias (MULLIGAN & BLOCH, 1998).

Na vigência de câncer são evidenciadas desordens nutricionais, incluindo redução do apetite e da função digestiva. Em resposta às condições fisiológicas e patológicas ocorrem mudanças das funções intestinais, que alteram a capacidade absorptiva de nutrientes do intestino (PHILPOTT et al., 1992). Estudos demonstraram que alimentos com maior quantidade de proteína aumentam a absorção de aminoácidos em vários graus. Tem sido reportado que a deficiência protéica pode aumentar, diminuir ou não alterar a absorção de aminoácidos (KARASOV et al., 1987).

Em contra-partida, a função intestinal associada à deprivação protéica pode sustentar o controle da regulação do transporte intestinal, podendo ter importantes implicações nutricionais. A deprivação protéica pode resultar no decréscimo da absorção intestinal, onde a estrutura intestinal poder ser afetada pelas condições da dieta (KANSAL, 1980). A redução do peso corpóreo e mudanças na composição corpórea, na vigência do câncer, estão relacionados com a redução da ingesta de alimentos e/ou uma redução da absorção intestinal. Capacidade absorptiva do intestino delgado relacionada ao estado patológico do organismo pode ser observada em trabalho recente, onde verificou-se que a absorção de metionina estava aumentada e de leucina diminuída, em ratos adultos portadores do carcinoma de Walker (GOMES-MARCONDES et al., 1998). Isto sugere que o transporte intestinal de aminoácidos neutros pode ter importante papel na utilização dos mesmos pelas células neoplásicas, com

conseqüente menor oferta para os tecidos hospedeiros, o que provavelmente contribui ao desenvolvimento de balanço nitrogenado negativo em pacientes com câncer.

2. Gravidez

A nutrição materna é de extrema importância para o curso e o final da gravidez, pois durante esse processo verificam-se alterações fisiológicas que são sustentadas por um adequado suprimento de nutrientes. As adaptações do organismo materno durante a gestação só podem ocorrer de forma eficiente se o suprimento de alimentos for adequado. Por outro lado, a capacidade adaptativa da gestante a condições adversas, visando a proteção do feto, é limitada (BALDWIN, 1981).

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

hormônios placentários parecem ser responsáveis por este comportamento metabólico bifásico (BAIRD, 1986). Esses hormônios, possivelmente, determinam a conservação de energia no início da gestação, que sustentará o anabolismo da placenta e do feto no final do período gestacional (FREINKEL & METZGER, 1992; HERRERAS et al., 1991).

Apreciável ganho de peso materno é decorrente do acúmulo de gordura corporal, que ocorre no início da gestação atingindo o máximo no segundo terço da gravidez, como conseqüência da concentração plasmática elevada de estrógenos, progesterona e lactogênio placentário (HLP) (BAIRD et al., 1991; HERRERA et al., 1991; RYAN & ENNS, 1988). As adaptações do metabolismo protéico durante a gravidez são muito pouco definidas. Existem evidências de que, durante o início da gestação de ratas, ocorre acúmulo de proteína na carcaça e que, possivelmente, essa proteína seja mobilizada através do catabolismo protéico muscular materno, assegurando o suprimento de aminoácidos que serão utilizados para o crescimento fetal nos estágios finais da gravidez (MILLICAN et al. 1987; WEIJS et al., 1995).

O dispêndio energético e os ajustes metabólicos, que ocorrem durante a gravidez no organismo materno, fornecem oxigênio e nutrientes suficientes para o crescimento e o desenvolvimento normais da placenta e do feto, bem como estabelecem reserva energética materna e fetal adequada, assegurando a sobrevivência do novo ser após o nascimento (ADAM & FELIG, 1978; BAIRD, 1986). O feto depende de um ininterrupto suporte de oxigênio para obter energia, tanto para metabolismo basal como para os gastos metabólicos do crescimento, com constante captação

de oxigênio, glicose, lactato e aminoácidos através da circulação umbilical.

MILLEY (1998), observando a cinética de leucina no desenvolvimento fetal durante a hipoxia materna, verificou que a redução da oferta de O_2 reduziu a síntese protéica como também a degradação protéica, conseqüentemente houve decréscimo de 62% no acréscimo de proteína fetal, representado pela diferença entre a taxa de síntese e proteólise no feto.

Estudos feitos com fetos, perfundidos com leucina e expostos à hipoglicemia, indicaram redução do incremento de peso fetal e mostraram maior concentração plasmática de glicose, insulina e leucina nestes fetos (CARVER et al., 1997)

Atualmente são escassas as pesquisas que analisam a associação entre câncer e gravidez, desse modo estudos adicionais fazem se necessários para que se possa, em breve, melhorar o prognóstico e terapêutica para ambos pacientes, mãe e feto.

3. Leucina

O organismo mantém sua massa protéica pelo contínuo processo de reparo que envolve a síntese e degradação de proteínas, que devem estar em equilíbrio. Os aminoácidos assumem importante papel regulatório no metabolismo protéico, como os aminoácidos de cadeia longa (BCAA), principalmente leucina, valina e isoleucina (NAIR, 1992). A leucina é um importante combustível metabólico da musculatura esquelética, representando 8% da proteína corpórea em humanos e

parece estimular a incorporação de aminoácidos nas proteínas e inibir a degradação protéica, sendo oxidada em acetil CoA e, posteriormente, utilizada como substrato energético pelo músculo (RENNIE & TRIPTON, 2000).

A redução de massa muscular periférica durante patologias, como septicemia, câncer e outras, pode ser devido ao aumento do catabolismo muscular, à redução da síntese protéica, ou combinação desses dois fatores. Durante o câncer, ocorre degradação protéica e aumento da demanda de alguns aminoácidos, particularmente a leucina. A maior utilização de leucina pelas células tumorais-ascite, quando comparadas com células normais, é devido à alta síntese de lipídios e proteínas (LAZO, 1981). Alguns autores consideram que o aumento da taxa de proteólise muscular esquelética tem como função primordial fornecer aminoácidos para a síntese de glutamina no músculo, que será utilizada pelas células neoplásicas (FURST et al., 1989).

O implante tumoral, em ratas grávidas, pode modificar o *turnover* protéico da mãe e do feto, com conseqüente alteração do transporte de aminoácidos entre mãe e feto. O crescimento tumoral altera a morfologia placentária (TOLEDO, 1999), bem como a cinética do transporte de alanina e leucina (CARBO, 1998).

Estudos sustentam a idéia de que a leucina estimula e recupera a síntese protéica na musculatura esquelética, estando envolvida na regulação do metabolismo protéico e melhorando o balanço nitrogenado, com conseqüente manutenção da carcaça (ANTHONY, 1999).

Dietas contendo diferentes proporções de BCAA tem

demonstrado importantes efeitos benéficos na troca metabólica associada à recuperação da perda muscular, tem aumentado a síntese protéica corpórea e melhorado a cinética corpórea de leucina, indicando favorável influência no metabolismo protéico (BUQUETS, 2000).

OBJETIVOS

O aumento dos conhecimentos sobre as alterações fisiopatológicas, que ocorrem durante a gestação associada ao desenvolvimento de câncer, torna-se necessário para que se consiga propor métodos terapêuticos e preventivos para pacientes grávidas portadoras de neoplasia maligna.

O presente estudo foi delineado para avaliar as interações entre desenvolvimento corpóreo, gravidez e câncer na presença ou ausência da suplementação de leucina na dieta. Para tanto, foram analisados aspectos do metabolismo protéico de ratas jovens, grávidas ou não, portadoras do carcinossarcoma de Walker 256.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas 120 ratas Wistar (45 dias de idade; adolescentes), obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Estes animais foram mantidos em gaiolas metabólicas com dietas semi-purificadas e água *ad libitum*, com controle de luz claro-escuro de 12-12 horas.

Parte destas ratas foram colocadas com machos adultos (90 - 100 dias de idade) na proporção de quatro fêmeas para um macho, em gaiolas coletivas durante uma noite (12 horas), de acordo com método de harém descrito por BAKER (1991). Foi determinado como primeiro dia da gravidez todas aquelas fêmeas que apresentaram presença de espermatozóides na análise do esfregaço vaginal. As fêmeas não acasaladas constituíram os grupos controles.

2. Dietas

Foram utilizadas dietas semi-purificadas isocalóricas contendo 18% de proteína (normoprotéica - AIN-93G) (REEVES et al., 1993) ou 15% de proteína acrescida de 3% de L-leucina (alto teor de leucina). Adicionou-se cerca de 70% de carboidratos (sacarose, dextrina e amido), 7% de gordura (óleo de soja) e 5% de fibra (micro-celulose purificada). As dietas foram complementadas com mistura vitamínica e de sais minerais, bem como cistina e colina. A dieta controle contém 1,6% de L-leucina e a dieta excesso de leucina contém 4,3% de L-leucina.

3. Implante tumoral e obtenção do líquido ascítico

As células tumorais foram obtidas do carcinossarcoma de Walker 256, proveniente da linhagem do Banco de Tumores Christ Hospital Line, Arthur D'Little, EUA. Estas células foram mantidas *in vivo*, por inoculações na cavidade abdominal de ratos machos, feitas a cada 7 dias.

As ratas foram inoculadas no subcutâneo da região do flanco com 0,5 mL de suspensão celular contendo cerca de 250.000 células neoplásicas viáveis, avaliadas pelo método de exclusão com azul de tripan a 0,25% (GOMES et al., 1983), no 2º dia do experimento. Os animais dos grupos controle receberam inoculação de 0,5mL de solução fisiológica (0,9 g/dL) no tecido subcutâneo do flanco direito.

4. Procedimento experimental

As ratas foram distribuídas em grupos de acordo com a presença ou não do carcinossarcoma de Walker, presença ou não de prenhez, submetidas ou não à suplementação de leucina. Os animais permaneceram em gaiolas metabólicas individuais, a partir do 2º dia, durante todo o período experimental, para determinar a ingestão de alimentos e coleta de urina. Todas as ratas foram pesadas três vezes por semana. Os animais foram submetidos à perfusão intestinal a partir da terceira semana de gestação, após jejum de 12 horas e anestesia com hypnol (100 mg/Kg de peso), via peritoneal.

Foi coletado sangue por punção da aorta e o sacrifício ocorreu após

super dose de hypnol. A necropsia foi realizada em todas as ratas para o estudo de possíveis modificações em seu organismo e alterações do desenvolvimento placentário e fetal. Fragmentos de fígado, músculo gastrocnêmio, fetos e placentas foram retirados. Os fragmentos de tecidos e o soro foram armazenados em freezer a -20°C para posterior análise bioquímica de proteína tecidual (BRADFORD 1976) e análise sérica do teor de proteína total (HENRY, 1974), albumina (DOUMAS et al, 1971) e glicose sérica (TRINDER, 1969). As carcaças de todas as ratas foram conservadas em -20 °C para posterior análise da composição corpórea.

4.1 Modelo experimental

As fêmeas foram distribuídas em 12 grupos experimentais, com número mínimo de dez animais por grupo, a saber:

A - ratas jovens prenhes (P) ou não (C) submetidas à dieta normoprotéica.

B - ratas jovens prenhes (PL) ou não (CL) submetidas à dieta com alto teor de leucina.

C - ratas jovens prenhes (PW) ou não (CW) submetidas à dieta normoprotéica, com implante do carcinossarcoma de Walker 256.

D - ratas jovens prenhes (PWL) ou não (CWL) submetidas à dieta com alto teor de leucina, com implante do carcinossarcoma de Walker 256.

E - ratas pair-fed (p) jovens prenhes (PWp) ou não (CWp)

submetidas à dieta normoprotéica, submetidas a ingestão pareada com os grupos portadores de Walker, PW e CW.

F - ratas pair-fed (p) jovens prenhes (PWLp) ou não (CWLp) submetidas à dieta com alto teor de leucina, submetidas a ingestão pareada com os grupos com implante do carcinossarcoma de Walker 256, PWL e CWL.

4.2 Determinação da ingestão alimentar e balanço nitrogenado

Análise da ingestão alimentar foi obtida pela diferença entre as quantidades da dieta oferecida e da dieta que restou após período de 24 horas: Ingestão alimentar em 24 horas = dieta oferecida - dieta que restou.

O nitrogênio da dieta e urina foi determinado pelo método de micro KJELDAHL (ALBANESE & ORTO, 1963).

O balanço nitrogenado estimado foi obtido pela diferença da ingestão nitrogenada e da excreção de nitrogênio: BN = total de nitrogênio ingerido em 24 horas – total de nitrogênio excretado na urina em 24 horas.

4.3 Perfusão intestinal

A perfusão foi realizada no intestino delgado através de duas cânulas, uma colocada no lúmen do duodeno e outra no íleo. O segmento intestinal foi lavado primeiramente com solução de Hanks à temperatura de 37° C; após sutura da parede abdominal, a perfusão intestinal foi feita através da bomba peristáltica, com fluxo de 0,5 a 1,0 mL/minuto. Após 30 minutos de equilíbrio foi iniciada a coleta de amostras do perfusado para o

estudo da função intestinal, controlando e mantendo a temperatura do líquido perfundido a 37° C. Foram administradas soluções de glicose, de metionina e de leucina, a 0,25% por 3 min, coletando-se 3 amostras de cada solução. Os aminoácidos (metionina e leucina) nos perfundidos foram determinados por colorimetria segundo método de McCARTHY & SULIVAN (1941) para determinação de metionina, ROSEN (1957) para determinação de leucina e glicose pelo método colorimétrico de TRINDER (1969).

4.4 Composição Corpórea Química

A composição corpórea química foi feita segundo método padronizado pelo grupo de Metabologia Cirúrgica do Departamento de técnica Cirúrgica da Faculdade de Medicina USP. Para a determinação do teor de água, gordura, nitrogênio total, colágeno e não colágeno da carcaça do animal, utilizou-se o seguinte procedimento:

Teor de água: para obtenção da quantidade de água a carcaça do animal, sem o trato gastrointestinal, foi seca em estufa durante o período mínimo de 48 horas, à temperatura de $50 \pm 5^\circ \text{C}$, até atingir peso constante. Por diferença do peso fresco e do peso seco obteve-se a quantidade de água.

Teor de gordura: após a secagem da carcaça, esta foi colocada em extrator de sox leht para extração de gordura com éter de petróleo (PF 30° à 60° C), por um período mínimo de 48 horas; por diferença de peso do material seco com gordura menos o peso do material sem gordura obteve-se a quantidade de gordura.

Teor de nitrogênio total: após seca e desengordurada, a carcaça foi triturada e uma alíquota foi submetida à digestão com H_2SO_4 mais sulfato de potássio e analisada colorimetricamente, com reativo de Nessler, para a determinação do nitrogênio total (ALBANESE & ORTO, 1963).

Teor de nitrogênio colágeno: uma segunda alíquota da carcaça seca e desengordurada, sofreu tratamento com soda (NaOH 2N), ácido tânico à 5% e ácido sulfúrico 2N e após esse tratamento foi seguido o procedimento para determinação do nitrogênio total (digestão com H_2SO_4 e sulfato de potássio e colorimetria com Nessler) (SPENCER et al., 1937).

Teor de nitrogênio não colágeno: uma terceira alíquota foi tratada com NaOH (0,05N) e soluções de ácidos fluorídrico e clorídrico e, depois, seguido o mesmo procedimento para determinação de nitrogênio total (digestão com H_2SO_4 e sulfato de potássio e reação colorimétrica com reativo de Nessler) (LILIENTHAL Jr. et al., 1950).

5. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por Anova, seguido de teste Kruskal-Wallis onde apropriado, pré estabelecendo-se o nível de significância em 5%, em todos os casos (WOOLSON, 1987; GAD & WEIL, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados deste trabalho serão apresentados em duas partes. A primeira parte corresponde aos resultados obtidos de todos os grupos de ratas não grávidas. A segunda parte corresponde à trabalho já publicado na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* e outro submetido à publicação na revista *BMC*, referente a parte dos resultados obtidos de todos os grupos de ratas grávidas.

PARTE 1

1. ANÁLISE DO PESO CORPÓREO DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Verificou-se que as ratas C (jovens controles eutróficas) apresentaram evolução de peso e da porcentagem de ganho de peso crescente (Figura 1 e 2). A análise dos grupos jovens CL mostrou que a evolução de peso nestas ratas foi ligeiramente maior, porém estatisticamente similar às jovens C. Estes dados indicam que estes animais estavam em pleno desenvolvimento corpóreo, uma vez que atingiram peso corpóreo ao redor de 190 g, durante vinte e um dias de experimento, semelhante ao peso de ratas adultas jovens (Tabela 1, Apêndice).

Os grupos experimentais portadores de neoplasia, CW e CWL, apresentaram evolução de peso semelhante aos respectivos controles C e CL (Figura 1), porém analisando-se o peso final, que corresponde aos peso corpóreo final menos o peso do tumor (Figura 4), os grupos com tumor apresentaram redução em cerca de 10% para CW e 16% para CWL, em relação aos respectivos controles (Figura 2).

Estes resultados são coerentes com aqueles observados por ROYEN (2000), que verificaram redução do peso corpóreo em ratos portadores de ascite hepatoma Yoshida AH-130 (cerca de 16%). Por outro lado, a redução de peso corpóreo está correlacionada com a perda de massa protéica da carcaça (COHN, 1981).

A depleção do conteúdo protéico, associada à perda de peso, é o fator principal no desenvolvimento da caquexia nos organismos

portadores de neoplasia maligna (LAWSON et al., 1982) e conseqüentemente, principal causa morte para a maioria dos pacientes com câncer. BELIZARIO et al. (1998) verificaram, em trabalhos realizados em pacientes com câncer, perda de peso maior que 10%, na presença de fator de proteólise no músculo destes pacientes. Extensas pesquisas realizadas por TISDALE e seus colaboradores têm determinado a presença de fator de indução de proteólise em pacientes com câncer (TISDALE, 2001).

As grupos portadores de tumor, CW e CWL, apresentaram sobrevida entre 19 e 20 dias, onde o estado caquético foi, provavelmente, a principal causa morte destas ratas, devido a perda de massa corpórea. Os grupos pair-fed apresentaram apenas redução do peso corpóreo. Estes resultados corrobam aos dados de literatura (INUI, 1999; LOPES et al., 1989).

