



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINE TATIANE TONETO INOCÊNCIO

**“ATIVIDADE FÍSICA E SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE
LEUCINA ASSOCIADAS AO CRESCIMENTO TUMORAL:
ESTUDO DO PERFIL HORMONAL DE RATOS IMPLANTADOS
COM CARCINOSSARCOMA DE WALKER 256”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Aline Tatiane Toneto Inocencio
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

In71a Inocência, Aline Tatiane Toneto, 1983-
Atividade física e suplementação nutricional de leucina associadas ao crescimento tumoral: estudo do perfil hormonal de ratos implantados com carcinossarcoma de Walker 256 / Aline Tatiane Toneto Inocência. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Exercícios físicos. 2. Câncer. 3. Leucina. 4. Hormônios. 5. Tumor Walker 256. 6. Caquexia. I. Gomes-Marcondes, Maria Cristina Cintra, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Physical activity and nutritional supplementation with leucine associated with tumor growth: study of hormonal profile in Walker 256

Palavras-chave em Inglês:

Physical exercises

Cancer

Leucine

Hormones

Walker 256 tumor

Cachexia

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes [Orientador]

Patrícia da Silva Melo

Estela Maria Gonçalves

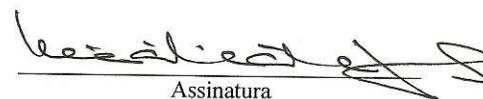
Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas 24 de Fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

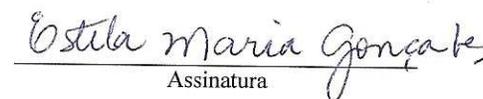
Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes
(Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Patricia da Silva Melo


Assinatura

Profa. Dra. Estela Maria Gonçalves


Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida por guiarem meus passos e por me proporcionarem esta experiência de vida.

Agradeço a minha mãe (Isabel) e meu pai (Maurílio) pelo apoio e incentivo, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem no meu sonho e por me ajudarem a realizar mais um. Por aguentarem meus momentos de tensão e de até mesmo de fraqueza e por me ajudarem a não cair. Digo sempre que meus pais fizeram a prova do mestrado junto comigo, pois esperaram ansiosos o resultado final e comemoraram como ninguém. Vocês são meu porto seguro, minha força e motivação. Sem vocês nada disso seria possível. Amo muito vocês.

Agradeço ao meu marido (Fabiano) por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por ser o meu grande incentivador. Nunca me deixou desanimar e sempre acreditou em mim. Sempre esteve presente em todos os momentos junto comigo. Te agradeço muito por isso e não canso de dizer: Deus deve gostar muito de mim por ter me dado você de presente. Eu te amo meu amor.

Agradeço a minha orientadora Maria Cristina pela dedicação, conselhos e incentivos. Pela oportunidade de eu estar realizando um sonho e por sempre acreditar em mim. Por estar sempre pronta para nos atender, tirar nossas dúvidas e pelos ensinamentos. Agradeço pela amizade que foi construída durante todos esses anos, desde minha iniciação científica. Admiro muito você como pessoa e como profissional. É um exemplo para todos nós alunos.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Nutrição e Câncer: Rebeka, André, Tatiane, Bread, Liliam, Priscila, Natália, Victória, João Gabriel, Bianca e Marcela, agradeço pelas ajudas nos experimentos, pelos “momentos descontração” que muitas vezes aliviavam um dia tenso e pela amizade. Em especial gostaria de agradecer a Emilianne, pela oportunidade de fazer parte do seu trabalho; é muito bom trabalhar com você. Obrigada pelo incentivo, ensinamentos, ajudas, pela amizade e por sempre acreditar e torcer por mim. Te admiro muito, muito mesmo. Agradeço também a Laís (minha “irmã gêmea”) pela amizade e companheirismo. Você sempre esteve comigo em todos os momentos do mestrado; estudamos e passamos juntas na prova. Não foi por acaso ou coincidência a maneira que nos conhecemos na aula do professor Miguel; hoje a gente sabe disso! Obrigada amiga, por tudo! Agradeço aos alunos de iniciação científica Victor e Thaís, por participarem dos experimentos e pelas ajudas. Sem vocês com certeza seria mais difícil. Muito obrigada galera! É muito bom trabalhar e estudar com vocês!

Aos meus queridos amigos do Lab 02: Luiz, que sempre me ajudou e me mostrou que um sorriso é o melhor remédio para um dia ruim. Muito bom tê-lo como amigo. As meninas Aline “Caloi”, Lari e Gaby; foi muito bom tê-las como amigas durante este tempo! Irei me lembrar para sempre dos nossos momentos de risadas na hora do almoço. Ao professor Miguel, por me ajudar nos estudos para a prova do mestrado e a professora Dora pelo incentivo e colaboração. Adoro vocês!

Agradeço minhas amigas Milene e Cíntia, que apesar da distância sempre estiveram presentes, rezando e torcendo por mim. Obrigada meninas! Amo vocês! E a minha amiga Larissa de Paula que desde a faculdade esteve presente também, em todos os momentos do

mestrado... Obrigada pela força, pela amizade e companheirismo. Você é muito especial, amo você!

Agradeço minha família e amigos que sempre torceram por mim.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (processo 2009/11993-5).

Muito obrigado a todos!

*“Quando tudo parece dar errado acontecem coisas boas que
não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo”*

Renato Russo.

RESUMO

O câncer-caquexia é caracterizado pelo desenvolvimento de anorexia, astenia, perda de peso, saciedade prematura, anemia e principalmente alteração no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas dos pacientes com neoplasia. O aminoácido leucina atua promovendo a sinalização celular, inibindo o processo de catabolismo protéico e estimulando o processo de síntese protéica no músculo esquelético, principalmente em animais experimentais. O exercício físico proporciona alterações metabólicas voltadas, principalmente, à síntese protéica. Desse modo, estudamos os efeitos do treinamento físico associado à dieta rica em leucina sobre o processo de adaptação metabólica e hormonal durante a evolução do tumor de Walker em ratos. Ratos Wistar foram submetidos ao treinamento físico (natação por 45 minutos diários, 5 dias por semana) durante 6 semanas e após esse período receberam implante de células do carcinossarcoma de Walker 256, no subcutâneo. Após 21 dias de crescimento tumoral, os ratos foram sacrificados para obtenção de soro para determinação de glicocorticoides e catecolaminas e ressecção de tecidos e órgãos (adrenais, fígado, coração e músculo). Avaliação da cultura primária da glândula adrenal desses animais pôde-se observar a síntese de catecolaminas e liberação de citocinas, no meio de cultura, em função do crescimento tumoral modulados pelos efeitos da dieta rica em leucina associada ao exercício físico. O crescimento tumoral promoveu alterações metabólicas, bioquímicas e hormonais no hospedeiro do câncer como perda de peso e aumento de hormônios catabólicos como ACTH e glucagon. O exercício promoveu diminuição de IL-6 e INF- γ no meio de cultura e aumento sérico de IL-4 e IL-10. O exercício e a suplementação com leucina proporcionaram a manutenção das concentrações plasmáticas de proteínas totais séricas e albumina, provavelmente em função da leucina, que é aminoácido conhecido como sinalizador celular e estimulador do metabolismo protéico. Nos animais tumor leucina exercitado (WLE), observamos manutenção de proteínas totais e albumina, manutenção dos níveis de ACTH e glucagon, além de diminuição nos níveis séricos de catecolaminas, em relação ao grupo LE. As análises bioquímicas, hormonais e de cultura de células mostraram que o exercício e a suplementação de leucina proporcionaram à melhora do estado caquético desses animais.

ABSTRACT

The cancer-cachexia is characterized by the development of anorexia, asthenia, weight loss, early satiety, anaemia and especially changes in the metabolism of carbohydrate, fat and protein in these cancer patients. The amino acid leucine acts promoting cell signalling by inhibiting the protein catabolism and stimulating the protein synthesis in skeletal muscle, especially in experimental animals. The exercise provides metabolic changes mainly in protein turnover. Thus studies that concern cancer-cachexia, physical exercise and nutritional supplementation can come up with best ways to support cancer treatment. In this work we evaluated the effects of physical training associated with leucine-rich diet on the metabolic processes and hormonal changes during Walker tumour growth in rats. Wistar rats (45 days-old) were submitted to physical training (swim section for 45 minutes daily, five days a week for 6 weeks). After 6 weeks of training, the rats received subcutaneous implant of Walker carcinoma cells. After 21 days of tumour growth, animals were sacrificed and collected blood, tissues and organs (adrenal, liver, heart and muscle). Cell primary culture of adrenal gland analysed the catecholamine synthesis and cytokines release in the culture medium, which was altered under tumour growth effects and modulated by the effects of leucine-rich diet associated with exercise physical. Tumour growth promoted metabolic, biochemical and hormonal changes in host such as weight loss and increased catabolic hormones release (ACTH and glucagon). The exercise decreased IL-6 and IFN- γ content in culture medium and increased IL-4 and IL-10 serum content. Exercise and leucine supplementation provided maintenance of total serum protein and albumin, probably due to leucine which is known as cell signalling and stimulates protein metabolism. In addition, tumour-bearing-exercised animals (WLE) maintained serum protein and albumin, and also the ACTH and glucagon levels, and reduced serum catecholamine levels, in relation to LE group. The biochemical analyses, hormonal and cell culture have shown that exercise and leucine supplementation could improve the cachectic state in experimental animals.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida

AIN-93G: *American Institute of Nutrition, 1993, Crescimento*

BCAA: Aminoácido de Cadeia Ramificada

C: Controle Sedentário

CE: Controle Exercitado

CEEA: Comitê de Ética na Experimentação Animal

CO₂: Gás Carbônico

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FCS: Soro Fetal Bovino

GLP-1: *Glucagon-like peptide-1*

HHA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IL: Interleucina

INCA: Instituto Nacional do Câncer

INF- γ : Interferon gama

L: Leucina Sedentário

LE: Leucina Exercitado

NaCl: Cloreto de Sódio

PBS: Tampão fosfato salino

TMB: Taxa Metabólica Basal

TMR: Taxa Metabólica de Repouso

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

W: Tumor Sedentário

WE: Tumor Exercitado

WL: Tumor Leucina

WLE: Tumor Leucina Exercitado

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	2
APRESENTAÇÃO GERAL.....	2
1.1 CÂNCER-CAQUEXIA.....	3
1.2 LEUCINA – aminoácidos de cadeia ramificada.....	8
1.3 ATIVIDADE FÍSICA.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. ANIMAIS.....	19
3.2 DIETAS.....	19
3.3 IMPLANTE TUMORAL.....	20
3.4 TREINAMENTO FÍSICO.....	21
3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	21
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	23
3.7 ANÁLISES DO PERFIL HORMONAL.....	23
3.8 ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA.....	23
3.9 ANÁLISES DE CITOCINAS.....	24
3.10 CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DA GLÂNDULA ADRENAL.....	24
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7. ANEXOS.....	62
7.1. Anexo 1 - Protocolo do Comitê de Ética	62
7.2. Anexo 2 – Paper submetido a <i>Applied Physiology, Nutrition and Metabolism</i>	63

1. INTRODUÇÃO

Apresentação geral

O câncer é uma patologia, que apenas pelo nome, ainda, abala psicologicamente os pacientes, culminando em desgaste emocional e, conseqüentemente, influenciando a qualidade de vida. Paralelamente, a falta ou redução de atividade física, associada ao processo de dor e alterações metabólicas e bioquímicas, abreviam ainda mais a expectativa de vida desses pacientes.

O câncer, ou neoplasia, é a proliferação e crescimento desordenado de células, de um determinado tecido, não controlado pelo organismo, que causa danos ao tecido/órgão adjacente ou, até mesmo, à distância do tecido original. Multiplicando-se rapidamente, essas células neoplásicas são agressivas e invasoras, determinando a formação de tumores secundários, ou metástases. Cerca de 50% dos diferentes tipos de cânceres promovem efeitos demasiadamente severos, induzindo a instalação do estado caquético do paciente. Caquexia, presente no câncer, altera bioquímica e metabolicamente o organismo, principalmente, o metabolismo protéico, no qual a perda de peso e proteína corpórea caracterizam a instalação e manutenção do estado caquético e conseqüentemente diminuindo a capacidade de resposta às terapias.

Das décadas de 80 e 90 até a atualidade, os estudos realizados visam melhor conhecer os fatores biológicos, moleculares e genéticos do câncer, além de investir em terapias coadjuvantes e nutricionais para melhorar ou reverter o intenso quadro de espoliação da caquexia.

Atualmente, vários estudos mostram que a prática de atividade física traz benefícios bioquímicos, imunológicos e corpóreos a indivíduos saudáveis e também que pode ser aplicado à pacientes com câncer, pelo fato de inibir mediadores catabólicos, melhorando assim a composição corpórea, além de diminuir o tamanho tumoral e o estado caquético desses pacientes.

Além disso, vários estudos visam associar o suporte nutricional como fator coadjuvante às terapias convencionais. Assim, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) têm sido estudados pelo seu importante papel como sinalizador celular, além de ser parte predominante do processo de *turnover* protéico corporal, representando assim um dos principais suplementos nutricionais, utilizados preferencialmente por desportistas. Desses BCAAs, o aminoácido leucina é o principal em produzir esses efeitos. A atividade física quando associada à suplementação de leucina, pode desempenhar papel importante na busca da melhora da qualidade de vida dos pacientes com neoplasia, uma vez que, a leucina estimula a síntese e inibe a degradação protéica, melhorando as reservas corpóreas.

Desse modo, conhecer as vias e os processos moleculares envolvidos na síntese e degradação protéica modulados pela leucina torna-se importante ferramenta para os processos coadjuvantes à terapia e, conseqüentemente, prevenção ou minimizar o estado caquético e, assim, melhorar a resposta às terapias e qualidade de vida dos pacientes com câncer.

1.1 CÂNCER-CAQUEXIA

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública em todo o mundo, pois é uma das principais causas de morte, sendo a segunda dentre as diversas patologias.

Nos Estados Unidos atualmente, a cada quatro mortes, uma é devido ao câncer (JEMAL *et al.*, 2009) e segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009) foi o responsável pela morte de 7,6 milhões de pessoas em 2008. Os estudos moleculares e bioquímicos do desenvolvimento e dos efeitos do câncer são de extrema importância para permitir a melhora da qualidade de vida desses pacientes, principalmente em regiões de baixa renda onde o custo de tratamento é extremamente alto, associado à cura de difícil alcance.

O carcinossarcoma de Walker 256, descoberto em 1928, é um tumor mamário espontâneo, que tem sido utilizado em vários estudos, por ser de fácil transplante e de espécie específica para ratos. O tumor de Walker é muito invasivo e possui crescimento muito rápido e pode ser afetado dependendo do tipo de nutriente ofertado aos animais (BLACK *et al.*, 1994); além de ser muito agressivo, também é considerado como o melhor modelo experimental, semelhante ao quadro de câncer-caquexia em humanos (EMERY, 1999).

A caquexia é uma síndrome metabólica associada a algumas doenças, ocasionando perda involuntária de peso corpóreo preferencialmente com espoliação da massa magra, com ou sem perda da reserva de tecido adiposo. Em geral, está presente em muitas doenças crônicas ou em fase terminal, tais como infecções, AIDS, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal crônica, artrite reumatóide, tuberculose e doença pulmonar obstrutiva crônica e principalmente no câncer, (MANTOVANI & MADEDDU, 2010).

Observada, frequentemente, em pacientes portadores de tumores gástrico, de cólon e pancreático, a caquexia é considerada o fator mais importante para a morte prematura desses pacientes (YOUNES e NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2009).

Aproximadamente 80% dos pacientes portadores desses tumores desenvolvem caquexia e, em mais de 20%, a caquexia é responsável pela morte desses pacientes (WEYERMANN *et al.*, 2009). Os efeitos da caquexia são severos, prejudicando grandemente a qualidade de vida dos pacientes, aumentando a toxicidade de terapia anti-câncer, podendo, ainda, diminuir a resposta terapêutica (BENNANI-BAITI e WALSH, 2010) e como mencionado acima reduzir a sobrevida do paciente.

