

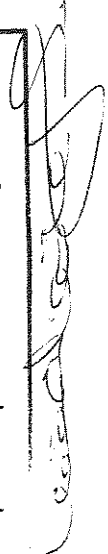
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MARIA CAROLINA MEIRA VILLANI COELHO

**"EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA E/OU DEFICIÊNCIA
DE METIONINA NA DIETA SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL E
ASPECTOS PONDERAIS, BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS DE
RATOS ADULTOS PORTADORES DE
CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256"**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) MARIA CAROLINA MEIRA VILLANI COELHO e aprovada pela Comissão Julgadora.



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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
Campinas

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C65e
V	EX
TOMBO BCI	48317
PROC.	16-832/02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/02
Nº CPD	

CH00166263-3

Bib id 236685

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C65e Coelho, Maria Carolina Meira Villani
Efeitos da suplementação de leucina e/ou deficiência de metionina na dieta sobre o crescimento tumoral e aspectos ponderais, bioquímicos e nutricionais de ratos adultos portadores de carcinossarcoma de Walker 256/Maria Carolina Meira Villani Coelho . --
Campinas, SP:[s.n.], 2001

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

1. Câncer. 2. Tumor de Walker 256. 3. Aminoácidos. 4. Composição corpórea. 5. Nutrição/dieta. I. Marcondes, Maria Cristina Cintra Gomes.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 17/12/2001

Banca Examinadora:

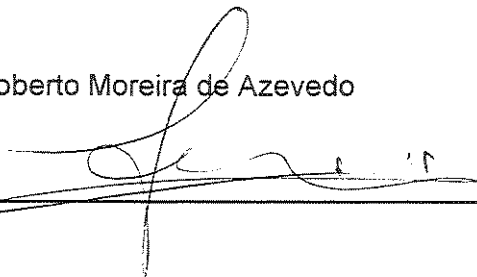
Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes (Orientadora)



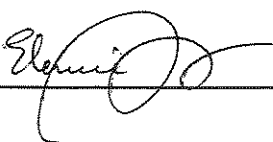
Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Mello



Prof. Dr. José Roberto Moreira de Azevedo



Profa. Dra. Elenice Aparecida Moraes Ferrari



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

99651000

“Nós apreendemos a natureza apenas através da idéia que dela formamos: uma idéia cultural, ligada à verdade do homem e do mundo, que a história humana, por meio tanto da arte quanto da filosofia e da ciência, não cessa de elaborar e questionar.”

Michel Ribon

Dedicatória

À presença do amor:

João Carlos, meu pai – entusiasmo e crença inabaláveis para realização de um sonho;

Maria Estela, minha mãe – inspiração sublime na busca do conhecimento;

Fernando, meu marido – paciência e desprendimento, comunhão e partilha abençoadas por Deus.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes pela orientação e credibilidade - requisitos básicos para elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas pela atenção, confiança e sempre disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João de Vasconcellos Neto, presença amiga, apoio incondicional para efetivar-se a conclusão deste projeto.

Aos amigos que conquistei, durante este percurso, Jairo Berti, Alexandre Miotto, Francisco Prada e Cláudia Magno, a dedicação intensa e cumplicidade - colaboração efetiva nesta pesquisa.

Aos colegas de laboratório, a colaboração prestimosa.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica, e do Curso de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular da Universidade Estadual de Campinas, ao estenderem-me seus preciosos conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas, pela presteza incontinenti, quando necessário: Machado (*in memoriam*), D. Cida, Alexandra, Ivo, Léscio e Washington; e à secretária da Pós-Graduação, Andréia.

À FAPESP pelo financiamento (n° 98/03868-0) - auxílio prioritário deste projeto. Ao FAEP – UNICAMP e CNPq - apoio financeiro deste projeto. À Ajinomoto Interamericana Industria e Comercio Ltda - fornecimento dos aminoácidos, à Produtos Roche Química e Farmacêutica S.A. - fornecimento da mistura vitamínica e Refinações de Milho Brasil - fornecimento de amido e dextrina, para elaboração das dietas semi-purificadas.

Aos meus familiares e amigos:

À Clarissa, minha irmã, e ao Gustavo, meu cunhado, a presença carinhosa e especial na elaboração deste trabalho.

À Stella, minha irmã, e aos meus cunhados Marcos, Daniela e Rodrigo, o crédito sempre entusiasmado.

Ao João Pedro, meu sobrinho e afilhado - presença do amor no sorriso mais puro de criança a aquietar meu coração.

À Clarice Meira, minha avó e luz do meu caminho, eterna gratidão.

Aos meus segundos pais, Profa. Nilsa Bestane de Souza Coelho e Dr. Cândido de Souza Coelho, o afeto, o apoio espontâneo e a fé inabalável - estímulo abençoado para conclusão deste projeto.

À Profa. Dra. Mariângela Burgos Martins de Azevedo, amiga e, especialmente para mim, exemplo de profissional competente e responsável.

À Dra. Laura D'Ottaviano e a Lídia D'Ottaviano de Souza Coelho, amigas especiais que sempre me presentearam com entusiasmo, credibilidade e carinho.

Aos meus grandes amigos, Renato, Mariana, Dimitri e Fabíola, a alegria carinhosa a verter-se em apoio necessário ao meu crescimento acadêmico.

ÍNDICE

Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Introdução	1
Objetivos.....	12
Materiais e Métodos.....	13
Resultados e Discussão	
1. Evolução diária do ganho de peso corpóreo, Porcentagem de ganho de peso corpóreo, Ingestão alimentar, Eficiência alimentar, Balanço nitrogenado e Peso tumoral.....	20
2. Composição corpórea.....	29
3. Parâmetros séricos e peso de órgãos.....	39
4. Perfusão intestinal.....	45
Conclusões.....	50
Referências Bibliográficas.....	52
Apêndice.....	64

Resumo

O crescimento contínuo tumoral promove profundas alterações metabólicas no hospedeiro, levando-o a caquexia e ao balanço nitrogenado negativo. Vários estudos mostram que, tanto em pacientes como em animais experimentais, aminoácidos musculares podem ser muito solicitados e importantes para o metabolismo tumoral. A leucina é um importante combustível metabólico da musculatura esquelética. A metionina, aminoácido essencial, é utilizada no processo inicial de síntese protéica; e a proliferação de várias células malignas é dependente deste aminoácido. Nosso objetivo é verificar o efeito da deficiência de metionina na dieta sobre o crescimento tumoral, o efeito protetor para o hospedeiro alimentado com dieta suplementada com leucina e a somatória desses procedimentos e seus benefícios. De acordo com o tipo de dieta oferecida que correspondem normoprotéica (18% de proteína - C); hipoprotéica (6% de proteína - D); isenta de metionina (18% de proteína e 0% de L-metionina - M); alto teor de leucina (15% de proteína e 3% de L-leucina - L); alto teor de leucina e isenta de metionina (15% de proteína, 3% de L-leucina e 0% de L-metionina - LM) e implante ou não do carcinossarcoma de Walker 256, os ratos foram distribuídos em grupos (número mínimo de 10 animais), a seguir: C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor. Após 22 dias, foram avaliadas as alterações bioquímicas, ponderais e alimentares, em animais portadores do carcinossarcoma de Walker 256.

Observamos, no grupo CW, todas as alterações características do hospedeiro, como redução do ganho de peso, redução da eficiência alimentar, e balanço nitrogenado negativo. Nos dados da composição corpórea química, apresentaram redução: do peso carcaça, da gordura corporal e da proteína de carcaça; diminuição do teor de proteína sérica e do peso do fígado. No grupo restrição protéica com tumor (DW), observou-se balanço nitrogenado negativo, redução da porcentagem de gordura corpórea e do nitrogênio colágeno e aumento da absorção intestinal de metionina e glicose. Outras variações ocorreram decorrentes da restrição protéica, e o peso tumoral foi reduzido significativamente. A suplementação de leucina (3%) parece melhorar alguns parâmetros corporais dos ratos portadores de tumor (LW) em relação aos grupos controle (CW), como tendência ao aumento de massa corpórea magra, da proteína de carcaça, do peso relativo muscular e do teor de proteína sérica, porém o crescimento tumoral mostrou-se semelhante ao grupo do CW. A deficiência de metionina interferiu em alguns parâmetros corporais de ratos sem tumor (M), reduzindo o ganho de peso corpóreo por dia, porcentagem de ganho de peso, balanço nitrogenado, porcentagem de gordura e proteína sérica; nos grupos portadores de tumor (MW), a deficiência de metionina parece intensificar os prejuízos causados pela presença do tumor, relacionados ao peso da carcaça, porcentagem de gordura e demonstrando tendência à redução da proteína de carcaça, da massa corpórea magra e do teor de proteína sérica; contudo, demonstrou tendência à redução do peso tumoral. A associação entre o excesso de leucina e deficiência de metionina causou, nos animais do grupo LM, redução do ganho de peso corpóreo, do peso de carcaça, da massa corpórea magra e da proteína de carcaça e, nos ratos com tumor LMW, além dos prejuízos citados anteriormente, houve redução significativa do peso relativo

do músculo. Por outro lado, em ambos os grupos LM e LMW, observou-se aumento do nitrogênio colágeno, e o peso tumoral reduziu significativamente neste grupo. Deste modo, verificamos que a deficiência de metionina não se mostrou eficiente na redução efetiva do crescimento tumoral e a somatória dessas manipulações não correspondeu às expectativas, sendo eficaz somente na redução do peso tumoral, porém não oferecendo a esperada proteção à carcaça do hospedeiro. Assim, concluímos que apenas a suplementação de leucina apresentou discreta proteção sobre a carcaça do hospedeiro.

Abstract

The tumor growth promotes great host metabolic changes, which induces cachexia, anorexia, and negative nitrogen balance. Studies have been shown that in cancer patients and animals the muscle amino acids can be wasted to the tumor metabolism. Leucine is the most important oxidative amino acid of skeletal muscle. Methionine, an essential amino acid, is utilized in protein synthesis, and the neoplastic cells proliferation depends on this amino acids. Our aim is to investigate the effects of methionine deficiency on tumor growth, the protector effect on the host using leucine supplemented diet and the added effect of these two proceeding and its benefits. Wistar rats were distributed in groups (n=10), according the diet offered which corresponded to normoprotein (18% protein – C), hypoprotein (6% protein – D), without methionine (18% protein + 0% L-methionine – M), leucine excess level (15% protein + 3% L-leucine – L), leucine excess without methionine (15% protein + 3% L-leucine + 0% L-methionine – LM); implanted or not with Walker 256 carcinoma. The groups were: C – control rats; CW tumor bearing rats; D - undernourished rats; DW – tumor bearing undernourished rats; M – rats feeding methionine deficient diet; MW – tumor bearing rats feeding methionine deficient diet; L – rats feeding leucine supplemented diet; LW – tumor bearing rats feeding leucine supplemented diet; LM – rats feeding leucine supplemented and methionine deficient diet; LMW – tumor bearing rats feeding leucine supplemented and methionine deficient diet. After 22 days of experiment, all the animals were sacrificed and biochemical, body and nutritional analysis were made. We observed body changes in CW group such as reduction in body weight gain, food

efficiency, and negative nitrogen balance. Body composition analysis showed reduction in carcass weight, body fat and protein; in CW group serum protein and liver weight were reduced. DW group showed negative nitrogen balance, reduction on body fat and collagen nitrogen and high methionine and glucose intestinal absorption rate; tumor weight was reduced in DW group. The leucine supplemented diet tended to improve some body parameters in LW group compared to CW group, such as slight raise of lean body mass, carcass protein, muscle weight and serum proteins, in spite of having similar tumor weight as CW group. The methionine deficiency induced body changes in rats, reducing body weight gain, percentage of body weight, negative nitrogen balance, reduction on body fat percentage and serum protein; in the tumor bearing groups MW, the methionine deficiency seemed to intensify the changes induced by the tumor, decrease in carcass weight, body fat percentage and slightly reduction on carcass protein, lean body mass and serum protein, therefore this group MW showed a decrease tendency in tumor weight. The association between leucine excess and methionine deficient induced a reduction on body weight gain, and carcass weight, decrease in lean body mass and carcass protein, and in tumor bearing groups there was also high decrease on muscle weight. On the other hand, both LM and LMW groups presented an increase on collagen nitrogen and a significant tumor weight reduction. On the bases of the results obtained, we verified that the methionine deficiency could not be efficient to reduce the tumor growth, and the association between the two diets manipulation (leucine excess plus methionine deficiency) did not correspond to our proposes although this association induced tumor weight reduction but did not protect the host wasting. In conclusion, only the leucine supplemented diet showed tendency to protect the host carcass.

INTRODUÇÃO

O câncer é considerado o maior assassino da história humana, evoluindo tanto quanto o avanço tecnológico e industrial da humanidade. O câncer parece surgir de dois diferentes tipos de carcinógenos: um consiste em agentes que causam danos aos genes envolvidos no controle da proliferação e migração celular, e o outro inclui os agentes que intensificam o crescimento tumoral ou seus precursores (TRICHOPOULOS, 1996).

Evidências indicam que, nos EUA, a mortalidade por alguns tipos de câncer como o infantil, testicular, estomacal e cervical está decaindo. Contudo o número geral de incidência dessa doença vem aumentando no mundo inteiro, sendo que os tipos mais freqüentes são o mamário, pulmonar, prostático, colônico e retal (OLIVERIA *et al.*, 1997).

Por outro lado, com o aumento de vida média populacional, a incidência de mortalidade causada por câncer está aumentando, devido à forte relação entre câncer e a idade avançada (OLIVERIA *et al.*, 1997). Além disso, atualmente, o número de pacientes portadores de câncer que sobrevive à doença é muito maior em relação aos anos 70, sendo que a sobrevida a todos os tipos de tumores é, em média, 25% mais alta (BUCHALA *et al.*, 2001).

Entender sobre carcinogênese é a chave para o desenvolvimento racional da prevenção ao câncer (HECHT, 1997). A melhor forma de lidar com qualquer doença é através da prevenção e esta é a verdadeira particularidade do câncer com todas as suas complexidades; às vezes, a prevenção toma-se difícil, duradoura e dramática, mas é a atitude mais importante a ser tomada (WATTENBERG, 1997). A prevenção do câncer possui dois estágios: o primeiro envolve o processo de carcinogênese como, por exemplo, o desenvolvimento e

a implantação de programas contra o fumo, um dos maiores carcinógenos atualmente conhecidos; o segundo consiste na intervenção para suprimir a progressão da transformação celular para o estágio de manifestações clínicas da doença (ROSE, 1997). Um dos maiores problemas da prevenção desta doença é o desconhecimento de mais de 50% das causas (WATTENBERG, 1997).

Estudos epidemiológicos auxiliam na identificação de importantes fatores de risco, sendo que vêm sendo implantadas medidas públicas, objetivando a prevenção e o controle do câncer (OLIVERIA *et al.*, 1997). O campo da epidemiologia molecular busca identificar riscos que podem levar ao câncer, baseada em exposição individual e susceptibilidade hereditária (WARREN & SHIELDS, 1997). Outros estudos sugerem que alguns componentes da dieta podem estar atuando como agentes de prevenção ao câncer e podem explicar as diferenças na incidência desta doença em populações que consomem diferentes dietas (GOODMAN, 1997).

Experimentos *in vivo* têm demonstrado que a intervenção na dieta está associada ao retardo do crescimento tumoral e ao prolongamento do período de latência do aparecimento de tumores palpáveis, levando à inibição da incidência de tumores (TELANG *et al.*, 1997).

Os efeitos danosos da ingestão de altas quantidades de gorduras e deficiências nutricionais específicas no desenvolvimento do câncer são bem conhecidos. Os benefícios de reduzir o teor de gordura da dieta e ingerir mais fibras são tão importantes quanto outros macro e micro nutrientes na prevenção do câncer. A inter-relação da dieta gordurosa e fibrosa, os efeitos das vitaminas, sais minerais e nutrientes antioxidantes nas várias fases do processo

carcinogênico são importantes áreas de pesquisa na tentativa de identificar e, então, eliminar, reduzir ou modificar agentes em comidas preparadas, podendo contribuir para etiologia do câncer (EL-BAYOUMY *et al.*, 1997).