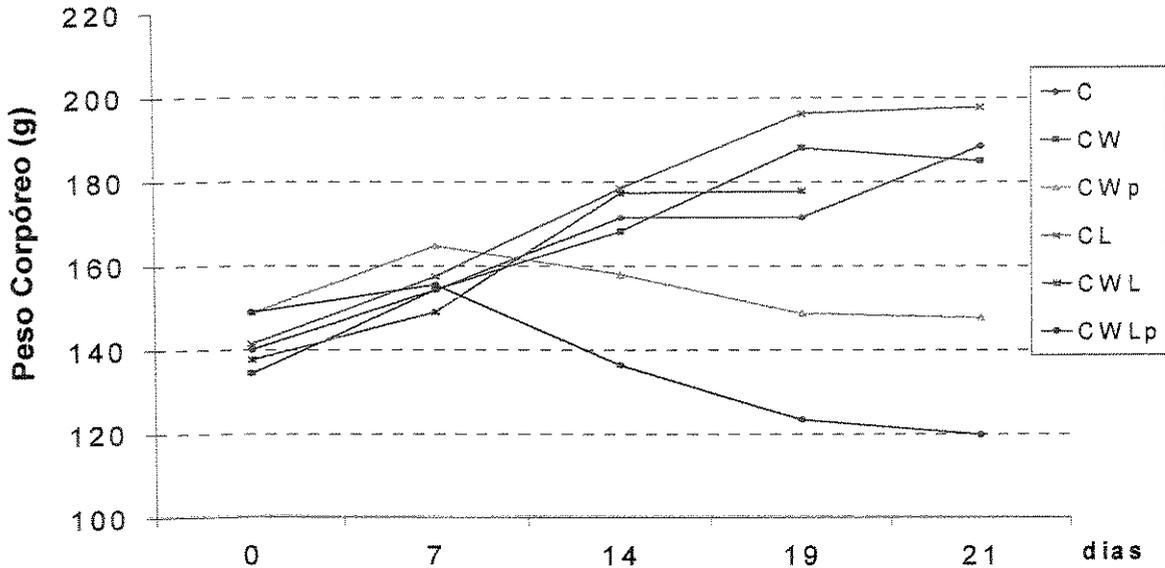


Figura 1: Evolução do peso corpóreo dos diferentes grupos experimentais. Grupos: C ratas jovens eutróficas; CW ratas jovens eutróficas portadoras de tumor; CWp ratas jovens eutróficas pair-fed; CL ratas jovens submetidas à dieta com excesso de leucina; CWL ratas jovens submetidas à dieta excesso de leucina portadoras de tumor, CWLp ratas jovens submetidas à dieta excesso de leucina pair-fed

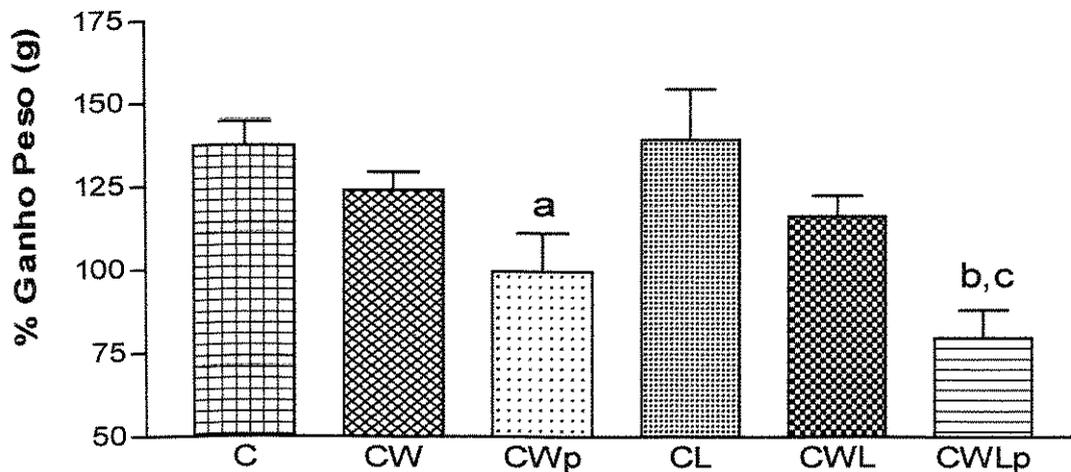


Figura 2: Ganho de Peso dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo controle; ^b, $p < 0,001$ em comparação ao respectivo grupo controle; ^c, $p < 0,05$ comparação entre CWL vs CWLp.

(Figura 5 e Tabela 2). LOPES (1989) verificou, em animais, que redução da ingesta alimentar estava associada ao crescimento tumoral. O aumento do gasto energético e a redução da ingesta contribui para a perda de peso e para a redução da síntese protéica muscular. GUATIANI et al. (1983) estudando ratos CO/COBS, após 14 dias do implante com carcinossarcoma de Walker, verificaram a redução de 15% do peso corporal e queda de 20% da ingestão alimentar, enquanto que o peso da neoplasia maligna representava cerca de 10% do peso corporal. Dados semelhantes foram encontrados em nossas fêmeas, onde as ratas CW e CWL apresentaram 7,03% e 8,8% de relação peso tumor sobre peso da carcaça, respectivamente, porém a redução da ingestão alimentar foi significativamente maior comparados aos dados da literatura. A anorexia é freqüentemente observada em pacientes e em animais com câncer, sendo considerada a principal determinante da caquexia (BRENNAN, 1981; KRAUSE et al., 1981; VILLA et al., 1992).

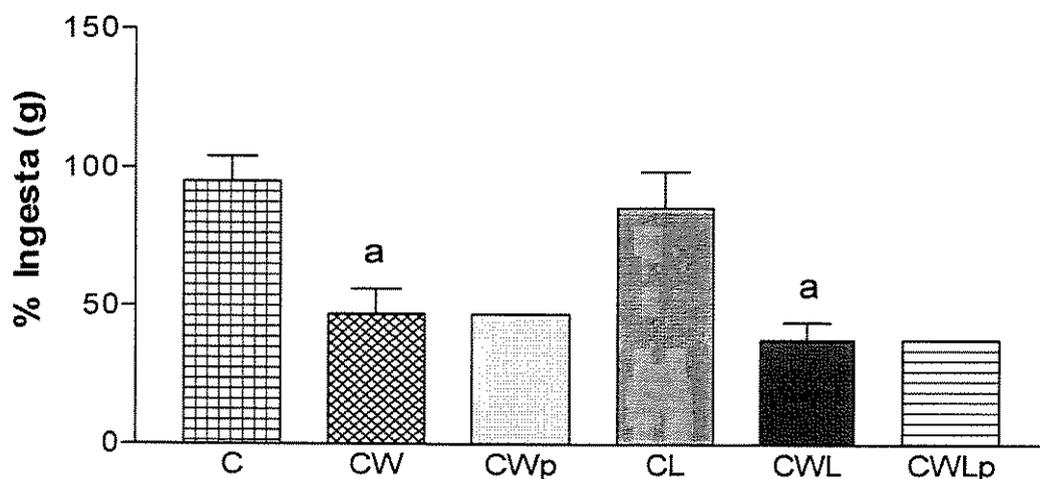


Figura 5: Ingestão alimentar dos grupos experimentais. Legenda de identificação vide figura 1.
^a, $p < 0,001$ em comparação aos respectivos controles. Grupos pair-fed ingeriram mesma quantidade que seus respectivos grupos com tumor.

3. ANÁLISE DO BALANÇO NITROGENADO DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos controles C e CL apresentaram elevado balanço nitrogenado, no início do período experimental com estabilização da incorporação nitrogenada ao longo dos 21 dias de experimentais (Figura 6 e Tabela 3). Estes dados são coerentes com a literatura uma vez que, o equilíbrio de excreção de nitrogênio e correspondente balanço nitrogenado positivo mantém o crescimento corporal (MITCHELL, 1978). A ingestão adequada de proteínas fornece aminoácidos que participam de vários processos metabólicos sendo, portanto, importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção de todos os tecidos e homeostasia do organismo.

O metabolismo de proteína corpórea, no organismo sadio, envolve *turnover* protéico onde a taxa de síntese protéica sobrepõe a taxa de degradação protéica para organismos em crescimento, como o balanço nitrogenado positivo observado em nossos experimentos (Figura 6 e Tabela 3).

No início do jejum há intensa mobilização de substratos; glicogênio hepático é intensamente mobilizado para manutenção da homeostasia glicêmica; as proteínas, principalmente musculares, são mobilizadas para fornecimento de alanina, implicando em utilização do esqueleto carbônico para síntese de glicose e excreção do nitrogênio, na forma de uréia. Desta forma perde-se nitrogênio estrutural. Entretanto com jejum prolongado, há adaptação fisiológica à menor mobilização de proteína e, conseqüentemente, menor excreção de nitrogênio urinário preservando o nitrogênio corporal e, conseqüentemente, mantendo a

proteína corporal. Nossos resultados mostram que os grupos pair-fed, tanto em ratas submetidas ou não a suplementação de leucina (CWp e CWLp), apesar da restrita ingestão, apresentaram redução da taxa de excreção de nitrogênio urinário mostrando tendência a manutenção do balanço nitrogenado, principalmente as CWp, em relação aos grupos controles, mostrando provavelmente, adaptação ao jejum prolongado.

GOMES-MARCONDES (1994) verificou redução do balanço nitrogenado em ratas adultas portadoras de neoplasia associado a espoliação do conteúdo de nitrogênio corporal. Resultado semelhante foi encontrado em pesquisas feitas com pacientes (PISTERS & BRENNAN, 1990) e com camundongos portadores de câncer de cólon MAC16 (BECK & TISDALE, 1989).

Os grupos de ratas jovens com neoplasia, CW e CWL, apresentaram decréscimo da ingestão e elevada excreção de nitrogênio com significativa queda do balanço nitrogenado, correspondente ao crescimento exponencial da massa neoplásica (14º dia até o final do experimento) em comparação aos seus grupos controles. A presença do câncer, causa do desequilíbrio do metabolismo protéico, provocou resposta distinta àquela ao jejum agudo, pois houve elevada degradação de proteína e sem adaptação visando reduzir a espoliação de massa protéica corpórea. Assim, a evolução do tumor aumenta a mobilização de proteína corporal (COHN, 1981), atuando como “caçador de nitrogênio”, conforme designado por alguns pesquisadores. Paralelamente, esta mobilização de proteína estaria fornecendo alanina para neo formação de glicose, via ciclo de Cori (TISDALE, 2000; SAUER & DAUCHER, 1990; MEDINA & CASTRO, 1990).

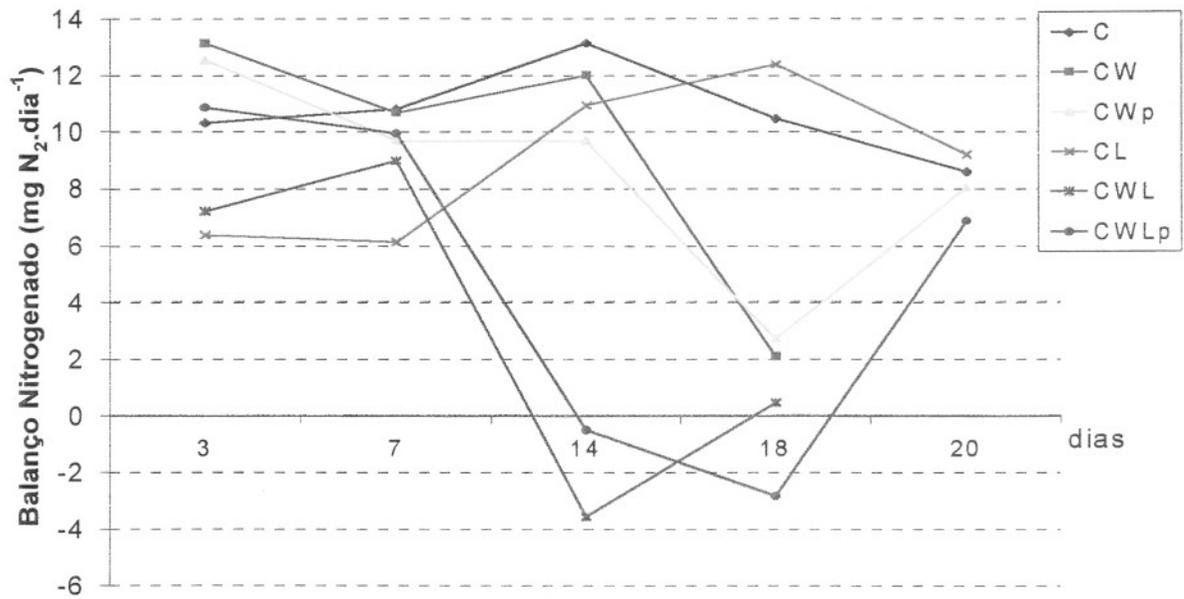


Figura 6: Balanço Nitrogenado estimado (ingestão menos excreção urinária de nitrogênio) dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação vide figura 1.

4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPÓREA DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os resultados obtidos, nesse trabalho, mostram que as ratas portadoras do carcinossarcoma de Walker 256 apresentaram significativas alterações na composição corpórea química.

A porcentagem de água corporal mostrou-se aumentada nos grupos portadores de neoplasia, tendência à elevação nas ratas CW e significativo acréscimo em cerca de 12% no grupo CWL, em comparação aos respectivos grupos controles C e CL (Figura 7). A porcentagem de água total nos grupos pair-fed foi, significativamente, maior que dos controles, e estes valores foram similares à porcentagem dos grupos portadores de tumor. Estes dados são coerentes com os dados da literatura onde outros autores verificaram aumento do teor total de água em pacientes e animais com câncer (COHN et al., 1981) correspondendo a processos de edema em função, muitas vezes do estado de desnutrição. Segundo a literatura, na desnutrição protéica, ocorre aumento da retenção hídrica em função da hipoalbumenia, presente nestes casos. Conforme será discutido adiante, houve decréscimo significativo de proteína total e albumina sérica de ratos portadores de tumor, corroborando com dados de literatura (GOMES-MARCONDES et al., 1998; CAIRO & LUCCHINE, 1993). Como também redução desses parâmetros nos animais pair-fed, concomitante ao aumento da água corporal (VASWANI et al., 1983; KLINGER et al., 1996), sugerindo processos semelhante à desnutrição protéico calórica (MELLO, 1985).

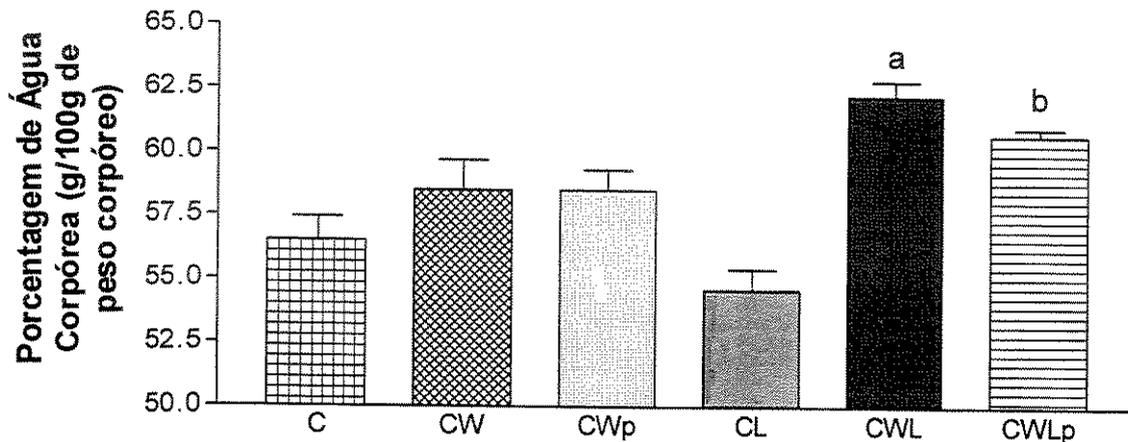


Figura 7: Porcentagem de água corpórea dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,001$ e ^b, $p < 0,01$ comparação ao respectivo controle CL.

Segundo TISDALE (2000), o decréscimo de massa de tecido adiposo, decorrente do aumento da lipólise, ocorre comumente em pacientes com câncer. Esta gordura corpórea é utilizada para suprir o aumento da demanda metabólica que ocorre no hospedeiro em função do crescimento neoplásico. Resultados semelhantes aos da literatura foram observados neste trabalho onde a porcentagem de gordura corpórea foi significativamente reduzida nos animais com câncer (CWL, Figura 8). No entanto, este dado não foi significativo para o grupo CW, contrariando os dados de literatura. No organismo com câncer ocorre aumento da oxidação de lipídeos (FALCONER et al., 1994) e aumento da redução dos lipídeos circulantes do sangue (WATERHOUSE & NYE, 1961), isto facilita o aumento da utilização dos ácidos graxos para o fornecimento de energia, mantendo suprimento energético para promover a síntese de glicose, estimulando o ciclo de Cori. Além disso, há uma elevada demanda de ácidos graxos, como linoleico e araquidônico que são essenciais para o crescimento do próprio tumor (HUSSEY & TISDALE, 1994; TISDALE,

2000). O déficit energético, causado pela redução da ingestão alimentar, juntamente com aumento da mobilização de lipídeos, diminuem a gordura corpórea, a qual é determinada pelo crescimento tumoral, causando caquexia (FREDRIX et al., 1997).

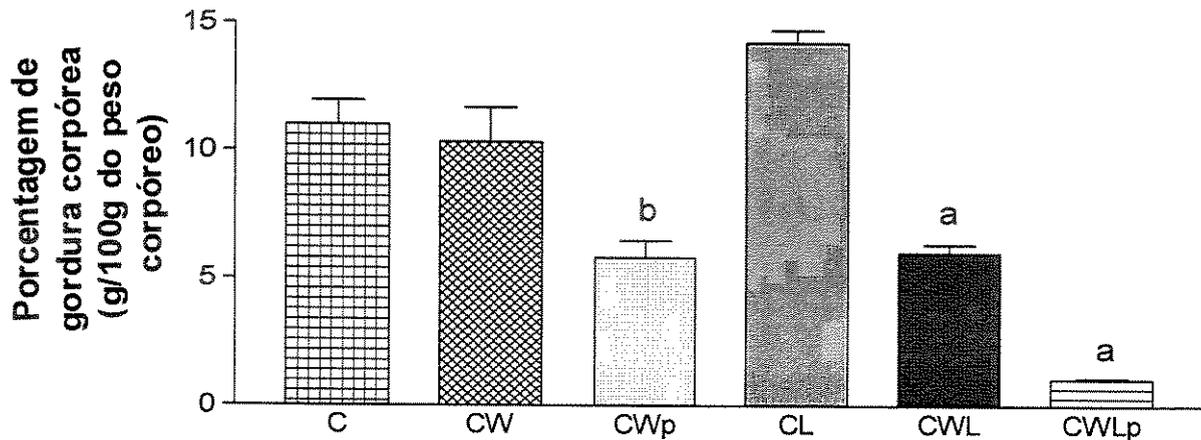


Figura 8: Porcentagem de gordura corpórea dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,001$ comparação ao controle CL; ^b, $p < 0,01$ comparação ao respectivo controle C.

A análise da massa corpórea magra (Figura 9), mostrou redução significativa deste parâmetro para os grupos com tumor CWL e ambos grupos pair-fed, em relação aos respectivos controles. Redução da massa corpórea magra, em cerca de 20 a 25%, foi observada em camundongos portadores de neoplasia, induzindo caquexia nestes animais (TODOROV et al., 1999).

Por outro lado, vários trabalhos tem mostrado que a suplementação de aminoácidos de cadeia longa, como leucina, atua melhorando os processo de síntese, bem como a redução da degradação protéica (ANTONHY, 1999; GARLICK & McNURLAN, 1994). Nos grupos submetidos a dieta com excesso de leucina não foi verificado o efeito da suplementação deste aminoácido de cadeia longa observando-se redução da massa corpórea magra nesses grupos com neoplasia (Figura 9).

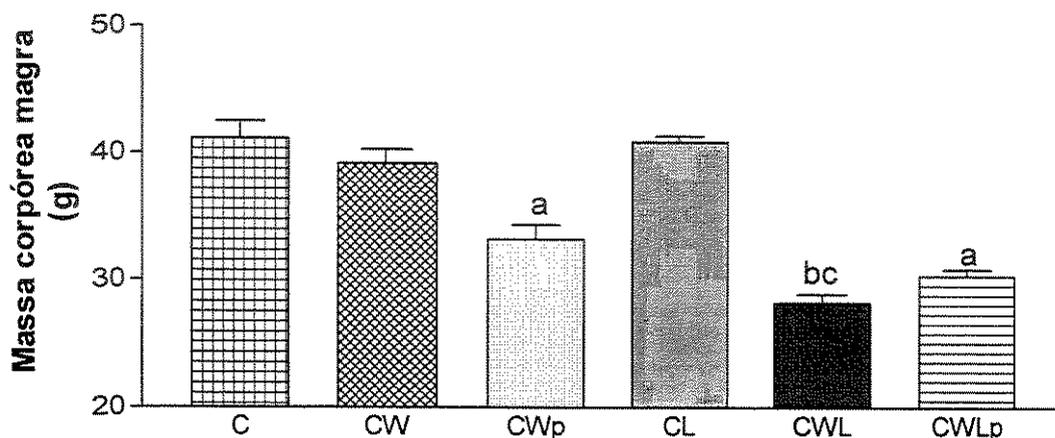


Figura 9: Massa corpórea magra dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,01$ comparação aos respectivos controles; ^b, $p < 0,001$ em comparação ao respectivo controle; ^c, $p < 0,01$ comparação CW vs CWL.