A caquexia é definida como síndrome clínica distinta e única, onde a ativação de citocinas pró-inflamatórias tem efeito direto sobre o metabolismo muscular e anorexia (MANTOVANI & MADEDDU, 2010). Esse estado é comumente caracterizado pelo desenvolvimento de anorexia, astenia, perda de peso, saciedade prematura e anemia (BACURAU e COSTA ROSA, 1997; ARGILÉS *et al.*, 2005; TISDALE, 2009, DHANAPAL *et al.*, 2011). Esses sintomas não são simplesmente o resultado da debilidade, mas sim pela evolução estratégica adaptativa para a sobrevivência (GROSSBERG *et al.*, 2010). Esse quadro é caracterizado pela grande perda de peso, relacionando-se à diminuição da qualidade e do tempo de vida (TISDALE, 1997). Dentre os sintomas produzidos pelo crescimento neoplásico, a anorexia, decréscimo da ingestão alimentar, é a complicação mais freqüente em pacientes com câncer (INUI, 1999; DHANAPAL *et al.*, 2011). A síndrome anorexia-caquexia é causada por alterações metabólicas e, principalmente, pelas citocinas produzidas pelo tumor ou liberadas pelo sistema imunológico como resposta à presença do câncer, bem como outros produtos do tumor que promovem lipólise e proteólise nesses pacientes (INUI, 1999). Assim, pacientes com câncer apresentam, dentre as inúmeras alterações metabólicas, intensa perda de massa corporal magra, em particular musculatura esquelética, que diminui em proporção direta aos efeitos

da evolução neoplásica, sendo o principal responsável pela redução do tempo de vida de pacientes com câncer. Ambos, redução da síntese e aumento da degradação protéica, ou seja, o aumento do *turnover* protéico total corpóreo tem sido muito observado nos pacientes com câncer (INUI, 1999; TISDALE, 1997; 1999; 2000) e como consequência da perda de tecido muscular há fadiga, fraqueza, atrofia muscular e comprometimento de muitas funções, como respiratórias e cardiovasculares (MULLIGAN & BLOCH, 1998).

Além disso, a competição por nutrientes entre o tumor e o hospedeiro induz, além do prejuízo do metabolismo protéico, alteração também no metabolismo de carboidratos e gorduras; incluindo o hipermetabolismo que leva a diminuição da eficiência energética, relacionando-se à diminuição da qualidade e do tempo de vida (TISDALE, 1997; ARGILÉS *et al.*, 2005).

Algumas hipóteses explicam o surgimento da caquexia, que pode ser consequência da ingestão diminuída de alimentos, consumo excessivo de nutrientes pelo tecido tumoral, alterações no metabolismo intermediário do indivíduo, secreção de citocinas, pelo hospedeiro ou pelas células tumorais, ou o somatório desses fatores. Destes, a anorexia e o catabolismo, como lipólise e proteólise da massa corpórea, promovido pela presença do tumor são os principais fatores (BACURAU e COSTA ROSA, 1997; TISDALE, 2003; TISDALE, 2005; TISDALE, 2009; INUI, 1999; BATISTA, 2012). Acredita-se que as alterações no organismo portador de tumor sejam induzidas por mediadores inflamatórios, além de outros fatores, como os secretados pelo crescimento tumoral, que estão envolvidos na mobilização de ácidos graxos e proteínas (BATISTA, 2012).

No organismo portador de tumor, as alterações metabólicas proporcionam elevação de determinados substratos circulantes, como glutamina, triacilglicerois, como também de alguns hormônios e citocinas específicos para esse aporte de nutrientes e substratos energéticos fundamentais para as células neoplásicas (Figura 1). Assim, as células tumorais competem com o organismo hospedeiro pelo consumo destes substratos, por apresentarem elevada demanda, principalmente, por glicose (BACURAU e COSTA ROSA, 1997).

O aumento do gasto energético é um dos determinantes da perda de peso durante o câncer-caquexia (TISDALE, 2005; SILVA, 2006) que é determinado pelo tipo de tumor (TISDALE, 2009; DHANAPAL *et al.*, 2011). O metabolismo energético é definido como a soma de reações químicas complexas e integradas, por meio das quais tanto os seres humanos, quanto os animais, obtêm energia do ambiente e, assim, mantêm o funcionamento adequado de todos os processos biológicos. A massa corporal é controlada pelo equilíbrio de ingestão e gasto de energia, como todos os sistemas termodinâmicos. Assim, a síndrome anorexia-caquexia é a base para alguns dos tratamentos atuais, bem como desenvolvimento de novos agentes e o conhecimento do sistema neuroendócrino (TISDALE, 2009; DHANAPAL *et al.*, 2011).

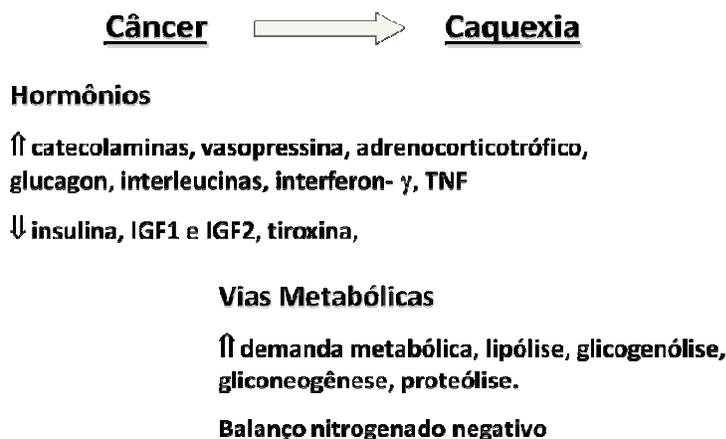


Figura 1: Alterações hormonais e metabólicas no câncer-caquexia.

O processo de carcinogênese frequentemente envolve estresse oxidativo e com isso liberação de vários hormônios catabólicos, contra-regulatórios da insulina, além de muitas citocinas pró-inflamatórias, que em muitos eventos promovem prejuízo ainda maior associado à evolução tumoral (KARBOWNIK *et al.*, 2001; ARGILÉS *et al.*, 2005). Por isso, há muitos estudos que relacionam a utilização de antioxidantes como possível tratamento preventivo do câncer. O hormônio melatonina tem atraído atenções por causa de sua alta atividade antioxidante e anticarcinogênica; estudos experimentais mostraram que seus efeitos podem reduzir o aparecimento do câncer e/ou inibir o crescimento de tumores já estabelecidos (KARBOWNIK *et al.*, 2001). Em ratos, a concentração plasmática dos hormônios catabólicos, como glicocorticóides, catecolaminas e glucagon, apresenta-se aumentada contribuindo para espoliação das reservas de macronutrientes no organismo. Porém, mais importante para a atuação dos hormônios catabólicos neste sentido, é a diminuição da concentração de insulina circulante, uma vez que tal situação hipoinsulinêmica ocorre preferencialmente nos portadores de tumor. É importante ressaltar que esse padrão de alterações metabólicas ocorre principalmente em modelos experimentais de animais portadores de diferentes tipos de tumor (BACURAU e COSTA ROSA, 1997).

1.2 LEUCINA – AMINOÁCIDO DE CADEIA RAMIFICADA

Nos pacientes com câncer, como mencionado acima, há a prevalência da anorexia como um dos principais pontos do estado caquético. Assim, para o tratamento do câncer-caquexia, minimizar o efeito da anorexia, com o aumento do consumo alimentar, não é capaz de reverter às alterações metabólicas observadas nesses pacientes. Porém, agentes que modulam as vias catabólicas são capazes de atenuar a degradação protéica no músculo

esquelético pela prevenção do aumento da expressão dessas vias induzidas pelo câncer-caquexia. Exemplos de agentes que apresentam tal ação são os aminoácidos de cadeia ramificada, como isoleucina, valina e leucina, sendo esse último o principal destaque entre os efeitos benéficos (TISDALE, 2004).

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs –*Branched chain amino acids*) são substratos essenciais e importantes reguladores da síntese de proteína corpórea e representam a maior fonte de nitrogênio para síntese de glutamina e alanina no músculo (HOLECEK, 2002). A leucina tem papel importante no metabolismo do músculo esquelético e pode aumentar a síntese protéica e diminuir a proteólise muscular, independente de outros aminoácidos de cadeia ramificada, como a isoleucina e a valina (ANTHONY *et al.*, 2001). Assim, diversos estudos têm sido realizados para melhor compreensão dos efeitos da leucina sobre o metabolismo muscular esquelético na vigência do câncer (HOLECEK, 2002). O aumento da taxa de oxidação dos BCAAs é comum em respostas inflamatórias sistêmicas induzidas pelo câncer, contribuindo assim para perda muscular (HOLECEK, 2002).

A dieta suplementada com leucina preserva o conteúdo protéico e diminui seu catabolismo no músculo esquelético de ratos portadores do carcinossarcoma de Walker 256. Este resultado sugere que a leucina pode atuar, direta ou indiretamente, na diminuição da depleção de tecidos do hospedeiro, comumente observado durante o progressivo crescimento tumoral (GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003).

A leucina é utilizada como fonte energética pelo músculo esquelético, podendo ser transaminada e oxidada para produzir acetil-CoA e, também, seu esqueleto de carbono é fonte para produção de alanina no músculo, que por sua vez é precursora da glicose, via

gliconeogênese hepática. Além disso, a leucina participa do processo de sinalização da transcrição, inibindo a proteólise e/ou estimulando a síntese protéica (Figura 2). Desse modo, esse BCAA previne a depleção da carcaça, preservando a massa protéica corpórea em ratos com tumor (PITKANEN *et al.*, 2003; VENTRUCCI *et al.*, 2004), além de melhorar o balanço nitrogenado, recuperando a massa corporal magra através da preservação da massa protéica muscular e do aumento da absorção intestinal de ratas portadoras do tumor de Walker (VENTRUCCI *et al.*, 2001).

Os BCAAs compreendem cerca de 14-18% da proteína muscular, sendo a leucina o mais importante para o processo de síntese protéica (ELEY *et al.*, 2007). Por outro lado, para a síntese protéica é necessário o balanço de aminoácidos, principalmente dos aminoácidos essenciais, dentre eles os BCAAs. Assim em pacientes com câncer, a diminuição dos níveis plasmáticos de aminoácidos, principalmente daqueles de cadeia ramificada, pode caracterizar como mais um agravante para o estado espoliativo durante a caquexia (ELEY *et al.*, 2007; TISDALE, 2009).

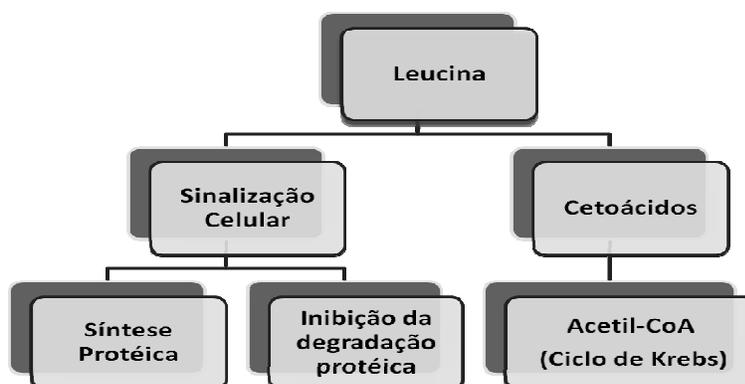


Figura 2: Esquema de utilização da leucina.

Em estudos prévios, verificamos que os efeitos de dieta semi-purificada, contendo alto teor de leucina e/ou glutamina, sobre as alterações bioquímicas relacionadas ao

metabolismo protéico e corporal de animais jovens, submetidos ao exercício físico aeróbio, proporcionaram melhora em alguns parâmetros analisados como maior síntese associada à menor degradação protéica nos ratos portadores do tumor Walker 256 (SALOMÃO & GOMES-MARCONDES, 2012; SALOMÃO *et al.*, 2010).

Em nossos estudos, também confirmados por outros autores, verificamos que a suplementação de leucina estimulou a síntese de proteína muscular esquelética, pelo fato de possuir efeito anabólico sobre o metabolismo protéico muscular além de inibir enzimas proteolíticas, aumentando assim a taxa de síntese e diminuindo sua degradação (CROWE, 2006; ELEY *et al.*, 2007; SALOMÃO & GOMES-MARCONDES, 2012; MATTHEWS, 2005; VENTRUCCI *et al.*, 2004; SALOMÃO *et al.*, 2010). Assim, a dieta rica em leucina poderia ser utilizada como alternativa associada à terapia convencional, sendo assim promissora ao efeito anti-atrofia muscular (ZANCHI *et al.*, 2008). ELEY e colaboradores (2007) e LIMA e colaboradores (2008) também observaram, em seus estudos, que a leucina produziu pequena, porém significativa, inibição do crescimento tumoral.

Estudos mostram que suplementação de leucina, juntamente com os outros BCAAs, reduz indicadores séricos de dano muscular (CROWE, 2006). Muitos estudos têm mostrado que somente a leucina, preferencialmente entre os BCAAs, apresenta resultados consistentes sobre o metabolismo protéico, quando administrada em diferentes quantidades e durações (ANTHONY *et al.*, 1999; ANTHONY *et al.*, 2001; ANTHONY *et al.*, 2002).

1.3 ATIVIDADE FÍSICA

Ao longo da história, a atividade física sempre esteve presente na rotina do ser humano associada ao estilo de vida, que basicamente buscava, e até hoje, busca os benefícios das práticas desportivas para o corpo perfeito.

Na medida em que a ciência e seu desenvolvimento proporcionaram, por um lado, a redução da mortalidade por doenças infecto-contagiosas e o aumento da longevidade, por outro lado houve aumento de doenças crônicas degenerativas e a perda da qualidade de vida, pela falta de hábitos como o cuidado com a dieta e prática de atividade física regular. Atualmente, tem-se estimulado e esclarecido a importância da prática de atividades e exercícios físicos para a redução das principais disfunções orgânicas causadas pelo sedentarismo, já que suas consequências para a saúde são bastante nocivas e bem conhecidas como maior risco de aterosclerose e suas consequências (angina, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral), aumento da obesidade, hipertensão arterial, diabetes, osteoporose, dislipidemia, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, depressão, ansiedade, além de aumento do risco de afecções osteomusculares e de alguns tipos de câncer de cólon e de câncer de mama.

Assim, recentemente tem-se estimulado muito a prática de exercícios como forma de melhorar a qualidade de vida e também como forma de obter benefícios à saúde, principalmente em alguns tipos de patologias como o câncer. A atividade física pode exercer fator benéfico na sobrevivência por regular o metabolismo de esteróides sexuais, a sensibilidade à insulina e respostas do sistema imunológico. De acordo com algumas pesquisas, a dieta e a prática de atividade física regular diminui o risco de morte correlacionada as doenças induzidas pelo sedentarismo, como por exemplo a obesidade, doenças cardíacas, etc. Cada vez mais, evidências clínicas apoiam a inclusão de atividade

física moderada como estratégia preventiva para o bem estar e saúde (MAGNÉ *et al.*, 2011).

O exercício aeróbio tem como função melhorar a *performance* física, assim como as reservas corpóreas, melhorando assim o prognóstico de pacientes com câncer (CREVENNA *et al.*, 2003; KNOLS *et al.*, 2005), uma vez que ameniza o sintoma de espoliação mais presente nesses pacientes que é a perda de massa muscular, levando a fadiga, comprometendo a força e resistência muscular, causando também transtornos psicológicos (AL-MAJID *et al.*, 2001; DIMEO *et al.*, 1998; 2003; LUCÍA *et al.*, 2003; THORSEN *et al.*, 2003).

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que o treinamento físico melhorou o teor da principal proteína muscular – a miosina –, além de reduzir o tamanho tumoral em cerca de 30% em relação aos animais sedentários portadores de tumor (SALOMÃO *et al.*, 2010). LIRA e colaboradores (2008) mostraram fato parecido, onde o tumor reduziu em cerca de 10% após treinamento físico. Assim, estudos têm demonstrado que a prática de atividade física traz benefícios a animais experimentais portadores de tumor, por inibir mediadores catabólicos, reduzir o tamanho tumoral e melhorando a composição corpórea (LIMA *et al.*, 2008; LIRA *et al.*, 2008; SALOMÃO *et al.*, 2010), e também em pacientes com câncer melhorando a qualidade do sono e reduzindo o grau de inflamação (SPROD *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que, em animais, o exercício de intensidade moderada diminuiu a incidência de tumores transplantados, reduziu os sintomas neoplásicos, como também o surgimento de metástase e crescimento tumoral (SHEWCHUK *et al.*, 1997; DANERYD *et al.*, 1995). Esses estudos observaram que o exercício físico, em ratos

implantados com tumor, modulou ou até mesmo adiou o quadro de anorexia e caquexia. Além disso, promoveu aumento da taxa metabólica, induziu a adaptação da biogênese da mitocôndria no músculo esquelético e aumentou a capacidade antioxidante (DANERYD *et al.*, 1990 e 1995).