O consumo de frutas e vegetais vem sendo mostrado como redutores no risco da incidência de vários tipos de câncer, principalmente de cólon. Produtos animais e gorduras saturadas estão sendo associados ao aumento da incidência de câncer de cólon e próstata. A alta ingestão de sal e o fumo aumentam o surgimento de câncer estomacal. A ingestão de bebidas quentes (hábitos característicos de algumas regiões) pode estar associada ao câncer de esôfago. Estudos têm indicado que componentes químicos carcinogênicos, como aminas heterocíclicas, hidrocarbonetos policíclicos e nitrosaminas, formados durante o processo de cozimento, podem estar relacionados a algumas formas de câncer. O álcool, mesmo não sendo considerado carcinogênico em estudos laboratoriais, pode ser considerado um intensificador de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de fígado, da cavidade oral, do trato digestivo e, provavelmente, o mamário (OLIVERIA *et al.*, 1997).

As dietas gordurosas podem ser consideradas como fator de risco na ausência de fatores protetores como a ingestão de alimentos fibrosos. A taxa de mortalidade por câncer de cólon é menor nas regiões onde há o predomínio no uso de óleo de oliva (gordura insaturada) e em áreas onde o consumo de peixes e outros frutos do mar são comuns. A dieta calórica também aumenta o risco de câncer de cólon, independentemente do teor de gordura da dieta (EL-BAYOUMY *et al.*, 1997).

A dieta fibrosa afeta a microflora intestinal, modificando tanto capacidade metabólica como a sua composição, alterando os produtos da

quebra de polissacarídeos, gorduras e proteínas no intestino. Estes produtos podem agir como promotores e/ou inibidores de tumores do cólon, dependendo do tipo de fibra (EL-BAYOUMY *et al.*, 1997). Assim, a dieta fibrosa pode interferir nas toxinas solúveis e ácidos biliares, no aumento da massa fecal, na produção de carcinógenos pela flora intestinal, e na produção de ácidos graxos de cadeias curtas, através do processo de fermentação (BERTAGNOLLI *et al.*, 1997).

As dietas gordurosas podem produzir altos níveis de ácidos biliares e aumento da concentração de ácidos graxos no intestino, podendo resultar na promoção de tumor. As gorduras originam o aumento de DAG (diacilglicerol), importante molécula na ativação celular, no lúmen do cólon. Além disso, podem ocorrer mutações produzidas por aminas heterocíclicas resultantes da fritura de carnes vermelhas. Por outro lado, as frutas e as verduras contêm derivados que atuam como indutores de enzimas desintoxicantes ou como inibidores diretos da carcinogênese, além de possuir substâncias anti-oxidantes moduladoras do ácido aracdônico (BERTAGNOLLI *et al.*, 1997).

Aparentemente, é o excesso de proteína total na dieta ou sua adequabilidade, indicada pelo balanço da aminoácidos, que atua aumentando a incidência de tumores espontâneos observados em roedores. Algumas evidências sugerem que proteínas afetam tanto a fase de iniciação como o crescimento subsequente dos tumores (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1982).

O tumor ou neoplasma é formado por células que escapam do processo regulatório e passam a crescer e dividir-se de maneira descontrolada. Estas células não seguem a taxa normal de divisão celular do tecido originário,

nem possuem função determinada. Os tumores podem ser benignos ou malignos, onde o último difere do primeiro por mostrar crescimento ilimitado, podendo disseminar-se para os tecidos vizinhos, por metástases. Para tanto, as células cancerosas possuem características muito peculiares como alterações morfológicas, perda da inibição por contato (formando camadas), propriedades imunológicas diferentes (antígenos específicos tumorais), maior e mais rápida captação de glicose, utilização do metabolismo anaeróbico (glicólise acelerada e alta secreção de ácido láctico) e citoplasma indiferenciado (organelas mal desenvolvidas, mudanças degenerativas, inclusões citoplasmáticas) (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 1993).

O crescimento contínuo tumoral promove profundas alterações metabólicas no hospedeiro, levando-o à caquexia e ao balanço nitrogenado negativo. Os ratos portadores de carcinoma de Walker 256 mostram um decréscimo da massa corpórea magra com o aumento do tecido neoplásico acompanhado pela degradação protéica dos tecidos hospedeiros. A redução da massa corpórea magra pode ocorrer tanto pela redução da síntese como pelo aumento da degradação protéica, ou ambos (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Em recente experimento, verificou-se que o aumento na oxidação da leucina em animais portadores de tumor pode estar relacionado com a demanda de ambos os tecidos, musculatura esquelética e tumor, contribuindo para o *turnover* de aminoácidos (VENTRUCCI *et al.*, 2001).

As variações causadas pelo tumor são mais pronunciadas em animais jovens comparados aos animais adultos (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Segundo SAUER & DAUCHER (1983), as células neoplásicas na deficiência de substrato energético (glicose) utilizam outros substratos energéticos como alanina, glutamina, ácido láctico, convertidos em glicose via Ciclo de Cori e, também, corpos cetônicos.

DEL MONTE *et al.* (1983) e GOLD (1974), estudando ratos com tumor, evidenciaram que o aumento de muitos tumores levava à hipoglicemia, diminuição do nível de insulina no plasma e ao aumento no processo gliconeogênico. Vários estudos mostraram, tanto em pacientes como em animais experimentais, que aminoácidos musculares podem ser muito solicitados para o metabolismo tumoral. Segundo esses mesmos autores, um dos efeitos sistêmicos do crescimento tumoral é a depleção da proteína muscular, que é decorrente do aumento da degradação e diminuição de sua síntese (GARLIK & MCNURLAN, 1994; LIMA-GONÇALVES *et al.*, 1987; TAYKEY, 1996).

Ratos portadores de hepatoma de Yoshida AH-130 mostraram que a presença desse tumor causou alterações nas concentrações totais de aminoácidos, resultando no aumento das concentrações de glicina e alanina e decréscimo nas concentrações de prolina, valina, tirosina, lisina, histidina, arginina e, principalmente, glutamina (GARCÍA-MARTINEZ *et al.*, 1995). Por outro lado, estes mesmos autores relataram, em estudos anteriores, que a administração de *tumor necrosis factor* promoveu aumento de proteólise na musculatura esquelética de ratos normais (GARCÍA-MARTINEZ *et al.*, 1993; TAYKEY, 1996).

GOLDBERG *et al.* (1978) e KREBS *et al.* (1975) mostraram que a leucina é um importante combustível metabólico da musculatura esquelética.

Em situações onde há aumento da oxidação da leucina, há uma diminuição correspondente na liberação de alanina pelo músculo esquelético (KARL *et al.*, 1976).

Alguns autores consideram que o aumento da taxa de proteólise muscular esquelética tem como função primordial fornecer aminoácido para a síntese de glutamina no músculo, que será utilizada pelas células neoplásicas (FURST *et al.*, 1989). A taxa de liberação de glutamina de músculo isolado foi significativamente aumentada na caquexia em ratos portadores do carcinossarcoma de Walker (PARRI-BILLINGS *et al.*, 1991). Alguns trabalhos mostraram elevada oxidação de leucina [^{14}C] em músculo gastrocnêmio e hemidiafragma de ratos com carcinossarcoma de Walker, em relação a dos animais pair-fed (GOODLAD & CLARK, 1980; SIDDIQUI & WILLIAMS, 1989). A glutamina, aminoácido mais abundante no plasma, é ativamente utilizada e oxidada pelas células tumorais *in vitro*, sendo precursora da síntese de vários aminoácidos, purinas e pirimidinas nas células neoplásicas (LUQUE *et al.*, 1990; SAUER & DAUCHY, 1990).

Os trabalhos de MEDINA & CASTRO (1990) e NEWSHOLME (1990) mostram que as células neoplásicas possuem alto fluxo glicolítico e glutaminolítico. Em alguns tipos celulares, a glutamina afeta a taxa de consumo e oxidação da glicose e vice-versa. LUQUE *et al.* (1990) verificaram que células do tumor de Erlich apresentam taxa de glicólise elevada, devido ao grande consumo de glicose e produção de lactato; a adição de glutamina ao meio de incubação reduziu esta taxa.

YUDKOFF *et al.* (1994), estudando astrócitos em cultura incubados com leucina [^{15}N], verificaram que a transaminação de leucina é 17 vezes

maior que a oxidação de leucina, sendo esta a maior fonte de nitrogênio do glutamato.

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

A metionina, aminoácido essencial, é utilizada para o processo inicial de síntese protéica (OGIER *et al.*, 1993). A proliferação de várias células malignas é dependente de metionina e, em meio de cultura livre de metionina, a proliferação destas células interrompe-se na fase S/G1 de divisão celular (HOFFMAN, 1982).

GUO *et al.* (1993) mostraram que dieta deficiente em metionina promoveu aumento da sobrevivência de camundongos portadores de tumor Yoshida. YOSHIDA *et al.* (1995) demonstraram que dieta parenteral isenta de metionina, em ratos portadores de hepatoma AH109A, promoveu redução do peso deste tumor. Entretanto, os autores relatam que a síntese de proteína tumoral não se alterou, provavelmente, pela produção de metionina endógena, mas a proteólise tumoral estava aumentada nestes animais, levando a conclusão que foi o aumento do catabolismo protéico tumoral que, provavelmente, contribuiu para o seu menor crescimento.

POIRSON-BICHAT *et al.* (1997 a, b) demonstraram que a deficiência de metionina causou inibição da proliferação de células de glioma *in vitro* e provavelmente exerceu um efeito anti-tumoral sobre essas células.

Em decorrência desta mobilização de substratos energéticos, é sabido que, freqüentemente, o crescimento neoplásico desencadeia perda de peso do

hospedeiro, levando, com isso, ao estado caquético do paciente ou animal experimental (GOODLAD & CLARK, 1981; STEIN, 1978; FIELDS *et al.*, 1982; LUNDHOLM *et al.*, 1982; TESSITORE *et al.*, 1993).

Com o contínuo crescimento neoplásico, o organismo hospedeiro desenvolve balanço nitrogenado negativo. Em muitos casos, a massa corporal magra de ratos portadores de carcinoma decresce em proporção direta ao aumento da massa neoplásica (BECK & TISDALE, 1989).

GONÇALVES *et al.* (1993) observaram que, na presença do tumor maligno, a excreção de nitrogênio fecal correspondeu a 79%, enquanto que nos ratos controles esta excreção foi de 5,7%, sugerindo evidente balanço nitrogenado negativo.

STEIN (1978) expôs que o indivíduo em jejum prolongado adapta-se a este estado, reduzindo, de forma significativa, a perda de massa protéica corpórea, passando a canalizar ácidos graxos e glicerol para o seu metabolismo energético; o paciente com câncer perde essa capacidade de adaptação, perdendo, dessa forma, quantidade considerável de massa protéica corpórea. Mais de 80% dos pacientes hospitalizados com neoplasia apresentam desnutrição protéico-calórica, sendo a caquexia a *causa mortis* mais freqüente (NIXON *et al.*, 1988; STALLION *et al.*, 1993; WOLF *et al.*, 1993).

Segundo BECK & TISDALE (1987), há depleção da gordura corporal, aumento de aminoácidos no músculo, particularmente da leucina, valina e isoleucina. Segundo GOLDBERG & CHANG (1978), a leucina é oxidada em acetil CoA, que é utilizada como substrato energético para o músculo.

TORRES *et al.* (1993) observaram que a oxidação da valina, pelo músculo sóleo de ratos, foi estimulada pela suplementação de leucina na dieta.

O entendimento do metabolismo de aminoácidos e, em particular, o transporte de aminoácidos podem melhorar projetos experimentais futuros e testar a eficácia da manipulação nutricional dos aminoácidos e seus efeitos ao componente central (JAKEMAN, 1998).

Segundo McNURLAN *et al.* (1994), a nutrição parenteral, contendo 0,2g de nitrogênio/Kg de peso corpóreo e enriquecida com 30% de aminoácidos de cadeia longa, foi menos efetiva do que a nutrição intravenosa convencional.

BOLUFER *et al.* (1986) sugerem que o aumento total na absorção da leucina e da cicloleucina, pelo jejuno em ratos com ressecção intestinal, foi decorrente da alta concentração de metionina e/ou do aumento da permeabilidade epitelial desses animais. Por outro lado, THOMPSON *et al.* (1994) verificaram que a menor taxa de absorção de nutrientes, em ratos com ressecção do íleo e irradiação abdominal, estava associada à dinâmica morfológica do intestino.

Além disso, pesquisas realizadas com ratos com diferentes idades mostraram que a absorção de L-fenilalanina e L-triptofano foi significativamente reduzida no jejuno desses ratos. Estes estudos relataram, também, que havia ligeiro decréscimo na captação destes aminoácidos no jejuno, em ratos com 12 meses, quando comparados com ratos de 6 meses, sugerindo que a diminuição da absorção possa ser um processo contínuo com a idade (NAVAD *et al.*, 1988; VINARDELL, 1992).

Trabalhos utilizando técnicas *in vivo*, em ratas, informaram que o valor de k (constante de transporte) do L-triptofano e L-fenilalanina foi baixo em animais jovens (6 meses), comparados com adultos (12 meses) e velhos (27 meses). Outro estudo *in vivo*, realizado pelos mesmos autores, avaliou que

existe baixa afinidade para o transporte de L-glicina, L-alanina e L-lisina, em ratos mais velhos comparados com animais adultos e jovens. Em contraste, há alta afinidade para o transporte por L-leucina e L-arginina em ratos velhos comparados com ratos adultos (PENZES & BOROSS, 1974; VINARDEL, 1992).

OBJETIVOS

Tendo em vista a abordagem bibliográfica acima descrita, sabemos que os aminoácidos musculares são largamente solicitados e importantes para o metabolismo tumoral; a metionina apresenta importante papel no processo inicial da síntese protéica e na proliferação de várias células malignas, enquanto a leucina é um importante combustível metabólico da musculatura esquelética.

Este trabalho tem por objetivo verificar o efeito da deficiência de metionina na dieta sobre o crescimento tumoral, o efeito protetor para o hospedeiro alimentado com dieta suplementada com leucina e a somatória desses procedimentos e seus benefícios, avaliando, assim, prováveis alterações bioquímicas, ponderais e alimentares, em animais portadores do carcinossarcoma de Walker 256.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

No presente trabalho foram utilizados 122 ratos Wistar, adultos (90 a 100 dias de idade), com peso corpóreo médio de 300g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais foram mantidos em ciclo de fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, no Biotério do Laboratório de Câncer e Nutrição do Departamento de Fisiologia e Biofísica, da Universidade Estadual de Campinas.

2. Modelo Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos experimentais, com número mínimo de 10 animais por grupo, a saber:

Grupos sem implante tumoral:

C - ratos submetidos à dieta normoprotéica

D - ratos submetidos à dieta hipoprotéica

L - ratos submetidos à dieta com alto teor de leucina

M - ratos submetidos à dieta com deficiência de metionina

LM - ratos submetidos à dieta com alto teor de leucina e deficiência de metionina

Grupos com implante do Carcinossarcoma de Walker 256:

CW - ratos submetidos à dieta normoprotéica

DW - ratos submetidos à dieta hipoprotéica

LW - ratos submetidos à dieta com alto teor de leucina

MW - ratos submetidos à dieta com deficiência de metionina

LMW - ratos submetidos à dieta com alto teor de leucina e deficiência de metionina

3. Composição das Dietas

A composição das dietas, segundo REEVES *et al.*, (1993), está apresentada na Tabela 1, onde todas as dietas são isocalóricas e correspondem à **dieta C**: dieta normoprotéica (18% de proteína); **dieta D**: dieta hipoprotéica (6% de proteína); **dieta M**: a dieta isenta de metionina (18% de proteína e 0% de L-metionina); **dieta L**: a dieta com alto teor de leucina (15% de proteína e 3% de L-leucina); **dieta LM**: a dieta com alto teor de leucina e isenta de metionina (15% de proteína, 3% de L-leucina e 0% de L-metionina).

4. Implante Tumoral

As células tumorais foram obtidas do carcinossarcoma de Walker 256, provenientes da linhagem obtida do Banco de Tumores Chist Hospital Line, Arthur D'Little, EUA. As células neoplásicas utilizadas foram cedidas ao Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pelo grupo de Metabologia Cirúrgica da Faculdade de Medicina da USP.

O implante das células tumorais foi feito no tecido subcutâneo da região dorso-lateral direita do rato, de acordo com técnica padronizada por GOMES *et al.* (1983). O número de células implantadas foi de 250.000 em 0,5 mL por inóculo.

Os animais dos grupos C, D, L, M e LM receberam inoculação de 0,5 mL de solução fisiológica a 0,9% no tecido subcutâneo do flanco direito.

TABELA 1: Composição das diferentes dietas semi-purificadas contendo 18% de proteína na dieta normoprotéica C e 6% na dieta hipoprotéica D.

