

ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DA ATIVIDADE MOTORA SOB OS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA

Palavras-Chave: CAQUEXIA, LEUCINA, ETHOVISION

Autores/as:

ANA LIVIA DE PINHO BARRETO [bolsista SAE -UNICAMP – IB]

Dr. GUILHERME AUGUSTO DA SILVA NOGUEIRA [co-orientador UNICAMP – IB]

Dr.^a NATALIA ANGELO DA SILVA MIYAGUTI [UNICAMP – IB]

ROGERIO WILLIANS DOS SANTOS [UNICAMP – IB]

Prof. Dr. ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA [UNICAMP – IB]

Prof.^a Dr.^a MARIA CRISTINA CINTRA GOMES-MARCONDES (orientadora) [UNICAMP – IB]

INTRODUÇÃO:

A caquexia é uma síndrome metabólica multifatorial e complexa, caracterizada pela perda de peso corporal involuntária, principalmente devido a perda de massa muscular e tecido adiposo, redução da ingestão alimentar, elevado gasto energético, catabolismo e inflamação (FEARON *et al.*, 2011; JOHNS *et al.*, 2013; BARACOS *et al.*, 2018). Essa condição é consequência de várias doenças crônicas, e, no caso da caquexia proveniente do câncer, a atrofia do músculo esquelético é um dos principais problemas, visto que a massa muscular esquelética representa até 50% da proteína corporal total em indivíduos saudáveis (MULLER *et al.*, 2014).

O músculo estriado esquelético é um tecido extremamente adaptável que pode alterar suas propriedades estruturais e funcionais dependendo da estimulação. A regulação da massa muscular é controlada pela síntese proteica e taxas de degradação que devem ser equilibradas para manter a massa muscular (ANTHONY, 2016). Qualquer desequilíbrio no processo de síntese de proteínas levará a alterações na massa muscular como por exemplo atrofia muscular. Assim, considerando que a massa muscular esquelética é o tecido mais representativo do nosso corpo, e a atrofia muscular é um grave problema clínico relacionado ao pior prognóstico e maior mortalidade, principalmente para os pacientes com câncer. Nesse sentido, uma das estratégias em estudo é a suplementação nutricional, na qual a leucina tem lugar de destaque (VIANA *et al.*, 2021).

A leucina é um aminoácido essencial de cadeia ramificada que exerce papel essencial em muitas vias metabólicas no músculo esquelético, atuando como fonte de energia, agentes anti-inflamatórios e estimuladores para a síntese de proteínas (DE CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2014; VIANA *et al.*, 2021). Assim, a leucina também pode atenuar a proteólise, bem como aumentar a síntese de proteínas no

músculo esquelético, sobretudo através da ativação da via mTOR (COLUMBUS *et al.*, 2015a, b; DE CAMPOS-FERRAZ *et al.*, 2014).

Estudos pré-clínicos com modelos de estudos de caquexia do câncer trouxeram um progresso significativo no conhecimento de como a leucina protege o tecido muscular esquelético sob a caquexia do câncer. A suplementação de leucina em modelo de camundongo caquético portador de tumor de adenocarcinoma de cólon murino foi capaz trazer muitos benefícios, tais como (i) a atenuação da perda de massa muscular devido à alta degradação de proteínas do músculo esquelético (PETERS *et al.*, 2011); (ii) o aumento da síntese proteica no músculo gastrocnêmio (SALOMÃO *et al.*, 2010); (iii) proteção ao tecido muscular fetal em ratos portadores de tumor Walker 256 (CRUZ e GOMES-MARCONDES, 2014); (iv) modulação de danos cardíacos, proteólise de cardiomiócitos e apoptose induzida por caquexia (TONETO *et al.*, 2016); e (v) diminuição da degradação da proteína muscular em ratos adultos portadores de tumor Walker 256 (CRUZ *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2021).

O presente estudo teve como objetivo investigar os potenciais benefícios da suplementação de leucina através da avaliação funcional do músculo por meio da análise comportamental dos animais feita por um software de rastreamento de vídeo (VIANA *et al.*, 2021). O programa utilizado foi o EthoVision, que através do rastreamento de sinal de vídeo analógico, a partir de imagens capturadas no período diurno e noturno dos animais experimentais, faz a digitalização dos quadros e analisa os pixels resultantes para determinar a localização dos animais em um determinado espaço/tempo. Dessa forma, mediante cálculos, são realizados uma série de quadros para derivar um conjunto de descritores quantitativos do movimento animal, permitindo que o comportamento seja estudado de maneira confiável e consistente (SPINK *et al.*, 2000).