Por outro lado, PINE et al. (1994) observaram que ratas submetidas a dieta com alto teor de proteína mostraram manutenção da proteína e gordura corpórea. No presente estudo experimental, os teores de nitrogênio total e não colágeno corpóreo (Figuras 10 e 11) foram similares nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, analisando-se o teor de nitrogênio colágeno (Figura 11) verificou-se redução significativa nos grupos CW e CWL, sugerindo que a evolução da neoplasia promoveu mobilização preferencial do nitrogênio colágeno, preservando o nitrogênio não colágeno que corresponde ao componente intracelular. Por outro lado, deve ser enfatizado que a redução do nitrogênio colágeno foi menos aumentada nos grupos com excesso de leucina (decréscimo em cerca de 18%) em comparação com os grupos com neoplasia sem suplementação (CW) onde a redução deste parâmetro foi de 29%. Estes dados vão de encontro com a proposta inicial do trabalho, em que aventou-se a hipótese de que a suplementação de leucina pudesse preservar a massa protéica da carcaça do hospedeiro.

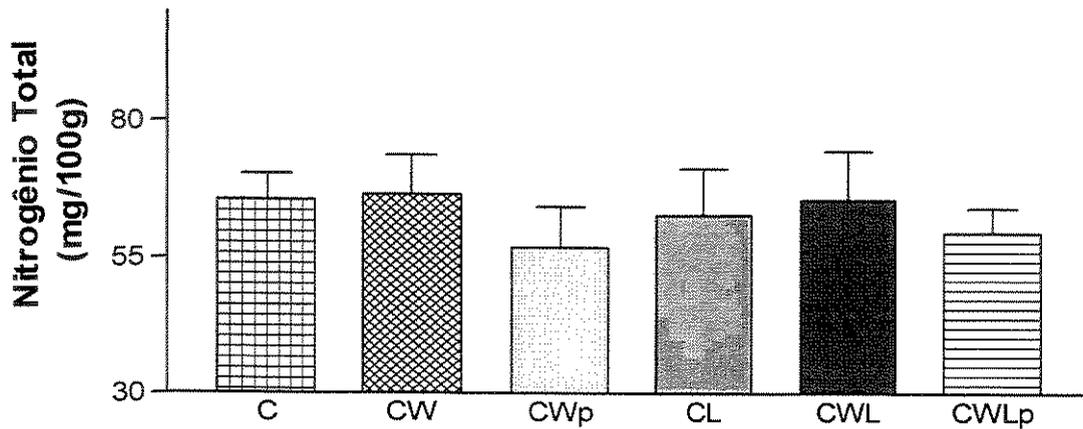


Figura 10: Nitrogênio Total na carcaça dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1.

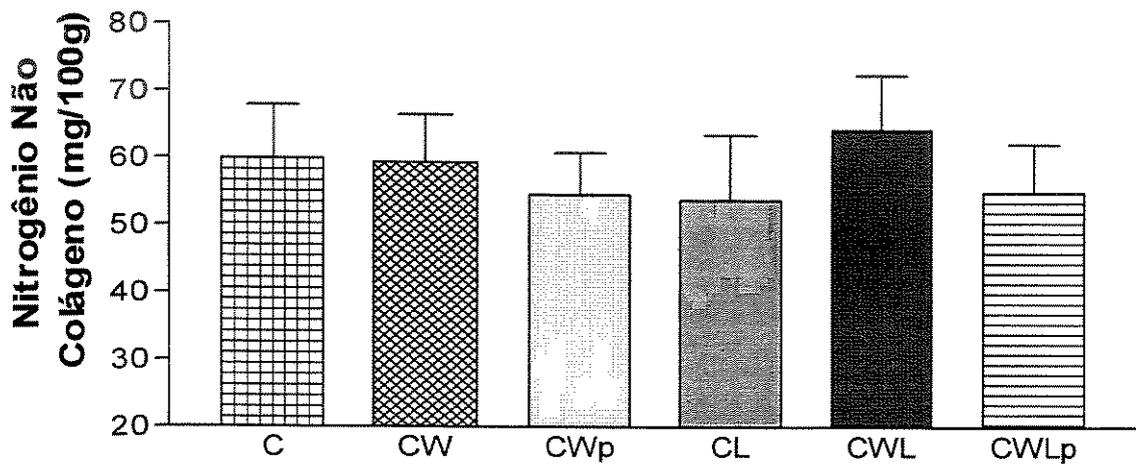


Figura 11: Nitrogênio Não Colágeno na carcaça dos grupos experimentais de ratas. Legenda de identificação vide figura 1.

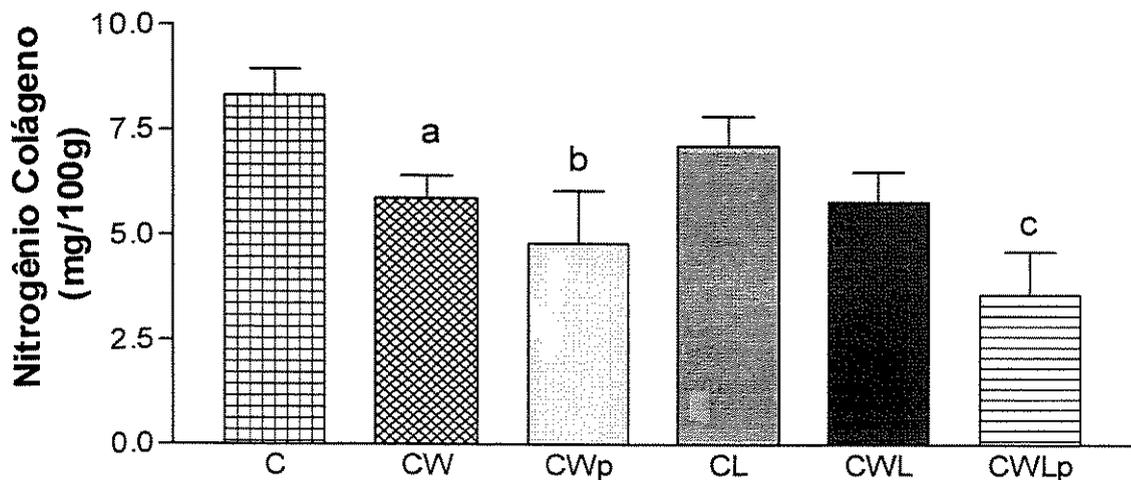


Figura 12: Nitrogênio Colágeno na carcaça dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação vide tabela 1 (Apêndice). ^a, $p < 0,05$ ^b, $p < 0,01$ comparação com respectivo grupo controle C; ^c, $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle.

Estudos de composição corpórea mostram diminuição predominante da massa muscular esquelética de pacientes com diferentes tipos de câncer (COHN et al., 1981). Neste trabalho, verificamos redução de parâmetros corporais que corroboram a hipótese de que a caquexia desenvolvida nestes animais reduz, significativamente, o peso do músculo gastrocnêmio (Figura 13), decréscimo acentuado da gordura corpórea (Figura 8) e da massa corpórea magra (Figura 9), em ambos os grupos portadores de tumor, submetidos ou não a dieta com excesso de leucina.

O peso muscular das fêmeas (CW e CWL) foi reduzido ao final do experimento (Figura 13), provavelmente devido ao intenso crescimento do tumor (Figuras 3 e 4). No estágio inicial do desenvolvimento neoplásico, a proteína corporal não se altera e o nitrogênio é distribuído entre o músculo e a neoplasia. No entanto, no estágio final, quando a anorexia está evidente, a proteína corporal reduz drasticamente (MacFIE, 1987; COHN et al., 1981). Estes resultados coincidem com o decréscimo de proteína muscular verificado no grupo com tumor CW (Figura 14). O câncer cresce, enquanto que a massa muscular e adiposa do hospedeiro são reduzidas (LAWSON et al., 1982; LANDEL et al., 1985). Tanto a síntese protéica, como a utilização de glicose pelas células musculares estão muito diminuídas no câncer, com menor incorporação de leucina [^{14}C], fenilalanina [$4\text{-}^3\text{H}$] e valina [^{14}C], e aumento do catabolismo destes aminoácidos, conforme observado em ratos com carcinossarcoma, em camundongos com adenocarcinoma de cólon e em pacientes com carcinoma hepatocelular (BECK et al., 1991; GUAITANI, 1993; O'KEEFE et al., 1990; SMITH & TISDALE, 1993). Diminuição da atividade de enzimas envolvidas na oxidação e/ou degradação glicolítica e maior

atividade das proteases musculares estão associadas à redução da massa muscular esquelética, com atrofia preferencial dos músculos fásicos, atingindo, principalmente, as proteínas contráteis, em relação às sarcoplasmáticas. Segundo TAKEY & BRASEL (1990), a síntese protéica muscular está diminuída, bem como a concentração de aminoácidos essenciais plasmáticos e do tecido muscular, de ratos portadores do carcinossarcoma de Walker 256. Trabalhos recentes, realizados com o hepatoma ascítico de Yoshida AH-130, com o carcinossarcoma de Walker 256 e com adenocarcinoma MAC16, mostraram que a diminuição rápida e intensa de peso do hospedeiro estava associada a redução acentuada do conteúdo de proteína da musculatura, considerado como principal fator da caquexia (GUAITANI, 1993; SMITH & TISDALE, 1993; TESSITORE et al., 1993).

Estudos com suplementação de aminoácidos de cadeia longa tem evidenciado a melhora dos processos de síntese (ANTHONY et al., 1999) bem como redução da degradação de proteína (BUSQUETS et al., 2000). Concordando com a hipótese inicial deste trabalho de que a suplementação de leucina poderia prevenir a espoliação da carcaça do hospedeiro com câncer, verificou-se que apesar da redução do peso do músculo gastrocnêmio e da massa corpórea magra nas ratas CWL, não foi verificada diferença na concentração protéica muscular em relação à respectiva controle CL e em contrapartida esta concentração de proteína foi significativamente maior do que nas ratas CW, sugerindo um provável efeito protetor da suplementação de leucina na dieta.

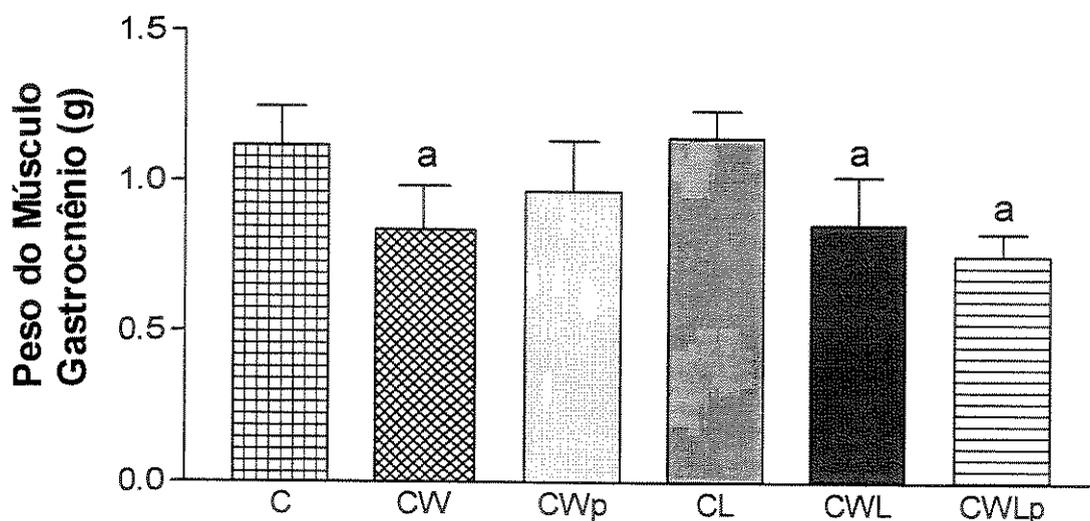


Figura 13: Peso do Músculo Gastrocnêmio dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,001$ em comparação aos respectivos controles.

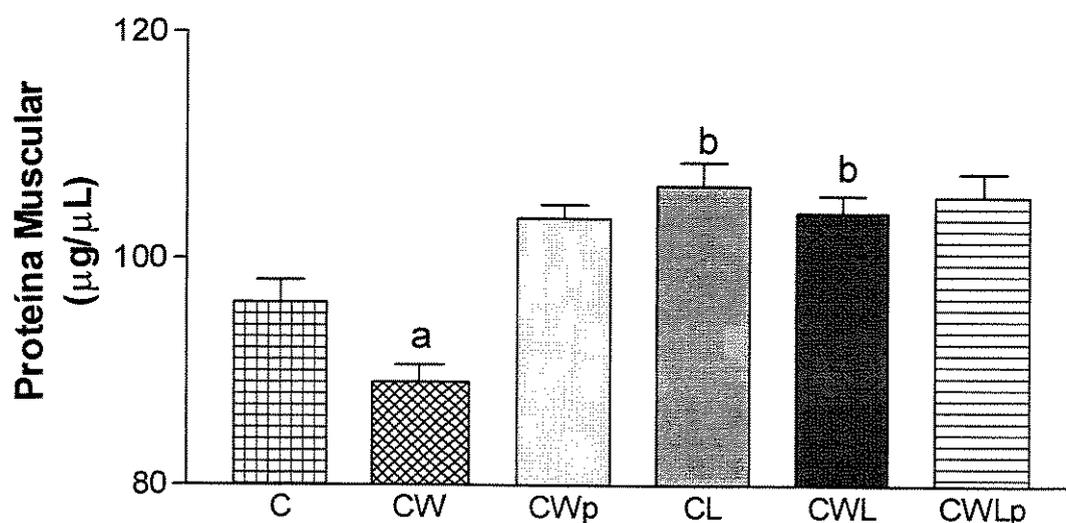


Figura 14: Teor de Proteína do músculo gastrocnêmio dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,05$ em comparação com respectivo grupo controle; ^b, $p < 0,05$ comparação entre C vs CL e CW vs CWL.

O peso do fígado foi significativamente elevado nos grupos portadores de neoplasia alimentados com dieta normoprotéica (CW), apresentando aumento em cerca de 18% em comparação ao grupo controle C. Por outro lado, os animais alimentados com dieta com excesso

de leucina mostraram peso hepático semelhante as respectivas CL. Estes dados abrem caminho para investigações futuras, quanto a atividade hepática dessas ratas portadoras de tumor.

TAKEY et al. (1986) observam que animais implantados com o carcinossarcoma de Walker apresentam peso do fígado significativamente maior, porém com teor de nitrogênio semelhante ao dos controles. Entretanto, VILLA e colaboradores estudando hepatócitos isolados de ratos portadores do carcinossarcoma mostraram aumento da degradação de proteínas de *turnover* lento (albumina) em relação aos controles ou pair-fed, bem como aumento da síntese protéica explicando, assim, o maior conteúdo de proteína e do peso do fígado em ratos portadores de câncer .

Ocorre, ainda, no fígado maior incorporação de aminoácidos marcados nas proteínas, indicando síntese protéica elevada e aumento da atividade das enzimas lisossomais, mostrando maior atividade hepática na presença do câncer (LAWSON et al., 1982).

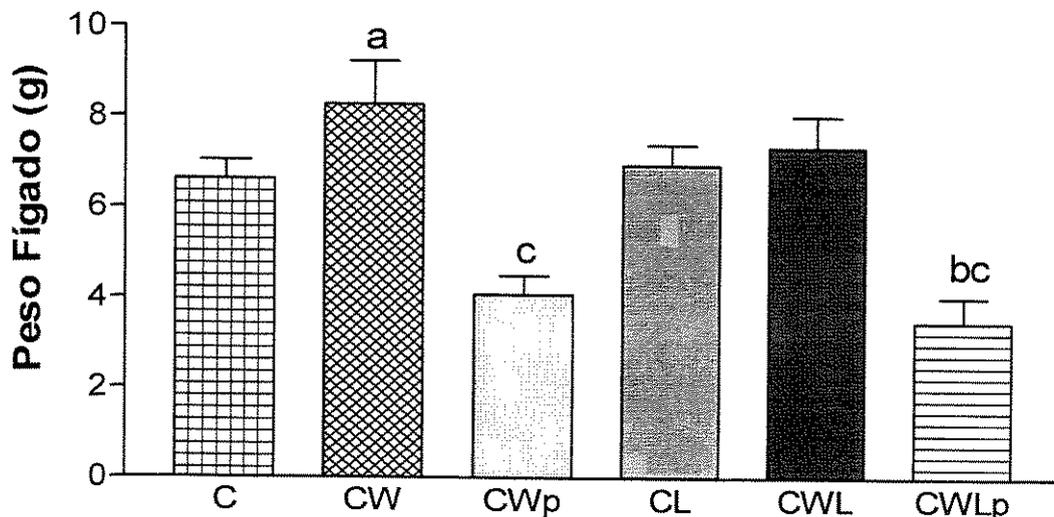


Figura 15: Peso do Fígado dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação dos grupos vide figura 1. ^a, $p < 0,001$ em comparação ao respectivo controle; ^b, $p < 0,01$ em comparação ao respectivo controle; ^c, $p < 0,001$ em comparação com os respectivos grupos portadores de neoplasia.

5. ANÁLISE DO PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Vários trabalhos da literatura mostraram elevada utilização de glicose com conseqüente redução deste substrato na circulação sangüínea em pacientes e animais portadores de neoplasia (SVANINGER et al., 1989; SAUER & DAUCHY, 1990; GAMBARDELLA et al., 1993). Estes dados confirmam aqueles observados nesse trabalho onde houve redução significativa no teor de glicose, nas ratas jovens com implantação de tumor (CW e CWL) em relação ao respectivo grupo controle (C e CL) (Figura 16).

Por outro lado, a redução glicêmica encontrada no grupo CWL foi, significativamente, menos pronunciada (cerca de 28 %) do que àquela observada nas CW (54 %) (Figura 16).

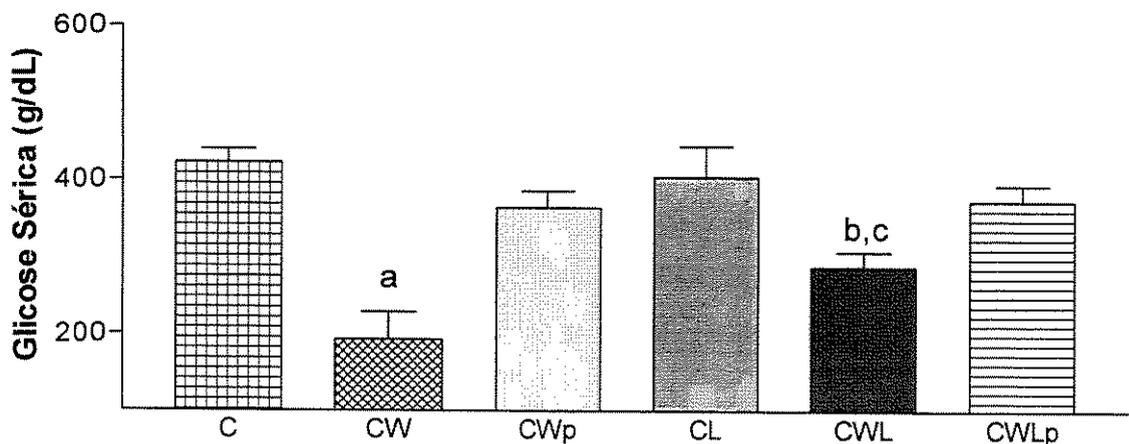


Figura 16: Concentração de glicose sérica dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação dos grupos vide figura 1. ^a, p<0,01 em comparação ao respectivo controle; ^b, p<0,05 em comparação ao respectivo controle; ^c, p<0,05 comparação entre CW vs CWL.

Paralelamente, foram observadas nos grupos CW e CWL, reduções significativa do teor sérico de proteína total, albumina e globulina (Figuras 17, 18 e 19). Estes dados coincidem com os achados, da literatura, em pacientes e animais com câncer (CAIRO & LUCCHINE, 1993; GOMES-MARCONDES et al., 1998; LUNDHOLM et al., 1980). A redução do teor de proteína total está associado à redução da albumina; provavelmente degradação de albumina por hepatócitos isolados está elevada na presença de câncer, em relação aos controles. Além disso, VILLA et al. (1992) verificaram significativa queda de síntese hepática de albumina em ratos portadores de tumor, sugerindo que a queda da concentração plasmática seria decorrente da elevada degradação, bem como queda da síntese de albumina, em relação aos controles e pair fed. Nossos resultados, grupos pair-fed, são concordantes com os achados de literatura, em que há queda do teor de proteína total e albumina em decorrência do processo de restrição da ingestão alimentar e conseqüente desnutrição (MELLO, 1985). Além disso, os animais com tumor (CW) apresentaram peso hepático elevado, concordando com elevação da atividade hepática e conseqüentemente aumento da degradação de albumina verificado por VILLA e colaboradores (1992) em animais com carcinossarcoma.