	DIETA C	DIETA D	DIETA M	DIETA L	DIETA LM
<i>Kcal (100g de dieta)</i>	405,5	406,7	405,5	397,3	410
<i>Carboidrato</i>	65%	77%	65,4%	60%	63,5%
<i>Proteína^a</i>	18,2%	6,5%	17,8%	18,7%	18,3%
<i>Gordura</i>	7%	7%	7%	7%	7%
AMIDO	395,5	444,5	397,5	387,5	397,5
DEXTRINA	154,4	178	157	122	148
AÇÚCAR	100	149	100	90	90
FIBRA CELULOSE	50	50	50	50	50
MISTURA DE SAIS ^b	35	35	35	35	35
MISTURA DE VITAMINAS ^c	10	10	10	10	10
COLINA	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
ÓLEO DE SOJA	70	70	70	70	70
CISTINA	6,7	2,2	6,7	5,7	5,7
ALANINA	4,6	1,5	4,6	3,9	3,9
ARGININA	6,4	2,1	6,4	5,4	5,4
ÁC. ASPÁRTICO	12,2	4,1	12,2	10,4	10,4
ÁC. GLUTÂMICO	36,3	12,1	36,3	30,9	30,9
GLICINA	3,2	1,1	3,2	2,7	2,7
HISTIDINA	4,6	1,5	4,6	3,9	3,9
ISO LEUCINA	8,5	2,8	8,5	7,2	7,2
LEUCINA	15,4	5,1	15,4	45,4	45,4
LISINA	13	4,3	13	11,1	11,1
METIONINA	4,6	1,5	—	3,9	—
FENIL ALANINA	8,8	2,9	8,8	7,5	7,5
PROLINA	20,5	6,8	20,5	17,5	17,5
SERINA	9,7	3,2	9,7	8,2	8,2
TREONINA	6,7	2,2	6,7	5,7	5,7
TRIPTOFANO	2,1	0,7	2,1	1,8	1,8
TIROSINA	9,3	3,1	9,3	7,9	7,9
VALINA	10	3,3	10	8,5	8,5

Dietas isocalóricas. **Legenda:** a. teor de proteína foi determinado pelo método de microkjeldahl (ALBANESE & ORTO, 1963); b. ROGER & HARPER (1965); c. MILLER *et al.*, (1962)

5. Procedimento Experimental

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para coleta de urina durante todo o período experimental. As dietas semi-purificadas foram colocadas em recipientes especiais evitando, desta maneira, a contaminação por urina e fezes, possibilitando a avaliação e mensuração da ingestão de alimentos diária em 22 dias de experimento.

Foram efetuadas três medidas semanais do peso corpóreo: peso da carcaça, que corresponde ao peso corpóreo menos o peso do tumor, ingestão alimentar e coleta de urina, para análise do balanço nitrogenado. Os animais foram submetidos à perfusão intestinal no período pré-agônico, sendo anestesiados com Nembutal (100mg/Kg de peso), via peritonial. O sangue foi coletado por punção cardíaca, para posterior análise bioquímica do soro. O sacrifício ocorreu a partir da superdose do anestésico.

Para determinação da composição corpórea química da carcaça, foram retirados o trato gastrointestinal (fígado, estômago e intestinos) e o músculo gastrocnêmio esquerdo de todos os animais; no caso dos animais portadores do carcinossarcoma de Walker 256, o tumor foi extirpado. A carcaça, soro e tecidos coletados foram armazenados em freezer a -20°C.

- **Observação:** o grupo LMW apresentou problemas durante o período experimental, não completando o tempo experimental previsto. Decorrente deste imprevisto, foi possível apenas obtenção de soro de um único animal para análise dos teores de glicose e proteína total sérica, não sendo realizada a perfusão intestinal neste grupo e do seu respectivo controle (LM).

6. Perfusão Intestinal

A perfusão foi realizada através da canulação do intestino delgado. Duas cânulas foram utilizadas, sendo 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 de bomba peristáltica, com fluxo de 0,5 a 1,0 mL/minuto. Após 30 minutos de equilíbrio, foi iniciada a coleta das amostras do perfusado para o estudo da função intestinal, controlando e mantendo a temperatura do líquido perfundido a 37°C. Foram administradas as soluções de glicose a 138,7µmol/L, metionina a 167,5µmol/L e leucina a 190,5µmol/L, por 3 minutos, coletando-se 3 amostras de cada solução. A glicose e os aminoácidos (metionina e leucina) perfundidos foram determinados por colorimetria: a metionina, segundo método de McCARTHY & SULIVAN (1941), a leucina, segundo ROSEN (1957) e a glicose, segundo método de TRINDER (1969).

7. Determinações Bioquímicas

a. Dosagem de nitrogênio total das dietas e urina foi determinada, segundo ALBANESE & ORTO (1963). Neste trabalho foi analisado o balanço nitrogenado estimado que corresponde ao nitrogênio total ingerido menos o nitrogênio total excretado, foi considerado apenas nitrogênio urinário.

b. Dosagens séricas:

- Para determinação da glicose sérica foi utilizado método colorimétrico, por glicose oxidase, segundo TRINDER (1969).
- Para determinação do teor de proteína total sérica foi utilizado o método colorimétrico segundo HENRY (1974).

c. Proteína total de carcaça foi analisada após digestão da amostra de carcaça com NaOH 1N e determinada colorimetricamente com *Comassie Brilliant Blue G-250*, segundo micrométodo de BRADFORD (1976).

d. Composição corpórea química foi determinada, segundo método padronizado pelo grupo de Metabologia Cirúrgica do Departamento de técnica Cirúrgica da Faculdade de Medicina USP. A metodologia da composição corpórea química avaliada está descrita a seguir:

i) Teor de água: para obtenção da quantidade de água na carcaça do animal, secou-se a carcaça, sem o trato gastrointestinal, 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.

ii) 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°), 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.

iii) Teor de nitrogênio colágeno: uma alíquota da carcaça seca e desengordurada sofreu tratamento com soda (NaOH, 2N), ácido tânico a 5% e ácido sulfúrico 2N (SPENCER *et al.*, 1937); após este procedimento, a amostra foi analisada quanto ao teor de nitrogênio, utilizando-se digestão ácida e colorimétrica (digestão com H_2SO_4 e sulfato de potássio e colorimetria com reativo de Nessler), segundo método de microKjeldahl (ALBANESE & ORTO, 1963).

8. Análise Estatística

Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis não paramétrico, seguido do teste Dunns para comparação entre as médias (WOOLSON, 1987; GAD & WEIL, 1994). Diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

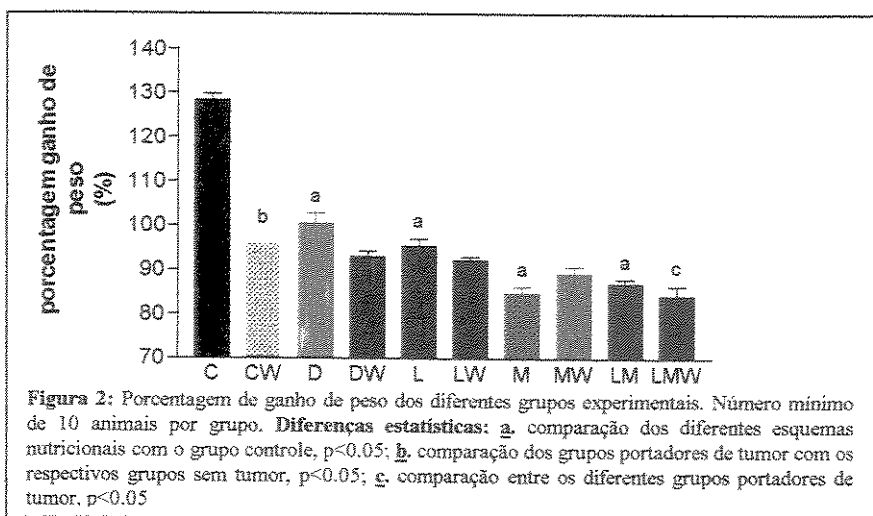
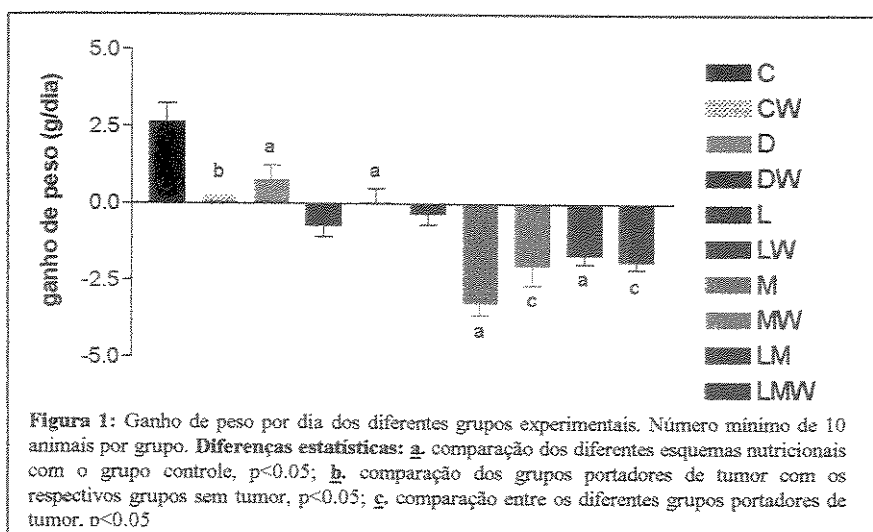
1. Evolução diária do ganho de peso corpóreo, Porcentagem de ganho de peso corpóreo, Ingestão alimentar, Eficiência alimentar, Balanço nitrogenado e Peso tumoral

A evolução do ganho de peso corpóreo do grupo C mostrou-se progressiva e constante durante todo o período experimental, apresentando média do ganho de peso em cerca de 2,5g/dia. O ganho de peso por dia mostrou-se reduzido nos grupos D (70%), L (99%), M (222%) e LM (163%), quando comparamos ao grupo controle C. O grupo CW, portador do carcinoma de Walker 256, apresentou decréscimo do ganho de peso por dia em relação ao seu respectivo grupo controle C (cerca de 90%). O mesmo foi verificado nos grupos DW e LW, porém não estatisticamente significativo. Ao comparamos os grupos portadores do carcinoma de Walker 256, verificamos que o grupo CW mostrou maior ganho de peso por dia em relação aos grupos MW e LMW (8 vezes menor aproximadamente), como pode ser observado na **Figura 1¹** e **Tabela 2** (apêndice).

Os grupos tratados com dietas diferentes à normoprotéica apresentaram decréscimo da porcentagem de ganho de peso corpóreo em relação ao grupo controle C, D e L (aproximadamente 24% menor), M e LM (cerca de 32% menor), quando comparamos as diferentes dietas. Comparando os grupos portadores do carcinoma de Walker 256 com seus respectivos grupos controle, observamos que CW apresentou decréscimo em relação ao C (cerca de 25%), DW reduziu (cerca de 8%) em relação ao D, e M reduziu (cerca de

¹ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

5%) em relação ao MW. O grupo LMW apresentou decréscimo, quando comparado aos grupos CW, DW e LW (cerca de 10% de redução); o grupo MW apresentou redução em relação ao grupo CW (cerca de 7%), quando analisamos os grupos portadores do carcinoma de Walker 256 (Figura 2² e Tabela 3 apêndice).



Segundo SANTOS (1990), as proteínas participam de todos os processos vitais e o critério básico seguido para o estabelecimento do

² **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

requerimento mínimo de proteína é a de perda obrigatória de nitrogênio pelos indivíduos através de dietas aproteicas. A diminuição de peso corporal, devido à perda de tecidos, pode ocasionar a desnutrição.

Aminoácidos musculares geram energia para o músculo e para o resto do corpo, utilizando a via glicolítica do fígado. Se existe má nutrição, as reservas recentes do músculo esquelético são exauridas e as proteínas viscerais são mobilizadas para a produção de combustível.

A prioridade máxima da utilização de aminoácidos inclui a formação de hormônios, manutenção do sistema imune e síntese de proteínas viscerais e circulantes (CROCKER *et al.*, 1983).

Segundo PUCHALA *et al.* (1997), a metionina está envolvida em muitos processos, mas, provavelmente, sua importância maior é de iniciar a síntese protéica. Este aminoácido deve ser ingerido na dieta, sendo exclusivo precursor da S-adenosímetionina (doadora primária de metionina). Limitações da ingestão de metionina podem ocasionar severo retardo do crescimento e do ganho de peso. Em nossos resultados observamos valores de eficiência alimentar dos grupos M e LM semelhantes aos do grupo C (Figura 4³), porém houve decréscimo acentuado do ganho de peso corpóreo nos animais destes mesmos grupos (M e LM) (Figura 1³).

GRIMBLE & GRIMBLE (1998) observaram que animais alimentados com dietas deficientes em metionina sofreram perda de peso profunda ou retardo do crescimento, como observado em nossos resultados (Figura 1 e 2).

Segundo GRIMBLE & GRIMBLE (1998), a homocisteína e grupos metil

³ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

adicionados na dieta, na forma de colina, recuperaram o crescimento normal, pois ocorreu síntese de metionina através da remetilação da homocisteína via S-adenosilmetionina.

Na célula, a transformação de homocisteína em metionina, envolve uma série de reações enzimáticas dependentes de vitamina B₆ e B₁₂, podendo ser também convertida em cisteína. Os níveis de homocisteína variam com diversos fatores como idade, deficiência de vitaminas e predisposição genética (ALTHAUSEN & PASCHEN, 2000).

GOODMAN & GÓMEZ (1987), em experimentos com ratos, observaram redução no consumo de dietas livres de proteína comparada à dieta completa. Em nossos estudos, os animais dos grupos M e LM apresentaram tendência ao decréscimo da ingestão alimentar, como pode ser observado na Figura 3⁴.

A quebra e a síntese de proteínas ocorrem em proporção equivalente, deste modo o balanço nitrogenado tende ao equilíbrio em condições normais de saúde e ingestão de dietas adequadas. Quando a oferta de nitrogênio é limitada ou ausente, este equilíbrio é alterado para suprir a demanda, e o balanço nitrogenado pode tornar-se negativo (CROCKER *et al.*, 1983).

Nossos estudos mostraram que, apesar de não apresentarem balanço nitrogenado negativo, os grupos D, L e M demonstram diminuição do balanço nitrogenado em relação ao grupo controle C, surgindo, provavelmente, desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação de proteína com conseqüente perda de nitrogênio (Figura 5⁴).

⁴ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

A evolução da ingestão alimentar não apresentou oscilações estatisticamente significativas entre os diferentes grupos experimentais.

Contudo, como podemos observar na Figura 3⁵ e Tabela 4, houve tendência à redução da ingestão alimentar nos ratos portadores de tumor, quando comparados aos seus respectivos grupos controle, podendo, ainda, verificar-se tendência à redução da ingestão nos animais alimentados com dietas deficientes em metionina (M e LM) e leve tendência ao aumento da ingestão alimentar dos ratos alimentados com dieta hipoprotéica (D), comparados ao grupo C.

A eficiência alimentar foi obtida a partir do cálculo: $Pf - Pi / \Sigma$ ingestão alimentar, onde Pf = peso corpóreo final, Pi = peso corpóreo no início do experimento e Σ ingestão alimentar = corresponde ao montante total ingerido durante todo período experimental.