METODOLOGIA:

Este trabalho utilizou 28 camundongos machos da linhagem C57BL/6J (19 - 28 meses de idade) em estado senil, obtidos no CEMIB/UNICAMP (CEUA nº 5806-1/2021), alojados em gaiolas individuais num ambiente de condições controladas (ciclo de claro e escuro 12/12h; temperatura 22 ± 2 °C; e umidade entre 50 e 60%). Água e ração padrão foram oferecidos *ad libitum* até o implante do tumor. Todos os ensaios foram realizados conforme as diretrizes gerais do *United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research* em relação ao bem-estar animal (VALE *et al.*, 2005).

A dieta controle e a suplementada com 3% de leucina utilizadas no experimento foram confeccionadas conforme as composições descritas previamente (VIANA *et al.*, 2021), contendo 20% de proteína, 64% de carboidratos e 7% de lipídeos, acrescidos de vitaminas e sais minerais. Para a dieta rica em leucina, a esses mesmos componentes foram acrescidos 3% de L-leucina.

Os animais foram randomicamente distribuídos em 4 grupos: controle (C) e portadores de tumor (TB) Lewis Lung Carcinoma (LLC) alimentados com dieta suplementada com leucina (CLEU e TBLEU) ou controle (C e TB). Teste de força foi realizado antes e após o implante do tumor, conforme previamente descrito (VIANA *et al.*, 2021), e os dados em gramas foram normalizados pela média das medidas do osso tibial da pata posterior direita em milímetros (mm).

O comportamento no período noturno (12hs) dos animais foi registrado por meio de câmeras de visão noturna posicionadas frontalmente às gaiolas. Os arquivos de vídeo foram analisados pelo software de rastreamento de vídeo EthoVisionXT e os parâmetros avaliativos utilizados foram a distância total percorrida (cm), a velocidade média (cm/s) e o tempo total em movimento (s), conforme previamente descrito (VIANA *et al.*, 2021).

Todos os dados de força e comportamento dos grupos foram comparados com o comportamento no momento basal (inoculação pré-tumor), no momento intermediário – entre 11 e 15 dias após a inoculação do tumor – e no momento final (20 dias após a inoculação do tumor) e expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de variância ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Correlações foram testadas pelo coeficiente de Pearson e análise de regressão linear simples foi utilizada para avaliar associações entre variáveis independentes. Para todas as análises estatísticas foi considerado significativo $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Observou-se redução de tempo de movimento dos animais dos grupos com tumor - TB e TBLEU – e também do controle leucina – CLEU – em relação ao grupo controle no dia 11 após implante do tumor. Essa diferença persistiu entre os animais dos grupos portadores de tumor no momento final do experimento. Porém não foram estatisticamente diferentes os grupos TBLEU vs CLEU. Em relação ao teste de força, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum momento avaliado (Figura 1). Também não foram observadas correlações entre os valores do teste de força e os dados comportamentais (Figura 2).

Nossos achados corroboram a literatura. Viana e colaboradores (2021) observaram que, após a implantação de tumor de Walker 256 em ratos, houve redução dos parâmetros comportamentais analisados em relação aos valores observados prévios da inoculação. Ainda, a redução da atividade física é uma das características presentes na caquexia (BLUM *et al.*, 2010).

Entretanto, para este trabalho com senis, não foram observadas diferenças dos parâmetros comportamentais e força quando os animais receberam dieta suplementada com leucina, como já descrito previamente (VIANA *et al.*, 2021). De acordo com GEPPERT *et al.* (2021), os efeitos da caquexia podem ser agravados pelo envelhecimento em camundongos portadores de tumor. Isto posto, acreditamos que a diferença de idade entre nossos animais (senis) e os animais usados pela maioria dos estudos (jovens e adultos) influenciou parcialmente para esse resultado, uma vez que a dose de leucina utilizada em nosso trabalho já demonstrou ser eficaz para a melhora do quadro de caquexia. Dessa forma, estudos complementares com diferentes concentrações de leucina serão necessários para complementar nossos achados.