GUAITANI et al. (1993) também observaram redução dos teores plasmáticos de proteína total, albumina e globulina, e aumento do *turnover* protéico plasmático em ratos portadores de carcinoma. Elevada concentração de aminoácidos plasmáticos provêm substratos para serem utilizados no processo de neoglicogenese e também para serem utilizados pelas células neoplásicas (LEVIM et al., 1983; SAUER & DAUCHY, 1990).

O tumor utiliza, preferencialmente, determinados aminoácidos, como glutamina, leucina e metionina, nos seus processos de síntese protéica, bem como oxidação, acarretando desequilíbrio na concentração plasmática dos mesmos (SAUER & DAUCHY, 1990). Desta forma a neoplasia retém o nitrogênio em benefício do seu próprio crescimento, enquanto o hospedeiro reduz a incorporação e aumenta a degradação protéica, contribuindo para a depleção da carcaça e instalação do estado caquético.

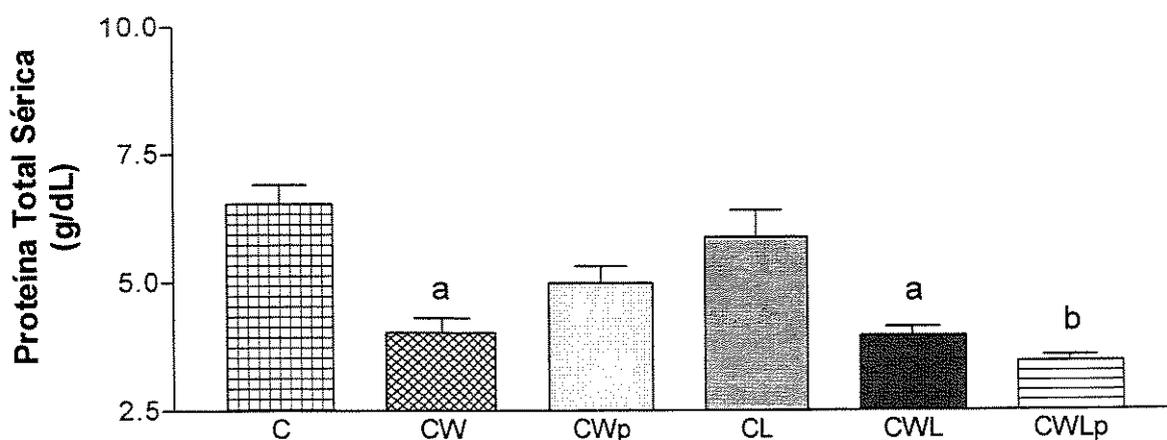


Figura 17: Concentração de proteína total sérica dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação dos grupos vide figura 1. ^a, $p < 0,05$ em comparação ao respectivo controle; ^b, $p < 0,01$ em comparação ao respectivo controle.

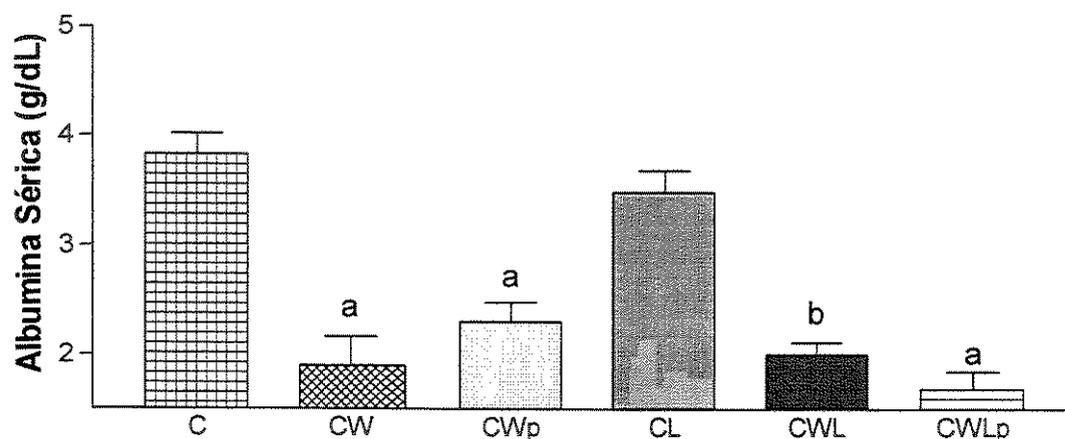


Figura 18: Concentração de albumina sérica dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação dos grupos vide figura 1. ^a, $p < 0,01$ em comparação ao respectivo controle; ^b, $p < 0,05$ em comparação ao respectivo controle.

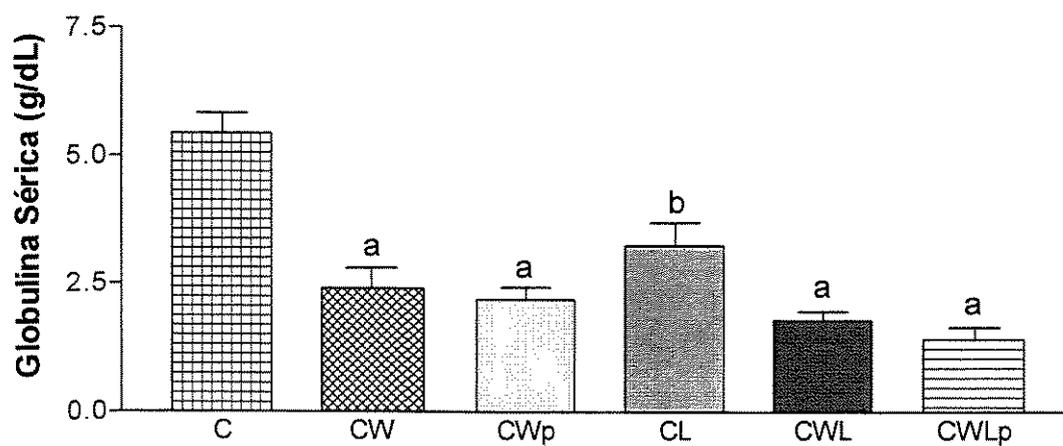


Figura 19: Concentração de globulina sérica dos grupos experimentais de ratas jovens. Legenda de identificação dos grupos vide figura 1. ^a, $p < 0,01$ em comparação com o respectivo controle; ^b, $p < 0,01$ comparação entre C vs CL.

6. ANÁLISE DA TAXA DE ABSORÇÃO INTESTINAL DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

O grupo CW apresentou semelhante taxa de absorção de glicose em relação à respectiva controle C (Figura 20). Estes dados não coincidem com os encontrados em resultados prévios (GOMES-MARCONDES et al., 1998) onde verificou-se redução da taxa de absorção de glicose em animais adultos portadores do tumor de Walker, ou ainda taxa de absorção semelhante em animais recém desmamados portadores deste mesmo tumor. Em contraste, redução da ingestão de alimentos ou jejum, aumenta rapidamente a taxa de transporte nas células endoteliais intestinais, conseqüentemente, aumentando o transporte de glicose (FERRARIS & DIAMOND, 1997).

De fato, razões fisiológicas ou patológicas poderiam decrescer o número e/ou tamanho dos microvilos, ou do número de enterócitos ou, ainda, do número de carreadores da borda em escova (MARTI et al., 1995). Em experimentos realizados em ratos, foi demonstrado que, com a redução da oferta de proteína, o transporte de aminoácidos essenciais foi mantido ou ligeiramente aumentado por carreadores dependentes ou independentes de Na^+ (HIST, 1993). Os resultados observados nos grupos pair-fed, CWp, são concordantes com os dados da literatura, pois a restrição à ingestão resultou em aumento da taxa de absorção de metionina (Figura 21) e absorção de leucina similar às ratas controles C (Figura 22).

A presença de tumor, no grupo CW, mostrou tendência a redução taxa de absorção de metionina e leucina em comparação ao controle C. Estes dados não concordam com aqueles observados por

GOMES-MARCONDES et al. (1998), em que a taxa de absorção de metionina foi elevada nos animais com tumor, independente da idade do hospedeiro e a taxa de absorção de leucina foi elevada apenas nos ratos jovens com tumor. Como foi ressaltado anteriormente, a ingestão adequada de aminoácidos é necessária à manutenção da taxa de crescimento e desenvolvimento. Além da presença do crescimento neoplásico causar anorexia, a menor ingestão protéica promoveu menor taxa da absorção de aminoácidos, observada neste animais, contrariando os dados de literatura, que a menor oferta de proteína induzira aumento da taxa de absorção (HIRST, 1993).

Por outro lado, todos os grupos com dieta com excesso de leucina apresentaram elevada taxa de absorção de metionina e leucina (Figura 21 e 22) comparados aos grupos de eutróficas C e CW. Entretanto, o grupo CWL apresentou considerável redução da taxa de absorção de metionina e leucina em relação a respectiva controle CL. Porém, nas ratas submetidas a excesso de leucina CWL, a taxa de absorção de ambos aminoácidos (metionina e leucina) foi significativamente aumentada, quando comparadas as ratas CW.

SHEWCHUK et al. (1997) verificaram que a suplementação de glutamina na dieta de ratas portadoras de hepatoma de Morris promoveu aumento da evolução do peso corpóreo, reduzindo o peso tumoral e a relação peso tumor pelo peso da carcaça. No presente trabalho, apesar da redução do peso muscular, a massa corpórea magra das fêmeas CWL foi parcialmente recuperada, uma vez que houve um acréscimo de 11,5% em relação às CW. Provavelmente esta elevada taxa de absorção promoveu o suporte de aminoácidos para garantir as alterações metabólicas

direcionada à manutenção da massa corpórea magra, que não foi verificado nas CW.

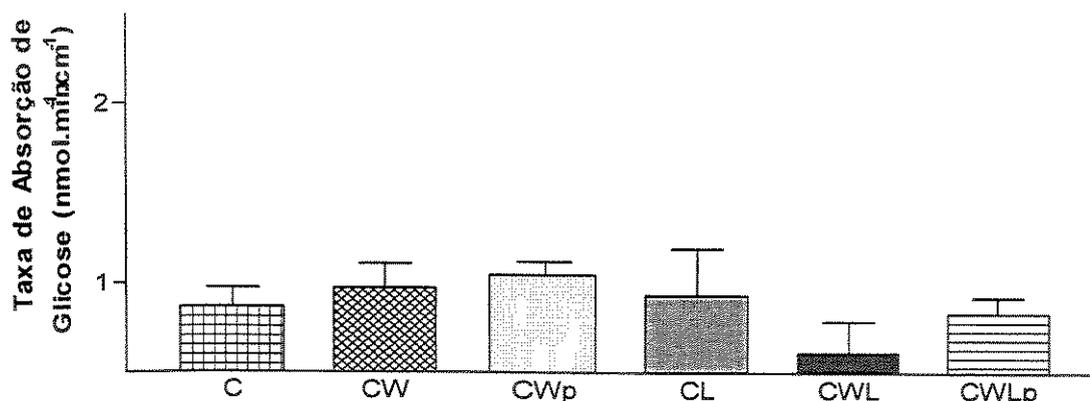


Figura 20: Taxa de absorção de glicose dos grupos de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1.

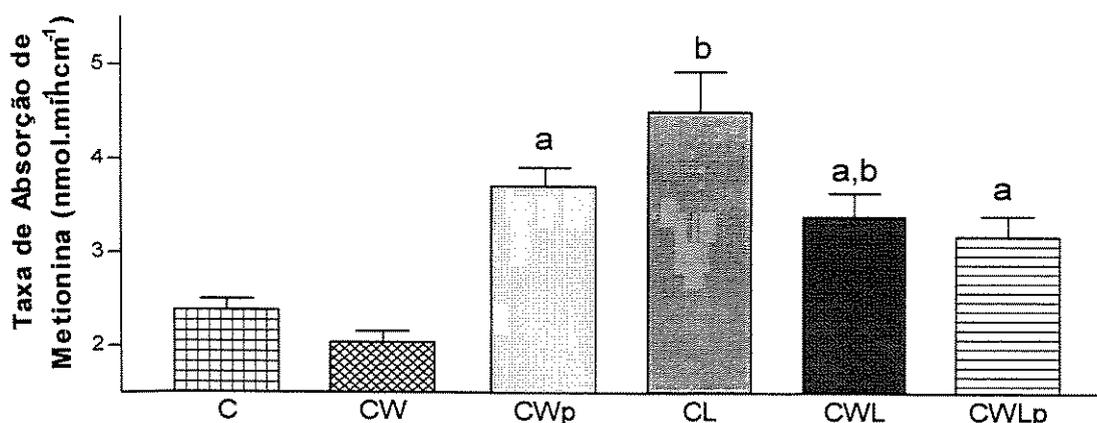


Figura 21: Taxa de absorção de metionina dos grupos de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,01$ em comparação ao respectivo controle; ^b, $p < 0,001$ comparação entre CL vs C e CW vs CWL.

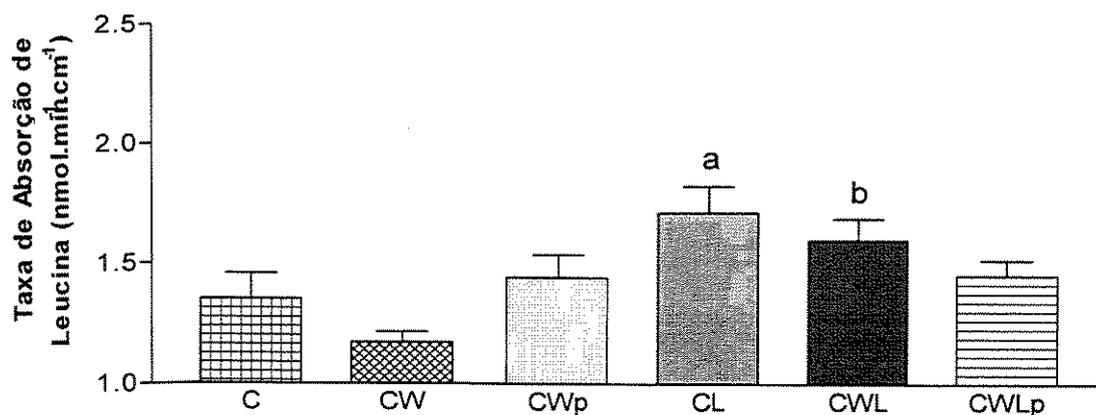


Figura 22: Taxa de absorção de leucina dos grupos de ratas jovens. Legenda de identificação vide figura 1. ^a, $p < 0,05$ comparação C vs CL; ^b, $p < 0,05$ comparação CW vs CWL.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento tumoral alterou o metabolismo do organismo hospedeiro com redução do peso corpóreo, da ingestão alimentar e do peso do músculo gastrocnêmio caracterizando o estado caquético.

A suplementação de leucina na dieta promoveu: aumento do conteúdo protéico muscular no grupo CWL, quando comparado ao grupo CW que recebeu dieta normoprotéica, tendeu a melhorar o balanço nitrogenado, recuperando parcialmente a massa corpórea magra, através da preservação nitrogênio não colágeno (conteúdos intracelulares) e aumento da absorção intestinal do organismo com câncer.

Estes achados sugerem que a leucina provavelmente melhora o processo de síntese e degradação protéica preservando assim a carcaça e melhorando a qualidade de vida de organismos portadores de neoplasia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRÃO A: Câncer de mama associado à gravidez e lactação. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, **34**:180-2, 1988.
2. ADAM PAJ & FELIG P: Carbohydrate, fat, and amino acid metabolism in the pregnant woman and fetus. In: FALKNER, F. & TANNER J.M. eds. **Human growth-1. Principles and prenatal growth**. New York, Plenum Press, 1978. p. 461-547.
3. ALBANESE AA & ORTO LA: Protein and amino acids. In: ALBANESE AA ed. **Newer methods of nutritional biochemistry**. N.Y., Academic Press. 1963, v. I. cap. 1, p. 84.
4. ANTHONY JC, ANTHONY TG, KIMBALL SR, VARY TC, JEFFERSON LS: Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. **Am J Physiol**, **277(6 Pt 1)**:E1077-86, 1999.
5. ARGILES JM & LOPES-SORIANO FJ: The role of cytokines in cancer cachexia. **Med. Res. Review**, **19(3)**:223-248, 1999.]
6. ARGILES JM, ALVAREZ B, LOPES-SORIANO FJ: The metabolic basis of cancer. **Med. Res. Rev**, **17(5)**: 477-98, Review, 1997.
7. ARGILES JM & LOPES-SORIANO FJ: Metabolic host-tumor relationships during perinatal phase. **Med Clin**, **28:109(5)**:186-94, 1997.
8. BAIRD JP: Some aspects of the metabolic and hormonal adaptation to pregnancy. **Acta Endocrinol**, **277 (Suppl)**: 11-18, 1986.
9. BALDWIN W: Adolescent pregnancy and childbearing. An Overview **Semin. Perinatol.**, (N.Y.) **5**:1-8, 1981.

10. BAKER HL: Reproduction and breeding. In. BAKER, H.L.; LINDSEYL, J.R.; WEISBROTH, S.H.: **The laboratory rat**. New York, Academic Press, v. I, cap. 7, p. 153- 168, 1991.
11. BECK SA & TISDALE MJ: Effect of megestrol acetate on weight loss induced by tumour necrosis factor α and a cachexia-inducing tumour (MAC16) in NMRI mice. **Br. J. Cancer**, **62**: 420-424, 1990.
12. BECK SA & TISDALE MJ: Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor production cachexia in the host cancer. **Cancer Res.**, **47**: 5919-23, 1987.
13. BECK AS, SMITH KL, TISDALE MJ: Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. **Cancer Research**, **51**:6089-6093, 1991.
14. BECKMAN DA, BRENT RL, LLOYD JB: Leucine sources for the rat fetus. **Placenta. Jan**;**18(1)**:79-82, 1997.
15. BELIZARIO JE, KATTZ M, RAW CI: Bioactivity of skeletal muscle proteolysis inducing factors in the plasma proteins from cancer patients with weight loss. **Br. J. Cancer.**, **63**:705-7, 1991.
16. BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, **72**:248-254, 1976.
17. BRENNAN MF. Total parenteral nutrition in the cancer patient. **N Engl J Med**, **305(7)**:375-82,1981.
18. BUCHALLA AP, POLES C, TEICH DH: O que funciona contra o câncer. **Veja**, ano **34(4)**:90-97, 2001.
19. BURT ME & BRENNAN MF: Nutritional support of the patient with esophageal cancer. **Semin Oncol**, **11(2)**:127-3, 1984.

20. BUSQUETS S, ALVAREZ B, LLOVERA M, AGELL N, LOPES-SORIANO FJ, ARGILES JM: Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. **J Cell Physiol.**, **184(3)**:380-4, 2000.
21. CAIRO G & LUCCHINI M: Molecular basis of reduced albumin gene expression in hepatoma cell lines with different growth rates. **Exp Cell Res.** **206(2)**:255-60, 1993.
22. CARBO N, COSTELI P, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILES JM: Tumor growth influences skeletal muscle protein turnover in the pregnant rat. **Pediatric Research**, Vol. 43, No. 2, 1998.
23. CARBO N, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILES JM: Tumour growth and fetal uptake of amino acids in the pregnant rat. **Eur J Cancer.** **32A(8)**:1413-9, 1996.
24. CARBO N, LOPEZ-SORIANO FJ, FIERS W, ARGILES JM: Tumour growth results in changes in placental amino acid transport in the rat: a tumour necrosis factor alpha-mediated effect. **Biochem J.** **1**;313 (Pt 1):77-82, 1996.
25. CARBO N, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILES JM: The effects of tumour necrosis factor-alpha on circulation amino acids in the pregnant rat. **Cancer Let.**, **79(1)**: 27-32, 1994.
26. CARVER TD, QUICK AA, TENG CC, PIKE AW: Leucine metabolism in chronically hypoglycemic hypoinsulinemic growth-restricted fetal sheep. **Am J Physiol**, **272 (1Pt 1)**:E107-17, 1997.
27. CERVELLO I, LAFUENTE A, GIRALT M, MALLOL J: Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. **Placenta**, **13**: 273-80, 1992.
28. COHN SH, GARTENHAUS W, SAWITSKY A, RAI K, ZANZI I, VASVANI, et al: Comportamental body composition of cancer patients by measurement of total body nitrogen, potassium and water. **Metabolism.** **30**:222-9, 1981.

29. DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chim Acta** **31(1)**:87-96, 1971.
30. el RAZI NETO S, ZORN TM, CURI R, CARPINELLI AR: Impairment of insulin secretion in pancreatic islets isolated from Walker 256 tumor-bearing rats. **Am J Physiol.**, **271(3)3 Pt 1**: C804-809, 1996.
31. FALCONER JS. FEARON KCH, PLESTER CE: Cytokines the acute phase response and energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. **Ann Surg**, **219**:325-330, 1994.
32. FERRARIS RP, DIAMOND J Regulation of intestinal sugar transport. **Physiol Rev**, **77(1)**:257-302. Review, 1997.
33. FREDIX EWH, BREKEL A JS, WOUTERS EFM: Energy balance in nosmall cell lung carcinoma patients before and after surgical resection of their tumors. **Am Cancer Society**, **15(79)**:717-723, 1997.
34. FREINKEL N & METZGER BE: Metabolic changes in pregnancy. In: WILSON, JD & FOSTER, DW: **WILLIAMS Textbook of endocrinology**. 8th ed. Philadelphia, Saunders, cap. 17, p. 993-1006, 1992.
35. GAD SC & WEIL CS: Statistic for toxicologists. In: Wallace H (editor), **Principles and Methods of toxicology**. Raven Press Ltda., New York, 221-274, 1994.
36. GALLENBERG MM & LOPRINZI CL: Breast cancer and pregnancy. **Sem. Oncol.**, **16**: 369-76, 1989.
37. GAMBARDELLA AL, PAOLISSO G, D'AMORE A, GRANATO M, VERZA M, VARRICCHIO M: Different contribution of substrates oxidation to insulin resistance in malnourished elderly patients with cancer. **Cancer**, **72(10)**: 3106-3113, 1993.
38. GARLICK PJ & McNURLAN MA: Protein metabolism in the câncer patient. **Biochimic**. **76**: 713-717, 1994.

39. GUATIANI A, TORRE PD, MORASCA L, PINTUS C, BARTOSEK I: Two lines of Walker carcinoma 256: Their peculiarities and different interaction with the host. **Tumori**, **69**:1-9, 1983.
40. GEMIGNANI ML & PETREK JÁ: breast cancer during pregnancy: diagnostic and therapeutic dilemmas. **Adv. Surg.**, **34**:273-86, 2000.
41. GOLDBERG AL & CHANG TW: Regulation and significance of amino acids in skeletal muscle. **Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.**, **37**: 2301-5, 1978.
42. GOMES MCC: Desnutrição protéico-calórica, desenvolvimento corporal e crescimento do carcinossarcoma de Walker 256: Alterações metabólicas e morfológicas em ratos jovens. São Paulo, 1985 [**Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
43. GOMES MCC, BEVILACQUA RG, LIMA-GONALVES E, RESENDE L: Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. **Cien. Cult.**, **35(7)**: 736, 1983.
44. GOMES-MARCONDES MC: Influência da gestação sobre o crescimento do cancer e deste sobre o desenvolvimento feto-placentário. Estudo experimental em ratas Wistar inoculadas com carcinossarcoma de Walker 256. São Paulo, 1994 [**Dissertação de Doutorado**. Instituto de Ciências Biomédicas, da Univ. de São Paulo].
45. GOMES-MARCONDES MC, CURY L, CURI R: Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. **Cancer Research Therapy and Control**. Vol 5: 277-83, 1998.
46. HENRY RJ: Determination of serum protein by biuret reaction. In: **Clinical Chemistry Principles and Techniques**. 2ed. Hagerstown, Harper & How, p.413, 1978.
47. HERRERAS E, LASUNCIÓN MA, PALACÍN M, ZORZANO A, BONET B: Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel Era. **Diabetes**, **40 (Suppl 2)**: 83- 8, 1991.

48. HRIST BH: Dietary regulation of intestinal nutrient carriers. **Proc Nutr Soc.** **52(2)**:315-24. Review, 1993
49. HOLLANDER DM, EBERT EC, ROBERTS AL, DEVEREUX DF: Effects of tumor type and burden on carcass lipid depletion in mice. **Surgery**, **100(2)**: 292-7, 1986.
50. HYTTEN FE: Long term consequences of fetal deprivation. **Br. J. Obstet Gynaecol.** **97(8)**: 665-6, 1990.
51. HUSSEY HJ & TISDALE MJ: Effect of polynsaturated fatty acids on the growth of murine colon adenocarcinomas in vitro and in vivo. **Br J Cancer**, **70**:6, 1994.
52. INUI A: Cancer anorexia-caquexia syndrome. Are neuropeptides the key? **Cancer Research**, **59 (15)**:4493-4501, 1999.
53. KANSAL KV: Intestinal transport of amino acids in protein-deficient rats and the effect of rehabilitation using a casein diet. **J. Nutr.**, **111**:1513-21, 1980.
54. KARASOV WH, SOLBERG DH, DIAMOND JM: Dependence of intestinal amino acid uptake on dietary protein or amino acids levels. **Am J Physiol**, **252(5 Pt 1)**:G614-25, 1987.
55. KING RM, WELCH JS, MARTIN JK Jr, COULAM CB. Carcinoma of the breast associated with pregnancy. **Surg Gynecol Obstet**, **160(3)**:228-32, 1985.
56. KLINGER MM, MACCARTER GD, BOOZER CN: Body weight and composition in the Sprague Dawley rat: comparison of three outbred sources. **Lab Anim Sci.**, **46(1)**:67-70, 1996.
57. LANDEL AM, HAMMOND WG, MEGUID MM: Aspects of amino acid and protein metabolism in cancer-bearing states. **Cancer**, **55**:230-7, 1985.

58. LAZO AP: Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. **Eur. J. Biochem.** **117**:19-25, 1981.
59. LAWSON DH, RICHMOND A, NIXON DW, RUDMAN D: Metabolic approaches to cancer cachexia. **Annu Rev. Nutr.** **2**:277-301, 1982.
60. LEVIN L, GEVERS W, JARDINE L, DE GUEL FJM, DUNCAN EJ: Serum amino acids in weight-losing patients with cancer and tuberculosis. **Eur J Cancer Clin Oncol**, **19**:711-5, 1983.
61. LIBERMAN L, GIESS CS, DERSHAW DD, DEUTCH BM, PETREK JA: Imaging of pregnancy-associated breast cancer. **Radiology.** **191(1)**: 245-248, 1994.
62. LILIENTHAL Jr JL, ZIERLER KL, FOLK BP, BUKA R, RILEY MJ: A reference base and system for analysis of muscle constituents. **J Biol Chem**, **182**:501-8, 1950.
63. LOPES MN, BLACK P, ASHFORD AJ, PAIN VM: Protein metabolism in the tumour-bearing mouse. **Biochem J**, **264**: 713-719, 1989.
64. LUNDHOLM K, EDSTROM S, KARLBERG I, EKMAN L, SCHERSTEN T: Relationship of food intake, body composition, and tumor growth to host metabolism in non growing mice with sarcoma. **Cancer Res**, **40(7)**:2516-22, 1980.
65. LUNDHOLM K: Interactions of cytokines in the host. **Acta Chir Scand**, **549 (suppl)**:31-4, 1989.
66. MacFIE J, BURKINSHAW L: Body composition in malignant disease. **Metabolism**, **36**:290-294, 1987.
67. MARTI T, GONZALEZ E, VINARDELL MP: Elucidation of intestinal transport results as a function of age. **Physiol Res.**, **44**:31-37, 1995.
68. MARTINES-LACACI I & DICKSON RB: Dual regulation of epidermal growth factor family of growth factors breast cancer by sex steroids and protein kinase C. **J Steroid Biochem Med Biol**, **57(1-2)**, 11-11, 1996.

69. McCARTHY TE & SULIVAN MX: A new and highly specific colorimetric test of methionine. **J Biol Chem** **141**:871-876, 1941.
70. McNULAN MA, HEYS SD, PARK KGM, BROOM J, BROWN DS, REMIN O, GARLICK PJ: Tumor and host tissue responses to branched-chain amino acid supplementation of patients with cancer. **Clin. Science**, **86(3)**: 339-345, 1994.
71. MEDINA MA & CASTRO IN: Glutaminolysis and glycolysis interaction in proliferate cells. **Int. J. Biochem.**, **22(7)**: 681-3, 1990.
72. MELLO MAR: Desnutrição protéico-calórica, gravidez e desenvolvimento materno: estudo de alterações corporais e etabólicas entre ratas jovens. São Paulo, **Tese Doutorado**, Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. São Paulo, 1985.
73. METCALFE J, STOCK MK, BARRON DH: Maternal physiology during gestation. In: E. KNOBIL & J. NEILL ed., **The Physiology of Reproduction**. New York, Raven Press, cap. 53, p.2145-76, 1998.
74. MILLEY JR: Ovine fetal leucine kinetics and protein metabolism during decreased oxygen availability. **Am J Physiol.** **274(4 Pt 1)**:E618-26, 1998.
75. MILLICAN PE, VERNON, RG, PAIN VM: Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. **Biochem. J.**, **248**: 251-7, 1987.
76. MITCHELL HS: Desnutrition. In: **Nutrição por Mitchell et al.** 6 ed. Rio de Janeiro, Interamericana, p. 330-45, 1978.
77. MULLIGAN K & BLOCH AS: Energy expenditure and protein metabolism in human immunodeficiency virus infection and cancer cachexia. **Seminars in Oncology**, **25**:2, Suppl 6 (April), 1998.
78. NAIR KS, SCHWARTZ RG, WELLE S: Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. **Am J Physiol.**, **263(5 Pt 1)**:E928-34, 1992

79. O'KEEFE SJD, OGDEN J, RAMJEE G, RUND J: Contribution of elevated protein turnover and anorexia to cachexia in patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, **50**:1226-30, 1990.
80. OLIVEIRA AS, CHRISTOS PJ, BERWICK M: The role of epidemiology in cancer prevention. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **216(2)**:142-150, 1997.
81. PARENTE JT, AMSEL M, LERNER R, CHINEA F: Breast cancer associated with pregnancy. **Obstet. Gynecol**, **71**: 861-4, 1988.
82. PETREK JA, PRESSMAN PI, SMITH RA: Lymphedema: current issues in research and management. **CA Cancer J Clin.**, **50(5)**:292-307; quiz 308-11. Review, 2000.
83. PETREK JA: Breast cancer during pregnancy. **Cancer**, **74**: 518-527, 1994.
84. PHILPOTT DJ, BUTZNER JD, MEDDINGS JB: Regulation of intestinal glucose transport. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **70**: 1201-1207, 1992.
85. PINE AP, JESSOP NS, ALLAN GF, OLDHAM JD: Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 4. Tissue protein synthesis and turnover associated with mobilization of maternal protein. **Br J Nutr**, **72(6)**:831-44, 1994.
86. PINE AP, JESSOP NS, OLDHAM JD: Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. **Br J Nutr**, **72(6)**:815-30, 1994.
87. PISTERS PWT & BRENNAN MF: Amino acid metabolism in human cancer cachexia. **Annu. Rev. Nutr.**, **10**:107-32, 1990
88. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY J: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.** **123**: 1939-51, 1993.

89. RENNIE MJ & TRIPTON M: Protein and amino acids metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. **Ann. Rev. Nut.**, **20**:547-83, 2000.
90. ROSEN H: A modified ninhydrin colorimetric analysis of amino acids. **Arch Biochem. Biophys.** **67**: 1-15, 1957.
91. RUSSO IH, KOSZALKA M, RUSSO J: Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis. **Br. J. Cancer**, **64**: 481-4, 1991.
92. RYAN EA & ENNS L: Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. **J. Clin. End. Metab.**, **67(2)**: 341-7, 1988.
93. SAUER LA & DAUCHY RT: Tumour-host metabolic interrelationships. **Biochem. Soc. Trans.**, **18**: 80-2, 1990.
94. SEELAENDER MC, CURI R, COLQUHOUN A, WILLIAMS JF, ZAMMITT VA: Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of cachectic rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma: effect of indomethacin treatment. **Biochem Mol Biol Int.****44(1)**:185-93, 1998.
95. SHEWCHUK LD, BARACOS VE, FIELD CJ: Dietary L-glutamine supplementation reduces the growth of the Morris Hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. **J Nutr.**, **127(1)**:158-66, 1997.
96. SMITH KL & TISDALE MJ: Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. **Br. J. Cancer.** **68**: 314-318, 1993.
97. SMITH KL, LORITE MJ, TISDALE MJ: Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid. **Cancer Res.**, **59**:507-5513, 1999.
98. SPENCER HC, MAUGULIS S, WILDER VW: A micromethod for the determination of gelatin and a study of the collagen content of muscles from normal and dystrophic rabbits. **J Biol Chem**, **120**:256-266, 1937.

99. SVANINGER G, GELIN J, LUNDHOLM K: The cause of death in non-metastasizing sarcoma-bearing mice. A study with relevance for tumor treatment experiments in mice. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** **25**:1295-302, 1989.
100. TAKEY JA, ISTFAN NW, JONES CT, HAMAWY KL, BISTRAN BR, BLACBURN GL: Influence of the Walker 256 carcinoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. **Cancer Res.**, **46**:5649-54, 1986.
101. TANNOCK IF: Biology of tumor growth. In: Cancer progress and prospects I. **Hospital Practice**, 81-93, 1983.
102. TAKEY JA & BRASEL JA: Effects of tumor necrosis factor α on skeletal muscle and Walker 256 carcinosarcoma protein metabolism studied in vivo. **Cancer Res.**, **90**:2765-68, 1990.
103. TESSITORE L, COSTELLI P, BACCINO FM: Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. **Br. J. Cancer**, **67**: 15-23, 1993.
104. TESSITORE L, COSTELLI P, BACCINO FM: Pharmacological interference with tissue hypercatabolism in tumour-bearing rats. **Biochem J.** **299 (Pt 1)**: 71-8, 1994.
105. TISDALE MJ: Metabolic effects in a murine cachexia model. **Biochem. Soc. Trans.**, **18**: 83- 4, 1990.
106. TISDALE MJ.: Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms. **Frontiers in Bioscience**, **6(d)**:164-174, 2001.
107. TISDALE MJ: Wasting in cancer. **J Nutrition**, **129(1)**: 2435-2465, 1999.
108. TISDALE MJ: Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, **16(10)**:1013-1014, 2000.
109. TODOROV PT, FIELD WN, TISDALE MJ: Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). **Br J Cancer**, **80(11)**:1734-7, 1999.

110. TOLEDO MT & GOMES-MARCONDES MC: Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. **Oncology Research**, 11:359-366, 1999.
111. TRINDER P: Determination of blood glucose using on oxidase-peroxidase system with a non carcinogenic chromogen. **J. Clin. Path.** 22: 158-61, 1969.
112. Van ROYEN M, CARBO N, BUSQUETS S, ALVAREZ B, WUINN LS, LOPES-SORIANO FJ, ARGILES JM: DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link wit cachexia? **Biochem Biofhs Res Comm.** 13;270(2):533-7, 2000.
113. VASWANI NA, VARTSKY D, ELLIS KJ, YASUMURA S, COHN SH: Effects of caloric restriction on body composition and total body nitrogen measured by neutron activation. **Metabolism**, 32(2):158-8, 1983.
114. VILLA P, ARIOLI P, GUAITANI A: Protein, turnover, synthesis and secretion of albumin in hepatocytes isolated from rats bearing Walker 256 carcinoma. **In vivo Cell. Dev. Biol.**, 28A:157-61, 1992.
115. WATTENBERG LW, WIEDMANN TS, ESTENSEN RD, ZIMMERMAN CL, STEELE VE, KELLOFF GJ: Chemoprevention of pulmonary carcinogenesis by aerosolized budesonide in female A/J mice. **Cancer Res.** 15;57(24):5489-92, 1997.
116. WATERHOUSE C & NYE WHR: Metabolic effects of infused triglycerides. **Metabolism**, 10:403-407, 1961.
117. WEIGLY ES: The pregnant adolescent. **J. Am. Diet. Assoc.**, 66:588-92, 1975.
118. WEIJS, P.J.M.; SCHREURS, V.V.A.M.; GROOTEN, H.N.A.: Meal feeding and leucine utilization pregnant rats. **Brith J. Nutr.** 73: 253-258, 1995.

119. WOLF RF, WEKSLER B, BRENNAN MF, BURT M: Growth hormone administration preserves lean body mass in sarcoma-bearing rats treated with doxoribium. **Cancer Res.**, **53(22)**: 5483-6, 1993.
120. WOOLSON RF: IN: Statistical Methods for the analysis of biomedical data. WOOLSON RF. University of Iowa, John Wiley & Sons, N.Y., cap. 11, p. 364-383, 1987.

PARTE 2

Nesta parte são apresentados os trabalhos sobre as ratas jovens grávidas, submetidas ou não a suplementação de leucina na dieta e inoculadas ou não com o carcinossarcoma de Walker 256. O trabalho publicado na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* corresponde à composição corpórea química, e o outro, submetido a publicação na revista *BMC*, corresponde aos resultados obtidos nos experimentos de absorção intestinal.

Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor

G. Ventrucci, M.A.R. Mello
and M.C.C. Gomes-Marcondes

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia,
Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Abstract

Cancer patients present high mobilization of host protein, with a decrease in lean body mass and body fat depletion occurring in parallel to neoplastic growth. Since leucine is one of the principal amino acids used by skeletal muscle for energy, we investigated the changes in body composition of pregnant tumor-bearing rats after a leucine-supplemented diet. Sixty pregnant Wistar rats divided into six groups were fed a normal protein diet (18%, N) or a leucine-supplemented diet (3% L-leucine, L). The pregnant groups were: control (CN), Walker 256 carcinoma-bearing rats (WN), control rats pair-fed with tumor-bearing rats (pfN), leucine-supplemented (CL), leucine-supplemented tumor-bearing (WL), and leucine-supplemented rats pair-fed with tumor-bearing rats (pfL). At the end of pregnancy, all animals were sacrificed and body weight and tumor and fetal weight were determined. The carcasses were then analyzed for water, fat and total, collagen and non-collagen nitrogen content. Carcass weight was reduced in the WN, WL, pfN and pfL groups compared to control. The lean body mass and total carcass nitrogen were reduced in both tumor-bearing groups. Despite tumor growth and a decrease in fetal weight, there was a slight decrease in collagen (7%) and non-collagen nitrogen (8%) in the WL group compared with the WN group which showed a decrease of 8 and 12%, respectively. Although the WL group presented severe tumor growth effects, total carcass nitrogen and non-collagen nitrogen were particularly higher in this leucine-supplemented group compared to the WN group. These data suggest that the leucine-supplemented diet had a beneficial effect, probably attenuating body wasting.

Key words

- Walker 256 tumor
- Pregnancy
- Body composition
- Leucine
- Carcass nitrogen
- Diet supplementation

Correspondence

M.C.C. Gomes-Marcondes
Departamento de Fisiologia e
Biofísica, IB, UNICAMP
13083-970 Campinas, SP
Brasil
Fax: +55-19-289-3124
E-mail: cintgoma@unicamp.br

Research supported by FAPESP
(Nos. 96/09463-6, 98/01473-8, and
98/16022-1), FAEP-UNICAMP and
CNPq.