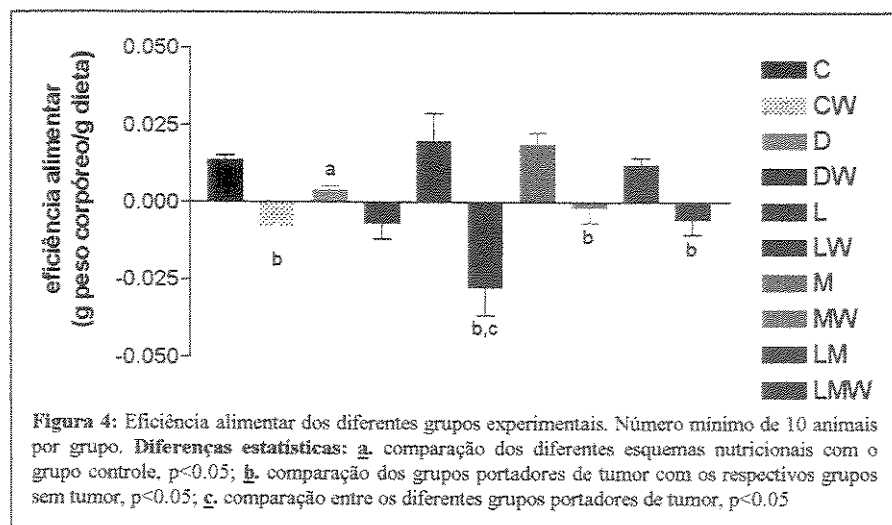
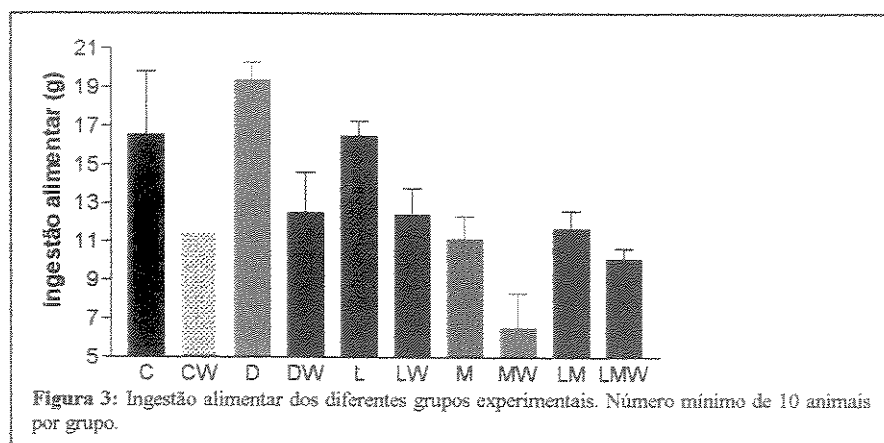
Assim, verificou-se que o grupo C mostrou evolução positiva da ingestão alimentar paralela ao acréscimo de peso corpóreo.

Por outro lado, a eficiência alimentar do grupo D mostrou-se reduzida, quando comparada aos grupos C (78%), M (70%), e LM (66%) aproximadamente, comparando os diferentes esquemas nutricionais.

A eficiência alimentar no grupo CW foi reduzida em relação ao C (em cerca de 0,4 vezes), bem como nos demais grupos com tumor; LW diminuiu em relação ao L (em cerca de 2,4 vezes), MW apresentou menor eficiência em relação ao M (em cerca de 1 vez) e nos LMW este parâmetro foi reduzido em relação ao LM (em cerca de 1,4 vezes), quando comparamos os grupos

⁵ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

portadores do carcinoma de Walker 256 aos respectivos grupos controle. Quando analisamos os grupos portadores do carcinoma de Walker 256, observamos decréscimo da eficiência alimentar no grupo LW em relação ao grupo MW de aproximadamente 95% (Figura 4⁶ e Tabela 5 apêndice).

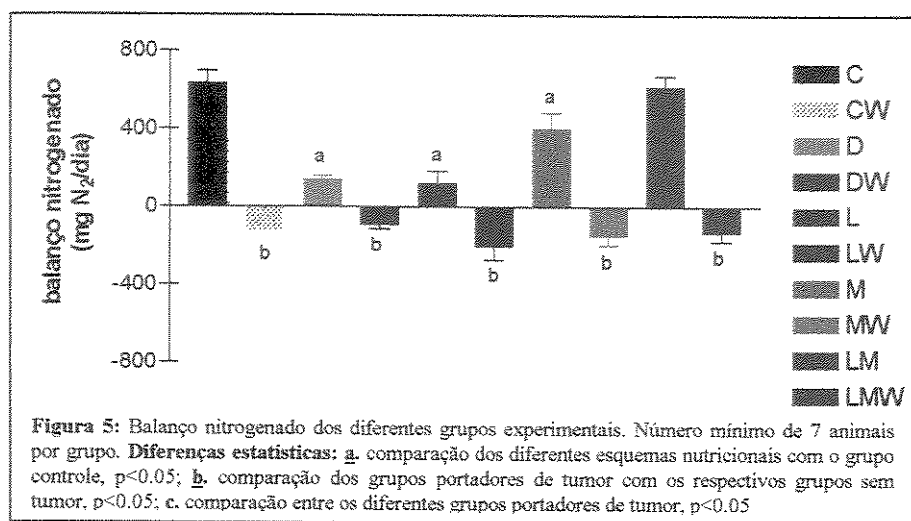


O balanço nitrogenado estimado foi calculado utilizando-se para o cálculo o nitrogênio ingerido menos o nitrogênio urinário excretado; o nitrogênio fecal não foi utilizado para esta análise. Os grupos D, L e M apresentaram

⁶Legenda: C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

balanço nitrogenado diminuído em relação ao grupo C (cerca de 77%, 80% e 36% respectivamente), quando comparamos as diferentes dietas.

Todos os grupos portadores de tumor (CW, DW, LW, MW e LMW) apresentaram decréscimo significativo do balanço nitrogenado, quando comparados aos seus respectivos grupos controle (C, D, L, M e LM) em aproximadamente 95%. Entre os grupos com tumor não houve diferenças significativas (Figura 5⁷ e Tabela 6 apêndice).



RETTORI *et al.*, (1995), relacionaram a associação entre anorexia e perda de peso corpóreo em animais portadores de tumor, demonstrando que, em animais com múltiplos implantes tumorais, a diminuição da ingestão alimentar possibilita a distinção do começo repentino da anorexia.

Em nossos estudos, observando os resultados da ingestão alimentar, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, nota-se tendência à anorexia nos grupos portadores de tumor correlacionada à redução de ganho de peso corpóreo e ao possível estado hipercatabólico, representado

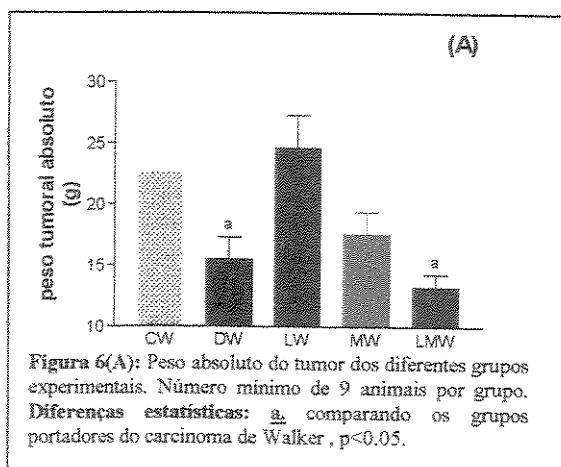
⁷**Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

pelo aumento de perda de nitrogênio da carcaça (balanço nitrogenado negativo) (Figura 1- 3 e 5).

A redução de peso corpóreo está associada ao estado hipercatabólico dos tecidos hospedeiros, sendo que a depleção protéica, no hospedeiro, reflete na ativa perda de peso, causada também por redução da ingestão alimentar e/ou competição metabólica pelo tumor (TESSITORE *et al.*, 1992).

A caquexia é freqüentemente associada a estágios terminais e avançados do câncer, podendo, também, se desenvolver precocemente durante o curso de doenças neoplásicas. É caracterizada por perda de peso corpóreo, balanço nitrogenado negativo (COSTELLI & BACCINO, 2000; BARACOS, 2000), anemia, anorexia, fraqueza e astenia (LLOVERA, 1993; ARGILES & LÓPEZ-SORIANO, 1999); é a manifestação extrema das adaptações metabólicas do hospedeiro ao crescimento tumoral (LAZO, 1985).

O tumor apresenta uma grande demanda de aminoácidos essenciais, no começo da fase clínica, e a regulação da mobilização de aminoácidos específicos corresponde à alteração metabólica do hospedeiro (LAZO, 1985).



Observamos que o grupo DW apresentou o peso absoluto de tumor reduzido em relação aos grupos CW (32%) e LW (37%) e, no grupo LMW, este parâmetro reduziu em relação aos grupos CW e DW (cerca de 42%), Figura 6(A)⁸.

⁸ **Legenda:** CW-controle com tumor; DW-desnutrido com tumor; LW-excesso de leucina com tumor; MW-deficiência de metionina com tumor; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

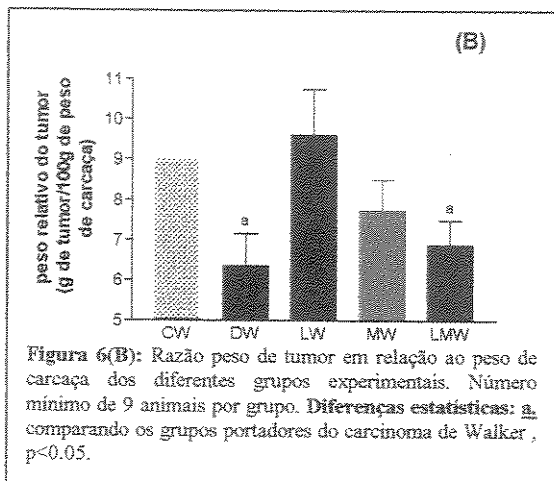
Verificamos redução do peso relativo do tumor nos grupos DW (cerca de 29%) e LMW (cerca de 24%) em relação ao grupo CW, como pode ser observado na Figura 6(B)⁹.

LE BRICON *et al.* (1996) relataram que, em 50% dos ratos, onde o tumor foi extirpado, houve aumento imediato da ingestão alimentar, peso corpóreo e balanço nitrogenado.

As células tumorais podem levar vantagem com o catabolismo

protéico, onde perturbações metabólicas protéicas no hospedeiro causam mobilização de aminoácidos teciduais favorecendo o crescimento tumoral (TESSITORE *et al.*, 1987).

SASAMURA *et al* (1998), estudando os efeitos da nutrição parenteral total contendo aminoácidos (D-fenilalanina, D-valina, D-leucina, D-metionina) em ratos, sobre o crescimento tumoral, observaram que a presença de D-leucina bem como D-metionina mostrou semelhante tendência inibitória sobre o crescimento tumoral. Estes resultados não são concordantes com os obtidos em nosso experimento, com excesso de leucina, onde o grupo LW apresentou peso de tumor similar ao grupo CW. Entretanto, verificou-se tendência a redução do crescimento tumoral no grupo com deficiência de metionina MW. Figuras 6(A)⁹, 6(B)⁹ e Tabela 8 (apêndice).

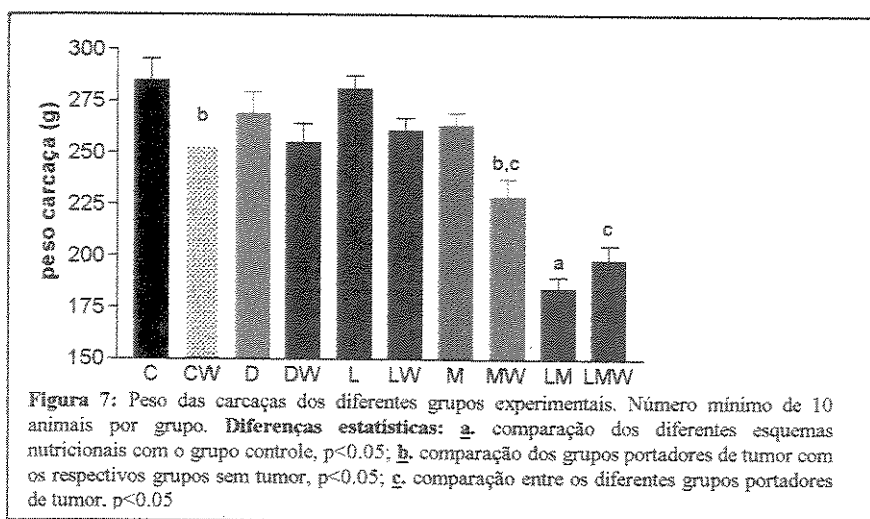


⁹ **Legenda:** CW-controle com tumor; DW-desnutrido com tumor; LW-excesso de leucina com tumor; MW-deficiência de metionina com tumor; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

2. Composição corpórea

Os valores individuais (média e desvio padrão da média) da composição corpórea química dos diferentes grupos experimentais podem ser observados na **Tabela 7** (apêndice).

O peso da carcaça, que corresponde ao peso corpóreo menos o peso do tumor e vísceras, apresentou-se reduzido apenas no grupo LM, aproximadamente 30% menor, em relação aos demais grupos, quando comparamos os diferentes esquemas nutricionais (**Figura 7¹⁰**). Quando comparamos os grupos portadores de Walker 256 aos respectivos grupos controle, verificamos que os grupos que apresentaram redução expressiva do peso da carcaça foram os grupos CW e MW (cerca de 12%) em relação aos respectivos grupos C e M. Os grupos DW e LW também apresentaram decréscimo do peso da carcaça em relação aos grupos D e L, respectivamente, porém não estatisticamente significativo.



¹⁰ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

Houve redução do peso da carcaça nos grupos MW e LMW em cerca de 13% e 22%, respectivamente, em relação aos demais grupos portadores do carcinoma de Walker 256 (Figura 7¹¹).

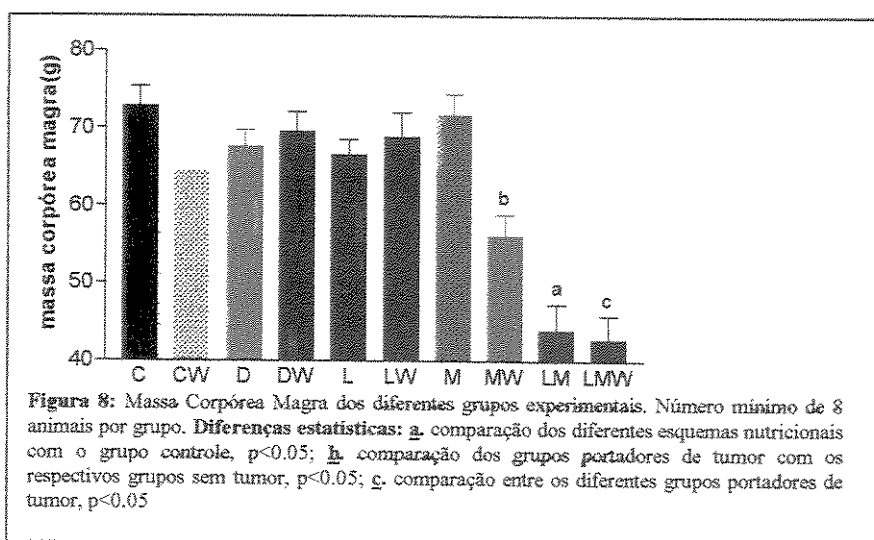
Na caquexia, a perda de massa corpórea magra, primariamente, reflete a perda de proteína tecidual, particularmente musculatura esquelética, implicando em um balanço nitrogenado negativo dos processos anabólicos e catabólicos (TESSITORE *et al.*, 1987), fato este que, também, pode ser observado em nossos resultados.

O decréscimo da massa corpórea magra ocorre em ratos portadores de tumor Walker 256 por dois motivos: diminuição da síntese protéica e/ou aumento da degradação protéica (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998). Como pode ser observado na Figura 7, nos grupos MW e LMW, onde os animais além de portadores do carcinossarcoma de Walker 256 foram alimentados com dietas deficientes de metionina, mostraram redução da massa corpórea magra em relação ao respectivo controle M e entre os grupos com tumor, respectivamente, o que nos leva a acreditar que a deficiência deste aminoácido pode estar intensificando, direta ou indiretamente, o catabolismo protéico muscular, agravando, ainda mais, o processo de espoliação do hospedeiro.

A supressão da síntese protéica e/ou a ativação da proteólise na caquexia do câncer, associadas à perda muscular, indicam a necessidade de terapias anabólicas e anti-catabólicas (BARACOS, 2000).