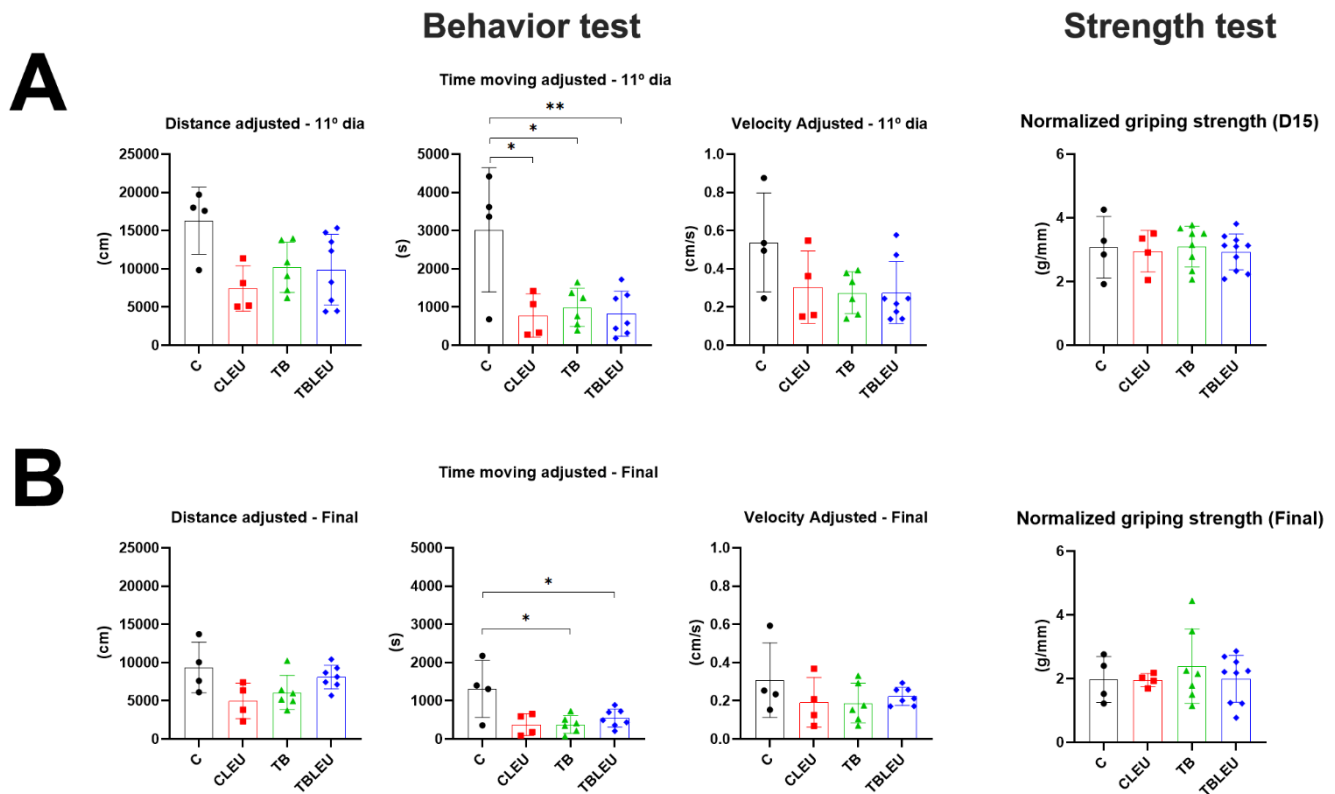


Figura 1: Evolução do comportamento e força muscular de camundongos C57BL/6J senis dos grupos controle e portadores de tumor LLC, alimentados com dieta suplementada com 3% de leucina ou controle. Parâmetros de comportamento da medidos durante a noite. Distância percorrida, tempo em movimento, velocidade (ajustados pelos dados basais) e força (normalizado pela média do osso tibial medido em milímetros) medidos no momento intermediário **(A)** final **(B)**. (C) Grupo controle, (CLEU) Grupo controle com dieta suplementada com 3% de leucina, (TB) Grupo com implante tumoral LLC, (TBLEU) Grupo com implante tumoral LLC com dieta suplementada com 3% de leucina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

