



A suplementação nutricional com leucina auxiliou na melhora de função muscular, afetada pela caquexia em camundongos portadores do carcinoma pulmonar de Lewis.

Palavras-Chave: câncer, função muscular, leucina, nutrição, suplementação nutricional.

Autores:

Laura Rodrigues Ferreira

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Co-Orientação: Dr^ª Natália Miyaguti Angelo da Silva

**Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas**

1. INTRODUÇÃO:

A caquexia associada ao câncer é uma síndrome responsável pela morte de até 22% dos pacientes oncológicos¹, sendo caracterizada pela perda involuntária de peso, causada principalmente pela perda de tecido muscular esquelético. Esta perda é reflexo do desequilíbrio entre a taxa de degradação e síntese proteica, resultando em fadiga e diminuição da força muscular^{1,2}. Assim, a caquexia afeta o estado funcional do paciente, levando à qualidade de vida diminuída, prejudicando as respostas do paciente aos tratamentos, e aumentando sua mortalidade^{3,4}.

O uso de intervenções nutricionais para minimizar os efeitos colaterais da caquexia tem sido uma abordagem promissora⁵. Assim, o aminoácido de cadeia ramificada – leucina – pode ser uma boa estratégia, pois atua como sinalizador celular, promovendo o aumento de síntese proteica e também diminuindo as vias de degradação proteica. Os efeitos terapêuticos da administração da suplementação nutricional com leucina na atenuação da caquexia em modelo com tumor de Walker-256 já foi demonstrada em diversos estudos prévios do nosso laboratório⁶⁻⁹, porém ainda não foi avaliado a função e força muscular nos animais suplementados com essa dieta. Sendo a caquexia uma síndrome multifatorial e que pode ter variações nas respostas metabólicas dependendo do tipo tumoral, existe a necessidade da validação desses dados pré-clínicos em outros modelos tumorais, a fim de uma maior validação dos dados obtidos até o momento, aumentando seu potencial translacional¹⁰.

O carcinoma pulmonar de Lewis é um modelo experimental amplamente utilizado nesta área de estudo pela sua capacidade de induzir caquexia muito semelhante à clínica^{10,11}. Porém, ainda são escassos os dados em relação às respostas desse modelo frente a suplementação com leucina. Assim, o objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com o aminoácido leucina sobre a função muscular de camundongos portadores do carcinoma pulmonar de Lewis.

No presente trabalho são apresentados os resultados da avaliação de parâmetros como variação de peso, ingestão alimentar e peso de órgãos para comprovação da instalação da caquexia neste modelo tumoral e estudo do potencial da leucina em modificar esses parâmetros, além de resultado quanto à avaliação da função muscular nos animais portadores de tumor.

2. METODOLOGIA:

2.1. GRUPOS E SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL

A Figura 1 resume os animais, dietas e grupos experimentais utilizados no estudo. As dietas seguiram o padrão do *American Institute of Nutrition* (AIN-93; dieta Controle)¹², sendo que a dieta rica em leucina continha 3% adicionais deste aminoácido em relação à dieta padrão.

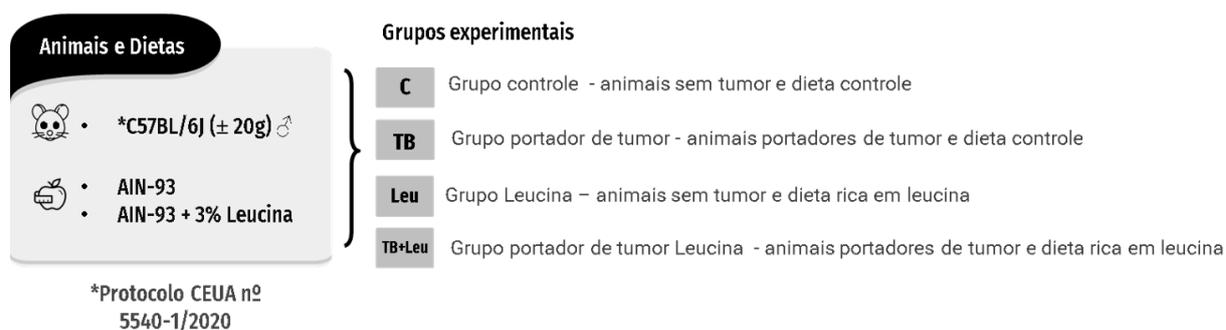


Figura 1. Protocolo experimental de acordo com o implante e suplementação nutricional. Legenda: C (grupo Controle (n=7)); TB (grupo portador de tumor (n=9)); Leu (grupo Leucina (n=7)); TB+Leu (grupo portador de tumor e Leucina (n=9)).