Modificações do estilo de vida, como atividade física regular e monitorada, podem afetar as respostas do organismo, como melhorar os processos antioxidantes celulares e aumentar o consumo de oxigênio, marcador da capacidade funcional, reduzindo náusea, depressão e a fadiga, e conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida desses pacientes com câncer (AL-MAJID *et al.*, 2001; DUNCAN *et al.*, 1997; ROBERTS & BARNARD, 2005). O exercício físico promove o aumento do consumo de glicose, além do aumento da síntese protéica, principalmente muscular, em função do aumento da insulina circulante, conseqüentemente, impõe possível redução de substrato às células tumorais (ANTHONY *et al.*, 1999). Como efeito positivo produzido pela atividade física no hospedeiro com câncer, a resistência periférica à insulina é também normalizada e as alterações nos níveis dos hormônios catabólicos e anabólicos são modificadas (DANERYD *et al.*, 1995). O condicionamento físico também melhora os depósitos de glicogênio e aumenta a massa protéica muscular (TOGNI *et al.*, 2003). Desse modo, estudos têm demonstrado que a prática de atividade física traz benefícios aos pacientes portadores de tumor, por inibir mediadores catabólicos, melhorando a composição corpórea; além de diminuir o tamanho tumoral e o estado caquético (LIMA *et al.*, 2008). O principal componente do gasto energético diário é a taxa metabólica de repouso (TMR), que pode ser alterada por vários fatores como a hora do dia, ingestão de alimentos, tipo de exercício e estresse. A TMR tende a diminuir com a idade e com a redução de massa corporal

(FOUREAUX *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos ainda não conclusivos quanto à relação entre o condicionamento físico e TMB especulam que a prática de atividade física regular possa aumentar a TMB em consequência da adaptação crônica ao exercício (WAHRLICH e ANJOS, 2001).

O exercício acarreta aumentos ou reduções nas concentrações sanguíneas de alguns hormônios, em relação às concentrações do estado de repouso, para que o organismo consiga suprir a maior demanda energética e manter a homeostase. CONTARTEZE e colaboradores (2007) analisaram biomarcadores de estresse (concentrações séricas de ACTH e corticosterona e concentrações de ácido ascórbico e colesterol da glândula adrenal) onde apontaram alterações no nível de estresse de ratos submetidos a exercício (natação) agudo ou 25% superior; os autores apontam que esses biomarcadores são adequados para inferir, com maior exatidão, os níveis de estresse de ratos exercitados em natação.

As secreções de hormônios esteróides, pelo córtex da adrenal, bem como de catecolaminas, pela medula adrenal, são estimuladas durante o estresse. Tal resposta é perfeitamente adequada quando o fator de estresse requer provisão extra de energia, bem como de substratos para determinados tecidos (RONSEIN *et al.*, 2004). Assim como na prática de exercícios, levando em consideração o fator estresse, a concentração de hormônios circulantes também apresenta-se alterada em organismos portadores de tumor, considerando o estado de caquexia como um estado crônico de estresse. Vários tipos de estresse estimulam a liberação do ACTH, modificando sua ritmicidade de secreção normal. Quando animais ou humanos ficam expostos a estímulos potencialmente nocivos como estresse físico, emocional e químico, como dor, trauma, hipóxia, hipoglicemia aguda,

exposição ao frio, ou até mesmo na situação patológica como o câncer, ocorre aumento da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), estimulando a secreção de ACTH e consequentemente elevação de glicocorticóides, como o cortisol (CONTARTEZE *et al.*, 2007; PAULI *et al.*, 2005).

O treinamento físico exerce, na maioria das vezes, efeitos positivos, porém pode promover efeitos negativos como aumento da inflamação e aumento do estresse oxidativo, dependendo da natureza, intensidade e duração do exercício, mas principalmente do estado em que se encontra o organismo portador de neoplasia, como tipo e evolução do câncer, estágio da doença e o tipo de tratamento médico a que esse paciente é submetido (KNOLS *et al.*, 2005). Assim, quando bem supervisionado, o exercício físico pode ser uma excelente alternativa no auxílio do tratamento e reabilitação dos pacientes com câncer, como mostrado na Figura 3 (SEGAL *et al.*, 2001; SEGAR *et al.*, 1998).

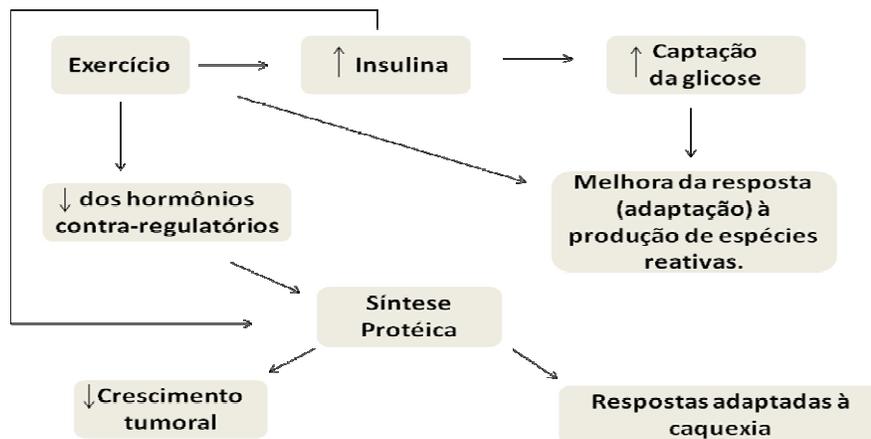


Figura 3: Efeitos do exercício físico no câncer-caquexia.

2. OBJETIVOS

Tomando-se o conhecimento da literatura além dos estudos prévios, realizados em nosso laboratório, sabe-se que a dieta com aminoácido de cadeia ramificada – leucina, além de participar dos processos de oxidação muscular e fornecer nutriente estrutural, atua promovendo a sinalização celular, inibindo o processo de catabolismo protéico e estimulando o processo de síntese protéica no músculo esquelético. Além disso, sabe-se que o exercício físico a longo prazo estabelecendo o condicionamento físico, proporciona melhorias ao organismo de modo geral além de alterações metabólicas voltadas à síntese protéica tanto em humanos como em modelos experimentais, como utilizados em laboratórios. Assim aventamos a hipótese de que os efeitos da dieta rica em leucina sobre as alterações metabólicas e hormonais em ratos portadores de tumor, previamente treinados, ou seja, a associação de duas situações – leucina e exercício – possa modular positivamente as respostas do hospedeiro frente à situação adversa como o crescimento neoplásico.

Portanto, o principal objetivo desse trabalho foi verificar o estado caquético e a homeostase energética de ratos submetidos aos efeitos do treinamento físico prévio, de intensidade leve-moderada, como a natação, como forma preventiva e moduladora dos efeitos espoliantes da evolução tumoral, sobre o desenvolvimento e estabelecimento do estado de caquexia, associado à suplementação nutricional com leucina, como forma terapêutica, e as possíveis melhoras das respostas desses hospedeiros. Assim, consideramos que a melhora da composição corpórea e principalmente da massa corpórea magra, em função da capacidade adaptativa ao treinamento físico associado à suplementação nutricional em ensaios experimentais possa ser extrapolado para a clínica, contribuindo

dessa forma, futuramente, para melhorar as respostas do paciente aos processos terapêuticos de tratamento dessa importante patologia que é o câncer.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliação de associação entre dieta rica em leucina e exercício físico sobre a evolução tumoral e aspectos ponderais de peso corpóreo e ganho de peso, além de avaliações bioquímicas como proteínas totais, albumina, glicose e lactato em ratos.
2. Avaliação do perfil hormonal (concentração sérica de glicocorticóides e catecolaminas), além de insulina, glucagon, amilina, GLP-1, melatonina e leptina em ratos portadores de tumor, treinados ou não, e submetidos à dieta rica em leucina.
3. Avaliação da síntese de glicocorticóides e de catecolaminas pela glândula adrenal, bem como atividade celular da adrenal, desses ratos portadores de tumor, submetidos ou não ao treinamento e/ou suplementação nutricional com leucina, utilizando-se metodologia *in vitro*, através de cultura primária da glândula desses animais.
4. Avaliação do perfil de citocinas (IL-4, 6 e 10, INF γ e TNF α) em ratos portadores de tumor, frente ou não ao treinamento e a dieta rica em leucina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos machos Wistar, com 45 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, que foram submetidos ao treinamento físico – natação – até a fase adulta (90 dias), permanecendo em sala experimental do Laboratório de Nutrição e Câncer, sob condições controladas de luz (12hs claro/ 12hs escuro) e de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), recebendo dieta e água *ad libitum*.

3.2 DIETAS

As dietas semipurificadas isocalóricas seguiram padrão AIN-93G (REEVES *et al*, 1993), contendo 18% de proteína normoprotéica (C), ou 18% de proteína acrescida de 3% de L-leucina (L). O ajuste da dieta rica em leucina foi feito reduzindo-se a quantidade equivalente de carboidratos. Foram adicionados cerca de 70% de carboidratos (sacarose, dextrina e amido), 7% de gordura (óleo de soja) e 5% de fibra (micro-celulose purificada) às dietas e complementadas com mistura vitamínica e de sais minerais, bem como cistina e colina. A dieta controle contém, na caseína utilizada como fonte de proteína, o equivalente a 1,1% de L-leucina. As dietas foram preparadas em nosso laboratório de acordo com Tabela 1.

Tabela 1: Composição das dietas semipurificadas de acordo com AIN- 93G.

Ingredientes *	Controle	Leucina
Amido¹	397,5 g	385,5 g
Caseína^{**}	200 g	200 g
Dextrina¹	132 g	122 g
Açúcar	100 g	90 g
Fibra Celulose	50 g	50 g
Mistura de Sais^{***}	35 g	35 g
Mistura de Vitaminas^{***}	10 g	10 g
Cistina²	3 g	3 g
Colina	2,5 g	2,5 g
Óleo de Soja	70 g	70 g
Leucina²	-	30 g

* Composição e quantidade de nutrientes, para 1Kg de dieta, baseadas na *American Institute of Nutrition* – AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993); ** Correção da caseína para o teor total de proteína igual a 74,4%; *** De acordo com AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993); ¹Doação da Corn Products do Brasil. ²Doação da Ajinomoto do Brasil.

3.3 IMPLANTE TUMORAL

O implante do carcinossarcoma de Walker 256 (linhagem proveniente do Banco de Tumores Christ Hospital Line, Arthur D'Little, EUA) foi efetuado no subcutâneo da região do flanco direito, inoculando-se $2,5 \times 10^6$ células viáveis por inóculo, conforme método descrito e padronizado em nosso laboratório (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998).

Os animais dos grupos controle (não implantados com tumor) receberam inoculação de 0,5mL de solução fisiológica (0,9% de NaCl) no tecido subcutâneo do flanco direito, perfazendo o grupo *sham*.

A manipulação dos animais com tumor seguiu regras do comitê internacional de pesquisa em câncer (*United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research*,

UKCCCR, 1998) (VALE *et al.*, 2005). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, CEEA-IB-UNICAMP, número 1940-1 (Anexo 1).

3.4 TREINAMENTO FÍSICO

O exercício físico compreendeu a natação aeróbia leve-moderada por seis semanas. Utilizou-se piscinas de 1m³ cada, onde foram treinaram 8 animais por vez, com temperatura da água a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O período inicial de treinamento foi de 5 minutos, aumentando-se gradativamente 5 minutos de exercício a cada dois dias, durante as duas primeiras semanas (período de adaptação, onde os animais foram submetidos ao condicionamento físico de forma lenta e gradual). A partir da terceira semana, aumentou-se o tempo de natação em 5 minutos adicionais por dia, atingindo o máximo de 45 minutos por dia, a partir da 4ª semana. Após o período total de seis semanas, os animais dos grupos com tumor receberam o implante de células do tumor de Walker 256 e os animais controles receberam injeção de solução fisiológica, continuando-se o treinamento por mais 21 dias até o sacrifício desses animais.

3.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os ratos foram distribuídos inicialmente em dois grupos, de acordo com a atividade física ou não: Controle Sedentário (C) e Controle Exercitado (CE). Após 45 dias de treinamento físico, os animais foram redistribuídos em 08 grupos experimentais, agora de acordo com a presença ou não do carcinossarcoma de Walker (W) e submetidos ou não à

suplementação de leucina (número mínimo de oito animais por grupo), a saber: Controle Sedentário (C, n=11), Tumor Sedentário (W, n=10), Leucina Sedentário (L, n=11), Tumor Leucina Sedentário (WL, n=9), Controle Exercitado (CE, n=11), Tumor Exercitado (WE, n=8), Leucina Exercitado (LE, n=11) e Tumor Leucina Exercitado (WLE, n=9) (Figura 4).

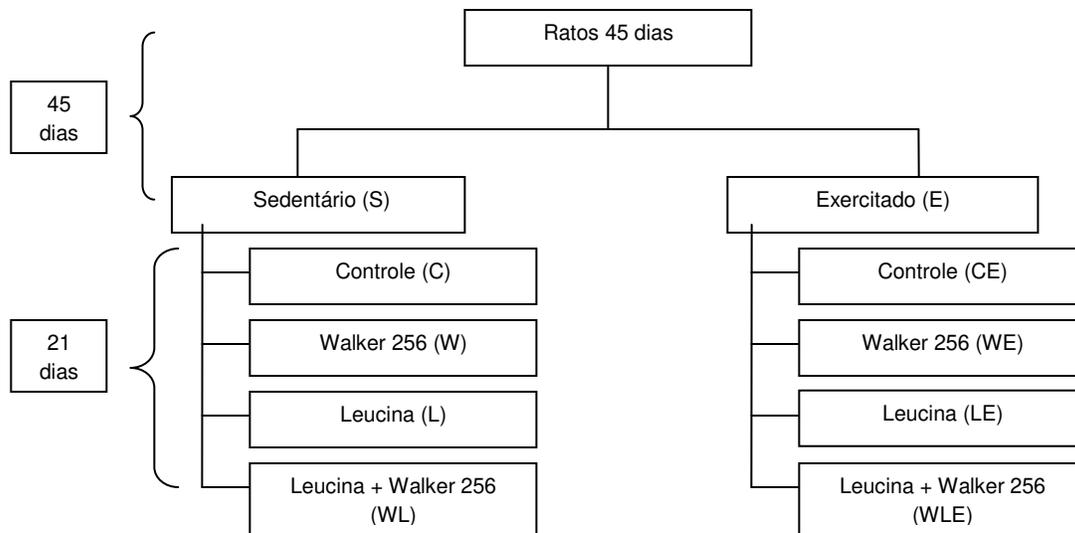


Figura 4: Grupos Experimentais de acordo com treinamento prévio ou não (exercitado e sedentário, respectivamente) e após 45 dias (ou seis semanas) os animais foram submetidos ou não ao implante tumoral e/ou suplementação nutricional com leucina e acompanhados por mais 21 dias até o sacrifício.

Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (três animais por gaiola) durante todo o período experimental, onde foram avaliados os pesos corpóreos (três vezes por semana).

Após aproximadamente 21 dias de crescimento tumoral ou período pré-agônico (o qual corresponde em média 21 dias após o implante tumoral), os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, para coleta de sangue (obtenção de soro para determinação da concentração de hormônios) e ressecção dos tecidos e órgãos (adrenal, fígado, coração e músculo). As amostras de soro foram armazenadas a - 20°C e os órgãos a - 80°C.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Alíquotas dos soros dos animais foram avaliadas quanto aos teores séricos de glicose, proteína, albumina e lactato, através de kits específicos: glicose – método enzimático (Laborlab), proteína total e albumina – por método biureto e verde bromocresol Protal (Laborlab), e lactato – método enzimático Bioclin (Quibasa), fornecidos pela Labcenter Campinas – SP.