¹¹ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

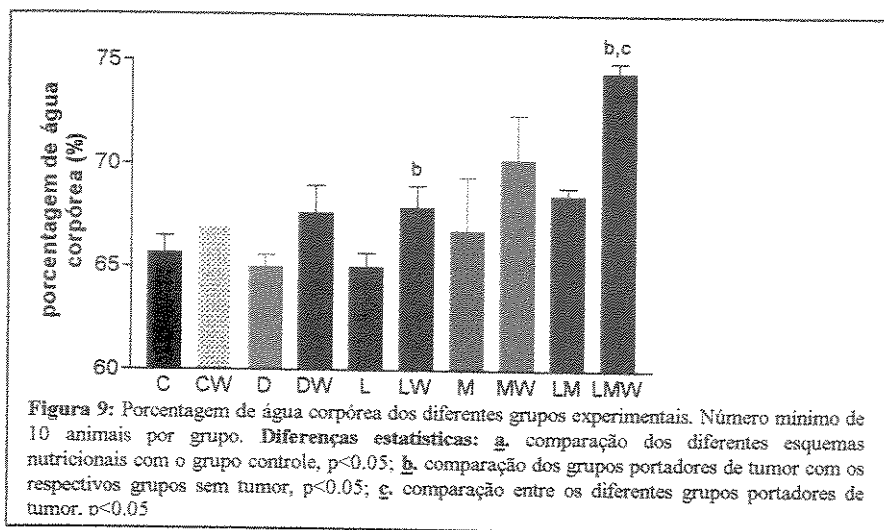
A análise da massa corpórea magra, que representa o peso corpóreo menos a quantidade de água e gordura corporais, mostrou valores similares para os grupos C, D, L e M, apresentando diferença significativa apenas para o grupo LM, onde houve redução (cerca de 35%) em relação aos demais grupos. O grupo MW apresentou redução deste parâmetro, quando comparado ao seu respectivo grupo controle M (cerca de 22%). Os demais grupos com tumor não apresentaram diferenças significativas, com exceção para o grupo CW, onde se percebe que há tendência à redução da massa corpórea magra em relação ao grupo C. O grupo LMW apresentou decréscimo em relação aos demais grupos com tumor (CW, DW, LW e MW) de aproximadamente 30% (Figura 8¹²).



Analisando os diferentes esquemas nutricionais, verificamos valores próximos da porcentagem de água corpórea em todos os grupos (C, D, L, M e LM). O grupo LW apresentou aumento desta porcentagem em relação ao grupo L (cerca de 4%) e o grupo LMW aumentou a água corpórea em relação ao LM

¹² **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

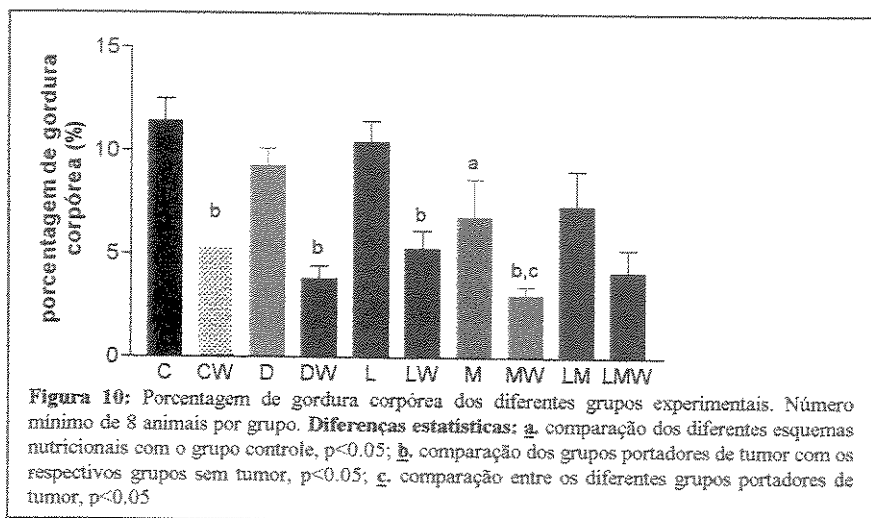
(cerca de 8%). Apenas estes resultados são significativos apesar de existir uma tendência, visível, do aumento da porcentagem de água corpórea dos animais hospedeiros de tumor em relação aos respectivos grupos controle. Comparando os grupos portadores do carcinoma de Walker 256, obtivemos aumento acima de 10% da porcentagem de água corpórea do grupo LMW em relação aos demais grupos (CW, DW, LW e MW), como pode ser observado na Figura 9¹³.



Houve decréscimo na porcentagem de gordura corpórea do grupo M em relação aos demais grupos sem tumor, acima de 27%, como pode ser observado na Figura 10. Por outro lado, condizentes com os dados da literatura (COHN *et al.*, 1981; GONÇALVES *et al.*, 1990), comparando os grupos portadores do carcinoma de Walker 256 e seus respectivos grupos controle, verificamos que os grupos CW, DW, LW e MW apresentaram redução na porcentagem de gordura corpórea em relação a C, D, L e M (cerca de 50%). O grupo MW reduziu, significativamente, em relação aos grupos CW e LW (cerca

¹³ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

de 43%), quando comparamos os grupos portadores do carcinoma de Walker 256 (Figura 10¹⁴).



Das alterações metabólicas que acometem animais portadores de tumor, a disfunção pancreática resulta na deficiência de insulina (hipoinsulinemia). Este fator somado à anorexia leva a um decréscimo na suplementação de substratos intracelulares, contribuindo para variações metabólicas observadas nos tecidos hospedeiros, incluindo aumento da gliconeogênese, proteólise muscular e lipólise no tecido adiposo (TOMAS *et al.*, 1994). Estas anormalidades metabólicas profundas, associadas à perda progressiva do peso corpóreo do hospedeiro, podem resultar em morte do hospedeiro com câncer. A perda tecidual envolve preferencialmente o tecido adiposo e, principalmente, musculatura esquelética (LLOVERA *et al.*, 1993).

GOODMAN *et al.* (1987) concluíram que ratos alimentados com dietas completas (carboidratos, proteínas e gorduras) demonstraram decréscimo da

¹⁴ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

quebra protéica miofibrilar do músculo esquelético. Em nossos estudos, observamos menores alterações da composição corpórea nos animais dos grupos CW e LW (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11¹⁵).

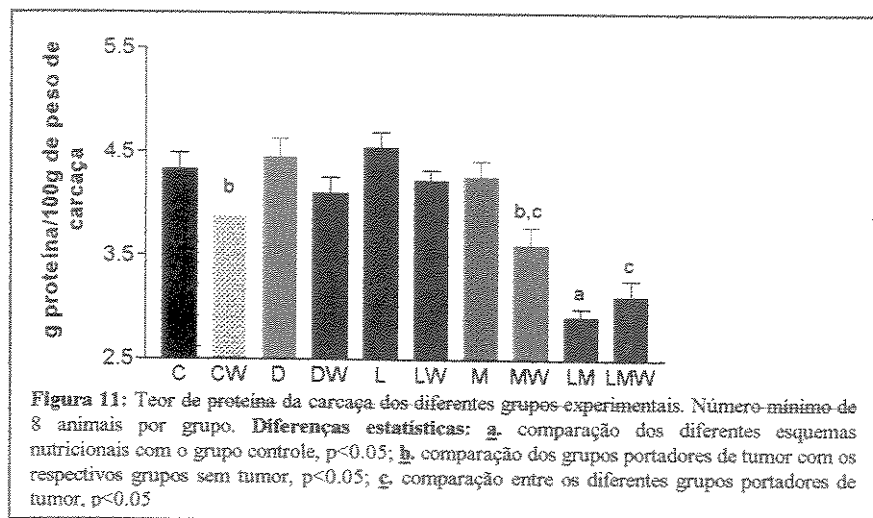
GONÇALVES *et al.* (1990), estudando ratos com implante tumoral de Walker 256 em diferentes condições nutricionais, observaram as seguintes alterações da composição corpórea: decréscimo acentuado de gordura, redução do nitrogênio, aumento dos valores de sódio corpóreo (podendo explicar o aumento da retenção de água) e aumento da água corpórea. Nossos resultados são condizentes com os da literatura, como podem ser observados nas Figuras 9 e 10.

Quando analisamos o efeito das diferentes dietas, verificamos que o grupo LM apresentou teor de proteína de carcaça reduzido, em cerca de 31%, em relação aos demais grupos C, D, L e M, que apresentam similaridade dos valores obtidos. Os grupos CW e MW apresentaram redução significativa em relação aos seus respectivos controles C e M cerca de 10% e 15%, respectivamente (Figura 11).

Notamos que o grupo LMW correspondeu ao único grupo com tumor que apresentou tendência a aumentar a proteína de carcaça em relação ao seu respectivo controle LM; porém, não houve diferença estatisticamente significativa. Entre os grupos com tumor, verificamos que no grupo LMW este parâmetro reduziu (cerca de 20%) em relação aos grupos CW, DW e LW, e o

¹⁵ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

grupo MW apresentou redução (cerca de 12%) em relação aos grupos DW e LW, como observado na **Figura 11**¹⁶.



SVANBERG *et al.* (1999), estudando o efeito da realimentação com aminoácidos após jejum de 36 horas, em camundongos, observaram aumento significativo da síntese de proteínas solúveis e, também, do estímulo a síntese de proteínas miofibrilares, porém, esta última ocorreu mais tardiamente atingindo o limite de 10% de significância.

Vários trabalhos têm demonstrado que a suplementação de aminoácidos de cadeia longa, como a leucina, atua melhorando os processos de síntese, bem como a redução da degradação protéica (ANTONHY, 1999; GARLICK & McNURLAN, 1994). O tumor utiliza, preferencialmente, determinados aminoácidos não essenciais e essenciais, como glutamina, leucina e metionina, nos seus processos de síntese protéica, bem como oxidação, acarretando desequilíbrio do *pool*/ total de aminoácidos no organismo

¹⁶ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

(SAUER & DAUCHY, 1990). Corroborando com os dados da literatura, nossos resultados (**Figura 11**) demonstraram que a suplementação de leucina em ratos portadores de tumor (LW) reduziu a depleção de proteína de carcaça, enquanto no grupo com deficiência de metionina (MW) houve elevada espoliação da proteína de carcaça.

O crescimento de tumores malignos depende da suplementação exógena de metionina. A dependência por metionina pelas células neoplásicas caracteriza a base do efeito anti-tumoral *in vivo* exercido pela dieta livre de metionina, uma vez que as células neoplásicas interrompem a fase de divisão celular (POIRSON-BICHAT *et al.*, 1997 a, b).

Quando analisamos a composição corpórea dos animais alimentados com diferentes dietas, observamos que o grupo LM mostrou redução de peso da carcaça, massa corpórea magra, porcentagem de gordura corpórea e teor de proteína total (**Figuras 7, 8, 10 e 11¹⁷**).

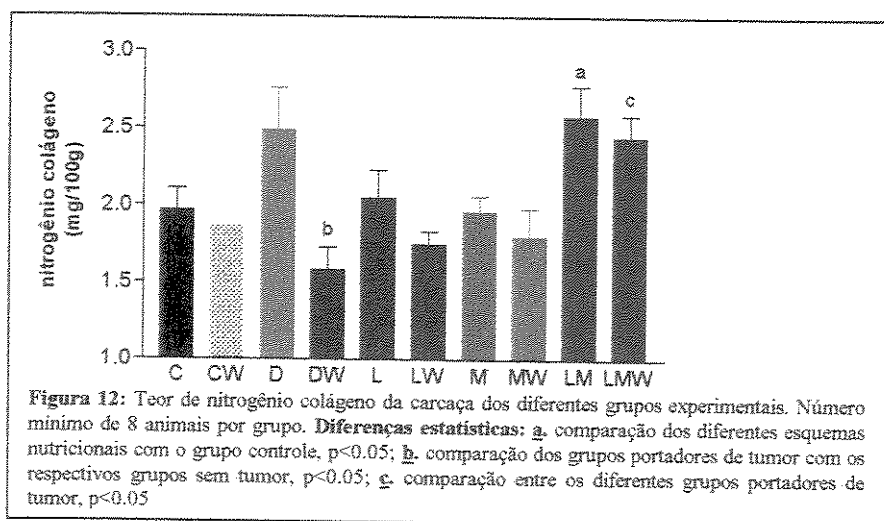
Isto nos leva a acreditar que o desbalanço na oferta de aminoácidos pode induzir um quadro parecido com a caquexia, pois a grande oferta de leucina não supriria a deficiência de metionina, levando ao aumento do catabolismo protéico para suprir as necessidades do indivíduo, já que, no caso de deficiência de metionina exógena, a homocisteína não supriria a demanda endógena para a síntese de metionina, restringindo a síntese de ATP e, em experimentos *in vivo*, com ratos submetidos à dieta deficiente em metionina,

¹⁷ **Legenda:** C-contrôle; CW-contrôle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

houve redução do aparecimento de metástases, como foi demonstrado por POIRSON-BICHAT *et al.* (1997 a, b).

Ao comparar as diferentes dietas, verificamos que o grupo LM apresentou aumento do nitrogênio colágeno da carcaça em relação aos grupos C, L e M (cerca de 21%). Notamos tendência à diminuição do nitrogênio colágeno da carcaça de todos os grupos com tumor comparado aos seus respectivos controles; apenas o grupo DW apresentou redução significativa em relação ao seu respectivo grupo controle D (cerca de 36%).

Na comparação dos diferentes grupos portadores do carcinoma de Walker 256, observamos que o grupo LMW apresentou aumento do nitrogênio colágeno em relação aos demais grupos (CW, DW, LW e MW) de aproximadamente 24% (Figura 12¹⁸).



O nitrogênio corpóreo pode ser dividido em dois grandes componentes, um relacionado à massa celular corpórea metabolicamente ativa e outro ligado

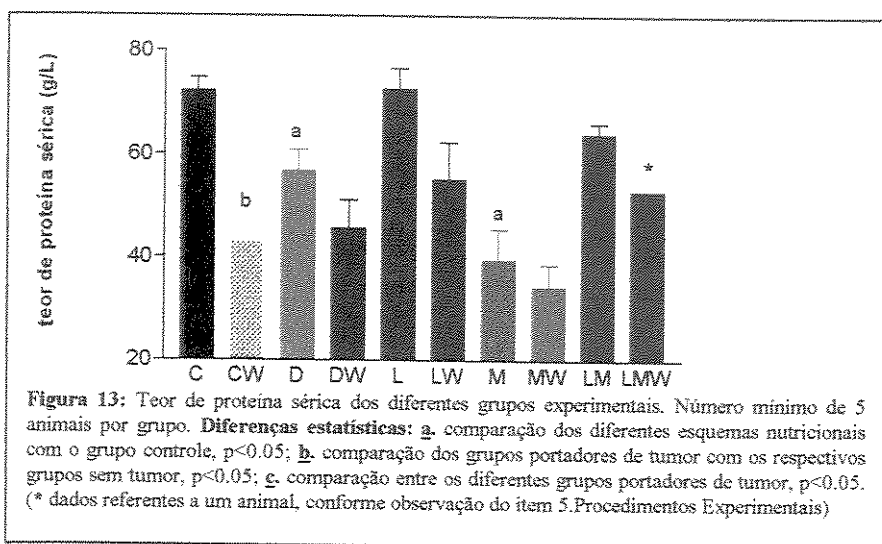
¹⁸ **Legenda:** C-contrôle; CW-contrôle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

aos componentes da massa extracelular, metabolicamente muito lenta (nitrogênio colágeno) (GONÇALVES *et al.*, 1990).

VENTRUCI *et al.* (2001) observaram redução da massa corpórea magra, redução de nitrogênio colágeno, decréscimo de gordura e aumento da porcentagem de água corpórea, em ratas grávidas portadoras de Walker 256 e alimentadas com dieta rica em leucina. Nossos resultados, com respeito a estes parâmetros, foram semelhantes aos encontrados na literatura, como pode ser observado nas Figuras 8, 9, 10 e 12.

3. Parâmetros séricos e peso de órgãos

O teor de proteína sérica dos grupos D, M e LM foi menor, quando comparado ao grupo C (cerca de 21%, 45% e 11% respectivamente), havendo similaridade destes valores nos grupos C e L. O grupo CW foi o único a reduzir estatisticamente o teor de proteína sérica em relação ao grupo C, apesar de evidente tendência à diminuição deste parâmetro em todos os grupos com tumor. Entre os grupos portadores do carcinoma de Walker 256, não houve diferenças significativas (Figura 13¹⁹).