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

O resumo do procedimento experimental está apresentado na Figura 2, mostrando a avaliação de função muscular realizada antes da inoculação do tumor e após 28 dias de crescimento tumoral. Os animais portadores de tumor receberam implante de 1×10^6 células/inóculo do carcinoma pulmonar de Lewis no subcutâneo do flanco dos animais. Foram realizadas medidas de peso e ingestão, duas vezes por semana durante o procedimento experimental. Após a eutanásia, foi realizada a coleta e pesagem dos órgãos: músculos (gastrocnêmio e tibial), tumor, baço e gordura perigonadal.

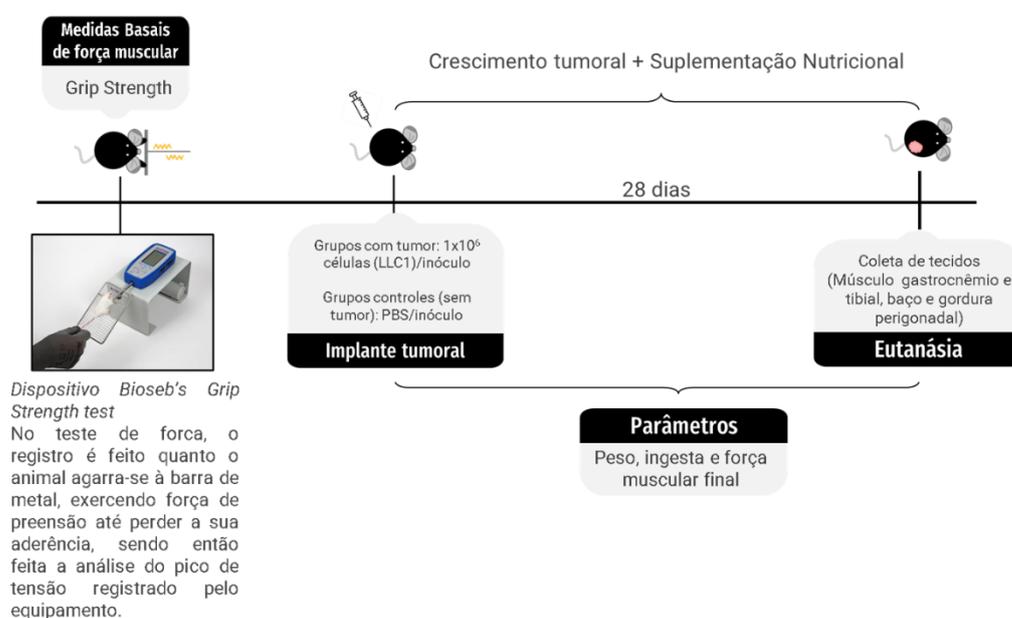


Figura 2: Esquema resumido do procedimento experimental -para os grupos C, TB, Leu e TB+Leu (vide legenda Figura 1).

2.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS

- Os dados foram normalizados pela medida do comprimento do osso tibial;
- Foi utilizado o teste *two-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni;
- Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$;
- Os valores estão expressos como média e desvio padrão da média (SD).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1.O DESENVOLVIMENTO TUMORAL INDUZIU CAQUEXIA NOS ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR, SEM MODULAÇÕES INDUZIDAS PELA DIETA RICA EM LEUCINA.

Não houve diferenças de peso entre os grupos no início do experimento (Figura 3a). Após 28 dias de crescimento tumoral foi registrada variação negativa de peso nos grupos TB e TB+Leu (Figura 3b), acompanhado pela diminuição do peso de carcaça, quando comparados aos respectivos controles (Figura 3c). Tais dados indicam espoliação da carcaça induzida pela instalação da caquexia nos animais portadores de tumor. Não houve diferença entre a ingestão alimentar cumulativa entre os grupos (Figura 3d), assim, os animais não apresentaram anorexia. Também não foi encontrada diferença significativa entre o peso tumoral dos grupos TB e TB+Leu (Figura 3e), mostrando que a leucina não influenciou este parâmetro.