3.7 ANÁLISES DO PERFIL HORMONAL

A análise sérica hormonal de corticosteróides, ACTH, melatonina, insulina, glucagon, amilina, GLP-1 e leptina foi realizada a partir de ligante anticorpo, através de kits Lincoplex – Linco (Millipore) para ensaio multiplex por fluorescência, seguindo instruções do fabricante, utilizando-se o equipamento Luminex (Millipore).

A análise de catecolaminas e ácido ascórbico foi realizada a partir do homogeneizado de adrenal e do meio de cultura da adrenal, através de ensaio fluorimétrico, utilizando-se filtro de excitação 420nm e emissão 510nm, utilizando-se os protocolos desenvolvidos por KELNER (1985) e MINDLIN & BUTTLER (1938). A partir do homogeneizado de adrenal foi realizada a determinação de proteína tecidual pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.8 ANÁLISE DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA

A análise da enzima fosfatase alcalina foi realizada no homogeneizado da glândula adrenal. Para análise da fosfatase alcalina foi utilizado reagente de 4-nitrofenil fosfato dissódico (p-NPP, 37mM), como substrato; e a atividade da enzima foi determinada nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos por espectrofotometria, expressa em nmol/ μ g proteína/min (MARTINS *et al.*, 2001). Para esta análise foi utilizada amostras de homogeneizado da glândula adrenal.

3.9 ANÁLISES DE CITOCINAS

A análise de citocinas (IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , e INF γ) foi realizada a partir de ligante anti-corpo, através de kits Multiplex (Millipore) para ensaio multiplex por fluorescência, seguindo orientações do fabricante, utilizando-se o equipamento Luminex (Millipore).

3.10 CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DA GLÂNDULA ADRENAL

Após o sacrifício, os animais foram mergulhados em álcool 70° GL para assepsia e colocados em fluxo laminar, para dissecação da glândula adrenal de forma asséptica. O tecido adrenal foi colocado em tubo estéril com meio de cultura DMEM e triturado em pedaços de aproximadamente 1 mm. Em seguida, os fragmentos de adrenal foram desagregados enzimaticamente, adicionando 500 uL de tripsina, durante 2 minutos em banho-maria a 37°C, produzindo assim suspensão de células, tanto da córtex quanto da medula da adrenal. Em seguida, as células foram semeadas em garrafas de 25cm³ com meio

de cultura DMEM, enriquecido com 5% de FCS, 1% de glutamina, 50 U por mL cada de penicilina e estreptomicina, incubadas por 24 horas a 37°, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células adrenais já aderidas foram processadas com a remoção do meio de cultura e interrupção das atividades celulares com PBS gelado e então foram removidas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos para separar o pellet celular que foi armazenado a -80°C (FRESHNEY, 1994).

O meio de cultura foi analisado quanto à concentração de citocinas e corticosterona a partir de ligante anti-corpo, através de kits Multiplex (Millipore) para ensaio multiplex por fluorescência seguindo orientações do fabricante, utilizando-se o equipamento Luminex (Millipore) e quanto à concentração de catecolaminas através de ensaio fluorimétrico, utilizando-se filtro de excitação 420nm e emissão 510nm, utilizando-se os protocolos desenvolvidos por KELNER (1985).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados métodos estatísticos não paramétricos, realizando-se as médias e erro padrão das médias e comparação dos múltiplos grupos por análise de variância (*Two-way* ANOVA) para estabelecer os efeitos do exercício e suplementação nutricional sobre os parâmetros corporais ou sobre os efeitos tumorais, seguido do teste de Bonferroni para detecção de diferenças significativas entre os grupos, para probabilidade menor que 5%. Para apresentação dos dados também foi realizada análise de variância *two-way* para análise dos efeitos tumorais em relação ao grupo controle ou efeitos do exercício físico em relação ao grupo controle (GAD & WEIL, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caquexia é um estado clinicamente complicado e preocupante, e no presente trabalho, em que utilizamos modelo experimental de caquexia avaliamos o estado caquético desses animais portadores de tumor, verificando-se que o exercício físico e a suplementação de leucina proporcionaram melhoras ao organismo hospedeiro de tumor, uma vez que a leucina foi importante para a síntese de proteínas e diminuição do catabolismo protéico, e juntamente com o exercício físico aeróbio, proporcionou seus efeitos ainda mais pronunciados.

Indivíduos portadores do câncer apresentam alterações fisiológicas bastante importantes dependendo do estado de desenvolvimento tumoral, do caráter inicial de evolução da doença e do estado nutricional do hospedeiro. Dependendo do tipo de neoplasia, o hospedeiro apresenta alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, além de outras complicações, levando ao desenvolvimento da caquexia (YOUNES & NOGUCHI, 2000).

Nossos resultados mostraram que os efeitos produzidos pelo crescimento do carcinossarcoma de Walker 256 foram similares aos produzidos por alguns tipos de tumor que causam caquexia e também que esses efeitos deletérios da evolução da neoplasia puderam ser modulados, até mesmo minimizados, com a suplementação nutricional associada ao exercício físico.

Na Figura 5 observa-se que a evolução do peso corpóreo dos animais, durante o período de exercício (antes da inoculação tumoral), mostrou-se crescente e gradativa. Durante este período não houve diferenças estatísticas entre os grupos sedentários e

exercitados. Após a inoculação do tumor (após o 45º dia de treino) e redistribuição dos animais em grupos sedentários e exercitados, submetidos ou não a dieta rica em leucina e portadores ou não de carcinossarcoma de Walker 256 (vide redistribuição dos grupos na Figura 4), observamos decréscimo na evolução de peso em todos os animais portadores de tumor, independente da suplementação nutricional e do treinamento físico, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos ($P>0,05$). Verificou-se na Figura 5B, que os animais sedentários tenderam a manter o peso corpóreo, enquanto que os exercitados apresentaram tendência ao decréscimo do peso corporal, em relação aos correspondentes grupos com tumor sedentários.

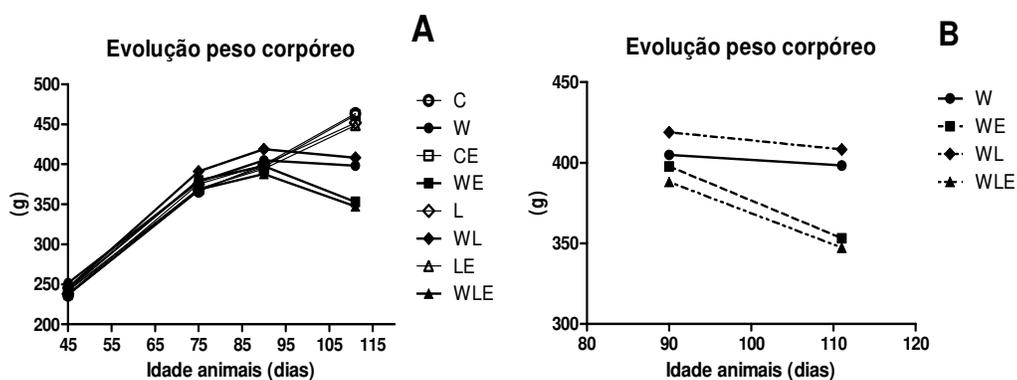


Figura 5: Evolução do peso corpóreo (g) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral, **A** - durante todo período experimental; **B** - período de evolução tumoral (90º dia de idade – implante tumoral e no 111º dia de idade - sacrifício, correspondente ao período pré-agônico). **Legenda:** (C) controle sedentário, (W) tumor sedentário, (L) leucina sedentário, (WL) tumor leucina sedentário, (CE) controle exercitado, (WE) tumor exercitado, (LE) leucina exercitado, (WLE) tumor leucina exercitado.

No presente estudo, verificamos que a evolução de peso corpóreo foi crescente durante todo experimento até o momento anterior ao inóculo tumoral e que, a partir desse momento, preferencialmente, em decorrência ao estado de caquexia instalada houve perda de peso nos grupos portadores de tumor, enquanto que os animais sem tumor mantiveram expressivo ganho de peso. Como apontado pela literatura, os efeitos da evolução do câncer

promove perda involuntária de peso corpóreo e essa perda é agravada pela secreção de citocinas, principalmente pelos tecidos do hospedeiro ou mesmo pelo tecido tumoral, direcionando perda preferencial da massa corpórea magra e tecido adiposo (TISDALE, 1999; 2009, ARGILÉS, 1999; 2003).

Outros estudos apontam que o exercício físico quando bem controlado, estimula a preservação da massa corpórea uma vez que exerce efeito positivo para o processo de síntese protéica (SALOMÃO *et al.*, 2010; . & GOMES-MARCONDES, 2012; KNOLS *et al.*, 2005; CREVENNA *et al.*, 2003). Nesse estudo, quando observamos os animais dos grupos exercitados com tumor WE e WLE, percebemos maior perda de peso em relação aos grupos sedentários W e WL, dados esses também observados em estudos prévios em nosso laboratório (TONETO *et al.*, 2011).

Na Figura 6, observamos o peso do tumor em relação ao peso da carcaça. Os grupos experimentais portadores de tumor de Walker 256 apresentaram peso do tumor acima de 10% em relação ao peso da carcaça. Não houve diferença estatística entre os grupos, mostrando que o crescimento tumoral foi independente do tratamento a que os diferentes grupos com tumor foram submetidos – treinamento físico e/ou suplementação nutricional.

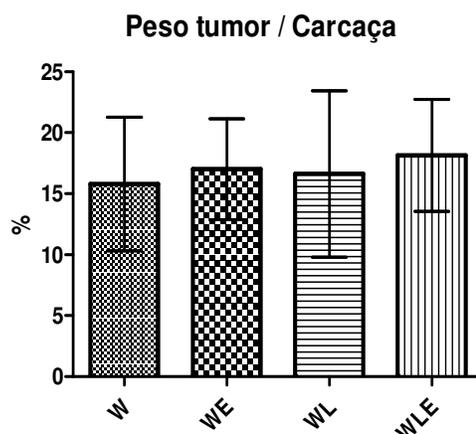


Figura 6: Porcentagem do peso do tumor em relação a carcaça (%) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina e treinamento físico. **Legenda:** (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado.

Esses dados mostraram-nos que o tumor desenvolveu-se de forma bastante rápida e agressiva, visto que sua porcentagem do peso foi superior a 10% em relação ao peso corpóreo. Entretanto, a evolução exponencial do tumor e seus efeitos deletérios quando associados ao exercício (WE e WLE) proporcionaram perda de peso desses animais, porém desencadearam alterações morfofisiológicas semelhantes ou menos exacerbadas que nos animais sedentários, como mostram estudos prévios do laboratório (TONETO, *et al.* 2011; SALOMÃO & GOMES-MARCONDES, 2012).

O crescimento tumoral promoveu profundas alterações metabólicas e bioquímicas no hospedeiro do câncer. No presente estudo, também foram observadas alterações bioquímicas e hormonais condizentes com a literatura, como variações de alguns parâmetros bioquímicos como glicose e lactato e hormonais como ACTH. Embora a literatura aponte para a perda característica de proteína e albumina, no presente estudo não verificamos estas alterações. O exercício e a suplementação nutricional, com aminoácido leucina, proporcionaram a manutenção das concentrações plasmáticas de proteínas totais séricas e albumina, visto que a leucina, aminoácido conhecido como sinalizador celular, provavelmente estimulou o metabolismo protéico proporcionando maior síntese de proteínas séricas circulantes além de proteínas estruturais (TISDALE, 2004; ANTHONY *et al.*, 2001).

A Figura 7 mostra a concentração de proteínas totais séricas dos animais experimentais; pudemos observar que, embora não houve diferença estatisticamente significativa, os animais portadores de tumor dos grupos tumor exercitado (WE) e tumor leucina sedentário (WL) apresentaram redução de proteínas totais séricas em relação aos

seus respectivos controles; o grupo tumor leucina exercitado (WLE) apresentou recuperação da concentração de proteína total sérica em relação ao seu respectivo controle (LE) sem diferenças estatísticas.

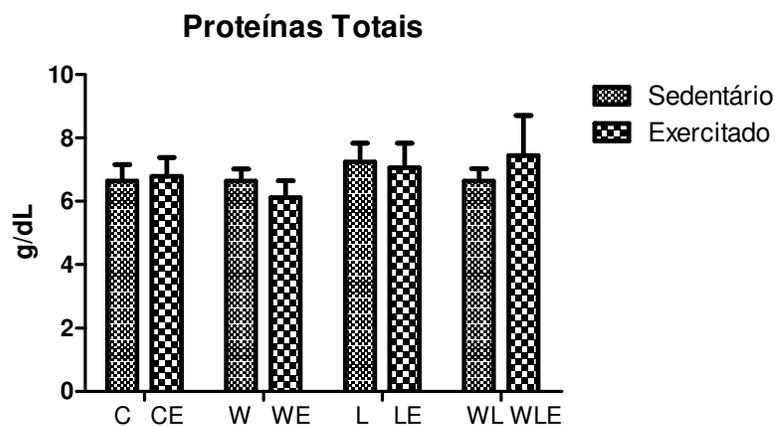


Figura 7: Concentração de proteínas totais séricas (g/dL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle sedentário, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado.

Assim como as proteínas totais séricas, a albumina sérica (Figura 8) também não apresentou variação estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

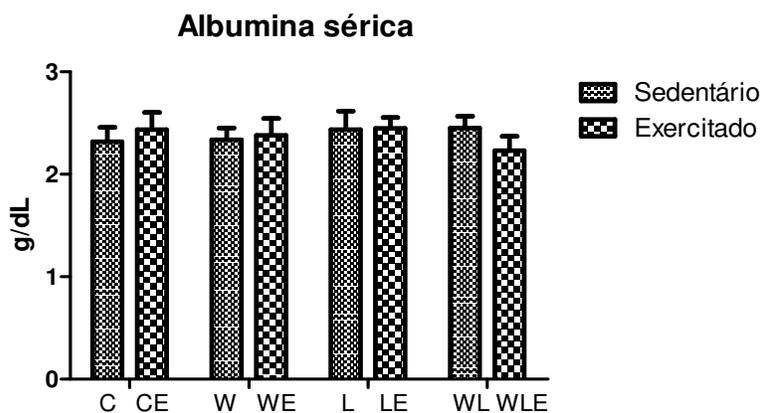


Figura 8: Concentração de albumina sérica (g/dL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle sedentário, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado.

As células tumorais têm como principal fonte energética a glicose e por isso a presença do tumor aumenta o consumo deste substrato. Baixos níveis de glicose em animais portadores de tumor justificam a grande utilização deste, preferencialmente por células neoplásicas ou tumorais (TISDALE, 1999). A musculatura esquelética, durante o exercício físico, compete com as células tumorais pelo uso de glicose circulante, diminuindo a oferta desse substrato para o crescimento neoplásico; como consequência dos efeitos do treinamento há hipoglicemia ou mantém os níveis glicêmicos próximos aos normais. No presente trabalho (Figura 9), pudemos observar que os animais portadores de tumor mostraram hipoglicemia decorrente do estado catabólico induzido pelo crescimento tumoral (W<C). Observamos que o grupo tumor exercitado (WE) também apresentou redução da glicemia em relação ao grupo CE, enquanto que o grupo WLE apresentou redução da glicemia somente em relação aos grupos L e LE. Os animais suplementados com leucina, tanto sedentário quanto exercitado (L e LE) apresentaram tendência à elevação da glicemia (porém não diferente estatisticamente) em relação aos animais eutróficos. A suplementação nutricional não preveniu a hipoglicemia nos animais com tumor, independente do programa de exercício aeróbico, pois os animais WE e WLE apresentaram redução da glicemia similar aos grupos W e WL. Provavelmente, apesar do crescimento tumoral, o exercício e a suplementação nutricional com leucina proporcionaram menor elevação de glucagon nos animais (WE e WLE), sugerindo adaptações metabólicas, que culminam na manutenção de parâmetros como proteinemia e albumemia, preservando a espoliação protéica (SALOMÃO *et al.*, 2010; TISDALE, 2000).