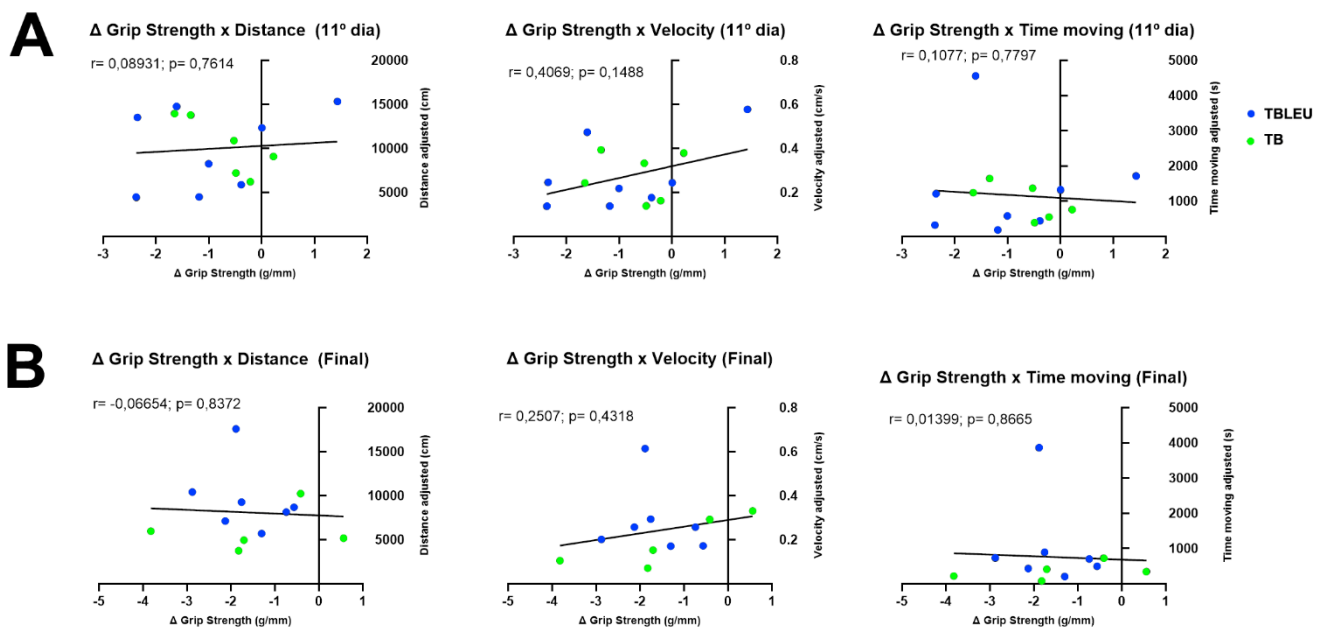


Figura 2: Correlação dos parâmetros de comportamento em relação a força. Gráficos de dispersão com linhas de regressão linear ajustadas de distância percorrida, velocidade, tempo em movimento e força no momento intermediário **(A)** e final **(B)** em relação ao momento basal do experimento de camundongos C57BL/6J senis dos portadores de tumor LLC, alimentados com dieta suplementada com 3% de leucina ou controle.

CONCLUSÃO:

O software de rastreamento de vídeo EthoVisionXT é uma importante ferramenta, capaz de avaliar parâmetros comportamentais dos animais analisados. Apesar da suplementação com 3% leucina não ter sido suficiente para melhorar os parâmetros comportamentais analisados entre os dois grupos de camundongos C57BL/6J senis portadores de tumor, verificamos que também não houve diferença entre TBLEU e o seu respectivo controle CLEU. Portanto, dietas com concentrações maiores de leucina deverão ser testadas para avaliação de seus efeitos em animais senis.