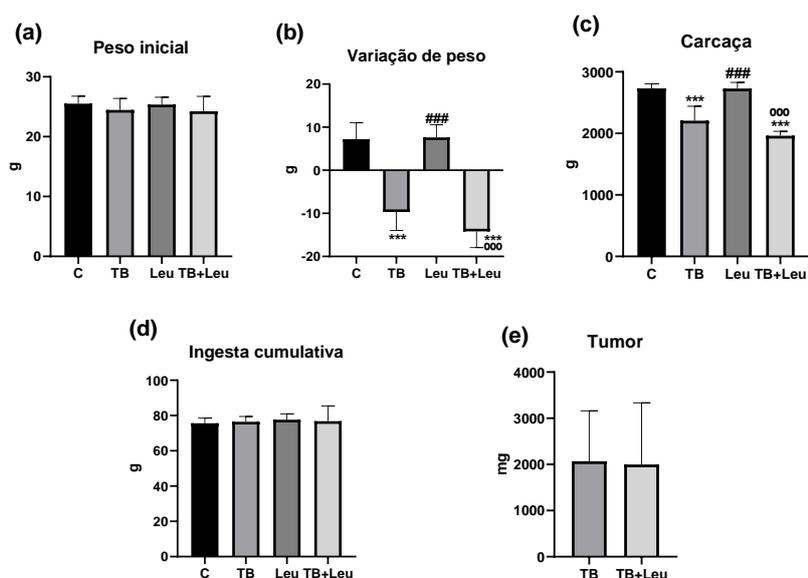


Figura 3. Dados morfométricos: (a) peso inicial dos animais por grupo antes da inoculação tumoral; (b) variação de peso entre os grupos após 28 dias de crescimento tumoral; (c) peso da carcaça (peso final menos peso tumoral); (d) ingestão da dieta cumulativa registrada por grupo após 28 dias de evolução tumoral; (e) peso tumoral. Legenda: para siglas e descrição de grupos veja seção de material e métodos e legenda da Figura 1. Os valores são expressos como média \pm SD. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs C; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs TB; ° $P < 0,05$, °° $P < 0,01$, °°° $P < 0,001$ vs Leu).

3.2.O DESENVOLVIMENTO TUMORAL INDUZIU ESPOLIAÇÃO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO, DA GORDURA PERIGONADAL E ESPLENOMEGALIA NOS ANIMAIS PORTADORES DE TUMOR, INDEPENDENTE DA DIETA RICA EM LEUCINA.

Em relação ao músculo gastrocnêmio, conforme esperado, houve espoliação deste músculo e instalação da caquexia¹³, mostrando que os grupos TB e TB+Leu tiveram redução do peso relativo deste músculo (Figura 4a). Tal redução não foi observada para o músculo tibial do grupo TB, apenas para o grupo

TB+Leu (Figura 4b). Foi registrado que os camundongos portadores de tumor apresentaram esplenomegalia (Figura 4c), provavelmente em função das citocinas pró- inflamatórias circulantes, podendo ser indício da presença de inflamação sistêmica típica da caquexia ². A caquexia associada ao câncer pode ocorrer com ou sem perda de gordura corpórea ¹⁴ e durante o experimento foi observado que os dois grupos com tumor sofreram espoliação da gordura perigonadal (Figura 4d).

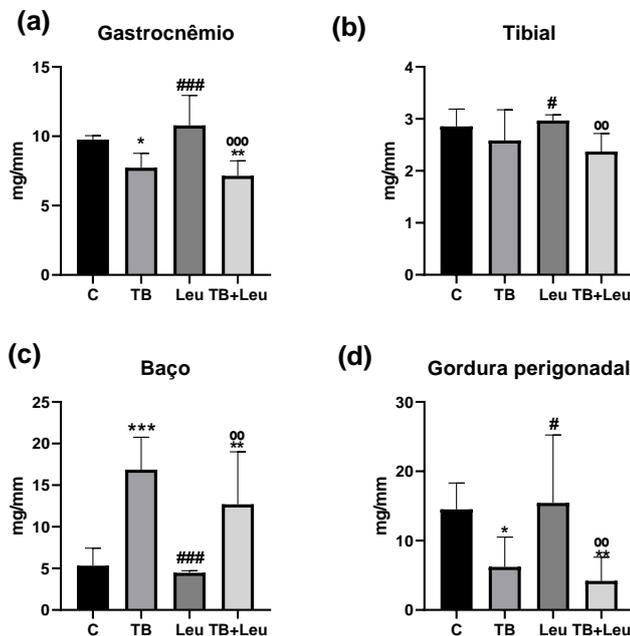


Fig. 4. Parâmetros morfométricos dos tecidos e órgão: (a) peso do músculo gastrocnêmio; (b) peso do músculo tibial; (c) peso do baço; e (d) peso da gordura perigonadal. Legenda: para siglas e descrição de grupos veja seção de material e métodos e Figura 1. Os valores são expressos como média \pm SD. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs C; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs TB; ° $P < 0,05$, °° $P < 0,01$, °°° $P < 0,001$ vs Leu).