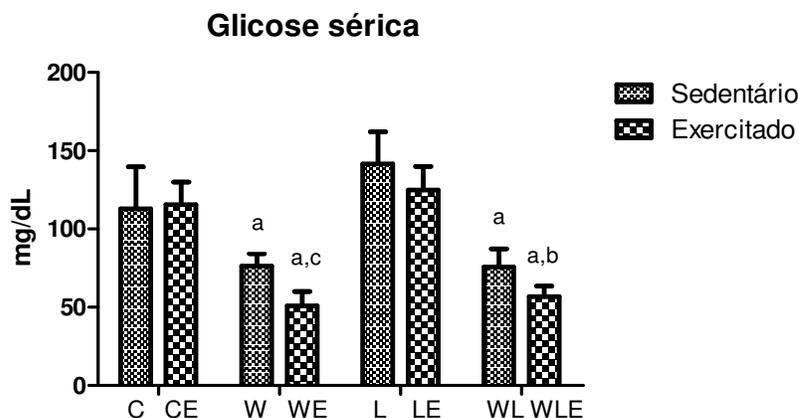


Figura 9: Concentração de glicose sérica (mg/dL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= P< 0,05 quando comparado a C; b= P<0,05 quando comparado com L e LE; c= P<0,05 quando comparado com CE.

O lactato, formado pelo metabolismo anaeróbico da glicose, principalmente na musculatura como também pelo tecido neoplásico, pode ser captado pelo fígado e ser convertido em glicose (via neoglicogênese) (BACURAU & COSTA ROSA, 1997; SALOMÃO *et al.*, 2010). Verificamos que o teor de lactato sérico (Figura 10) dos animais portadores de tumor W, WE e WL, com exceção para os WLE, foi maior que seus respectivos controles (C, CE e L), com diferença estatística apenas para o grupo WE quando comparado com C e CE. Diferentemente, o grupo WLE apresentou laticemia igual ao seu respectivo controle LE (Figura 10). Desse modo, a elevação de lactato verificada nos animais portadores de tumor, do presente estudo, provavelmente foi em decorrência do aumento da metabolização de glicose, principalmente pelo tecido neoplásico, verificada nos grupos W, WE e WL, já que nos animais exercitados não portadores de tumor (CE) não verificamos elevação da concentração de lactato sérico. Embora o lactato esteja aumentado no grupo LE, não foi diferente estatisticamente. Assim, novamente como apontado pela literatura, as vias metabólicas como ciclo de Cori (utilização de glicose – no músculo e/ou células neoplásicas – até a produção de lactato e a conversão deste em glicose pelo fígado)

são acionadas pela presença do tumor levando à espoliação dos tecidos do hospedeiro, culminando assim em desperdício de energia metabólica em prol do tecido neoplásico (BACURAU & COSTA ROSA, 1997, CORI & CORI, 1925).

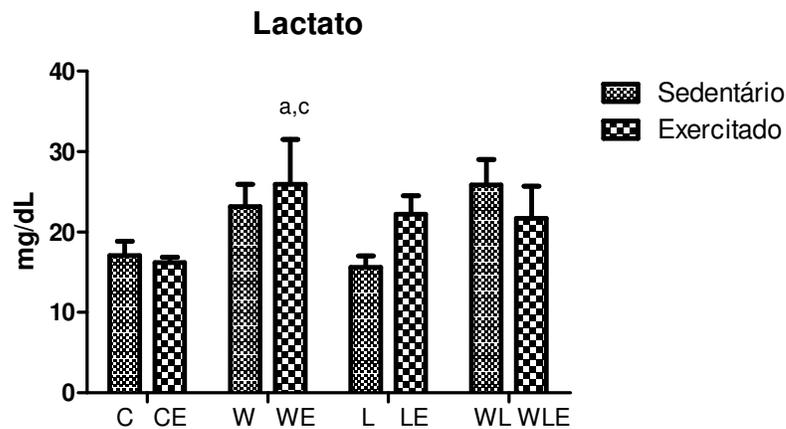


Figura 10: Concentração sérica de lactato sérico (mg/dL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= $P < 0,05$ quando comparado a C; c = $P < 0,05$ quando comparado ao CE.

Alterações hormonais são encontradas em pacientes com câncer como consequência dos efeitos do crescimento tumoral (DANERYD *et al.*, 1995; SALOMÃO *et al.*, 2010; VENTRUCCI *et al.*, 2004; 2007). As Figuras 11A e 11B mostram as concentrações séricas de insulina e glucagon, respectivamente. Corroborando com outros estudos, no presente estudo verificamos que o tumor de Walker também induziu diminuição da secreção de insulina em todos os grupos experimentais (W, WE, WL e WLE) (Figura 11A) em relação aos seus respectivos controles. Ressalta-se que os animais suplementados com leucina (WL) apresentaram concentração sérica de insulina aumentada em relação ao grupo W. Em contrapartida, a concentração sérica de glucagon aumentou em todos os grupos portadores de tumor (W, WE, WL e WLE) em relação aos seus respectivos

controles (C, CE, L, LE), com aumento menos pronunciados nos animais exercitados e também suplementados em relação ao grupo W. As variações dos hormônios anabólicos (sempre relacionados ao estoque energético) estão sempre associadas ao aumento sérico dos hormônios contra-regulatorios, como o glucagon, que por sua vez estão relacionados ao aumento da disponibilidade de substrato energético, principalmente glicose, a ser utilizada via anaeróbia pelas células tumorais (TISDALE, 2009; SALOMÃO *et al.*, 2010, BACURAU & COSTA ROSA, 1997).

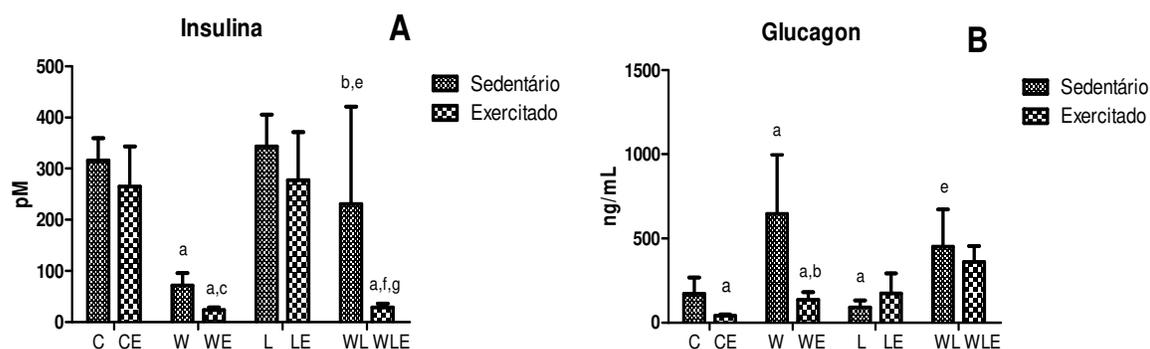


Figura 11: Concentração sérica de **A**- insulina (pM) e **B** – glucagon (ng/mL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= P< 0,05 quando comparado a C; b= P,0,05 quando comparado a W; c= P<0,05 quando comparado a CE; e=P<0,05 quando comparado a L; f=P<0,05 quando comparado a WL; g=P<0,05 quando comparado a LE.

Com a evolução tumoral há também o aumento da liberação de hormônios como catecolaminas, corticosterona e ACTH, que estão relacionados ao estresse e principalmente a disponibilização de substratos a serem utilizados preferencialmente pelas células neoplásicas (TISDALE, 2003; 2005; 2009). Na Figura 12, verificamos importantes alterações nas concentrações séricas de ACTH no grupo portador de tumor sedentário (W) apresentaram-se elevadas em relação a todos os grupos controles e também em relação aos

demais grupos com tumor. Em contrapartida, nos outros grupos experimentais portadores de tumor (WE, WL e WLE) este hormônio manteve-se com níveis normais em comparação ao grupo C, embora, os grupos tumor exercitado (WE) e tumor leucina exercitado (WLE) tenderam a níveis mais elevados que seus respectivos controles (CE e LE), esses dados foram significativamente menores que os animais W. Em estudos prévios, animais portadores de tumor submetidos ao exercício físico e suplementação nutricional com leucina, por longo período, apresentaram elevada concentração de ACTH como no animal sedentário (TONETO *et al*, 2011). Esses dados sugerem que o exercício e/ou leucina provavelmente proporcionaram adaptação ajudando a diminuir o estresse, visto que o aumento na concentração de ACTH indica maior estimulação do córtex da adrenal.

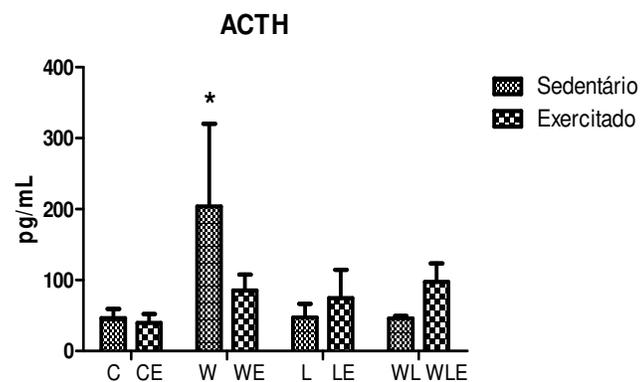


Figura 12: Concentração sérica de ACTH (pg/mL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. *P<0,05 quando comparado aos demais grupos.

Concordante com a situação de estresse promovido pela evolução neoplásica, os valores séricos de corticosterona (Figura 13A) tenderam ao aumento em todos os animais com tumor (W, WE, WL e WLE), com valores significativos para os grupos W e WLE (Figura 13A). Quando observamos o hormônio corticosterona liberado no meio de

cultura da glândula adrenal (Figura 13B) verificamos que a secreção desse hormônio foi reduzida no grupo controle exercitado (CE) quando comparado com o grupo controle (C), sugerindo que a produção de corticosterona e, conseqüente, liberação estavam concordantes com a situação de adaptação ao treinamento físico. Contrariamente ao observado na concentração sérica, a secreção elevada pela glândula adrenal no grupo tumor exercitado leucina (WLE) quando comparado com o grupo tumor sedentário leucina (WL) e leucina exercitado (LE), sugere resposta adaptativa que requer maiores investigações.

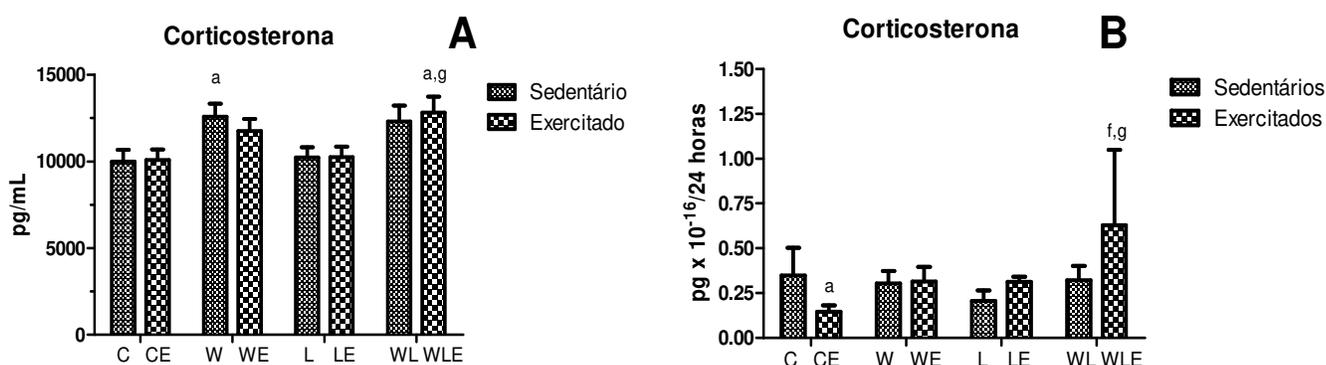


Figura 13: Concentração de Corticosterona em **A** - soro (pg/mL) e **B** - meio de cultura (pg x 10⁻¹⁶/ 24 horas) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado a= P< 0,05 quando comparado a C; f= P<0,05 quando comparado a WL; g=P<0,05 quando comparado a LE.

Podemos observar na Figura 14, a concentração de ácido ascórbico no homogenizado da glândula adrenal (Figura 14A) e liberada no meio de cultura primária da glândula adrenal (Figura 14B) dos diferentes grupos experimentais. Observamos que os grupos controle exercitado, tumor exercitado e tumor leucina sedentário (CE, WE e WL, respectivamente) apresentaram elevação da concentração de ácido ascórbico do homogenizado glandular em relação do grupo controle sedentário (C). Por outro lado, a concentração de ácido ascórbico no meio de cultura da glândula adrenal não apresentou

variações estatisticamente significativas entre os grupos. A concentração de ácido ascórbico na glândula adrenal representa importante substrato para a síntese de corticosterona, assim o conteúdo total desse componente representa o inverso da liberação do hormônio corticosterona para a circulação sanguínea. Assim a menor concentração verificada nos homogenizados glandulares dos animais com tumor sugere maior síntese e liberação desse hormônio, e conseqüente atuação nos tecidos do hospedeiro induzindo mobilização de substratos. Esses dados podem ser extrapolados para aqueles verificados no meio de cultura primária da adrenal, os grupos com tumor (W e WL) apresentaram ligeiro aumento da concentração de ácido ascórbico no meio, sugerindo menor conteúdo na glândula e indiretamente maior liberação de corticosterona (Figura 14B). No presente estudo, verificamos que essa situação ocorreu independentemente do treinamento ou suplementação nutricional a que esses animais com tumor foram submetidos.

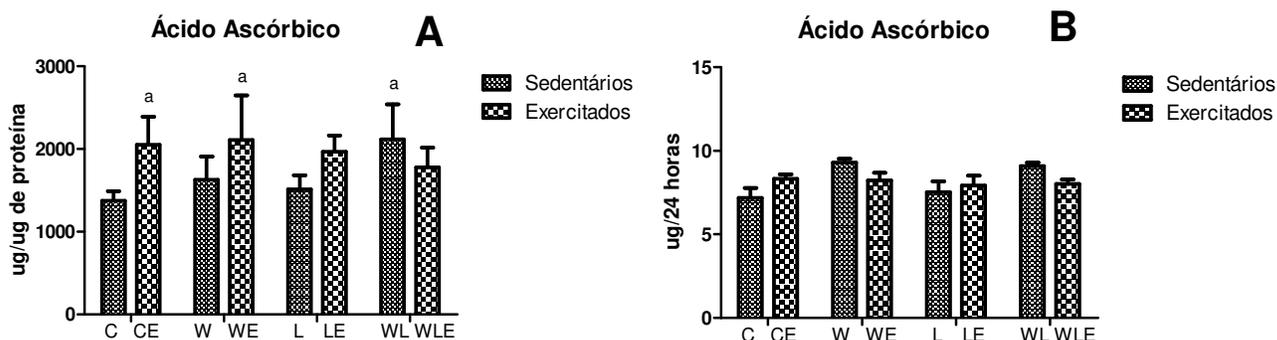


Figura 14: Concentração de ácido ascórbico no **A** - homogeneizado da glândula adrenal (ug/ug de proteína) e **B** - meio de cultura (ug/24 horas) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= P< 0,05 quando comparado a C.

Analisamos o nível de catecolaminas a partir do homogeneizado da adrenal (Figura 15A) e também no meio de cultura de células da adrenal (Figura 15B). Observamos

que na Figura 15A, os animais portadores de tumor (W, WE e WL) além dos grupos CE e LE, apresentaram níveis de catecolaminas elevados em relação aos seus respectivos controles, porém o grupo tumor leucina exercitado (WLE) tendeu a redução da concentração de catecolaminas em relação ao controle leucina sedentário (L) e ao grupo tumor leucina sedentário (WL). Na Figura 15B, observamos os grupos WL e WLE apresentaram maiores níveis de secreção de catecolaminas em relação aos seus respectivos controles (L e LE), onde o grupo WL mostrou diferença estatística em relação ao grupo leucina sedentário (L). Animais suplementados com leucina sedentários (L) e leucina exercitados (LE) apresentaram níveis reduzidos de catecolaminas liberadas no meio de cultura em relação ao grupo controle sedentário (C), porém na análise estatística indicou probabilidade maior que 5%.