BIBLIOGRAFIA

- BARACOS, V.E.; MARTIN, L.; KORC, M.; GUTTRIDGE, D.C.; FEARON, K.C.H. Cancer-associated cachexia. *Nat. Publ. Gr.*, 2018; 4: 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.105>.
- BLUM, D.; STENE, G. B.; SOLHEIM, T. S.; FAYERS, P.; HJERMSTAD, M. J.; BARACOS, V. E.; FEARON, K.; STRASSER, F.; KAASA, S. Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model—a study based on data from an international multicenter project (EPCRC-CSA). *Annals of Oncology* 25: 1635–1642, 2014
- COLUMBUS, D.A., STEINHOFF-WAGNER, J., SURYAWAN, A.; NGUYEN, H.V.; ADRIANA HERNANDEZ-GARCIA, A.; FIOROTTO, M.L.; DAVIS T.A. Impact of prolonged leucine supplementation on protein synthesis and lean growth in neonatal pigs. *Am. J. Physiol. – Endocrinol. Metab.*, 2015b; 309: E601–E610. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00089.2015a>.
- COLUMBUS, D.A.; FIOROTTO, M.L.; DAVIS, T.A. Leucine is a major regulator of muscle protein synthesis in neonates. *Amino Acids*, 2015b; 47: 259–270.
- CRUZ, B.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2014; 12: 2. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-2>.
- CRUZ, B.; OLIVEIRA, A.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. L-leucine dietary supplementation modulates muscle protein degradation and increases pro-inflammatory cytokines in tumour-bearing rats. *Cytokine*, 2017; 96: 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2017.04.019>.
- DE CAMPOS-FERRAZ, P.L.; ANDRADE, I.; DAS NEVES, W.; HANGAI, I.; ALVES, C.R.; LANCHÁ, A.H.JR. An overview of amines as nutritional supplements to counteract cancer cachexia. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, 2014; 5: 105–110.
- FEARON, K.; STRASSER, F.; ANKER, S.D.; BOSAEUS, I.; BRUERA, E.; FAINSINGER, R.L.; JATOI, A.; LOPRINZI, C.; MACDONALD, N.; MANTOVANI, G.; DAVIS, M.; MUSCARITOLI, M.; OTTERY, F.; RADBRUCH, L.; RAVASCO, P.; WALSH, D.; WILCOCK, A.; KAASA, S.; BARACOS, V.E. Definition and classification of cancer cachexia: na international consensus. *Lancet Oncol.*, 2011; 12: 489–495.
- GEPPERT, J.; WALTH, A.A.; TERRÓN EXPÓSITO, R.; KALTENECKER, D.; MORIGNY, P.; MACHADO, J.; BECKER, M.; SIMOES, E.; LIMA, J.D.C.C.; DANIEL, C.; BERRIEL DIAZ, M.; HERZIG, S.; SEELAENDER, M.; ROHM, M. Aging Aggravates Cachexia in Tumor-Bearing Mice. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 24;14(1):90.
- GOMES-MARCONDES, M.C.C., VENTRUCCI, G., TOLEDO, M.T.; L. CURY, J.C.; COOPER, A. leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2003; 36: 1589–1594. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003001100017>.
- MULLER, M.J.; GEISLER, C.; POURHASSAN, M.; GLUER, C.C.; BOSY-WESTPHAL, A. Assessment and definition of lean body mass deficiency in the elderly. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014;68:1220–1227. doi: 10.1038/ejcn.2014.169.
- NICASTRO, H.; ARTIOLI, G.G.; COSTA ADOS, S.; SOLIS, M.Y.; DA LUZ, C.R.; BLACHIER, F.; LANCHÁ, A.H. JR. An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. *Amino Acids*, 2011; 40: 287–300.
- PETERS, S.J.; VAN HELVOORT, A.; KEGLER, D.; ARGILÈS, J.M.; LUIKING, Y.C.; LAVIANO, A.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J.; DEUTZ, N.E.; HAAGSMAN, H.P.; GORSELINK, M.; VAN NORREN, K. Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice. *Oncol. Rep.*, 2011; 26: 247–254. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1269>
- SALOMÃO, E.M.; TONETO, A.T.; SILVA, G.O.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. Physical exercise and a leucine-rich diet modulate the muscle protein metabolism in Walker tumor-bearing rats. *Nutr.*, 2010; *Cancer* 62: 1095–1104.
- SHIMOMURA, Y.; YAMAMOTO, Y.; BAJOTTO, G.; SATO, J.; MURAKAMI, T.; SHIMOMURA, N.; KOBAYASHI, H.; MAWATARI, K. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J. Nutr.*, 2006; 136: 529S–532S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.2.529s>
- SPINK, A. J., TEGELBOSCH, R. A. J., BUMA, M. O. S., NOLDUS, L. P. J. J. The EthoVision video tracking system – A tool for behavioral phenotyping of transgenic mice. *Wageningen, Physiology & Behavior* 73 (2001) 731– 744, 2000.
- TONETO, A.T.; FERREIRA RAMOS, L.A.; SALOMÃO, E.M.; TOMASIN, R.; AEREAS, M.A.; GOMES-MARCONDES, M.C. Nutritional leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumour-bearing cachectic animals. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, 2016; 7: 577–586. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12100>.
- VALE, C.; STEWART, L.; TIERNEY, J. Trends in UK cancer trials: Results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. *Br. J. Cancer* 2005, 92, 811–814.
- VIANA, L.R.; CHIOCCHETTI, G.M.E.; OROY, L.; VIEIRA, W.F.; BUSANELLO, E.N.B.; MARQUES, A.C.; SALGADO, C.M.; DE OLIVEIRA, A.L.R.; VIEIRA, A.S.; SUAREZ, P.S.; DE SOUSA, L.M.; CASTELUCCI, B.G.; VERCESI, A.E.; CONSONNI, S.R.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. Leucine-Rich Diet Improved Muscle Function in Cachectic Walker 256 Tumour-Bearing Wistar Rats. *Cells*. 2021 Nov 23;10(12):3272.