Received March 27, 2000
Accepted January 3, 2001

Malignant neoplasias can kill the host due to fast growth spreading to all tissues and the intense waste of nutrients, or by a combination of these factors (1). Cancer cachexia is characterized by anorexia and host tissue depletion. More than 80% of the patients with malignant disease present features of malnutrition and cachexia as the cause of

death (2). During cancer growth the host presents hypercatabolism, mainly of protein, reduced tissue mass and an increasingly negative nitrogen balance. In many cases, the lean body mass of tumor-bearing rats decreases proportionally to the increase of the neoplastic mass (1). A recent experiment has shown increased leucine oxidation in tumor-bearing

ing animals, supporting the demand for both skeletal muscle and tumor tissue, which seems to contribute to the enhanced amino acid turnover (3). In the presence of energy deficiency, tumor cells use other substrates such as alanine, glutamine, lactic acid and ketone bodies (4). Maternal nutrition is very important for the duration of pregnancy. The physiological changes occurring during pregnancy can be sustained by an appropriate nutrient supply to ensure placental and fetal development (5). The association between cancer and pregnancy is about 0.1% (6). Cancer development is difficult to predict and its diagnosis is delayed due to the period, evolution and term of pregnancy (5). In fact, some studies have suggested that pregnancy does not favor the development of cancer, but protects the organism against tumor growth (7). In contrast, recent studies have shown fetal reabsorption and death during the evolution of malignant Walker tumor (8). Protein is intensely mobilized in the organism with cancer, a fact leading to the cachectic state. On the other hand, during the early stages of rat pregnancy, protein is synthesized and accumulated in the maternal organism and is later mobilized during the last days of pregnancy to provide substrates for the fetus (9). To some extent, the fetus can be compared to rapid tumor growth since both tissues have an exponential growth and are dependent on an adequate supply of glucose and amino acids. For this reason, the association between cancer and pregnancy may change the nutritional supply to both tumor and fetal tissues. Furthermore, several studies have reported that the branched chain amino acid leucine independently stimulates skeletal muscle protein synthesis and that enhanced oxidation can prevent alanine release by skeletal muscle (10). Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of a leucine-supplemented diet on chemical body composition during tumor growth in pregnant rats.

Young female Wistar rats (45 days old, N

= 60) were obtained from the State University of Campinas animal facility, and maintained in the Nutrition and Metabolism Research Laboratory of the Department of Physiology and Biophysics of UNICAMP. Female rats were placed with adult males (90-100 days old, 4 females: one male) in collective cages for one night (12 h) according to the harem method. The first day of pregnancy was determined following detection of sperm in a vaginal smear. Animals were housed in metabolic cages under normal conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12/12-h light/dark cycle). All animals were fed *ad libitum* a semipurified AIN-G93 diet with free access to drinking water throughout the experiment. Pair-fed non-tumor-bearing controls were offered the same amount of food as that eaten by the tumor-bearing rats. The pregnant animals were divided into six groups and studied for 20 days. Three groups were fed a normal protein diet (18% protein, AIN-G93; N): control rats (CN), tumor-bearing rats (WN), and control pair-fed to tumor-bearing groups (pfN). The other three groups were fed the leucine diet (15% protein and 3% L-leucine, according to AIN-G93; L): control rats fed the leucine-supplemented diet (CL), tumor-bearing rats fed the leucine-supplemented diet (WL), and leucine pair-fed groups (pfL). A Walker 256 tumor cell suspension (approximately 0.25×10^6 cells in 0.5 ml of saline) was subcutaneously injected on the right flank of the WN and WL rats, and the control groups (CN, CL, pfN and pfL) were injected with 0.5 ml 0.9% NaCl without anesthesia. The tumor cells were injected immediately after pregnancy was detected. General UKCCR guidelines (1988 United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research) for animal welfare were followed (Ethical Committee for Animal Research, CEEA and COBEA, Brazil, No. 034-2). During the experimental period, changes in body weight, tumor weight, and food intake were recorded every two days. Tumor weight was calculated from 3 orthogonal

linear measurements and compared with the data from a weight dimension curve (8). After 20 days, all rats were killed by cervical dislocation. Placental, fetal and tumor weight were recorded. Gastrointestinal tract, fetuses, placentas, uterine tissues and tumor mass were removed, and all carcasses were kept at -20°C for chemical analysis of body composition. The amount of carcass water was determined by subtracting dry weight from wet weight. Total fat was extracted with petroleum ether using a Soxhlet apparatus. An aliquot of the carcass after dry and fat extraction was analyzed for total nitrogen content using a colorimetric micro-Kjeldahl method (11). Another sample was submitted to alkaline digestion with sodium hydroxide plus acidified tannic acid. After these procedures, collagen nitrogen was measured by the colorimetric method described by Albanese and Orto (11). Non-protein nitrogen was calculated by subtracting collagen nitrogen from total nitrogen. Statistical differences between groups were assessed by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (12) followed by the Dunn test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

At the end of the experiment all pregnant rats presented a gain in body weight compared to that observed at the beginning of the experimental period. Even during pregnancy, when maternal adaptations cause a weight

gain, tumor growth induced a reduction in body weight (10% in WN and 15% in WL, $P < 0.005$; Table 1) compared to the control groups. These results agree with those obtained in studies on CO/COBS rats bearing Walker 256 tumor for 14 days, which have shown a 20% reduction in food intake and a 15% reduction in body weight (13). In a previous study (8) we detected a 12% body weight reduction in adult pregnant tumor-bearing rats after 21 days. Although the decrease in body weight percentage in both tumor-bearing groups was similar to that reported in other studies, food intake was greatly decreased in these groups (around 32% in the WN and WL groups, data not shown).

Cancer cachexia is a complex syndrome in which, besides fat depletion, the progressive body weight loss occurs mainly because of the wasting of protein tissue (14). Parallel to a greater tumor mass, similar in both tumor-bearing groups independently of diet treatment (Table 1) and a progressive tumor/carcass weight ratio in WN and WL (around 7% in both groups), there was a marked decrease in fetal weight in both tumor-bearing groups (57% in WN and 67% in WL; Table 1). These results also support the idea of a harmful effect of tumor burden especially during pregnancy because tumor implantation caused marked changes in the ratio between placental and

Table 1 - Body and carcass weight, body gain, tumor and fetal weight of the pregnant groups studied.

Data are reported as means \pm SEM for 10 animals per group. Groups: control (CN); bearing a Walker 256 carcinoma (WN); control pair-fed to tumor-bearing groups (pfN); control receiving a leucine-supplemented diet (CL); tumor-bearing rats receiving a leucine-supplemented diet (WL), and leucine pair-fed groups (pFL). *Carcass weight represents the total body weight minus placentas, fetus, uterus, intestinal tract and tumor tissue. * $P < 0.05$ compared to control groups; ** $P < 0.05$, CN vs CL or WN vs WL (Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test).

	CN	WN	pfN	CL	WL	pFL
Body weight on the first day (g)	140.6 \pm 4.92	172.9 \pm 7.93*	153.1 \pm 2.78	146.2 \pm 4.71	162.6 \pm 7.56	149.8 \pm 5.96
Body weight on the last day (g)	231.0 \pm 10.25	221.0 \pm 8.01	170.1 \pm 8.41*	207.2 \pm 8.62	226.4 \pm 13.02	146.3 \pm 8.20*
Carcass weight (g) [#]	172.7 \pm 2.66	166.1 \pm 7.21	140.1 \pm 6.35*	160.1 \pm 3.14	165.4 \pm 9.34	120.0 \pm 6.81*
Body weight gain on the last day (%)	165.5 \pm 8.55	128.9 \pm 4.52*	111.8 \pm 6.53*	141.9 \pm 5.06**	135.2 \pm 7.03**	98.18 \pm 5.72*
Tumor weight (g)		11.73 \pm 0.93			11.58 \pm 0.68	
Fetal weight (g)	3.73 \pm 0.13	1.61 \pm 0.22*	2.98 \pm 0.34*	3.45 \pm 0.16	1.15 \pm 0.16	2.77 \pm 0.28*

fetal weight. In the WN group, the fetal weight decrease was positively correlated with the placental weight decrease ($P < 0.01$; data not shown) and therefore the nutritional support to fetal growth could be due to reduced placental function. This idea is supported by the fact that fetal weight reduction was less intense during nutritional deficiency, such as that observed in both pfN and pfL groups (a 20% fetal weight decrease). In addition, the leucine-supplemented diet associated with tumor growth induced a reduction in fetal and placental weight similar to that observed in the WN group.

Despite the reduction in fetal weight induced by the leucine-enriched diet, there was no correlation between the placental and fetal weight, suggesting that other mechanisms may be involved in the harm to the maternal unit. Previous studies have shown that tumor implantation reduces placental and fetal weight and protein content in the placenta and fetus of adult tumor-bearing rats (8), and produces intensive hemorrhage and edema in the placenta of tumor-bearing rats (15). In contrast, the implantation of Yoshida AH-130 ascites hepatoma during the last week of rat gestation resulted in normal fetal growth (16). In most studies, the percentage of carcass water was higher in cancer patients (17). The body water content was slightly increased in the WN, WL (6% and 7%, respectively) and pair-fed groups (6% in pfN and 9% in pfL). Therefore, our data suggest that the changes produced by tumor growth in these pregnant rats do not support the alterations in body water content observed in cancer patients and in animals (18). The fat carcass decrease observed in both tumor-bearing groups (32% in WN and 20% in WL) may have been due to the intense fat mobilization from adipose tissue especially in the WN group.

Depletion of host fat stores is a common finding in cancer cachexia. In an extensive review (14), this loss of body fat was related, in part, to a circulatory lipid-mobilizing fac-

tor derived from the tumor cells. Although anorexia is common in cancer, loss of carcass fat cannot be attributed to a decreased calorie intake alone, since pair-fed animals do not lose as much fat as tumor-bearing rats. In contrast, we observed that the decrease in body fat was similar in both tumor-bearing and pair-fed rats. This was possibly related to the catabolic phase during the last days of the rat pregnancy. In pregnant rats, body fat accumulation reaches a maximum at 19 days of gestation and declines on the 21st day, but several fat depot changes are highly dependent on the animals' feeding condition, since they change in magnitude and even in direction in the fasting state (19). A slight decrease in lean body mass, which was not significant, was observed in the WN group (Table 2).

Other studies have shown a significant increase in proteolysis in cancer patients, twice as high as observed in malnourished patients. This wasting of lean body mass reveals the incapacity to conserve body protein (20). In contrast, the WL group presented a slight increase in lean body mass compared with its respective control group. However, the increase in WL lean body mass was significantly higher than in the WN group (around 12%), suggesting an improved effect of the leucine-enriched diet. In spite of a slight (not significant) decrease in total carcass nitrogen in both tumor-bearing groups (Table 2), the WL group kept the total nitrogen level (13% higher than in the WN group) even during the wasting of tumor growth. Collagen nitrogen represents the extracellular mass that can be less metabolically active and less wasted than the cellular mass. The collagen nitrogen was preserved in the WN group compared to the WL group, which presented a significant decrease in this parameter compared to the CL group (Table 2).

Carbo et al. (16) suggested that pregnancy could protect against the cachexia induced by the tumor or retard its appearance. The authors found a similar increase in

Table 2 - Body water content, body fat, lean body mass, total carcass nitrogen, and collagen and non-collagen nitrogen content of the pregnant groups studied.

Data are reported as means \pm SEM for 10 animals per group. See Table 1 for group abbreviations. * $P < 0.05$ compared to the respective control groups; ** $P < 0.05$ compared to the WN group (Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test).

	CN	WN	pFN	CL	WL	pFL
Body water (%)	56.81 \pm 1.46	60.85 \pm 1.73	59.39 \pm 0.58	56.79 \pm 2.55	59.46 \pm 1.46	61.31 \pm 0.54
Body fat (%)	13.49 \pm 0.68	9.10 \pm 1.79*	8.07 \pm 0.87*	15.07 \pm 2.17	12.07 \pm 1.62	5.56 \pm 0.42*
Lean body mass (g)	39.54 \pm 0.86	37.71 \pm 1.46	37.53 \pm 1.44*	39.24 \pm 0.90	42.22 \pm 1.45**	33.05 \pm 1.93*
Total nitrogen (mg/100 g carcass weight)	65.61 \pm 3.10	60.29 \pm 3.58*	63.90 \pm 4.32	69.74 \pm 4.10	68.27 \pm 3.47**	54.21 \pm 1.70*
Collagen nitrogen (mg/100 g carcass weight)	5.68 \pm 0.53	6.96 \pm 0.42*	7.08 \pm 0.50	8.57 \pm 0.55*	6.82 \pm 0.77*	6.48 \pm 0.75
Non-collagen nitrogen (mg/100 g carcass weight)	59.82 \pm 3.10	53.33 \pm 4.21*	56.87 \pm 4.49	61.17 \pm 3.89	60.27 \pm 4.34**	47.73 \pm 1.71*

proteolytic rates in both tumor-bearing pregnant and virgin rats, but in spite of a great reduction in both protein synthesis and degradation in the tumor-bearing groups, these changes were similar to those observed in the control pregnant groups. Cohn et al. (17) reported that non-collagen nitrogen represents the cellular mass and during pathological states there is a preferential mobilization of this protein store.

In the present study, we found a significant reduction in non-collagen nitrogen only in the WN tumor-bearing group (around 11%; Table 2). In contrast, WL rats presented a 13% higher non-collagen nitrogen level than WN, suggesting that the waste in body nitrogen was lower in the leucine-supplemented group. Although collagen nitrogen was decreased in the WL group, non-collagen nitrogen was maintained in these animals, suggesting that leucine supplementation provided a substrate to preserve the nitrogen carcass. Peripheral muscle wasting may be due to increased muscle catabolism, decreased protein synthesis, or a combination of the two (14). While there appears to be an overall decrease in the synthesis of muscle protein in cancer patients, there is an increase in whole-body protein turnover leading to an elevated endogenous protein breakdown and oxidation of amino acids. In addition, amino acid requirements are altered in the tumor-

bearing state. Host leucine requirements have been shown to be increased in the presence of a rapidly growing tumor. Some malignant cells have specific requirements for essential amino acids. Removal of one amino acid by the tumor would lead to a depression of host protein synthesis (14). For this reason, since normal synthesis requires the full complement of amino acids, we may suggest that supplementation with one amino acid (for example, leucine) probably supported the high rates of muscle oxidation, contributing to the decreased output of some amino acids from skeletal muscle, which could be used by neoplastic cells. Further studies are currently underway to find out whether leucine supplementation could be of benefit to the host carcass by reducing peripheral tissue mobilization.

Acknowledgments

The authors are indebted to Prof. Michael J. Tisdale for suggestions and English review and Dr. Juvenal Marcondes Neto for computing assistance. The authors are also grateful to Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda. for providing L-leucine, to Corn Products Brasil Ingredientes for providing cornstarch and Roche Industriais e Química S.A. for providing the vitamin mix.

References

1. Svaninger G, Gelin J & Lundholm K (1989). The cause of death in non-metastasizing sarcoma-bearing mice. A study with relevance for tumor treatment experiments in mice. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 25: 1295-1302.
2. Ng B, Wolf RF, Weksler B, Brennan MF & Burt M (1993). Growth hormone administration preserves lean body mass in sarcoma-bearing rats treated with doxorubicin. *Cancer Research*, 53: 5483-5486.
3. Argiles JM & Lopez-Soriano FJ (1990). The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. *Biochemical Journal*, 268: 241-244.
4. Sauer LA & Dauchy RT (1990). Tumour-host metabolic interrelationships. *Biochemical Society Transactions*, 18: 80-82.
5. Baird JP (1986). Some aspects of the metabolic and hormonal adaptation to pregnancy. *Acta Endocrinologica*, 277 (Suppl): 11-18.
6. Petrek JA (1994). Breast cancer during pregnancy. *Cancer*, 74: 518-527.
7. Russo IH, Koszalka M & Russo J (1991). Comparative study of the influence of pregnancy and hormonal treatment on mammary carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 64: 481-484.
8. Gomes-Marcondes MCC, Cury L & Curi R (1998). Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. *Cancer Research Therapy and Control*, 5: 277-283.
9. Freinkel N & Metzger BE (1992). Metabolic changes in pregnancy. In: Wilson JD & Foster DW (Editors), *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th edn. Saunders, Philadelphia, 993-1006.
10. Anthony JC, Anthony TG & Layman DK (1999). Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *Journal of Nutrition*, 129: 1102-1106.
11. Albanese AA & Orto LA (1963). Protein and amino acids. In: Albanese AA (Editor), *Newer Methods of Nutritional Biochemistry*. Vol. I. Academic Press, New York, 84.
12. Gad SC & Weil CS (1994). Statistics for toxicologists. In: Wallace H (Editor), *Principles and Methods of Toxicology*. Raven Press Ltd., New York, 221-274.
13. Guatiani A, Torre PD, Morasca L, Pintus C & Bartosek T (1983). Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interaction with the host. *Tumori*, 69: 1-9.
14. Tisdale MJ (1997). Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition*, 13: 1-7.
15. Toledo MT & Gomes-Marcondes MCC (1999). Morphologic aspect of the placenta in young and adult pregnant rats bearing Walker 256 carcinoma. *Oncology Research*, 11: 359-366.
16. Carbo N, Costelli P, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM (1998). Tumor growth influences skeletal muscle protein turnover in the pregnant rat. *Pediatric Research*, 43: 250-255.
17. Cohn SH, Gartenhaus N, Sawittsky A, Zanzi I, Waswani A, Ellis KJ, Yasumura S, Cortes E & Vartsky D (1981). Compartmental body composition of cancer patients by measurements of total body nitrogen potassium and water. *Metabolism*, 30: 222-229.
18. Gonçalves EL, Waitzberg DL, Bevilacqua RG & Bevilacqua LR (1990). Body composition in various nutritional conditions. Experimental study. *Revista Paulista de Medicina*, 108: 125-133.
19. López-Luna P, Maier I & Herrera E (1991). Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biology of the Neonate*, 60: 29-38.
20. Hyltander A, Drott C, Korner U, Sandstrom R & Lundholm K (1991). Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. *European Journal of Cancer*, 27: 9-15.

EFFECTS OF LEUCINE SUPPLEMENTED DIET ON INTESTINAL ABSORPTION IN TUMOR BEARING PREGNANT RATS.

VENTRUCCI G, MELLO MAR, GOMES-MARCONDES MCC*. Dept Physiology & Biophysic, Biology Institute, UNICAMP, Brazil. 13083-970. * to whom correspondence should be addressed.

It is known that amino acids oxidation is increased in tumor-bearing rats muscle and that leucine is an important ketogenic amino acid that provides energy to the skeletal muscle. To evaluate the effects of a leucine supplemented diet on the intestinal absorption alterations produced by Walker 256, growing pregnant rats were distributed into six groups. Four groups received a normal protein diet (18% protein): virgin (C), pregnant (P), tumor-bearing (W), pair-fed rats (Pp). Three others pregnant groups were fed a diet supplemented with 3% leucine (15% protein plus 3% leucine): leucine (L), tumor-bearing (WL) and pair-fed with leucine (Lp). After 21 days, the animals were submitted to intestinal perfusion to measure leucine, methionine and glucose absorption. In tumor-bearing pregnant rats, the metabolic changes led to reduction in both fetal and tumor development. Leucine and methionine absorption slightly increased in W group. In spite of having a significantly decrease on leucine and methionine absorption compared to L, the WL group has shown a higher rate absorption of these amino acids than W group, probably due to the ingestion of the leucine supplemented diet offering more amino acid. Glucose absorption reduced in both tumor-bearing groups. Leucine group promoted high leucine absorption, which can be used by neoplastic cells and, mainly, by fetus and host. Probably, the transamination of the branched long chain amino acid provided energy for the skeletal muscle, keeping the nitrogen offered to host carcass.

Financial support: Fapesp (98/16022-1, 96/9463-6), Ajinomoto, Roche, Corn Products Brazil.

Key words: Walker 256 tumor, pregnancy, leucine, methionine, glucose, intestinal absorption.