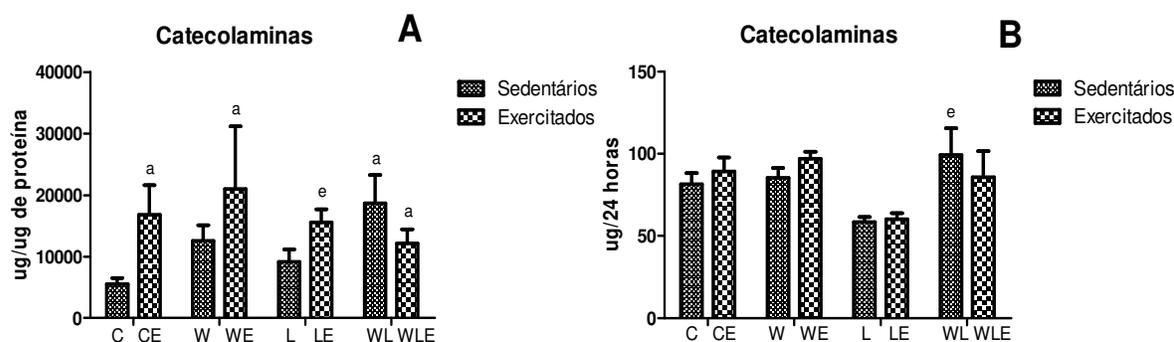


Figura 15: Concentração de Catecolaminas no **A** - homogeneizado da glândula adrenal (ug/ug de proteína) e **B** - meio de cultura (ug/24 horas) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= P< 0,05 quando comparado a C; e=P<0,05 quando comparado a L.

O hormônio amilina, co-secretado com insulina e também relacionado à distribuição e estoque energético, também foi avaliado (Figura 16) e o perfil sérico desse hormônio apresentou-se reduzido em todos os grupos portadores de tumor em relação aos seus respectivos controles com exceção do grupo tumor sedentário (W). A suplementação

de leucina promoveu nos grupos não portadores de tumor aumento da concentração sérica de amilina, tanto para o grupo sedentário (L) quanto para o grupo exercitado (LE) em comparação aos demais grupos. Esses dados corroboram com os dados da literatura, onde reportam que os hormônios anabólicos (insulina e amilina) estão relacionados com a disponibilidade de energia estocada para os processos de intensa atividade, como atividade física ou mesmo processos patológicos que envolvem elevada espoliação desses estoques. Assim, os animais com tumor apresentaram menor concentração sérica de insulina e amilina, demonstrando que há intenso processo catabólico e de dispêndio energético, agora suportado pelos hormônios contra-regulatórios.

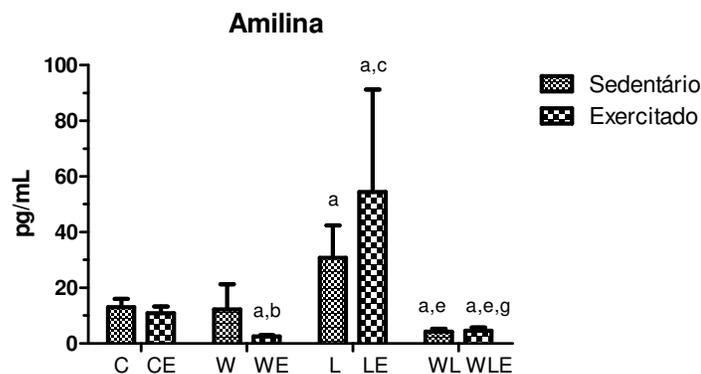


Figura 16: Concentração sérica de amilina (pg/mL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= $P < 0,05$ quando comparado a C; b= $P < 0,05$ quando comparado a W; c= $P < 0,05$ quando comparado a CE; e= $P < 0,05$ quando comparado a L; g= $P < 0,05$ quando comparado a LE.

Nesse mesmo raciocínio, a disponibilidade de nutrientes e glicose plasmática estimula a secreção do hormônio GLP-1, que por sua vez estimula a secreção de insulina. Os grupos portadores de tumor W, WE e WLE, assim como o grupo CE, (Figura 17) apresentaram concentrações séricas reduzidas de GLP-1 em relação ao grupo controle (C), com diferenças estatisticamente significativas. Esses dados novamente corroboram com o

fato de intenso dispêndio energético instalado no organismo portador de tumor. Assim, o crescimento tumoral causa importantes alterações hormonais nos pacientes com câncer e também em animais experimentais (DANERYD *et al.*, 1995; SALOMÃO *et al.*, 2010; VENTRUCCI *et al.*, 2004; 2007), que culminam em aumento da disponibilidade de substrato energético, principalmente glicose, que por sua vez é desviada, causando hipoglicemia, para ser utilizada pelas células tumorais (TISDALE, 2009; SALOMÃO *et al.*, 2010, BACURAU & COSTA ROSA, 1997).

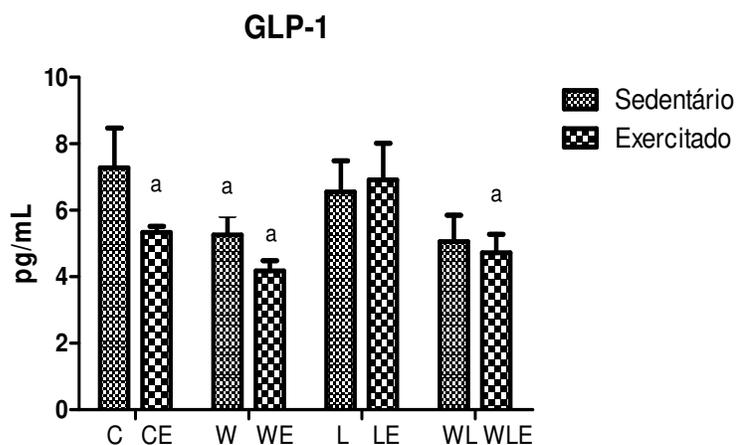


Figura 17: Concentração sérica de GLP-1 (pg/mL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= P< 0,05 quando comparado a C.

Como mencionado acima, a evolução tumoral, no presente estudo o carcinossarcoma de Walker, promoveu alterações na liberação de hormônios como catecolaminas, corticosterona e ACTH, além da elevação dos hormônios contra-regulatórios e diminuição da insulina, que estão relacionados ao estresse e principalmente a disponibilização de substratos a serem utilizados preferencialmente pelas células neoplásicas (TISDALE, 2003; 2005; 2009).

Estudos mostram que a diminuição da concentração sérica de melatonina corresponde à maior incidência de neoplasia ou também ao aumento da evolução tumoral (MIRIK & DAIRS, 2008). Embora não diferente estatisticamente, o hormônio melatonina tendeu a redução nos grupos implantados com tumor, em relação aos respectivos controles, como mostra a Figura 18; essa tendência mostrou-se ainda mais acentuada quando houve associação entre suplementação nutricional e exercício físico. Em nossos resultados a concentração sérica deste hormônio encontra-se menor em todos os grupos portadores de tumor, quando comparada aos respectivos controles, assim como o hormônio amilina. Esses dados são condizentes com a porcentagem do peso tumoral que permaneceu semelhante em todos os grupos independente do exercício físico ou suplementação nutricional.

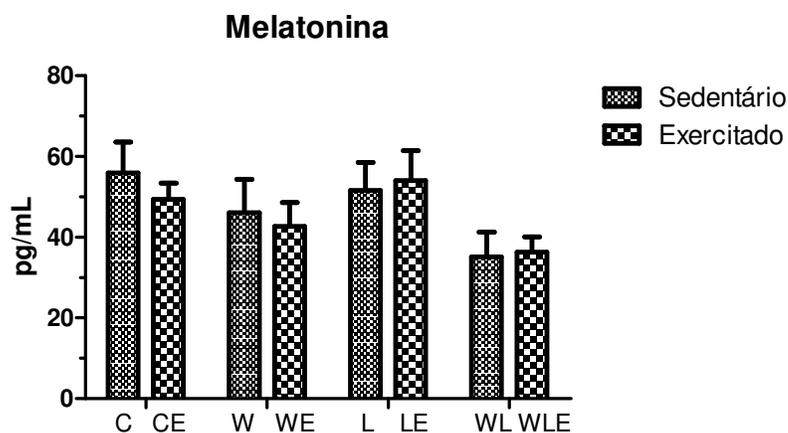


Figura 18: Concentração sérica de melatonina (pg/mL) dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado.

A literatura mostra que a variação das citocinas séricas está intimamente relacionada à alteração do metabolismo de carboidratos, lipídeos e de proteínas (ARGILES *et al.*, 2005 e 2011). IL-6, TNF- α e INF- γ são reconhecidas como mediadoras do processo

caquético, principalmente pela resposta pró-inflamatória ocorrida nesse estado durante o câncer (TISDALE, 1997; 2009; ARGILES *et al.*, 2011). Altas concentrações plasmáticas dessas citocinas são observadas em pacientes com câncer e podem estar envolvidas com a perda de peso não relacionada à anorexia (INUI, 2002).

Análise de citocinas séricas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias pode ser observada na Figura 19. Os resultados referentes a IL-4, citocina anti-inflamatória, (Figura 19A) mostraram que a concentração sérica dessa citocina foi elevada em todos os grupos submetidos ao exercício físico, com exceção para o grupo portador de tumor submetido a dieta rica em leucina (WLE), porém ressalta-se que o grupo tumor leucina sedentário (WL) apresentou concentração mais elevada em relação ao respectivo controle (C e L). Já os demais grupos com tumor (W, WE e WLE), mostraram valores séricos da IL-4 mais baixos em relação aos respectivos controles (Figura 19A).

No mesmo contexto, a citocina IL-10, também outra citocina anti-inflamatória, apresentou-se bastante elevada no soro em todos os grupos portadores de tumor, quando comparados aos respectivos controles, ressaltando que esse aumento foi independente do padrão nutricional e/ou de treinamento (Figura 19C). A relação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória sempre estará aumentada, mesmo que IL-10 esteja elevada nesses animais (ARGILÉS, 1999). A IL-4, assim como a IL-10, é uma citocina anti-inflamatória que inibe o processo pró-inflamatório (pró-caquético) bloqueando a produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) (ARGILES, 1999). Assim, alterações no balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias causam diversas complicações na saúde encontradas em patologias como câncer-caquexia (ARGILES, 2003 e LIRA *et al.*,

2009). Aumento nos níveis séricos de IL-10 foi observado, no presente estudo, em todos os grupos portadores de tumor, como também foi encontrado em outras pesquisas (SALOMÃO *et al.*, 2010), sugerindo que nesses animais, em função da evolução tumoral, há o processo inflamatório crônico instalado pela caquexia, e que esses processos podem ser modulados, em parte, pela associação do exercício físico e suplementação nutricional.

Como mencionado, o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias revela o estado em que a patologia pode estar sendo direcionado. Assim, a IL-6, citocina pró-inflamatória, apresentou-se elevada no soro do grupo exercitado CE em relação ao controle C (Figura 19B). A suplementação nutricional com leucina não alterou o padrão sérico de IL-6, porém quando associada ao exercício físico houve redução da concentração sérica de IL-6 (LE < C e L). Com relação aos grupos portadores de tumor, verificamos que não houve variação da IL6 nos grupos W e WE em relação ao C, porém os grupos WL e WLE apresentaram elevação da IL-6 em relação ao grupo W e também aos demais grupos experimentais (Figura 19B).

INF- γ , outra citocina pró-inflamatória, apresentou concentração reduzida nos animais treinados CE, em relação ao controle, por outro lado os grupos suplementados com dieta rica em leucina não apresentaram variação da concentração dessa citocina em relação aos respectivos grupos (C=L=LE) (Figura 19D). Quanto aos grupos com tumor, observou-se concentração de INF- γ semelhante no grupo W em relação ao C, porém houve elevação dessa citocina no soro do grupo WE em relação ao grupo CE. Já os grupos suplementados com leucina, WL e WLE, apresentaram concentração séricas de INF- γ reduzida quando comparados aos seus respectivos controles L e LE e também em relação aos grupos W e WE (Figura 19D).

Os resultados referentes à dosagem de TNF- α (fator de necrose tumoral) sérico (Figura 19E) mostraram que essa citocina pró-inflamatória elevou-se em todos os grupos com tumor (W, WE, WL e WLE) em relação aos seus respectivos controles, sendo W e WL diferentes estatisticamente em relação ao controle (C) e WLE diferente estatisticamente em relação ao controle e leucina exercitado (C e LE). No presente estudo, observamos aumento na concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e INF- γ nos grupos portadores de tumor, quando comparados aos grupos controles, corroborando com a literatura. Estas citocinas estão relacionadas com a perda de massa magra, sendo esse fator relacionado com mudanças no metabolismo de carboidratos e principalmente com a degradação de proteína, fornecendo aminoácidos que são direcionados a neoglicogênese – glicose – fornecendo energia ao crescimento neoplásico (SALOMÃO *et al.*, 2010; CORI & CORI, 1925; LIRA *et al.*, 2011). AL-MAJID & WATERS (2008) mostraram que os efeitos da inflamação crônica são produzidos por citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento do processo de caquexia. Pelo fato da IL-6 ser uma miocina que é produzida e liberada durante a contração muscular, ela também pode estar elevada nos animais exercitados (BRUUNSGAARD *et al.*, 1997).

Nossos dados condizem com a literatura, pois observamos ligeiro aumento da IL-6 nos animais treinados (CE), porém esses valores foram bastante elevados nos animais com tumor (WL e WLE) independente da suplementação nutricional ou treinamento físico. Além disso, a IL-6 parece ser benéfica para a regulação da insulina no metabolismo da glicose no músculo esquelético, no caso dos animais exercitados (SALOMÃO *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2009), como também pode estar participando dos processos adaptativos para disponibilização de substratos energéticos para os tecidos do hospedeiro bem como para o

tecido neoplásico, como observados em animais portadores de tumor. Níveis séricos de IL-6 são elevados antes do aparecimento de outras citocinas e este fato, também, foi observado em animais exercitados (SALOMÃO *et al.*, 2010). A concentração elevada de TNF- α nos animais com tumor sugere a participação dessa citocina também nos processos de mobilização tecidual, como verificado pela redução do tecido adiposo desses animais além do processo de inibição de síntese protéica (SALOMÃO *et al.*, 2010, LIRA *et al.*, 2011).

Esse trabalho também mostrou que a concentração de leptina sérica tende a ser mais baixa nos animais portadores de tumor, assim como vemos na literatura (ARGILES, 1999; 2005), implicando em menor reserva energética e também relacionada ao estado de anorexia verificado nesses animais. Em contrapartida, o grupo CE apresentou aumento da concentração de leptina em relação ao grupo C, sugerindo que houve manutenção das reservas energéticas provavelmente em função do exercício. Por outro lado, interferon são glicoproteínas que são sintetizadas e liberadas pelas células do hospedeiro em resposta também a presença de células tumorais (ARGILÉS, 2005 e 2011); participam preferencialmente do sistema de defesa imunológico, principalmente ativando células *natural killer* e macrófagos, aumentando o reconhecimento celular de defesa (HUTNICK *et al.*, 2004). Com a associação exercício físico e câncer os padrões de citocinas, principalmente, INF- γ não foi alterado nesses animais experimentais.

Como apresentado nesse trabalho, verificamos que o exercício físico diminuiu a concentração sérica de INF- γ no grupo CE, porém esse efeito não foi visualizado nos animais portadores de tumor e submetidos ao exercício (WE), concordante com a literatura. Porém quando associamos a suplementação nutricional, verificamos que os animais dos grupos WL e WLE apresentaram diminuição da concentração, sugerindo que, houve de

alguma forma, modulação do sistema imunológico nesses animais beneficiando essa resposta em função da adaptação ao processo espoliativo do crescimento tumoral.

A leptina está diretamente relacionada à distribuição e quantidade de lipídeos bem como a disponibilidade energética do organismo, além da influencia direta com o estado pró-inflamatório. Assim, a análise da concentração de leptina no soro mostrou que essa foi elevada no grupo CE em relação ao C, porém a suplementação nutricional não alterou o padrão sérico de leptina (L=LE=C) (Figura 19F). Por outro lado, analisando os animais portadores de tumor verificou-se que houve redução da concentração sérica de leptina nos W, WE e WLE em relação aos respectivos controles (C, CE e WL, respectivamente) (Figura 19F), porém o grupo com tumor WL mostrou manutenção da concentração de leptina, sendo similar ao grupo L. Em trabalhos prévios, verificamos que houve intensa espoliação do tecido adiposo, sugerindo que essa seja uma das causas para redução da concentração de leptina serica (SALOMÃO *et al*, 2010; SALOMÃO & GOMES-MARCONDES, 2012).