3.3. O AMINOÁCIDO LEUCINA PREVENIU A PERDA DE FORÇA MUSCULAR INDUZIDA PELA CAQUEXIA

Não houve diferença entre os grupos para a medida inicial de força muscular (dado não mostrado). Após o desenvolvimento tumoral, houve diminuição de força muscular no grupo TB, induzida pela caquexia. Porém, para o grupo TB+Leu essa perda foi prevenida (Figura 5a).

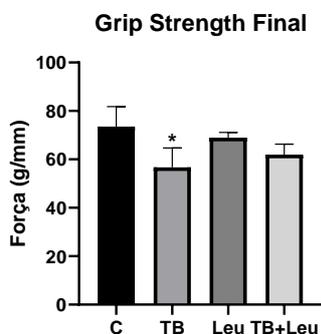


Figura 5. Força muscular registrada pelo teste de preensão – *grip strength*: após o desenvolvimento tumoral. Legenda: para siglas e descrição de grupos veja seção de material e métodos e Figura 1. Os valores estão expressos como média \pm SD. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs C; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs TB; ° $P < 0,05$, °° $P < 0,01$, °°° $P < 0,001$ vs Leu).

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos corroboram com a instalação da caquexia nos animais portadores de tumor, sendo que a leucina não alterou os parâmetros morfométricos avaliados, incluindo o peso relativo tumoral. Apesar da caquexia, a suplementação nutricional com leucina foi capaz de prevenir a perda de força muscular, sendo essa uma ação protetora contra um dos efeitos deletérios induzidos por essa síndrome. Análises futuras estão sendo realizadas para entender melhor os mecanismos relacionados com a melhora da função muscular encontrada nesta etapa do experimento.

BIBLIOGRAFIA

1. Argilés, J. M., Stemmler, B., López-Soriano, F. J. & Busquets, S. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 9–20 (2018).
2. Fonseca, G. W. P. da, Farkas, J., Dora, E., von Haehling, S. & Lainscak, M. Cancer Cachexia and Related Metabolic Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2321 (2020).
3. Peixoto da Silva, S., Santos, J. M. O., Costa e Silva, M. P., Gil da Costa, R. M. & Medeiros, R. Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* (2020) doi:10.1002/jcsm.12528.
4. Biswas, A. K. & Acharyya, S. Understanding cachexia in the context of metastatic progression. *Nat. Rev. Cancer* 1–11 (2020) doi:10.1038/s41568-020-0251-4.
5. Drahansky, M. *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . *Intech i*, 13 (2016).
6. Cruz, B. L. G. *et al.* Dietary leucine supplementation minimises tumour-induced damage in placental tissues of pregnant, tumour-bearing rats. *BMC Cancer* **16**, 58 (2016).
7. Gonçalves, E. M., Salomão, E. M. & Gomes-Marcondes, M. C. C. Leucine modulates the effect of Walker factor, a proteolysis-inducing factor-like protein from Walker tumours, on gene expression and cellular activity in C2C12 myotubes. *Cytokine* **64**, 343–350 (2013).
8. Viana, L. R. *et al.* Leucine-rich diet induces a shift in tumour metabolism from glycolytic towards oxidative phosphorylation, reducing glucose consumption and metastasis in Walker-256 tumour-bearing rats. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
9. Cruz, B. *et al.* Leucine-rich diet modulates the metabolomic and proteomic profile of skeletal muscle during cancer cachexia. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–25 (2020).
10. Suzuki, T., Von Haehling, S. & Springer, J. Promising models for cancer-induced cachexia drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **15**, 627–637 (2020).
11. Ballaro, R., Costelli, P. & Penna, F. Animal models for cancer cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* 281–287 (2016) doi:10.1097/SPC.0000000000000233.
12. Reeves, P. G. Committee Report 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-76A Rodent Diet. 1939–1951 (1993).
13. Sørensen, J. Lung Cancer Cachexia: Can Molecular Understanding Guide Clinical Management? *Integr. Cancer Ther.* **17**, 1000–1008 (2018).
14. Fearon, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. *Lancet Oncol.* **12**, 489–495 (2011).