Background

Cachexia is a debilitating state and still poorly understood syndrome of progressive body weight loss present in many types of cancer. It is characterized by host involuntary weight loss, anorexia and metabolic alterations (Inui, 1999). The anorexia-cachexia syndrome is a complex metabolic and behavioral alteration correlated with poor outcome and compromised quality of life, leading to death (Tisdale, 1997, 2000; Bruera, 1997). Loss of protein is a major factor in the shorter survival time of patients with cachexia and may also contribute to the immunologic abnormalities (Tisdale, 2000). Despite the controversy about the underlying molecular mechanism of cancer cachexia, the growing tumor has a considerable demand for essential amino acids and glucose. The tumor daily nutrient needs can increase considerably, especially for leucine (Lazo, 1981). As a result of the demand for leucine there is an amino acid flux from muscle to the tumor associated with muscular wastage in the host (Lazo, 1981).

Muscle wasting may be due to increased protein catabolism, decreased protein synthesis, or a combination of the two (Tisdale, 2000). Smith and Tisdale (1997) demonstrated that serum from cachectic animals was able to increase protein degradation in isolated gastrocnemius muscle, while serum from mice bearing MAC13 adenocarcinoma, which is not associated to cachexia, did not increase protein breakdown.

Branched-chain amino acids (BCAA: leucine, isoleucine and valine) are essential nutrients for both humans and animals, making up to 40% of the animal daily requirements of indispensable amino acids for humans (Adibi, 1976), leucine alone representing 8% of body protein in human (Block, 1956).

In the study of the mechanism that leads to protein waste, particular interest has been given to the metabolism of BCAA (Nair et al, 1992). The carbon skeletons arising from transamination of BCAA provide the major source of metabolic fuel for skeletal muscle. Argiles and Lopez-Soriano (1990) have shown that during cancer, the BCAA plasma levels were often increased and their turnover rates altered. It has been previously demonstrated that *in vivo* leucine oxidation to CO₂ is enhanced in tumor bearing animal (Goodlad et al, 1981; Argiles and Lopez-Soriano, 1990; Costelli et al, 1995) and associated to an increased amino acid turnover.

In previous studies, it has been shown that a leucine supplemented diet could prevent, in part, the high cell nitrogen wastage (expressed by non-collagen nitrogen) in pregnant tumor-bearing rats (Ventrucci and Gomes-Marcondes, 2001).

Amino acids absorption can occur by co-transport system and facilitated transport systems through cellular pathways. The intestinal amino acids transport capacity is related to the animal age and depends on the microvilli and the number of carrier on the brush border (Vinardell, 1992). The determination of nutrients or amino acids absorption in certain pathologies is an important condition to assurance the better dietary program to be given in these cases. Furthermore, this is an important issue in the study of cancer, since altered intestinal absorption may alter blood chemistry and contribute to anorexia genesis. To investigate the effects of a leucine supplemented diet on leucine, methionine and glucose absorption in the presence of Walker 256 tumor growth was the main purpose of the study reported here.

Methods

1) Animals and diets:

Young female Wistar rats (45 days old, N=60) were obtained from the animal facilities of University of Campinas, São Paulo, Brazil. The females rats were placed with adults males (90-100 days old, 4 females: 1 male) in collective cages during one night (12 hours), in agreement with harem methodology (Baker, 1991). The first day of pregnancy was determined following detection of sperm in vaginal smear.

All animals were kept in metabolic cages under normal conditions (22±2°C, 12/12 h light/dark cycle) with free access to water and food during 20 days.

The semi purified control diet contained 18% protein, 63% carbohydrate, 7% fat, and 5% fibers- AIN-93G (Reeves et al., 1993). High leucine diet contained 15% protein added 3% L-leucine and same amount carbohydrate, fat and fibers percentage as the control diet.

2) Groups of rats studied

The female rats were distributed into 7 groups: four groups were fed with semi-purified control diet: control (virgin) C; pregnant, P; pregnant tumor bearing rat, W; pregnant pair fed group, Pp, received the same amount ingested by tumor-bearing group W. Three others pregnant groups were fed with semi-purified

leucine supplemented diet: pregnant, L; pregnant tumor bearing, LW; and pregnant pair fed rat receiving leucine supplemented diet in the same amount ingested by LW group, Lp.

3) Tumor implantation

Groups W and LW were subcutaneously implanted with Walker 256 tumor cell suspension (approx. $0,25 \times 10^6$ in 0,5mL of saline) in the right flank of the rats. These pregnant groups were injected with tumor cells immediately after the detection of the pregnancy. The groups without tumor were injected with 0,5mL 0,9%(w.v.) NaCl without anesthesia.

All experiments were commenced between 8:00 and 10:00 am, and followed during 20 days after tumor implantation.

4) Experimental proceedings

Food intake and body weight were measured every two days. Tumor weight was calculated from 3 orthogonal linear measurements using the weight dimension curves (Gomes et al, 1983).

After 20 days all experimental groups were submitted to intestinal perfusion, as described by Gomes-Marcondes et al (1998) to estimate leucine, methionine and glucose after flux perfused solution containing 138,7 $\mu\text{mol/L}$ glucose, or 167,5 $\mu\text{mol/L}$ DL-methionine or 190,5 $\mu\text{mol/L}$ L-leucine. The flow rate was 0,5 to 1,0 mL/min at 37°C, pH 7,0, during 60 min.

The animals were killed after Nembutal hyper dose followed cervical dislocation. Arterial blood samples were collected to determine glucose, total protein and, albumin and muscle samples were weighted and determined the total protein content.

5) Biochemical determinations

Perfused and blood glucose were determined by colorimetric method, Trinder (1969). Methionine and leucine were measured following the spectrophotometric method described by McCarthy & Sullivan (1941)

and Rosen (1957) respectively. Total protein content was analyzed using colorimetric method (Bradford, 1976)

6) Statistical analysis

The Kruskal-Wallis one way analysis (Gad & Weil, 1994) assessed statistical differences, using the GraphPad Prism, v 3.00 for Windows 95. The comparisons among groups were considered statistically significant when the P value was below 5% level.

Results

Effect of Walker 256 tumor-bearing on body weight, food intake and fetal weight:

In this study, change in body and tumor weight were sequential monitored. These data is show in Table 1. In both pregnant groups, the tumor growth promoted a high decrease in food intake; it was around 58% decrease in W compared to P groups, and this decrease was less intense in WL group (50%). High decrease in food intake is demonstrated in several studies that show a deep decrease in food intake by tumor bearing (Guaitani et al., 1983; Tisdale, 2000). The same food intake was proposed to pair-fed groups.

The body weight gain was significantly reduced in W and WL groups compared to their respectively groups (50% in W and less reduced value was found in WL group, around 42%). In pair-fed groups the body weight gain was less reduced compared to tumor bearing, around 42% in Pp and 38% in Lp.

The same tumor weight was observed in both pregnant tumor bearing groups. The tumor/carcass weight ratio was around 7% in both groups.

Against a fetal weight reduction, around 57% and 66% in W and WL respectively tumor-bearing groups higher. In pair-fed groups, this reduction was not intense as in tumor bearing groups (around 20% on the both groups).

Hematological parameters:

Blood glucose, total protein and albumin data are shown in Table 1.

Blood glucose decrease in pregnant groups, with and without tumor, but this decrease was especially higher in W groups. The leucine supplemented diet groups did not presented blood glucose variation compared to control groups; and their values were significantly higher compared to P, W and Pp groups, around 26%. These values were similar to control group (C).

Despite of equal serum total protein, the serum albumin was decreased in both tumor-bearing groups compared to respective groups (P and L, Table 1).

Effects of Walker 256 carcinoma on muscle weight and protein:

Indeed, the tumor growth caused a pronounced decrease in muscle weight and protein content in W and WL groups (Figure 1). Analyzing the leucine supplemented diet groups it was verified that although WL groups presented decrease in muscle protein content in comparison to L group, it was slightly higher than in W group.

Intestinal Absorption during Walker 256 tumor growth:

Glucose, methionine and leucine absorption data are shown in Figure 2. The pregnant state caused a significant increase in glucose absorption independent on the diet treatment. This increase was around twice in both P and L groups (Figure 2 A).

Tumor growth promoted significant decrease on glucose absorption, around 50% in W and 30% in WL groups. Both pair fed groups also presented a decrease on glucose absorption (42% in Pp and non-significant decrease 25% in Lp).

Methionine absorption (Figure 2 B) was slightly increase in P, but it was 5 fold higher in L group compared to C group. Pregnant state really promotes an improvement on nutrients absorption due to the metabolic alterations to support maternal metabolic expenses and fetal growth.

Indeed the tumor growth inducing food intake promoted reduction on methionine absorption in W (20%) and WL group (30%). Similar decrease on this amino acid absorption was observed in both pair fed groups.

In contrast, the leucine absorption was not increased in P group, but in pregnant groups which received leucine supplemented diet the absorption rate was 1.5 fold higher than control group.

Although amino acid absorption is controlled by carrier transport, which can be increased or unchanged with food deprivation, in tumor bearing group W the leucine absorption was higher compared to C and P group, suggesting increased nutrients offer to provide the neoplastic cells proliferation. On the other hand, the leucine supplemented diet groups implanted with Walker 256 tumor presented a decrease on leucine absorption rate, differently from the pattern showed by W group.

Discussion

This study demonstrates that the tumour growth produces some host alterations in pregnant rats, which can be less pronounced during leucine supplemented diet. In the present experiments we can observe reduction in some parameters in LW group, such as food intake, body weight gain, muscle protein content, but less intense as in W group (Table 1 and Figure 1).

Reduction on food intake is frequently observed in animals and patients with cancer and it remains unknown the mechanism involved in the anorexia process. The tumour-bearing state is associated with a decrease in the host insulin: glucagon ratio. Hyperglucagonemia in the tumour-bearing state may be the most important hormonal alteration causing abnormal carbohydrate metabolism in cancer anorexia (Hartl et al, 1998). Increased glucagon levels can lead to anorexia, as well as increased hepatic gluconeogenesis and utilisation of gluconeogenic amino acids at the expense of protein synthesis, leading to a negative energy balance. Inhibiting glucagon secretion may increase carcass weight, preserve muscle protein, and even inhibit tumour growth (Hartl et al, 1998). Cytokines such as IL-6 stimulate glucagon secretion in humans (Inu, 1999). Recently, a transplantable rat glucagonoma has been isolated, which shows highly increased circulating levels of glucagon and GLP-I, and is associated with severe anorexia, adipsia, and weight loss (Inu, 1999). In recent study, decrease on food intake was observed in Walker tumour-bearing rats (Gomes-Marcondes et al., 1998 a,b).

Although, the anorexia is always associated with a deep reduction on body weight gain, there are many studies demonstrating that the cachexia process is much more complex as a simple association. Here in this study a significant reduction in body weight was associated with decrease in food intake, but these data was less pronounced in pair fed groups. Depletion of lean body mass in cancer cachexia is a major factor responsible for the reduced survival time of cancer patients (Tisdale 2000). Both reduced rates of

protein synthesis and increased rates of protein degradation have been observed in biopsies of skeletal muscle from cachectic-cancer patients. Whereas muscle-protein synthesis is depressed, synthesis of secretory proteins, such as acute-phase reactants, by the liver is actually increased, so that there may be no change in total body-protein synthesis. However, in these patients muscle-protein synthesis only accounted for 8% of total body synthesis versus 53% for healthy control subjects.

Although to date no studies have been reported in cancer patients, degradation of myofibrillar proteins probably occurs by the adenosine triphosphate-ubiquitin-dependent proteolytic system because studies in animals have implicated this pathway not only in cachexia but also in starvation, sepsis denervation, atrophy, and metabolic acidosis.

Loss of skeletal-muscle mass in both cancer patients' and an experimented model of cachexia in the mouse has been shown to correlate with the presence in the serum of bioactivity capable of inducing protein degradation in isolated skeletal muscle. Such bioactivity has been termed the proteolysis-inducing factor (PIF). Tisdale and collaborators (2000) demonstrated that this glycoprotein which can promote proteolysis on skeletal muscle in cachectic tumour and in non-tumour-bearing animals. Our results showed decrease in muscle weight and protein content especially in W group. These results suggest that probably the leucine-supplemented diet can improve the synthesis processes or inhibit the degradation mechanism in tumour bearing host. The positive reports of an effect of leucine have been observed in tissues in catabolic states. Conditions in vitro are, in general, catabolic, and studies in vivo have mostly been made on starved and/or stressed animals or man. Therefore, McNurlan et al (1982) have also investigated the effect of leucine on protein synthesis in starvation and protein depletion, both of which are characterised by loss of body nitrogen and low rates of tissue protein synthesis. Previous reports confirm (Garlick et al., 1975; McNurlan et al., 1982) that protein synthesis under starvation conditions is depressed in all tissues, with skeletal muscle the most seriously affected. In both starvation and protein deprivation depressed rates of protein synthesis were accompanied by low concentrations of plasma insulin, conditions that in the study of Li & Jefferson (1978) allowed leucine to stimulate protein synthesis in perfused muscle. In all groups which insulin concentrations were higher in animals receiving leucine, there was no increase in protein synthesis.

In starvation, concentrations were little different from those in fed rats, whereas in protein deprivation they were low. There was thus no correlation between rates of protein synthesis in any tissue and the

concentration of the branched-chain amino acids in plasma, confirming the observation of Millward et al. (1976) that there was no relationship between concentrations of branched-chain amino acids in muscle and the rate of protein synthesis. Injection of leucine caused an increase in its concentration in plasma to about 1 mM, which is comparable with that which stimulated protein synthesis in incubated muscle (Buse & Reid, 1975; Fulks et al., 1975), perfused hemicorpus (Li & Jefferson, 1978) and in perfused heart (Rannels et al., 1974; Chua et al., 1979).

Branched-chain amino acids (BCAA; leucine, isoleucine, and valine) are essential nutrients for both humans and animals, making up to 40% of the minimal daily requirements of indispensable amino acids in humans (Adibi, 1976), leucine alone representing 8% of body protein in humans (Block, 1956). Branched-chain amino acids (BCAA) have long been recognised as having a clear inhibitory action on proteolysis in skeletal muscle (Li & Jefferson, 1978 C). The body maintains the quality of its protein mass by a continuous repair process. This repair involves continuous process of protein synthesis and degradation and can be under control of the net balance between these two processes (Nair et al. 1992). Many nutrients, such as amino acids, have potential regulatory roles in protein metabolism (Fulks et al., 1975).

The availability of essential amino acids is critical for maintaining protein balance. Some studies suggest that leucine and its ketoanalogues decrease net nitrogen loss in humans (Sapir et al., 1983), therefore the mechanism of its anabolic effect remains controversial.

Leucine has been shown to stimulate incorporation of amino acids into skeletal and cardiac muscle protein (Fulks et al., 1985) and further to inhibit protein degradation in liver (Mich et al 1971, Sapir et al., 1983) and skeletal muscle (Fulks et al., 1975). In vivo studies in rats failed to demonstrate any effects of leucine on protein synthesis, but in humans a mixture of amino acids was reported to stimulate protein synthesis (McNurlan, et al., 1982).

Studies with human subjects indicate that the nitrogen balance is improved in response to BCAA administration in conditions in which a negative nitrogen balance exists (e.g., starvation, surgery, acute hepatic failure, and cancer) (Hunter et al., 1989; Miwa et al., 1995). Schaur et al. (1980) found that dietary administration of BCAA (leucine and isoleucine) to tumour-bearing rats caused a limited increase in survival time and decreases in tumour growth. Moreover, it has been shown that insulin effects on muscle protein synthesis in vivo are enhanced by BCAA infusion (Garlick and Grant, 1988) These results clearly support

the hypothesis that BCAA may give important signals in controlling muscle protein turnover. It was precisely with this aim that we investigated the action of leucine on muscle protein degradation with the objective of elucidating which proteolytic system was involved in the action of BCAA in skeletal muscle.

The results presented here clearly show that leucine is able to minimise the muscle proteolysis which can be seen in body weight gain, food intake and muscle protein content. An elegant experiment, done by Busquets et al. (2000) showed that leucine can influence gene expression for the different proteolytic system ubiquitin inducing a significant decrease (49 and 48% for the 2.4- and 1.2-kb transcripts, respectively) in the expression of the ubiquitin genes. Furthermore, the presence of the amino acid also caused a decrease in the C8 subunit of the proteasome both at 5 and 10 mM (31 and 47%, respectively). It has to be pointed out that the muscles did not show any significant changes that could affect the ATP-requiring ubiquitin system in either ATP or phosphocreatine (Busquets et al., 2000).

Normally the processes of growth and metabolism in the mammalian foetus are supported by a constant uptake of oxygen, glucose, lactate, and amino acids across the umbilical circulation (Milley, 1998). If the availability of these substrates to the foetus is limited, foetal growth decreases. It is widely assumed that, once the chorioplacenta is functional amino acid nutrition occurs by the direct placental transfers of free amino acids from the maternal to the foetal blood stream (Beckman et al., 1998)

During the period of foetal growth, before the chorioallantoic placenta is fully functional, the principal source of amino acids for the developing embryo is protein rather than free amino acids (Beckman et al, 1997) maternally derived protein is degraded in the endodermal cell of the visceral yolk sac and the resulting amino acids are utilised for protein synthesis by both embryo and the yolk sac.

Protein synthesis decreases sufficiently to account for most of a simultaneous decrease in foetal metabolic rate. Thus reduction of the metabolically expensive process of protein synthesis allow conservation of limited foetal oxygen supply for other needs.

Protein breakdown represents an additional constituent of protein turnover that requires expenditure of intracellular energy (Milley, 1998). Measurement of this variable is particularly important because foetal protein accretion, the difference between protein synthesis and protein breakdown, is an important component of foetal growth. Nevertheless, there is no data indicating whether foetal proteolysis is affected by decreased oxygen availability.

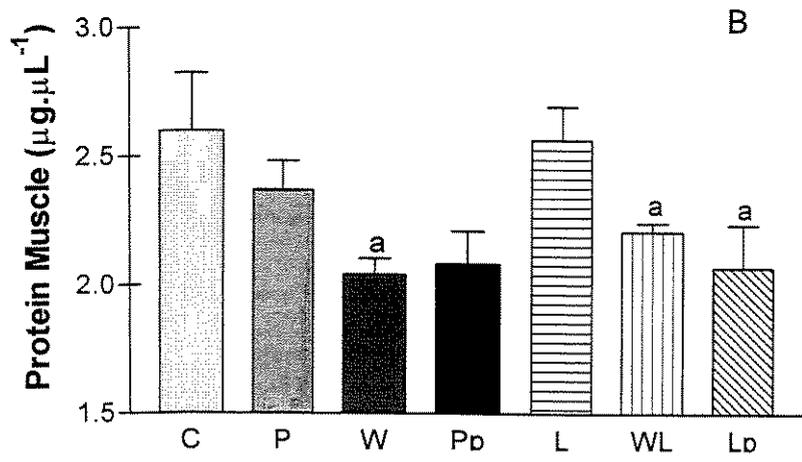
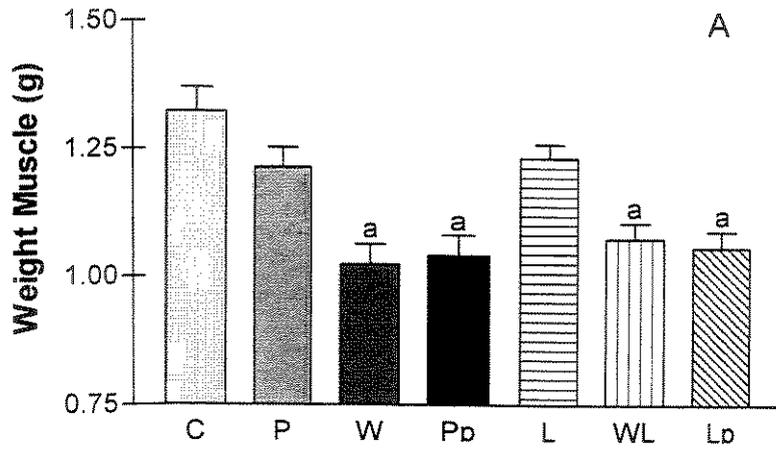
On the other hand, intestinal amino acid transport is regulated in a complex way by dietary levels of protein, protein hydrolysates, or amino acids (Stein et al, 1987). Inhibition of glucose absorption by high concentrations of certain AAs has also noted for mammalian cells in culture, such as mouse-L cells and Chinese hamster ovary cells (Stein et al, 1987). These factors may contribute to cause the pattern observed for the intestine. 1) Because several essential neutral AAs compete for absorption by the same intestinal transporter, an excess of one of those might inhibit growth by reducing absorption of essential AAs. The same argument applies to the essential basic AAs Lys and Arg, which probably compete for another transporter. 2) Excesses of essential AAs are generally more toxic than are excesses of nonessential AAs (12). 3) Pro, Asp, and Glu may be more metabolised to yield calories than are other AAs.