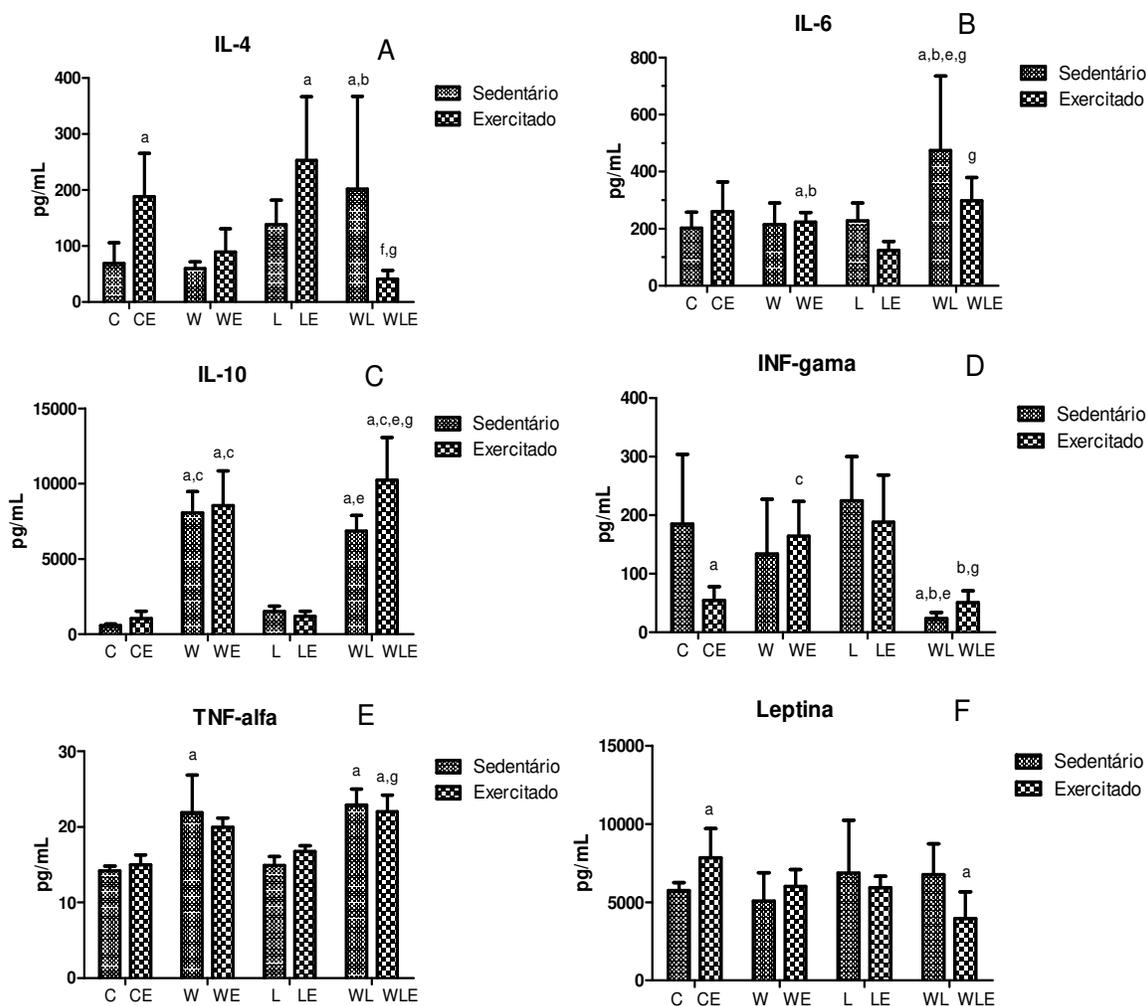


Figura 19: Concentração sérica de citocinas - IL4 (A), - IL6 (B), - IL10 (C), - INF gama (D), - TNF alfa (E) e Leptina (F), dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= P< 0,05 quando comparado a C; b= P<0,05 quando comparado a W; c= P<0,05 quando comparado a CE; e=P<0,05 quando comparado a L; f=P<0,05 quando comparado a WL; g=P<0,05 quando comparado a LE.

Com o propósito de analisar a atividade da glândula adrenal frente a situação de estresse, processo inflamatório crônico e restrição alimentar (anorexia), todos induzidos pelo crescimento tumoral, fizemos análises das concentrações de citocinas no meio de cultura primária da glândula adrenal (Figura 20).

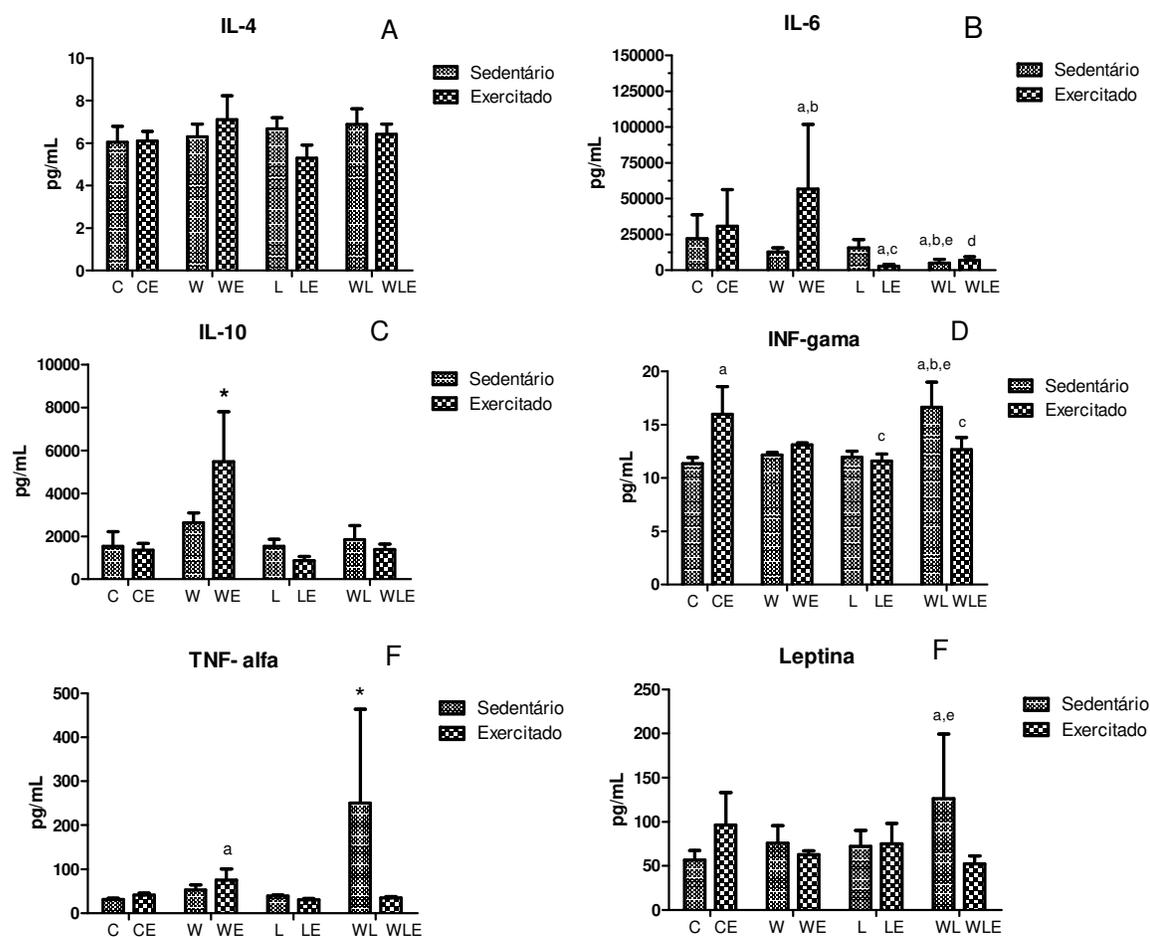


Figura 20: Concentração das citocinas - IL4 (A), - IL6 (B), - IL10 (C), - INF gama (D), - TNF alfa (E) e leptina (F) –, no meio de cultura de adrenais dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. * $P < 0,05$ quando comparado aos demais grupos; a= $P < 0,05$ quando comparado a C; b= $P < 0,05$ quando comparado a W; c= $P < 0,05$ quando comparado a CE; d= $P < 0,05$ quando comparado a WE; e= $P < 0,05$ quando comparado a L.

Quando analisamos os resultados referentes à concentração de IL-4 no meio de cultura, verificamos que os grupos não portadores de tumor apresentaram valores similares dessa citocina, tendendo a elevação no grupo L e redução no grupo LE em relação aos grupos C e CE (Figura 20A). O grupo portador de tumor W apresentou valor semelhante ao grupo C, enquanto os grupos WE e WL mostraram ligeira elevação da IL-4 no meio, em relação ao W; o grupo WLE apresentou resultado semelhante ao grupo W (Figura 20A).

Por outro lado, a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 no meio de cultura mostrou-se similar em todos os grupos sem tumor (C=CE=L) com tendência a

decréscimo no grupo LE (Figura 20C). Com relação aos grupos com câncer, verificou-se que tanto o grupo sedentário quanto exercitado (W e WE) apresentaram concentração dessa citocina elevada em relação aos respectivos controles ($W > C$ e $WE > CE$). Quando associou-se suplementação nutricional, a leucina proporcionou manutenção da concentração de IL-10 no meio de cultura ($WL = L$ e $WLE = L$) (Figura 20C). Esses dados revelaram padrão similar àquele verificado na concentração sérica. Assim, a presença do câncer causa processos adaptativos que envolvem alterações no balanço de citocinas pró e antiinflamatórias.

Quanto à presença de IL-6, no meio de cultura da adrenal, observamos os grupos suplementados com leucina (L e LE) apresentaram redução da concentração em relação aos grupos C e CE (Figura 20B); quanto aos grupos portadores de tumor, verificou-se que nos grupos W e WL a concentração de IL-6 no meio foi menor que nos respectivos grupos ($W < C$; $WL < L$), em contrapartida o grupo exercitado com tumor WE apresentou elevada concentração dessa citocina em relação aos grupos CE e W, quando houve associação com suplementação nutricional (WLE) houve manutenção da concentração da citocina no meio de cultura ($WLE = LE$) (Figura 20B).

Quanto à avaliação do INF- γ no meio de cultura da glândula adrenal, observamos que o exercício físico proporcionou elevação da concentração em relação ao grupo sedentário ($CE > C$), porém a suplementação nutricional manteve os valores semelhantes ($C = L = LE$) (Figura 20D). Com relação aos grupos portadores de tumor (W, WE, WL e WLE), todos apresentam tendência ao aumento dessa citocina quando comparados ao grupo controle e também ao respectivo controle (sendo WL diferente

estatisticamente), com exceção para o grupo WE que foi menor que o CE, visto que esse grupo foi maior que os demais (Figura 20D).

Os resultados referentes à dosagem de TNF- α (fator de necrose tumoral) no meio de cultura primária da glândula adrenal mostraram que os valores foram similares entre os grupos controles (C=L=CE=LE) (Figura 20E), porém ao analisarmos os grupos portadores de tumor, observamos concentração de TNF no meio de cultura mais elevado em todos os grupos com tumor (W>C; WE>CE; WL>L; com exceção para o grupo WLE = LE) (Figura 20E).

A concentração de leptina no meio de cultura da glândula adrenal (Figura 20F) foi similar entre os grupos controles com exceção para o grupo exercitado (C=L=LE; CE>C). Com relação aos grupos portadores de tumor, verificamos que os grupos W e WL apresentaram elevação da concentração de leptina, no meio, quando comparada aos seus respectivos controles, com diferenças estatísticas apenas para o grupo WL em relação a C, CE e L; diferentemente nos grupo WE e WLE, a concentração de leptina no meio foi reduzida em comparação aos respectivos controles (WE<CE; WLE<LE).

Verificamos também, com o intuito de avaliar a atividade celular da glândula adrenal, que a atividade enzimática da fosfatase alcalina foi reduzida nas adrenais dos grupos controle exercitado (CE), leucina exercitado (LE) e tumor sedentário (W) quando comparados com o grupo controle sedentário (C) (Figura 21). Também observamos maior atividade desta enzima nos grupos tumor exercitado (WE) e tumor leucina exercitado (WLE) quando comparados com W e LE, respectivamente. Sugerimos que este resultado se deve pelo fato dos animais portadores de tumor exercitados e/ou não suplementados com

leucina apresentarem maior atividade desta glândula que é responsável pela liberação de hormônios catabólicos e à adaptação ao estresse.

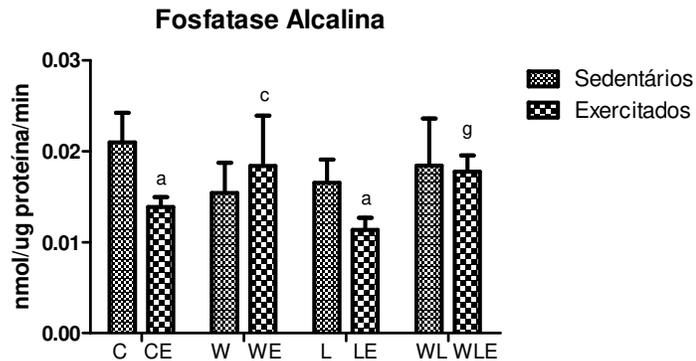


Figura 21: Atividade da enzima fosfatase alcalina no homogeneizado da glândula adrenal dos animais experimentais submetidos à dieta rica em leucina, treinamento físico e implante tumoral. **Legenda:** (C) controle, (CE) controle exercitado, (W) tumor, (WE) tumor exercitado, (L) leucina, (LE) leucina exercitado, (WL) tumor leucina, (WLE) tumor leucina exercitado. a= $P < 0,05$ quando comparado a C; c= $P < 0,05$ quando comparado com CE; g= $P < 0,05$ quando comparado com LE.

Assim, o presente trabalho mostrou a influência deletéria do desenvolvimento neoplásico e que esses processos podem ser modulados ou parcialmente beneficiados quando propusemos e verificamos que o exercício e a suplementação de leucina tendem a melhorar o estado caquético desses animais.

5. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pudemos concluir que:

A evolução do carcinossarcoma de Walker causa alteração no hospedeiro condizente com o processo de caquexia, semelhante ao observado em pacientes com câncer.

A suplementação nutricional exerce efeitos positivos quanto à manutenção do peso corpóreo, garantindo padrões hormonais; além da manutenção de alguns parâmetros, incluindo glicemia, proteinemia e albuminemia, preservando a espoliação protéica.

O exercício físico de intensidade leve-moderada proporciona modulação da secreção de hormônios catabólicos, como ACTH e corticosterona.

A evolução do carcinossarcoma de Walker 256 associado ou não a suplementação de leucina e/ou exercício físico proporciona alteração da resposta do sistema imunológico, como por exemplo, aumento de algumas citocinas anti-inflamatórias, além de redução de citocinas pro-inflamatórias.

A suplementação nutricional de leucina associada ao exercício físico proporciona melhoras do estado caquético dos animais em relação à adaptação ao estresse provocado pelo tumor. Os efeitos produzidos pelo exercício físico foram mais evidentes quando houve associação com a suplementação nutricional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAJID, S.; MCCARTHY, D. O. **Cancer-induced fatigue and skeletal muscle wasting: the role of exercise.** *Biol. Res. Nurs.*, 2: 186-197, 2001.

AL-MAJID, S.; WATERS, H. **The biological mechanisms of cancer-related skeletal muscle wasting: the role of progressive resistance exercise.** *Biol. Res. Nurs.*, 1: 7-20, 2008.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. **The role of cytokines in cancer cachexia.** *Med. Res. Rev.*, 19(3): 223-48, 1999.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. **Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia.** *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 6: 401-6, 2003.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTINEZ, C. LÓPEZ-SORIANO, F. J. **Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future.** *Nutrition*, 21: 977–985, 2005

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. **Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia.** *Eur. J. Pharmacol.* 2011 doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.007

ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T. G. & LAYMAN, D. K. **Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise.** *J. Nutr.* 12:1102-1106, 1999.

ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T. G. KIMBALL, S. R. & JEFFERSON, L. S. **Signalling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine.** *J. Nutr.* 131: 856-860S, 2001.