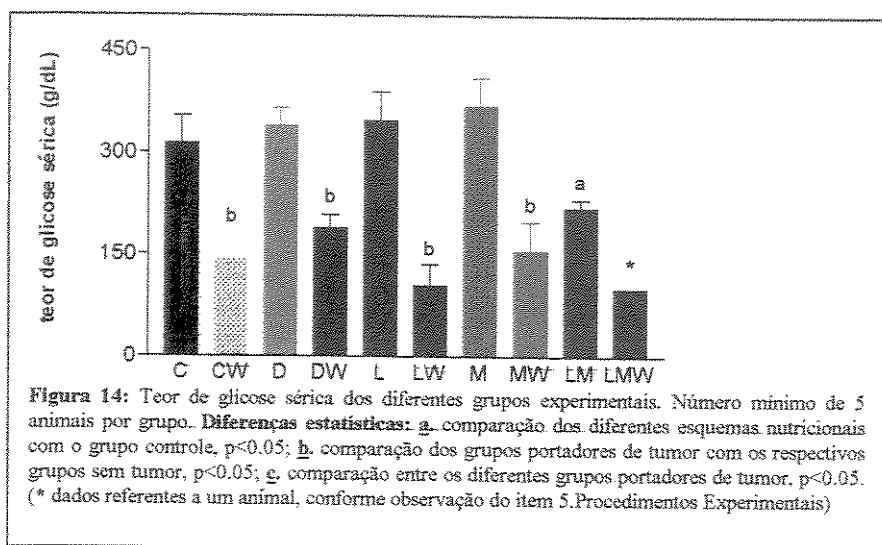


VENTRUCCI *et al.* (2001) e GOMES-MARCONDES *et al.* (1998) observaram reduções significativas no teor sérico de proteína total de animais portadores do carcinoma de Walker 256. Nossos resultados também apresentaram esta redução (Figura 13), concordando com os dados da

¹⁹ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

literatura. TESSITORE *et al.* (1992) observaram que a proteína plasmática total decresceu substancialmente durante o crescimento tumoral.

O grupo LM mostrou redução no teor de glicose sérica, em aproximadamente 35%, em relação aos grupos D, L e M. Quando comparamos os grupos com tumor aos seus respectivos controles, observamos que CW, DW, LW e MW reduziram a glicemia em relação aos grupos C, D, L e M (acima de 54%). Entre os grupos com tumor não houve diferenças estatísticas (Figura 14²⁰).



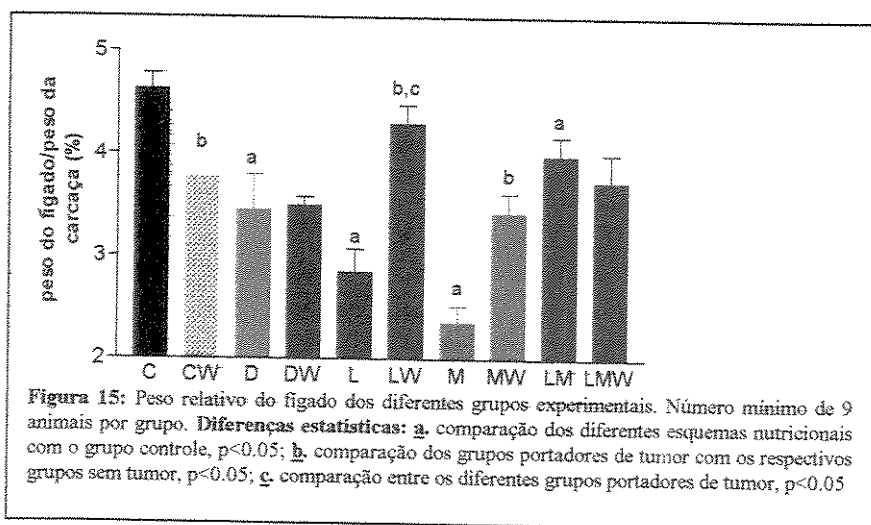
Contrariamente às nossas observações, VENTRUCCI *et al.* (2001) verificaram redução glicêmica menos profunda nos grupos alimentados com dieta rica em leucina (Figura 14).

TESSITORE *et al.* (1992) observaram que a concentração plasmática de glicose não sofreu alteração significativa, embora tenha apresentado valores constantemente baixos no fluido ascítico; assim, a homeostasia da glicose foi

²⁰ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

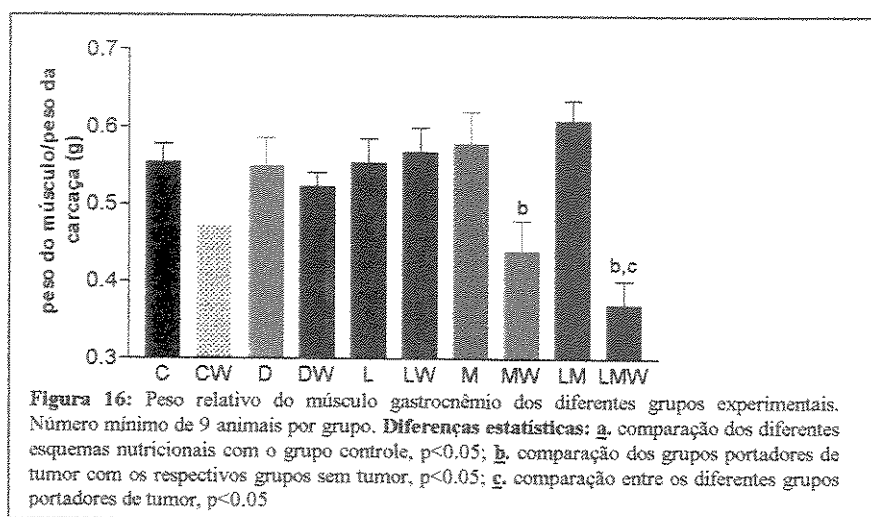
adequada à manutenção dos níveis plasmáticos normais em detrimento à utilização extensiva pelas células tumorais. Segundo TESSITORE, o rato hospedeiro de tumor não apresentou hipoglicemia. Contudo, nossos resultados mostraram redução significativa no teor de glicose sérica de ratos portadores de tumor comparados aos seus respectivos grupos controles.

O peso do fígado em relação à carcaça foi menor nos grupos D, L, M e LM em aproximadamente 49%, quando comparado ao grupo C. Dos grupos portadores do carcinoma de Walker 256, o grupo CW mostrou redução do peso hepático em relação ao grupo C e este parâmetro, nos grupos LW e MW, aumentou em relação aos grupos L e M (cerca de 31%). Quando comparamos os grupos portadores do carcinoma de Walker 256, observamos aumento do peso relativo do fígado no grupo LW em relação aos grupos DW e MW (cerca de 20%), porém não houve aumento significativo em relação ao grupo CW (Figura 15²¹ e Tabela 8 apêndice).



²¹ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

Quando observamos o efeito das diferentes dietas sobre o peso muscular relativo, verificamos similaridade dos valores obtidos em todos os grupos (C, D, L, M e LM), não apresentando diferenças significativas (Figura 16²²). Os grupos portadores do carcinoma de Walker 256, MW e LMW, reduziram o peso muscular em relação aos seus respectivos controles, M e LM (cerca de 24% e 39%, respectivamente). O grupo LMW apresentou redução do peso do músculo gastrocnêmio em relação à carcaça, quando comparado aos grupos portadores de tumor CW, DW e LW (aproximadamente 30%), como pode ser observado na Figura 16 e Tabela 8 (apêndice).



Em condições nutricionais insuficientes, o músculo esquelético apresenta baixa prioridade na hierarquia de reposição nutricional comparado a outros órgãos vitais como cérebro, coração, fígado e baço (SVANBERG *et al.*, 1999). A atrofia, perda de massa tecidual, afeta mais intensamente o músculo esquelético e o tecido adiposo, em relação aos órgãos como fígado, rins, adrenais ou baço. O músculo esquelético, o qual corresponde à maior massa

²² **Legenda:** C-contrôle; CW-contrôle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

protéica do organismo, é afetado severamente na caquexia do câncer (TOMAS *et al.*, 1994) e esta está diretamente relacionada à perda do conteúdo lipídico corporal (ARGILES & LÓPES-SORIANO, 1999) e à perda excessiva do nitrogênio (ARGILES *et al.*, 1999).

Os tumores podem causar aumento transitório do fígado (hiperplasia), correspondendo à fase exponencial de crescimento tumoral, seguido de decréscimo. Já o músculo gastrocnêmio apresenta decréscimo progressivo e esta atrofia é extremamente rápida (TESSITORE *et al.*, 1987). Segundo os autores, a redução de peso do fígado estava associada a mudanças na taxa de degradação protéica e ao lento *turnover* das proteínas, indicando claramente o crescimento tumoral (TESSITORE *et al.*, 1987). Segundo os autores, o músculo gastrocnêmio mostrou progressiva queda do conteúdo protéico e o fígado manifestou, primeiramente, elevação seguida da queda do conteúdo protéico (TESSITORE *et al.*, 1992).

SASAMURA *et al.* (1998) observaram que o peso do fígado mostrou-se reduzido em animais portadores de tumor alimentados com nutrição parenteral rica em D-leucina e D-metionina, comparados ao grupo controle, não verificando diferenças significativas relacionadas ao músculo gastrocnêmio. Esses resultados não conferem com os dados obtidos neste trabalho, onde o grupo LW apresentou aumento do peso do fígado (Figura 15²³) e são coerentes quanto ao peso do músculo, que não diferiu comparado ao seu controle L (Figura 16). Talvez, pode-se explicar a perda de peso muscular nos grupos MW

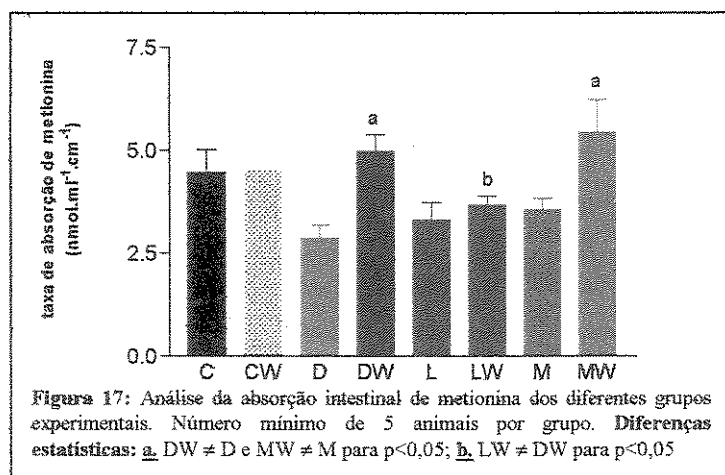
²³ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW-excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

e LMW como decorrente primariamente da deficiência de metionina dos grupos alimentados com dietas deficientes em metionina, pois, segundo alguns trabalhos, a suplementação de aminoácidos de cadeia longa promove a melhora dos processos de síntese (ANTHONY *et al.*, 1999) e a metionina é um aminoácido essencial necessário para o início da síntese protéica (POIRSON-BICHAT *et al.*, 1997 b).

4. Perfusão intestinal

Os resultados, a seguir, correspondem à absorção intestinal de metionina, leucina e glicose de todos os grupos experimentais submetidos aos diferentes esquemas nutricionais, com exceção dos grupos LM e LMW.

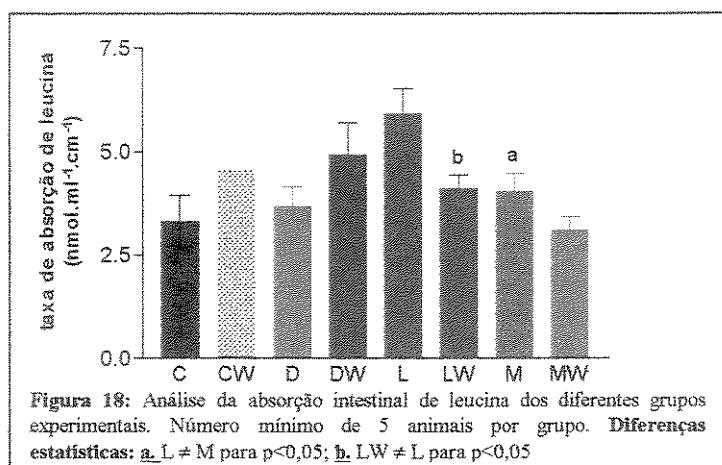
Quando comparamos os grupos portadores do carcinoma de Walker 256 aos respectivos controles, observamos aumento na taxa de absorção intestinal de metionina dos grupos DW e MW em relação aos grupos D (cerca de 27%) e M (cerca de 35%), respectivamente. Observando a taxa de absorção intestinal de metionina dos grupos portadores do carcinoma de Walker 256, verificamos decréscimo do grupo LW em relação ao grupo DW em cerca de 27% (Figura 17²⁴).



Por outro lado, quando analisamos a absorção intestinal de leucina, verificamos que houve redução desta taxa no grupo M em relação ao grupo L

²⁴ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor.

(cerca de 32%), quando comparamos as diferentes dietas. O grupo LW, portador do carcinoma de Walker 256, apresentou decréscimo na taxa de absorção em relação ao seu respectivo controle L em cerca de 31% (Figura 18²⁵).



Coincidentemente aos achados literários que trabalharam apenas com dietas normoprotéicas, em nossos resultados verificamos aumento significativo da absorção de metionina em alguns grupos com tumor (DW e MW) e decréscimo da taxa de absorção de leucina apenas no grupo LW, como pode ser observado nas Figuras 17 e 18.

Os dados da literatura mostram que a absorção intestinal de metionina aumentou significativamente em ratos jovens e adultos portadores de tumor e que a absorção de leucina mostrou elevada apenas nos ratos jovens, como observado por GOMES-MARCONDES *et al.* (1998).

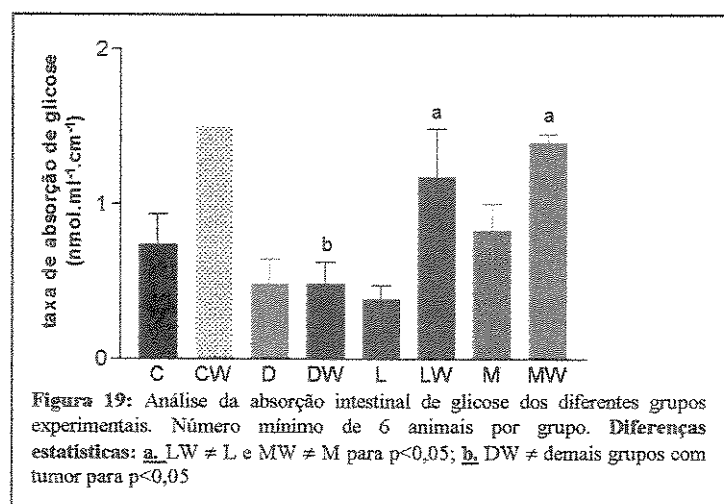
Contudo VENTRUCCI *et al.* (2001) observaram que, em ratas portadoras do carcinoma de Walker 256 alimentadas com dieta rica em leucina,

²⁵ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor.

houve redução da taxa de absorção intestinal de ambos aminoácidos (metionina e leucina), quando comparadas ao controle.

A absorção intestinal de aminoácidos diminui com a idade, devido à diminuição no número de enterócitos e/ou carreadores da borda em escova (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Quando comparamos os grupos portadores do carcinoma de Walker aos seus respectivos grupos controles, observamos aumento na taxa de **absorção intestinal de glicose** nos grupos LW e MW em relação aos grupos L (cerca de 67%) e M (cerca de 41%), respectivamente. O grupo CW apresentou aumento, porém não significativo, da absorção de glicose, o grupo DW apresentou redução na taxa de absorção intestinal de glicose em relação aos grupos CW (68%), LW (59%) e MW (65%) aproximadamente, quando comparamos os diferentes grupos portadores do carcinoma de Walker 256 (Figura 19²⁶).



²⁶ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor.

Alterações, na taxa de ingestão de aminoácidos, sugerem variações seqüenciais em razão dos diferentes tipos de transporte dos aminoácidos. Com raras exceções, estudos utilizando ratos como modelos experimentais mostraram que, após ressecção intestinal, ocorre aumento da taxa de absorção de glicose *in vivo* e *in vitro*. A redução da ingestão alimentar ou jejum pode aumentar a taxa de transporte nas células endoteliais intestinais, assim aumentando o transporte de glicose (FERRARIS & DIAMOND, 1997). Estes dados coincidem com os resultados encontrados em nosso trabalho, justificando, assim, aumento de taxa de absorção nos grupos LW e MW e tendência no grupo CW, como observado na Figura 19²⁷. Porém, GOMES-MARCONDES *et al.* (1998) observaram redução da taxa de absorção intestinal de glicose em ratos portadores de tumor Walker 256 e VENTRUCCI *et al.* (2001) observaram que não houve diferença significativa na taxa de absorção de glicose, comparando ratas com tumor ao grupo controle.

Nos grupos que receberam dietas hipoproteica e com deficiência de metionina, a presença do crescimento tumoral, provavelmente, em função das alterações fisiopatológicas que ocorrem, causou aumento significativo da absorção intestinal de metionina, sugerindo que este aumento pode ser consequência da sua demanda para síntese protéica aumentada devido ao desenvolvimento tumoral somado à baixa oferta de nutrientes oferecidos na dieta (Figura 17).