However, it seems unlikely that these differences growth rates per se caused the observed differences intestinal uptake rates because intestinal and mucosal masses and intestinal lengths did not vary with ration and because there is no correlation between dietary effects on growth rates and on uptake.

Intestinal sugar and amino acid transports are regulated independently. Although we observed differences in AA uptake related to leucine excess diet, we observed no such differences for D-glucose uptake except in the pregnant groups. The effects of tumor growing are much evident reducing the glucose, methionine absorption rate, but the leucine absorption is increased in this group. Conversely, exchanging one dietary sugar for another has specific effects on sugar uptake but not on AA uptake (Stein et al., 1987). Simultaneous reciprocal changes in dietary protein and carbohydrate levels affect sugar uptake and AA uptake in opposite directions. Thus intestinal sugar uptake appears to be regulated by dietary sugars or carbohydrates, AA uptake by dietary AAs or proteins.

Intestinal AA transporters are regulated semi-independently of each other, because the uptakes of AAs move via different transporters respond differently to the same dietary AA (Uhing & Arango, 1997). Stein and collaborators compared the effects of AAs on AA transport involving specific effects on transporters. For example, Asp is an outstanding stimulant of Asp uptake (mainly involving the acidic AA transporter) and of Lys uptake (mainly involving the basic AA transporter) but not of Leu uptake (mainly involving the neutral AA transporter) A priori, dietary supplementation by different AAs might have led to different rates of AA transport through some non-specific mechanism, such as differences in intestinal mucosal mass or architecture or energy supply or Na⁺ gradient. These findings can explain why methionine

absorption was significantly increased in leucine excess diet group (L, LW and Lp, Figure 2). In contrast, Hist (1993) reviewed the absorptive mechanisms and related that during nutritional manipulations there are adaptations of carriers, which can show the differences found in tumour-bearing groups. Thus the AA transport differences related to supplementing the ration with different AAs must involve specific effects on transporters especially when it is related with neoplastic growth. This means that the physiological impact of leucine on the effects of tumour growth remains to be further elucidated.



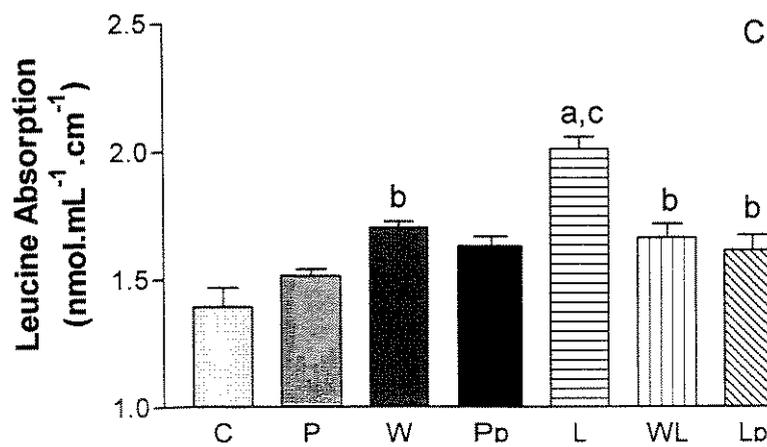
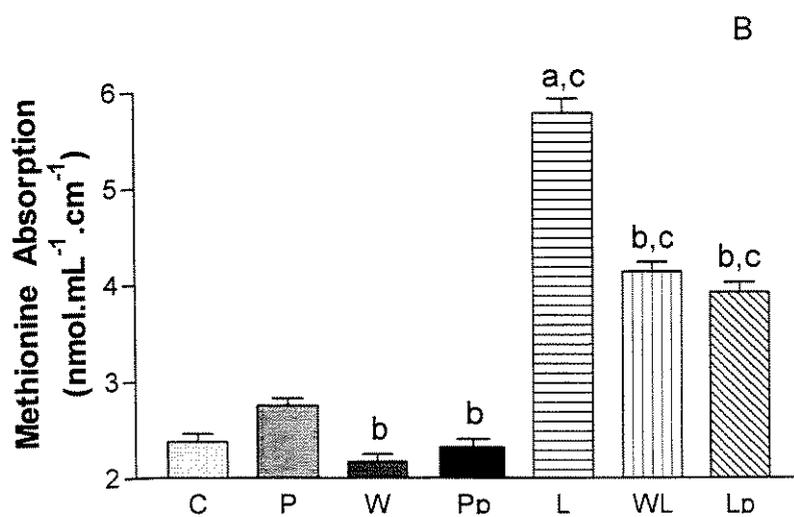
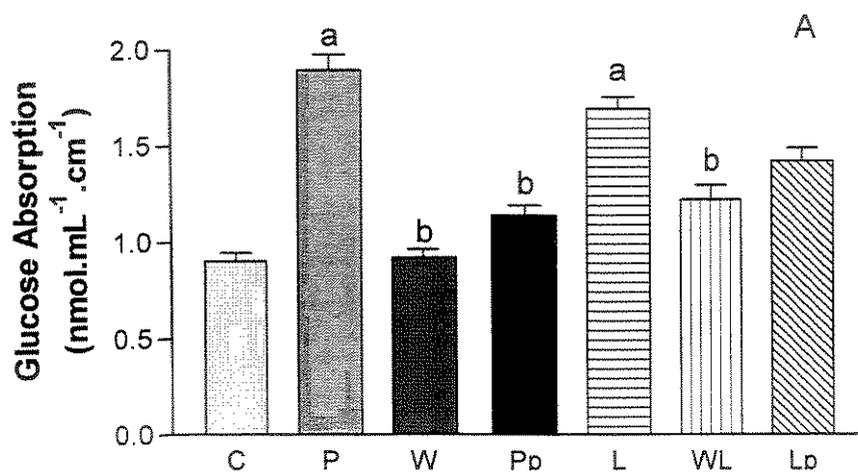


Figure 1: changes in muscle weight (A) and protein content (B) in virgin and pregnant groups. C, virgin control group; P pregnant rat; W pregnant tumor bearing group; Pp pregnant pair fed group; leucine supplemented diet groups: L pregnant rat; WL pregnant tumor bearing and Lp pregnant pair fed group. Data are means \pm SE. a $p < 0.05$ vs control group (C), differences were determined using two-way ANOVA followed by Dun's test.

Figure 2: Changes on glucose (A), methionine (B) and leucine (C) absorption rate in virgin and pregnant groups. C, virgin control group; P pregnant rat; W pregnant tumor bearing group; Pp pregnant pair fed group; leucine supplemented diet groups: L pregnant rat; WL pregnant tumor bearing and Lp pregnant pair fed group. Data are means \pm SE. a $p < 0.05$ vs control group (C); b $p < 0.05$ comparison P vs W, Pp, and L VS WL; c $p < 0.05$ comparison normoprotein diet vs excess diet.

References

1. ADIBI AS: Metabolism of branched-chain amino acids in altered nutrition. *Metabolism* 25:12587-1302, 1976.
2. ARGILES JM & LOPES-SORIANO FJ: The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. **Biochemical Journal**, **268**: 241-244, 1990.
3. BAKER HL: Reproduction and breeding. In: BAKER, H.L.; LINDSEYL, J.R.; WEISBROTH, S.H.: **The laboratory rat**. New York, Academic Press, v. I, cap. 7, p. 153- 168, 1991.
4. BECKMAN DA, BRENT RL, LLOYD JB: Leucine sources for the rat fetus. *Placenta*. Jan;18(1):79-82, 1997.
5. BECKMAN DA, MULLIN JP, BRENT RL, LLOYD JB: Leucine transport from mother to fetus in rat: role of the visceral yolk sac. *Nutrition Res.*, 18(10): 1783-89, 1998.
6. BLOCK RJ, WEISS KW.: *Amino acids Handbook. Methods and results of protein analysis*. Springfield, IL: Thomas p. 341-346, 1956.
7. BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, **72**:248-254, 1976.
8. BRUERA E: Anorexia, cachexia and nutrition. *Br. Med. J.*, 315: 1219-22, 1997.
9. BUSE MG, REID SS: Leucine: A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest*. 56(5):1250-61, 1975.
10. BUSQUETS S, ALVAREZ B, LLOVERA M, AGELL N, LOPES-SORIANO FJ, ARGILES JM: Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. *J Cell Physiol.*, 184(3):380-4, 2000.
11. CHUA B, SIEHL DL, MORGAN HE. Effect of leucine and metabolites of branched chain amino acids on protein turnover in heart. *J Biol Chem*. 10;254(17): 8358-62, 1979.
12. FULKS RM, LI JB, GOLDBERG AL: Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biolog Chemistry*, 250(1): 290-8, 1975.
13. GAD SC & WEIL CS: Statistic for toxicologists. In: Wallace H (editor), **Principles and Methods of toxicology**. Raven Press Ltda., New York, 221-274, 1994.
14. GARLICK PJ, GRANT I: Amino acids infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. *Biochem. J* 254: 579-584, 1988.
15. GARLICK PJ, MILLWARD DJ, JAMES WP, WATERLOW JC. The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 414(1): 71-84, 1975.
16. GOMES MCC, BEVILACQUA RG, LIMA-GONALVES E, RESENDE L: Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. **Cien. Cult.** **35(7)**: 736, 1983.
17. GOMES-MARCONDES MC, CURY L, CURI R: Consequences of Walker 256 tumor growth for the placental/fetal development in rats. **Cancer Research Therapy and Control**. **5**: 277-83, 1998.
18. GUATIANI A, TORRE PD, MORASCA L, PINTUS C, BARTOSEK I: Two lines of Walker carcinoma 256: Their peculiarities and different interaction with the host. **Tumori**, **69**:1-9, 1983.
19. HARTL WH, DEMMELMAIR H, JANCH KW, KOLETZKOB, SCHILDBERG FW: Effect of glucagon on protein synthesis in human rectal cancer in situ. *Ann. Surg.*, 227: 390-7, 1998.
20. HUNTER DC, WEINTRAUB M, BLACKBURN GL, BISTRIAN BR: Branched chain amino acids as the protein component of parenteral nutrition in cancer cachexia. *Br J Surg* 76:149-153, 1989
21. INUI A: Cancer anorexia-cachexia syndrome. Are neuropeptides the key? **Cancer Research**, **59 (15)**: 4493-4501, 1999.

22. LAZO AP: Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. **Eur. J. Biochem.** **117**:19-25, 1981.
23. LI JB, JEFFERSON LS.: Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1;544(2):351-9, 1978.
24. McCARTHY TE & SULIVAN MX: A new and highly specific colorimetric test of methionine. **J Biol Chem** **141**:871-876, 1941. NAIR KS, SCHWARTZ RG, WELLE S: Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. **Am J Physiol.**, **263(5 Pt 1)**: E928-34, 1992.
25. McNURLAN MA, FERN EB, GARLICK PJ: Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo. *Biochem. J.*, 204: 831-838, 1982.
26. MILLEY JR: Ovine fetal leucine kinetics and protein metabolism during decreased oxygen availability. *Am J Physiol.* 274(4 Pt 1): E618-26, 1998.
27. MILLWARD DJ, GARLICK PJ, NNANYELUGO DO, WATERLOW JC. The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem J.* 156(1):185-8, 1976.
28. MITCH WE, WALSER M, SAPIR DG. Nitrogen sparing induced by leucine compared with that induced by its keto analogue, alpha-ketoisocaproate, in fasting obese man. *J Clin Invest.* 67(2):553-62, 1981.
29. MIWA Y, KATO M, MORIWAKI H, OKUNO M, SIGIHARA J, OHNISHI H, ET AL.: Effects of branched-chain amino acids infusion on protein metabolism in rats with acute hepatic failure. *Hepatology* 22: 291-296, 1995.
30. RANNELS DE, HJALMARSON AC, MORGAN HE. Effects of noncarbohydrate substrates on protein synthesis in muscle. *Am J Physiol.* 226(3):528-39, 1974.
31. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY J: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.** **123**: 1939-51, 1993.
32. ROSEN H: A modified ninhydrin colorimetric analysis of amino acids. **Arch Biochem. Biophys.** **67**: 1-15, 1957.
33. SAPIR DG, STEWART PM, WALSER M, MOREADITH C, MOYER ED, IMBEMBO AL, ROSENSHEIN NB, MUNOZ S. Effects of alpha-ketoisocaproate and of leucine on nitrogen metabolism in postoperative patients. *Lancet.* 1(8332):1010-4, 1983.
34. SCHAUR RJ, SEMMELRO HJ, SCHREIBM W, TILLIAN HM, SCHAUENS E.: Tumor host interactions. 5. Nitrogen metabolism in Yoshida sarcoma-bearing rats. Reduction of growth rate and increase in survival time by administration of physiological doses of branched-chain amino acids. *J Can Res Clin Oncol* 98: 285-293, 1980.
35. TISDALE MJ. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *Nutrition.* 16(10):1013-4, 2000.
36. TRINDER P: Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non carcinogenic chromogen. **J. Clin. Path.**, **22**: 158-61, 1969.
37. UHING MR & ARANGO V.: Intestinal absorption of proline and leucine in chronically catheterized rats. *Gastroenterology*, 113: 865-874, 1997.
38. VENTRUCCI G, MELLO MAR, GOMES-MARCONDES: Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **34**: 333-38, 2001.

Table 1: Body weight, food intake, tumor weight/carcass weight, fetal weight, glucose, total protein and albumin serum of the groups studied.

	C	P	W	Pp	L	WL	Lp
Body weight on the last day (%)	30,21 ± 0,27	45,02 ± 1,32 a	22,83 ± 0,53 c	26,01 ± 1,07 c	43,19 ± 1,30 a	24,87 ± 0,61 c	26,78 ± 0,44 c
Food intake (%)	98,77 ± 4,55	95,75 ± 4,85	40,01 ± 3,56 ac		82,40 ± 8,64	41,29 ± 3,63 ac	
Tumor weight/carcass weight (%)			7,81 ± 0,27			7,46 ± 0,33	2,77 ± 0,44
Fetal weight (g)		3,73 ± 0,13	1,61 ± 0,22	2,98 ± 0,34	3,45 ± 0,16	1,15 ± 0,16	5,26 ± 0,11 b
Glucose serum (nmol/L ⁻¹)	5,35 ± 0,15	4,23 ± 0,21a	3,56 ± 0,15 ac	4,17 ± 0,21a	5,34 ± 0,21 b	4,90 ± 0,18 b	5,59 ± 0,26
Total protein serum	7,86 ± 0,50	6,47 ± 0,49	5,06 ± 0,32	5,82 ± 0,23	5,90 ± 0,48	4,72 ± 0,24	3,14 ± 0,51
Albumin serum (g/dL)	2,30 ± 0,29	2,81 ± 0,31	2,20 ± 0,23 c	2,70 ± 0,33	2,92 ± 0,28	2,28 ± 0,32 c	

Data are reported as means ± SE ,10 number of animals per group. Groups: control (C); pregnant control (P); pregnant tumor-bearing (W); pregnant control pair-fed to tumor-bearing groups (Pp); pregnant control receiving a leucine supplemented diet (L), pregnant tumor-bearing receiving a leucine supplemented diet (WL) and pregnant control leucine pair-fed group (Lp). a p<0,05 compared to control group (C); b p< 0,05 comparison among L, WL and Lp groups to P, W and Pp, respectively, c p< 0,05 P vs W and L vs WL.

APÊNDICE

TABELA 1: Evolução do peso corpóreo (g) dos diferentes grupos experimentais.

	Dias de Experimento											
	0	3	5	7	9	10	12	14	16	19	20	21
C	139,91	145,56	156,47	154,11	160,32	143,00	169,12	171,36	174,98	171,34	174,83	188,40
	± 4,06	± 5,41	± 4,23	± 4,14	± 3,96	± 1,30	± 3,49	± 3,79	± 3,27	± 2,18	± 1,66	± 0,97
CW	134,21	140,14	157,24	154,15	154,42	163,23	163,70	168,00	169,59	187,91	187,51	181,08
	± 2,69	± 2,37	± 2,46	± 2,80	± 3,06	± 3,15	± 2,58	± 3,59	± 3,04	± 3,83	± 3,03	± 2,51
CWp	148,67	153,53	158,72	164,55		165,22	161,12	157,77	161,65	148,50		147,42
	± 4,68	± 3,92	± 5,08	± 5,23		± 4,33	± 3,67	± 3,23	± 3,73	± 3,65		± 3,45
CL	141,28	141,03		157,37		164,30	177,18		178,42	196,12	194,58	197,60
	± 6,28	± 4,52		± 5,13		± 4,14	± 2,81		± 9,43	± 10,04	± 10,68	± 10,07
CWL	137,58	144,31		148,96		152,08	165,28		177,30	177,73		
	± 2,52	± 2,24		± 2,16		± 2,22	± 2,57		± 3,21	± 2,13		
CWLp	148,74	141,41	150,55	155,37		146,40	140,61	136,16	130,35	123,11		119,56
	± 3,29	± 5,15	± 3,46	± 3,56		± 2,64	± 2,35	± 2,11	± 3,19	± 2,40		± 3,09

Legenda: Grupos: C ratas jovens eutróficas; CW ratas jovens eutróficas portadoras de tumor; CWp ratas jovens eutróficas pair-fed; CL ratas jovens submetidas à dieta com excesso de leucina; CWL ratas jovens submetidas à dieta com excesso de leucina portadoras de tumor, CWLp ratas jovens submetidas à dieta com excesso de leucina pair-fed. Resultados expressos como médias ± erro padrão da média.

TABELA 2: Evolução da ingestão alimentar (g) dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação vide Tabela 1.

	Dias de experimento												
	1	3	5	7	9	10	12	13	14	16	17	18 20	
C		17,3 ± 1,0	15,2	13,3 ± 1,1	13,5 ± 0,4	14,1 ± 0,1	15,9 ± 0,4		15,5 ± 0,5	13,4 ± 0,6	25,6 ± 0,1	18,3 ± 2,2	12,8 ± 0,3
CW	23,4 ± 0,0	15,9 ± 0,7	16,2 ± 1,2	13,8 ± 0,8	16,0 ± 0,9	14,4 ± 1,2	13,8 ± 1,1		9,1 ± 1,0	8,3 ± 1,2		6,0 ± 1,1	
CL	12,0 ± 0,8	12,1 ± 0,4	15,1 1,9	11,0 ± 1,1		14,6 ± 1,2	18,6 ± 1,5	14,2 ± 1,4	11,3 ± 1,2		19,0 ± 1,3		12,0 ± 1,1
CWL	13,3 ± 0,7	13,1 ± 0,8	13,5 ± 2,1	11,5 ± 2,2		7,2 ± 1,0	6,1 ± 0,5	6,7 ± 0,4	5,0 ± 0,6	5,7 ± 0,7		5,2 ± 1,0	

Tabela 3: Peso do fígado, músculo gastrocnêmio e tumor dos diferentes grupos experimentais. Legenda de identificação vide Tabela 1.

	FIGADO	GASTROCNÊMIO	TUMOR
C	6,83 ± 0,50	1,09 ± 0,06	
CW	8,86 ± 0,46	0,88 ± 0,05	11,40 ± 0,45
CWp	4,15 ± 0,14	0,93 ± 0,06	
CL	7,30 ± 0,64	1,14 ± 0,04	
CWL	7,42 ± 0,23	0,83 ± 0,06	11,56 ± 0,37
CWLp	3,46 ± 0,16	0,75 ± 0,02	