A redução da absorção intestinal de leucina, no grupo M comparada ao grupo L, pode estar relacionada com o desbalanço de aminoácidos causado

²⁷ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor, D-desnutrido, DW-desnutrido com tumor, L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor, M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor.

pela deficiência metionina. Podemos notar que houve tendência ao aumento da absorção intestinal de leucina nos grupos CW e DW, contudo, no grupo LW, ocorreu redução significativa desta absorção em relação ao seu controle L, provavelmente, devido ao efeito da suplementação do aminoácido leucina na dieta (Figura 18²⁶).

A tendência a elevada da absorção intestinal de glicose no grupo CW e estatisticamente significativo nos grupos LW e MW, em relação aos seus respectivos grupos controle (C, L e M), está relacionada, provavelmente, com o aumento da utilização de glicose causado pela presença do tumor (Figura 19²⁶), paralela à redução no teor de glicose sérica em ratos portadores de tumor (Figura 14).

Deste modo, permanecem, ainda, pontos de estudo que necessitam ser investigados como avaliação mais profunda da bioquímica celular neoplásica frente a diferentes esquemas nutricionais e, também, o mecanismo pelo qual o tumor causa alteração na absorção intestinal e outros pontos para pesquisas futuras.

Cabe ainda salientar que o provável efeito protetor da leucina abre novas perspectivas para adequação da oferta de leucina na dieta e, conseqüentemente, novas alternativas terapêuticas no tratamento do câncer.

²⁶ **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW-excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW-deficiência de metionina com tumor.

CONCLUSÕES

1. A suplementação de leucina (3%) parece melhorar alguns parâmetros corporais dos ratos portadores de tumor (LW) em relação aos grupos controle (CW), como tendência ao aumento de massa corpórea magra, da proteína de carcaça, do peso relativo muscular e do teor de proteína sérica; porém, o crescimento tumoral mostrou-se semelhante ao grupo do CW.

2. A deficiência de metionina interferiu em alguns parâmetros corporais de ratos sem tumor (M), reduzindo o ganho de peso corpóreo por dia, porcentagem de ganho de peso, balanço nitrogenado, porcentagem de gordura e proteína sérica; nos grupos portadores de tumor (MW), a deficiência deste aminoácido parece intensificar os prejuízos causados pela presença do tumor, relacionados ao peso da carcaça, porcentagem de gordura e demonstrando tendência à redução da proteína de carcaça, massa corpórea magra e teor de proteína sérica. Contudo, demonstrou tendência à redução do peso tumoral

3. A associação entre o excesso de leucina e deficiência de metionina causou, nos animais do grupo LM, redução do ganho de peso corpóreo, do peso de carcaça, da massa corpórea magra e da proteína de carcaça; nos ratos com tumor LMW, além dos prejuízos verificados no grupo LM, houve redução significativa do peso relativo do músculo. Por outro lado, em ambos os grupos LM e LMW observou-se aumento do nitrogênio colágeno. O peso tumoral reduziu significativamente neste grupo.

4. Deste modo, verificamos que a deficiência de metionina não se mostrou eficiente na redução efetiva do crescimento tumoral, porém, a somatória destas manipulações não correspondeu às expectativas, sendo eficaz somente na redução do peso tumoral, não oferecendo a esperada proteção à carcaça do hospedeiro. Assim, concluímos que, apenas, a suplementação de leucina apresentou discreta proteção dos efeitos deletérios da neoplasia sobre a carcaça do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANESE AA & ORTO LA: Protein and aminoacids. In: ALBANESE AA ed. **Newer methods of nutritional biochemistry**. N.Y., Academic Press., 1963, v. I. cap. 1, p. 84.
2. ALTHAUSEN S, PASCHEN W: Homocysteine-induced changes in mRNA levels of genes coding for cytoplasmic- and endoplasmic reticulum-resident stress protein in neuronal cell cultures. **Brain. Res. Mol. Brain. Res.**, 84(1-2):32-40, 2000.
3. ANTHONY JC, ANTHONY TG, KIMBAL 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 (6Pt 1): E1077-86, 1999.
4. ARGILES JM, COSTELLI P, CARBO N, PALLARES-TRUJILLO J, LOPEZ-SORIANO FJ: Tumour growth and nitrogen metabolism in the host (Review). **Int. J. Oncol.**, 14(3):479-86, 1999.
5. ARGILES JM & LOPES-SORIANO FJ: The role of cytokines in cancer cachexia. **Med. Res. Review.**, 19 (3): 223-248, 1999.
6. BARACOS VE: Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. **Nutrition.**, 16(10):1015-8, 2000.
7. 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.
8. BECK SA & TISDALE MJ: Nitrogen excretion in cachexia and its modification by a high fat diet in mice. **Cancer Res.**, 49 : 3800-4, 1989.

9. BERTAGNOLLI MM, MCDOUGALL CJ, NEWMARK HL: Colon cancer prevention: intervening in a multistage process. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 216(2):266-74, 1997.
10. BOLUFER J, MURILLO F, DELGADO MJ, MURILLO ML: Amino acid absorption in jejunum of rats in vivo- a kinetic comparison of distal resection effects. **Comp. Biochem. Physiol.**, 84(3): 455-7, 1986.
11. BORGES-OSÓRIO MR & ROBINSON WM. Genética e câncer. In: BORGES-OSÓRIO MR & ROBINSON WM. **Genética Humana.**, 1993, cap.11, p.280-298.
12. BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. **Anal Biochem.**, 72: 248-254, 1976.
13. BUCHALLA AP, POLES C, TEICH DH: O que funciona contra o câncer. **Veja.**, ano 34(4): 90-97, 2001.
14. COHN SH, GARTENHAUS W, SAWITSKY A, RAI K, ZANZI I, VASVANI, *et al*: Comportamental body composition of cancer patientssss by measurement of total body nitrogen, potassium and water. **Metabolism.**, 30:222-9, 1981.
15. COSTELLI P, BACCINO FM: Cancer cachexia: from experimental models to patient management. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 3(3):177-81, 2000.
16. CROCKER KS, GERBER F, SHEARER J: Metabolism of carbohydrate, protein, and fat. **Nurs. Clin. North. Am.**, 18(1):3-28, 1983.

17. DEL MONTE U & ROSSI CB: Glucose supply by the living host and glycolysis of Yoshida ascites hepatoma in vivo. **Cancer Res.**, 23, 363, 1986.
18. EL-BAYOUMY K, CHUNG FL, RICHIE J JR, REDDY BS, COHEN L, WEISBURGER J, WYNDER EL: Dietary control of cancer. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 216(2):211-23, 1997.
19. FERRARIS RP & DIAMOND J: Regulation of intestinal sugar transport. **Physiol. Rev.**, 77(1):257-302, 1997.
20. FIELDS ALA, CHEEMA-DHADLI S, WOLMAN SL, HALPERIN ML: Theoretical aspects of weight in patients with cancer. Possible importance of pyruvate dehydrogenase. **Cancer.**, 50: 2183-8, 1982.
21. FURST P, ALBERS S, STEHLE P: Evidence for metabolism in the cancer patient. **Biochemie.**, 76: 713-717, 1994.
22. GAD S C & WEIL C S . Statistics for toxicologists. In: Wallace H (editor), **Principles and methods of toxicology.**, Raven Press Ltda., New York, 1994, p. 221- 274.
23. GARCIA-MARTINEZ C, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILÉS JM: Acute treatment with tumour necrosis factor- α induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. **Mol. Cel. Biochem.**, 125: 11-18, 1993.
24. GARCIA-MARTINEZ C, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILÉS JM: Amino acid uptake in skeletal muscle of rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. **Mol. Cel. Biochem.**, 148: 17-23, 1995.
25. GARLICK PJ & McnURLAN MA: Protein metabolism in the cancer patient. **Biochimic.**, 76(8): 713-717, 1994.

26. GOLD J: Cancer cachexia and gluconeogenesis. *Ann. Acad. Sci.*, 230: 103, 1974.
27. GOLDBERG AL & CHANG TW: Regulation and significance of aminoacids in skeletal muscle. *Fed. Proc. Am. Sooc. Exp. Biol.*, 37: 2301-5, 1978.
28. GOMES MCC, BEVILACQUA RG, LIMA-GONÇALVES E, REZENDE L: Modelo experimental de avaliação do desenvolvimento do tumor maligno. *Cien. Cult.*, 35(7): 736, 1983.
29. GOMES-MARCONDES MC, HONMA HN, AREAS MA, CURY L: Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31(10):1345-8, 1998.
30. GONÇALVES EL, WAITZBERG DL, BEVILACQUA LR, BURGER VM: Experimental study of nitrogen excretion in different nutritional conditions. *Rev. Brasl Biol.*, 53(3): 425-34, 1993.
31. GOODLAD GAJ & CLARK CM: Leucine metabolism in skeletal muscle of the tumour-bearing rat. *Europ. J. Cancer.*, 16: 1153-1162, 1994.
32. GOODLAD GAJ & CLARK CM: Amino acid metabolism in experimental cancer. In: KLUTHE R & LOHR GW. *Nutrition and Metabolism in Cancer.*, NY, G.T.V. Stuttgart, 1981, p. 69-75.
33. GOODMAN GE: The clinical evaluation of cancer prevention agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 216(2):253-9, 1997.
34. GOODMAN MN, DEL PILAR GOMEZ M: Decreased myofibrillar proteolysis after refeeding requires dietary protein or amino acids. *Am. J. Physiol.*, 253(1 Pt 1):E52-8, 1987.

35. GRIMBLE RF, GRIMBLE GK: Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. **Nutrition.**, 14(7-8):605-10,1998.
36. GUO H, LISHKO VK, HERRERA H, GROCE A, KUBOTA T, HOFFMAN RM: Therapeutic tumor-specific cell cycle block induced by methionine starvation in vivo. **Cancer Res.**, 53 (23): 5676-5679, 1993.
37. GUO HY, HERRERA H, GROCE A, HOFFMAN RM: Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. **Cancer Res.**, 53 (11): 2479-2483, 1993.
38. HECHT SS: Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 216(2):181-91, 1997.
39. HENRY RJ: Determination of serum protein by biuret reaction. In: **Clinical Chemistry Principles and Techniques**. 2ed. Hagerstown, Harper & How, 1978, p.413.
40. JAKEMAN PM: Amino acid metabolism, branched-chain amino acid feeding and brain monoamine function. **Proc. Nutr. Soc.**, 57(1):35-41, 1998.
41. KARL IE, GARBER AJ, KIPNIS DM: Alanine and glutamine release from skeletal muscle III. Dietary and hormonal regulation. **J. Biol. Chem.**, 251: 844, 1976.
42. KREBS HA: The role of chemical equilibrium in organ function. **Advances in Enzyme regulation.**, (edited by G. Weber) vol. 13, 449 Pergamon Press., London, 1975.

43. LAZO AP: Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumor cells. **Eur. J. Biochem.**, 117:19-25, 1981.
44. 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: 501-508, 1950.
45. LIMA-GONÇALVES E, BEVILACQUA RG, WAITZBERG DL, MARGARIDO NF, BEVILACQUA LR: Efeitos do trauma e desenvolvimento tumoral sobre o processo de cicatrização e estado nutricional do hospedeiro. Estudo experimental. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.**, 42(4): 145-154, 1987.
46. LIMA-GONÇALVES E, WAITZBERG DL, BEVILACQUA RG, BEVILACQUA LR: Composição corpórea em diferentes condições nutricionais. Estudo Experimental. **Rev. Paul Méd.**, 108 (3): 125-133, 1990.
47. LLOVERA M, LOPEZ-SORIANO FJ, ARGILES JM: Chronic tumour necrosis factor-alpha treatment modifies protein turnover in rat tissues. **Biochem Mol. Biol. Int.**, 30(1):29-36, 1993.
48. LUNDHOLM K, EDSTRON S, EKMAN L, KALBBERG I, SCHERSTEN T: Glucose turnover, gluconeogenesis from glicerol and estimation of net glucose cycling in cancer patients. **Cancer.**, 50: 1142-50, 1982.
49. LUQUE L, PAREDES S, SEGURA JA, NUNEZ de CASTRO I, MEDINA MA: Mutual effect of glucose and glutamine on their utilization by tumor cells. **Biochem. Inten.**, 21: 9-15, 1990.
50. Mc CARTHY TE & SULIVAN MX: A new and highly specific colorimetric test of methionine. **J. Biol. Chem.**, 141:871-876, 1941.

51. McNULAN MA, HEYS SD, PARK KGM, BROOM J, BROWN DS, EREMIN O, GARLICK PJ: Tumor and host tissue responses to branched-chain amino acid supplementation of patients with cancer. **Clin. Science (London)**., 86(3): 339-345, 1994.
52. MEDINA MA & CASTRO. In: Glutaminolysis and glycolysis interaction in proliferant cells. **Int. J. Biochem.**, 22(7): 681-3, 1990.
53. MILLER SA, DUMZA HA, GOLDBLATH SA: Cholesterolemia and cardiovascular sudanophilia in rat fed sadine mixtures. **J. Nutr.**, 77:397-402, 1962.
54. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Diet, Nutrition, and Cancer. Washington, D.C.: Committee on Diet, Nutrition and Cancer, Comission on life Sciences National Academy of Sciences, 1982.
55. NAVAD F & WINTER CG: Effect of aging on intestinal of aromatic amino acid in vitro in the rat. **Am. J. Physiol.**, 254: G630-G636, 1988.
56. NEWSHOLME EA: Application of metabolic-control logic to the requirements for cell division. **Biochem. Soc. Trans.**, 18: 78-80, 1990.
57. NIXON DW, KUTNER M, HEYMSFIELD S, FOLTZ AT, CARTY C, SEITZ A, CASPER K, EVANS WK, JEEJEEBHOY KN, DALY JM, HEBER D, POPPENDIEK H, HOFFMAN FA: Resting energy expenditure in lung and colon cancer. **Metabolism**., 37: 1059- 64, 1988.
58. OGIER, G.; CHANTEPIE, J.; DESHAVES, B.: Contribution of 4 methylthio-2-oxobutanoate and its transaminase to the growth of methionine-dependent cells in culture. Effect of transaminase inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, 45(8): 1631-1644, 1993.

59. OLIVERIA AS, CHRISTOS PJ, BERWICK M: The role of epidemiology in cancer prevention. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 216(2):142-150, 1997.
60. PARRY-BILLINGS M, LEIGHTON B, DIMITRIADIS GD, CURI R, BOND J, BEVANS S, COLQUHOUN A, NEWSHOLME EA: The effect of tumor bearing on skeletal muscle glutamine metabolism. **Int. J. Biochem.**, 23, 933-937, 1991.
61. PENZES L & BORROSS M: Intestinal absorption of enterocyclic and aromatic amino acid from the aging gut. **Exp. Geront.**, 9: 253-258, 1974.
62. POIRSON-BICHAT F, GONÇALVES G, BRAS GONÇALVES RA, DUTRILLAUX B, POUPON MF: Growth of methionine-dependent human prostate cancer (PC-3) is inhibited by ethionine combined with methionine starvation. **Br. J. Cancer.**, 75(11),1605-1612, 1997 (a).
63. POIRSON-BICHAT F, LOPEZ R, BRAS GONÇALVES RA, MICCOLI L, BOURGEOIS Y, DEMERSEMAN P, POISSON M, DUTRILLAUX B, POUPON MF: Methionine deprivation and methionine analogs inhibit cell proliferation and growth of human xenografted gliomas. **Life Scis.**, 60(12): 919-931, 1997 (b).
64. PUCHALA R, PIERZYNOWSKI T, SAHLU T: Effects of methionine and hormones on amino acid concentration in the skin of Angora goats. **Small. Ruminant. Research.**, 29: 93-102, 1998.
65. 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.
66. RETTORI O, VIEIRA-MATOS AN, TAHIN QS: Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progression in rats. *Tumori.*, 81(5):370-7, 1995.
 67. ROGER QR & HARPER HE: Amino acids diets and maximal growth in the rat. *J Nutr.*, 87:267-73, 1965.
 68. ROSE DP: Dietary fatty acids and prevention of hormone-responsive cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 216(2):224-33, 1997.
 69. ROSEN H: A modified ninhydrin colorimetric analysis of amino acids. *Arch Biochem. Biophys.*, 67: 1-15, 1957.
 70. SANTOS IDC: Requerimentos nutricionais básicos e deficiências. Campinas, 1990 [Dissertação de Mestrado em Fisiologia do Aparelho Digestivo e Nutrição. Instituto de Biologia, da Univ. Estadual de Campinas].
 71. SASAMURA T, MATSUDA A, KOKUBA Y: Tumor growth inhibition and nutritional effect of D-amino acid solution in AH109A hepatoma-bearing rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 44(1):79-87, 1998.
 72. SAUER LA & DAUCHER RT: Ketone body, glucose, lactic acid, and amino acid utilization by tumors *in vivo* in fasted rats. *Cancer Res.*, 43: 3497-503, 1983.
 73. SAUER LA & DAUCHY RT: Tumour-host metabolic interrelationships. *Biochem. Soc. Trans.*, 18: 80-2, 1990.

74. SAUER LA, STAYMAN III JW, DAUCHER RT: Amino acid, glucose, and lactic acid utilization *in vivo* by rat tumors. **Cancer Res.**, 42: 4090-7, 1982.
75. SIDDIQUI RA & WILLIAMS JF: The regulation of fatty acid and branched-chain amino acid oxidation in cancer cachectic rats: a proposed role for a cytokine, eicosanoid, and hormone trilogy. **Biochem. Med. Metab. Biol.**, 42: 71-86, 1989.
76. SPENCER HC, MOUGULIS S, WILDER VM: 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.
77. STALION A, FOLEY NT, CHANGE WT, FISCHER JE: Effects of increased beta-2-agonist dose in tumor-bearing animals. **Nutr. Cancer.**, 20(3): 251-60, 1993.
78. STEIN TP: Cachexia, gluconeogenesis and progressive weight loss in cancer patients. **J. Theor. Biol.**, 73: 51-9, 1978.
79. SVANBERG E, OHLSSON C, HYLINDER A, LUNDHOLM KG: The role of diet components, gastrointestinal factors, and muscle innervation on activation of protein synthesis in skeletal muscles following oral refeeding. **Nutrition.**, 15(4):257-66, 1999.
80. TAYKEY JA: Effects of tumor necrosis factor alpha on skeletal muscle amino acid metabolism studied in-vivo. **J. Am. Col. Nutrition.**, 15(2):164-168, 1996.
81. TELANG NT, KATDARE M, BRADLOW HL, OSBORNE MP, FISHMAN J: Inhibition of proliferation and modulation of estradiol metabolism:

- novel mechanisms for breast cancer prevention by the phytochemical indole-3-carbinol. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 216(2):246-52, 1997.
82. TESSITORE L, BONELLI G, BACCINO FM: Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. **Biochem J.**, 241(1):153-9, 1987.
 83. TESSITORE L, COSTELLI P, BACCINO FM: Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. **Br J Cancer.**, 67(1):15-23, 1993.
 84. THOMPSON ABR, CHEESEMAN CI, KEELAN M, FEDORAK R, CLINDININ MT: Crypt cell production rate, enterocyte turnover time and appearance of transport along the jejunal villus of the rat. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1191(1): 197-204, 1994.
 85. TOMAS FM, CHANDLER CS, COYLE P, BOURGEOIS CS, BURGOYNE JL, ROFE AM: Effects of insulin and insulin-like growth factors on protein and energy metabolism in tumour-bearing rats. **Biochem J.**, 301 (Pt 3):769-75, 1994.
 86. TORRES N, TOVAR AR, HARPER AE: Metabolism of valine in rats skeletal muscle mitochondria. **J. Nutr. Biochem.**, 4 (12):681-9, 1993.
 87. TRICHOPOULOS D, LI FP, HUNTER DJ: What causes cancer? **Sci. Am.**, 275 (3):80-7, 1996.
 88. TRINDER P: Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non carcinogenic chromogen. **J. Clin. Path.**, 22:158-61, 1969.
 89. VENTRUCCI G, MELLO MA, GOMES-MARCONDES MC: Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant

- rats bearing Walker 256 tumor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34(3):333-8, 2001.
90. VINARDELL MP: Comparative nutrition papers. Mini Review. Age Influences on amino acid intestinal transport. **Comp. Biochem. Physiol.**, 103(1):169-171, 1992.
 91. WARREN AJ, SHIELDS PG: Molecular epidemiology: carcinogen-DNA adducts and genetic susceptibility. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 216(2):172-80, 1997.
 92. WATTENBERG LW, WIEDMANN TS, ESSTENSEN RD, ZIMMERMAN CL, STEELE VE, KELLOF GJ: Chemoprevention of pulmonary carcinogenesis by aerosolized budesonide in female A/J mice. **Cancer Res.**, 57 (24): 5489-92, 1997.
 93. 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.
 94. WOOLSON RF: Statistical methods for the analysis of biomedical data. Ed. USA. **John Wiley & Sons.**, Iowa City, Iowa., 1987, p . 366-372.
 95. YOSHIDA S, YAMASAKI K, KAIBARA A, TAKAGI K, NOAKE T, ISHIBASHI N, KAKEGAWA T: Effect of methionine-deprived total parenteral nutrition on tumor protein turnover in rats. **Cancer.**, 76(7): 1275-1282, 1995.
 96. YUDKOFF M, DAIKHIN Y, LIN ZP, NNISSIM I, STERN J, PLEASURE D: Interrelationships of leucine and glutamate metabolism in cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, 62(3): 1192-202, 1994.

APÉNDICE

TABELA 2: Evolução do ganho de peso por dia (g/dia) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dia 06	Dia 10	Dia 18	Dia 22
C (n=10)	0,0267±0,0066	0,0412±0,0070	0,0037±0,0206	0,0237±0,0106
CW (n=14)	-0,076±0,023	0,092±0,021	0,030±0,036 (9)	-0,021±0,015 (3)
D (n = 10)	0,022±0,013	0,019±0,014	0,006±0,027	0,030±0,003 (6)
DW (n= 16)	0,008±0,0138	0,059±0,0114	-0,044±0,0115 (15)	
L (n= 11)	-0,058±0,012	0,003±0,023	0,048±0,014	-0,019±0,010
LW (n= 12)	-0,103±0,020	0,071±0,015	0,014±0,012 (8)	-0,015±0,040 (3)
M (n= 11)	-0,085±0,0249	-0,014±0,0051	-0,006±0,0099	-0,031±0,0071
MW (n= 15)	-0,046±0,0438	-0,103±0,0384 (8)	-0,023±0,0175 (12)	0,015±0,0193 (3)
LM (n= 10)	-0,025±0,011 (9)	-0,071±0,034	-0,017±0,009	
LMW (n=12)	-0,027±0,011	-0,001±0,008 (13)	0,014±0,023	

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média. **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM- excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

TABELA 3: Evolução da porcentagem de ganho de peso (g/100g peso) corpóreo dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dia 06	Dia 10	Dia 18	Dia 22
C (n= 10)	104,89±1,44	111,47±0,92	116,12±4,92	118,62±4,64
CW (n= 14)	91,03±2,07	98,23±1,30	100,40±2,48	99,94±2,37 (6)
D (n= 10)	98,20±1,43	98,12±2,23	102,46±3,46	114,40±2,79 (6)
DW (n= 16)	90,04±1,23	94,73±1,63	93,36 ±2,01 (15)	
L (n= 11)	93,54±1,55	95,81±1,32	98,08±2,13	97,63±2,48
LW (n= 12)	87,36±1,18	94,71±1,06	96,28±1,59 (11)	94,25±0,55 (3)
M (n= 11)	90,62±2,07	85,23±1,34	82,45±1,47	80,02±1,96
MW (n= 15)	90,96±3,64	88,10±1,50	87,35±2,64	96,87±1,80 (3)
LM (n= 10)	89,51±0,86	85,78±0,91	82,58±0,91	
LMW (n= 13)	86,31±1,31	84,46±1,00	85,52±1,85 (12)	

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média. **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM- excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

TABELA 4: Evolução da ingestão alimentar (g) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dia 06	Dia 12	Dia 18	Dia 22
C (n= 10)	17,677±1,62	11,142±0,98	25,290±2,41	12,105±3,79
CW (n= 15)	11,037±1,54	14,522±0,82	9,522±1,16	10,907±1,58 (4)
D (n= 10)	20,230±1,27	17,263±1,74	18,437±2,06	21,517±0,66 (6)
DW (n= 15)	14,663±2,05	14,563±1,36	8,367±1,59 (14)	
L (n= 12)	16,036±2,50	17,731±1,40	14,440±2,65	17,760±1,47
LW (n= 12)	16,422±2,22	12,088±0,74	10,808±0,75 (11)	10,347±2,14 (3)
M (n= 11)	8,400±0,66	10,180±1,15	12,224±1,28	13,870±0,63
MW (n= 15)	4,676±0,79	10,150±0,81	4,852±1,60	
LM (n= 10)	9,840±0,69	12,300±0,84	12,920±1,11	
LMW (n= 13)	11,269±2,10	9,754±1,01	9,308±0,81	

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. **Legenda:** C- controle; CW- controle com tumor; D- desnutrido; DW- desnutrido com tumor; L- excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M- deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM- excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

TABELA 5: Evolução da eficiência alimentar (g peso corpóreo/g dieta) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dia 06	Dia 12	Dia 18	Dia 22
C (n= 10)	-0,0002±0,0085	-0,0103±0,0083	0,0346±0,0049	-0,0298±0,0238
CW (n= 15)	0,018±0,024	0,106±0,054	-0,027±0,026 (9)	-0,017±0,036 (4)
D (n= 10)	0,052±0,027	0,011±0,013 (9)	0,034±0,021 (6)	-0,049±0,021
DW (n= 16)	0,051±0,032	-0,029±0,019	-0,071±0,014 (15)	
L (n= 11)		-0,008±0,0299	-0,051±0,0401	-0,013±0,0141
LW (n= 12)	-0,011±0,058	-0,073±0,025	-0,0001±0,023	-0,0646±0,055 (3)
M (n= 11)		0,043±0,018	0,035±0,025 (8)	0,037±0,019
MW (n= 15)	0,131±0,047	-0,006±0,027	-0,040±0,025	
LM (n= 10)	0,029±0,015	0,047±0,015	0,011±0,016	0,005±0,012
LMW (n= 13)	0,047±0,049	0,041±0,015	-0,016±0,017	

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. **Legenda:** C- controle; CW- controle com tumor; D- desnutrido; DW- desnutrido com tumor; L- excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M- deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM- excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

TABELA 6: Evolução do balanço nitrogenado (mgN_2/dia) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Dia 06	Dia 12	Dia 18	Dia 22
C (n= 10)	141,06 $\pm$ 32,1	291,63 $\pm$ 96,1	234,32 $\pm$ 57,3	630,04 $\pm$ 66,1
CW (n= 15)	262,22 $\pm$ 58,9	226,97 $\pm$ 48,8	153,42 $\pm$ 31,9	-126,61 $\pm$ 32,3
D (n= 10)	191,24 $\pm$ 61,8	98,86 $\pm$ 50,1	119,65 $\pm$ 54,3	141,95 $\pm$ 18,1
DW (n= 15)	102,64 $\pm$ 7,7	19,59 $\pm$ 3,4	-89,00 $\pm$ 24,5	
L (n= 10)	117,00 $\pm$ 51,4	279,61 $\pm$ 77,9	495,92 $\pm$ 82,8	123,09 $\pm$ 59,8
LW (n= 11)	222,63 $\pm$ 54,4	495,48 $\pm$ 71,0	-203,36 $\pm$ 67,0	
M (n= 11)	208,18 $\pm$ 73,6	257,81 $\pm$ 35,7	185,87 $\pm$ 30,1	403,10 $\pm$ 83,3
MW (n= 14)	245,50 $\pm$ 38,6	272,47 $\pm$ 28,2	-146,79 $\pm$ 49,2	
LM (n= 10)	431,18 $\pm$ 43,1	283,57 $\pm$ 66,2	618,76 $\pm$ 54,2	
LMW (n= 13)	492,88 $\pm$ 67,7	287,44 $\pm$ 62,7	-130,36 $\pm$ 45,3	

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. **Legenda:** C- controle; CW- controle com tumor; D- desnutrido; DW- desnutrido com tumor; L- excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M- deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM- excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor.

TABELA 7: Análise da composição corpórea química dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	PC = Peso carcaça (g)	Porcentagem de água (%água/100PC)	Porcentagem de gordura (%gord./100PC)	Massa corpórea magra (g)	Nitrogênio colágeno ($\text{mgN}_2/100\text{g}$)
C	284,8 $\pm$ 10,8	65,64 $\pm$ 0,858	11,43 $\pm$ 1,07	72,8 $\pm$ 2,54	1,968 $\pm$ 0,1415
CW	253,2 $\pm$ 6,2 b	66,93 $\pm$ 2,26	5,308 $\pm$ 0,832 b	64,62 $\pm$ 4,68	1,869 $\pm$ 0,1218
D	269,2 $\pm$ 10,6	65 $\pm$ 0,580	9,291 $\pm$ 0,856	67,65 $\pm$ 2,14	2,489 $\pm$ 0,2774
DW	255 $\pm$ 9,3	67,61 $\pm$ 1,35	3,824 $\pm$ 0,628 b	69,57 $\pm$ 2,52	1,587 $\pm$ 0,1442 b
L	281,3 $\pm$ 6,3	65,01 $\pm$ 0,668	10,45 $\pm$ 1,05	66,59 $\pm$ 1,96	2,051 $\pm$ 0,1813
LW	261 $\pm$ 6,1	67,91 $\pm$ 1,06 b	5,292 $\pm$ 0,861 b	68,89 $\pm$ 3,14	1,749 $\pm$ 0,0861
M	263,5 $\pm$ 5,9	66,78 $\pm$ 2,63	6,824 $\pm$ 1,84 a	71,67 $\pm$ 2,76	1,962 $\pm$ 0,1024
MW	228,7 $\pm$ 8,7 b,c	70,23 $\pm$ 2,19	3,026 $\pm$ 0,447 b,c	56,11 $\pm$ 2,8 b	1,799 $\pm$ 0,1869
LM	184,5 $\pm$ 5,6 a	68,49 $\pm$ 0,404	7,343 $\pm$ 1,74	43,95 $\pm$ 3,42 a	2,582 $\pm$ 0,1996 a
LMW	198,3 $\pm$ 7,3 c	74,46 $\pm$ 0,494 b,c	4,166 $\pm$ 1,09	42,82 $\pm$ 3,07 c	2,447 $\pm$ 0,1409 c

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. **Legenda:** C- controle; CW- controle com tumor; D- desnutrido; DW- desnutrido com tumor; L- excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M- deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM- excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor. **Diferenças estatísticas:** a. comparação dos diferentes esquemas nutricionais com o grupo controle, $p < 0.05$; b. comparação dos grupos portadores de tumor com os respectivos grupos sem tumor, $p < 0.05$; c. comparação entre os diferentes grupos portadores de tumor, $p < 0.05$

TABELA 8: Peso de órgãos (g) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Peso relativo do fígado	Peso relativo do músculo	Peso relativo do tumor	Peso absoluto do tumor
C	4,63±0,153	0,5541±0,024		
CW	3,794±0,143 b	0,4722±0,028	9,02±0,64	22,73±1,55
D	3,453±0,349 a	0,5503±0,036		
DW	3,494±0,092	0,5234±0,018	6,36±0,81 c	15,53±1,77 c
L	2,851±0,224 a	0,5542±0,031		
LW	4,302±0,181 b,c	0,5681±0,032	9,62±1,13	24,65±2,7
M	2,36±0,165 a	0,5792±0,041		
MW	3,426±0,198 b	0,4397±0,038 b	7,76±0,76	17,57±1,9
LM	3,984±0,193 a	0,6090±0,027		
LMW	3,731±0,271	0,3701±0,031 b,c	6,9±0,61 c	13,26±1,06 c

Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais por grupo. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. **Legenda:** C-controle; CW-controle com tumor; D-desnutrido; DW-desnutrido com tumor; L-excesso de leucina; LW- excesso de leucina com tumor; M-deficiência de metionina; MW- deficiência de metionina com tumor; LM-excesso de leucina e deficiência de metionina; LMW- excesso de leucina e deficiência de metionina com tumor. **Diferenças estatísticas:** a. comparação dos diferentes esquemas nutricionais com o grupo controle, $p<0.05$; b. comparação dos grupos portadores de tumor com os respectivos grupos sem tumor, $p<0.05$; c. comparação entre os diferentes grupos portadores de tumor, $p<0.05$