ANTHONY, J. C.; LANG, C. H.; CROZIER, S. J.; ANTHONY, T. G.; MACLEAN, D. A.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. **Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine.** *Am. J. Physiol.* 282: 1092-1101 E, 2002.

BACURAU, R. F. P.; COSTA ROSA, L. F. B. P. **Efeitos do exercício sobre a incidência e desenvolvimento do câncer.** *Rev. paul. Educ. Fís.*, 11 (2):142-47, 1997.

BATISTA, M. L.; PERES, S. B.; MCDONALD, M. E.; ALCANTARA, P. S. M.; OLIVAN, M.; OTOCH, J. P.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M. **Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors.** *Cytokine*, 57 (1):9-16, 2012.

BENNANI-BAITI, N. & WALSH, D. **Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome.** *Supp. C. Canc.*, 19(9):1451-63, 2010.

BLACK, J. M.; NESHEIM, M. C.; KINSELLA, J. E. **Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma.** *Brit. J. Nutri.*, 71: 283-294, 1994.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.** *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T. L.; MACLEAN, D. A.; PEDERSEN, B. K. **Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage.** *J. Physiology*, 499.3,833-841, 1997.

CONTARTEZE, R. V. L.; MANCHADO, F. de B.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. de. **Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato.** *Rev. Bras. Med. Esp.*, 13(3): 169-174, 2007.

CORI, C. F.; CORI, G. T. **The carbohydrate metabolism of tumors.** *J. Biol. Chem.*, 64:11-22, 1925.

CREVENNA, R.; SCHMIDINGER, M.; KEILANI, M.; NUR, H.; ZOCH, C.; ZIELINSKI, C.; FIAKAMOSER, V.; QUITTAN, M. **Aerobic exercise as additive palliative treatment for a patient with advanced hepatocellular cancer.** *Wien. Med. Wochenschr.*, 153(9-10):237-40, 2003.

CROWE, M. J.; WEATHERSON, J. N.; BOWDEN, B. F. **Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance.** *Eur. J. Appl. Physiol.*, 97: 664–672, 2006.

DANERYD, P. L.; HAFSTROM, L. R.; KARLBERG, I. H. **Effects of spontaneous physical exercise on experimental cancer anorexia and cachexia.** *Eur. J. Canc.*, 26: 1083-1088, 1990.

DANERYD, P.; WESTIN, T.; EDSTRÖM, S.; SOUSSI, B. **Tumour purine nucleotides and cell proliferation in response to exercise in rats.** *Eur. J. Canc.*, 31: 2309-2312, 1995.

DHANAPAL, R.; SARASWATHI, T. R.; RAJKUMAR, G. N. **Cancer Cachexia.** *J. Oral Maxillofac. Pathol.*; 15: 257-260, 2011.

DIMEO, F.; RUMBERGER, B.G.; KEUL, J. **Aerobic exercise as therapy for cancer fatigue.** *Med. Scien. Sport. Exerc.* 30: 475-478, 1998.

DIMEO, F.; SCHWARTZ, S.; FIETZ, T.; WANJURA, T.; BONNING, D.; THIEL, E. **Effects of endurance training on the physical formance of patients with hematological malignancies during chemotherapy.** *Support. Care Cancer*, 11(10): 623-628, 2003.

DUNCAN, K.; HARRIS, S.; ARDIES, C. M. **Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes.** *Canc. Letters.*, 116:151-158, 1997.

ELEY, H. L.; RUSSEL, S. T; TISDALE, M. J. **Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia.** *J. Biochem.* 407: 113-120, 2007.

EMERY, P. W. **Cachexia in experimental models.** *Nutrition.* 15:600–603, 1999.

FOUREAUX, G.; PINTO, K. M. C.; DAMASO, A. **Efeito do Consumo Excessivo de Oxigênio após Exercício da Taxa Metabólica de Repouso no Gasto Energético.** *Rev. Bras. Med. Esp.*, 12(6):393-398, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animals cells: a manual of basic technique.** *Willey-Liss, Inc.* 3rd ed., New York, 1994.

GAD, S. C. & WEIL, C. S. **Statistic for toxicologists**. In: Wallace H (editor), *Principles and Methods of toxicology*. Raven Press Ltda., New York, 221-274, 1994.

GOMES-MARCONDES, M. C; CURY L; CURI R. **Consequences of Walker 256 tumor grown for the placental/fetal development in rats**. *Cancer Res. Ther. Cont.*, 5: 277-283, 1998.

GOMES-MARCONDES, M. C.; VENTRUCCI, G.; TOLEDO, M. T.; CURY, L.; COOPER, J. C. **A leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats**. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36: 1589-1594, 2003.

GROSSBERG, A. J, SCARLETT, J. M.; MARKS, D. L. **Hypothalamic mechanisms in cachexia**. *Physiol. Behav.* 100(5): 478-89, 2010.

HOLECEK, M. D. **Relation between glutamine; branched-chain amino acids; and protein metabolism**. *Nutrition*, 18: 130-133, 2002.

HUTNICK, N. A.; WILLIAMS, N. I.; KRAEMER, W. J.; ORSEGA-SMITH, E.; DIXON, R. H.; BLEZNAK, A. D.; MASTRO, A. M. **Exercise intervention and Th1 (IFN-gamma) and Th2 (IL-6) cytokines following chemotherapy for breast cancer**. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 45: abstract#667, 2004.

INCA – **Estimativas 2010, Incidência do cancer no Brasil, 2009**. Disponível em http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=227/setembro/2011.

INUI, A. **Cancer anorexia-caquexia syndrome**. *Cancer Res.*, 59: 4493-4501, 1999.

INUI, A. **Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management**. *CA Cancer J. Clin.*, 52: 72-91, 2002.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M. J. **Cancer Statistics, 2009**. *CA Cancer J. Clin.*, 59:225-249, 2009

KARBOWNIK, M.; LEWINSKI, A.; REITER, R. J. **Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants.** *Int. J. Biochem. Cel. Biol.*; 33:735–753, 2001.

KELNER, K. L.; LEVINE, R. A.; MORITA, K.; POLLARD, H. B. **A comparison of trihydroxyindole and HPL/electrochemical methods for catecholamines measurement in adrenal chromaffin cells.** *Neurochem. Int.*; 7:373-376, 1985.

KIM, J. H.; BACHMANN, R. A.; CHEN, J. **Interleukin-6 and insulin resistance.** *Vitam. Horm.*; 80:613-633, 2009.

KNOLS, R.; AARONSON, N. K.; UEBELHARI, D.; FRANSEN, J.; AUFDENIKANPE, G. **Physical exercise in cancer patients during and after medical treatment: A systematic review of randomized and controlled clinical trials.** *J. Clin. Oncol.* 23(16): 3830-3841, 2005.

LIMA, C.; ALVES, L. E.; IAGHER, F.; MACHADO, A. F.; BONATTO, S. J.; KUCZERA, D.; SOUZA, C. F.; PEQUITO, D. C.; MURITIBA, A. L.; NUNES, E. A.; FERNANDES, L. C. **Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats.** *Eur. J. Appl. Physiol.*; 104:957–964, 2008.

LIRA, F. S.; TAVARES, F. L.; YAMASHITA, A. S.; KOYAMA, C. H.; ALVES, M. J.; et al.: **Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats.** *Cell Biochem. Funct.*, 26, 701-708, 2008.

LIRA, F. S.; YAMASHITA, A. S.; ROSA, J. C.; TAVARES, F. L.; CAPERUTO, E. CARNEVALI JR, L. C.; PIMENTEL, G. D.; SANTOS, R. V. T.; BATISTA JR, M. L.; LAVIANO, A.; ROSSI-FANELLI, F.; SEELAENDER, M. **Hypothalamic inflammation is reversed by endurance training in anorectic cachectic Rats.** *Nutr. Metabol.*, 8:60, 2011.

LUCIA, A.; EARNEST, C.; PÉREZ, M. **Cancer-related fatigue: can exercise physiology assist oncologists?** *Lancet. Oncol.*, 4: 616-625, 2003.

MAGNÉ, N.; MELIS, A.; CHARGARI, C.; CASTADOT, P.; GUICHARD, J.; BARANI, D.; NOURISSAT, A.; LARGILLIER, R.; JACQUIN, J.; CHAUVIN, F.; MERROUCHE, Y. **Recommendations for a lifestyle which could prevent breast cancer and its relapse: Physical activity and dietetic aspects.** *Crit. Rev. Oncol/Hematol.*, 2011 doi:10.1016/j.critrevonc.2011.01.013

MANTOVANI, G.; MADEDDU, C. **Cancer cachexia: medical management.** *Support. Care Cancer.*; 18:1–9, 2010.

MARTINS, M. J.; NEGRAO, M. R. & HIPOLITO-REIS, C. **Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated.** *Clin. Biochem.* 34(6): 463-468, 2001.

MATTHEWS, D. E. **Observations of branched-chain amino acid administration in humans.** *J. Nutr.*, 135: 1580S - 1584S, 2005.

MINDLIN, R. L.; BUTTLER, A. M. **The determination of ascorbic acid in plasma. A micromethod.** *J. Biol. Chem.*, 122: 673-85, 1938.

MIRIK, D. K.; DAVIS, S. **Melatonin as a biomarker of circadian dysregulation.** *C. Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 17(12): 3306-13, 2008.

MULLIGAN, K. AND BLOCH. **Energy expenditure and protein metabolism in humanan immune deficiency virus infection and cancer caquexia.** *Sem. Oncol.*; 25, 82-91, 1998.

PAULI, J. R.; LEME, J.; CRESPILO, D.; *et al.* **Influência do treinamento físico sobre parâmetros do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal de ratos administrados com dexametasona.** *Rev. Port. Cien. Desp.*; 5(2): 142-152, 2005. ISSN 1645-0523.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet.** *J. Nutr.* 123: 1939-1951, 1993.

ROBERTS, C. K.; BARNARD, R. J. **Effects of exercise and diet on chronic disease.** *J. Appl. Physiol* 98: 3-30, 2005.

RONSEIN, G. E.; DUTRA, R. L., SILVA, E. L. *et al.* **Influência do estresse nos níveis sanguíneos de lipídios, ácido ascórbico, zinco e outros parâmetros bioquímicos.** *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*; 38(1), 39-46, 2004. ISSN 0325-2957

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. Cancer.*; 62:8, 1095-1104, 2010.

SALOMÃO, E. M. & GOMES-MARCONDES. M. C. C, **Leucine or glutamine-rich diet associated to physical exercise changed the chemical body composition and protein metabolism in tumour bearing rats.** *J. Physiol Biochem.*, 2012. DOI:10.1007/s13105-012-0164-0.

SEGAL, R.; EVANS, W.; JOHNSON, D.; SMITH, J.; COLLETTA, S.; GAYTON, J.; WOODARD, S.; WELLS, G.; REID, R. **Structured exercise improves physical functioning in women with stages I and II breast cancer: results of a randomized controlled trial.** *J. Clin. Oncol.* 19(3): 657-665, 2001.

SEGAR, M. L.; KATCH, V. L; ROTH, R. S.; GARCIA, A. W.; PORTNER, T. I.; GLICKMAN, S. G.; HASLANGER, S.; WILKINS, E. G. **The effects of aerobic exercise on self-esteem and depressive and anxiety symptoms among breast cancer survivors.** *Oncol. Nurs. Forum.* 25(1): 107-113, 1998.

SHEWCHUK, L. D, BARACOS, V. E, FIELD, C. J. **Dietary L-glutamine supplementation reduces the growth of the Morris hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats.** *J. Nutr.*; 127: 158-166, 1997.

SILVA, M. P. N. da; **Anorexia-cachexia syndrome in cancer patients;** 2005. *Rev. Bras. Cancerol.*; 52 (1): 59-77, 2006.

SPROD, L. K.; PALESH, O. G.; JANELSINS, M. C.; PEPPONE, L. J.; HECKLER, C. E.; ADAMS, M. J.; MORROW, G. R.; MUSTIAN, K. M. **Exercise, sleep quality, and mediators of sleep in breast and prostate cancer patients receiving radiation therapy.** *Community Oncol.* 7(10): 463–471, 2010.

PITKANEN, H. T.; OJA, S. S.; RUSKO, H.; NUMMELA, A.; KOMI, P. V.; *et al.*: **Leucine supplementation does not enhance acute strength or running performance but affects serum amino acid concentration.** *A. Acids*, 25: 85–95, 2003.

THORSEN, L.; NYSTAD, W.; DAHL, O.; KLEPP, O.; BREMNES, R. M.; WIST, E.; FOSSA, S. D. **The level of physical activity in long-term survivors of testicular cancer.** *Eur. J. Cancer*, 39: 1216-1221, 2003.

TISDALE, M. J. **Cancer cachexia: Metabolic alterations and clinical manifestations.** *J. Nutr.*, 13:1-7, 1997.

TISDALE, M. J. **Wasting in Cancer.** *J. Nutr.* 129: 243S–246S, 1999.

TISDALE, M. J. **Metabolic Abnormalities in Cachexia and Anorexia.** *Nutrition* 16:1013–1014, 2000.

TISDALE, M. J. **The 'cancer cachectic factor'.** *Support. Care Cancer*, 11(2):73-8, 2003.

TISDALE, M. J. **Cancer cachexia.** *Langenbecks. Arch. Surg.* 389(4):299-305, 2004

TISDALE, M. J. **Molecular pathways leading to cancer.** *Physiol.* 20: 340-348, 2005.

TISDALE, M. J. **Mechanisms of cancer cachexia.** *Physiol. Rev.*; 89: 381-410, 2009.

TOGNI, V.; OTA, C. C.; FOLADOR, A.; JUNIOR, O. T.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; FREITAS, F. A.; LONGO, R.; MARTINS, E. F.; CALDER, P. C.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. **Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with N-3 polyunsaturated fatty acids for one generation.** *Nutr. Cancer*, 46: 52-58, 2003.

TONETO, A. T.; SALOMÃO, E. M.; SILVA, G. O.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. **Exercise and leucine supplementation affects the metabolic rate in Walker 256 tumour-bearing rats.** *A. Physiol. Nutr. and Metabolism.* 2011 Submetido 2011-0368.

VALE, C.; STEWART, L.; TIERNEY, J.; UK COORDINATING COMMITTEE FOR CANCER RESEARCH NATIONAL REGISTER OF CANCER. **Trends in UK cancer**

trials: results from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials. *Br. J. Cancer.* 92(5):811-4, 2005.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M. A.; GOMES-MARCONDES, M. C. **Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing Walker 256 tumor.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 333-338, 2001.

VENTRUCCI, I. G.; MELLO, M. A. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. **Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet.** *End. Rel. Cancer.* 11:887-895, 2004.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M. A.; GOMES-MARCONDES, M. C. **Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats.** *B. M. C. Cancer.* 7:42, 2007.

WAHRLICH, V.; ANJOS, L. A.; **Historical and methodological aspects of the measurement and prediction of basal metabolic rate: a review.** *Cad. Saúde Pública;* 17(4): 801-817, 2001.

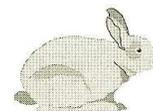
WEYERMANN, P.; DALLMANN, R.; MAGYAR, J.; ANKLIN, C.; HUFSCHMID, M.; DUBACH-POWELL, J.; COURDIÉ-FRUH, I.; HENNEBÖHLE, M.; NORDHOFF, S.; MONDADORI, C. **Orally Available Selective Melanocortin-4 Receptor Antagonists Stimulate Food Intake and Reduce Cancer-Induced Cachexia in Mice.** *P. One*, 4, (3): e4774, 2009.

YOUNES, R. N. & NOGUCHI, Y. **Pathophysiology of cancer cachexia.** *Rev. Hosp. Clin.*, 55, (5): 181-193, 2000.

ZANCHI, N. E.; NICASTRO, H.; LANCHI Jr, A. H. **Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of *in vitro* and *in vivo* studies.** *Nutr. Metabol.*; 5:20, 2008.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

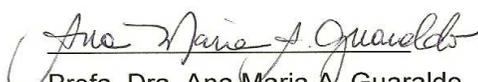
CERTIFICADO

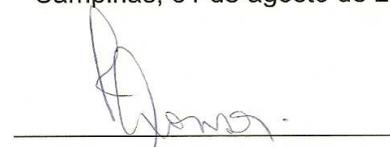
Certificamos que o Protocolo nº 1940-1, sobre "Atividade física e suplementação nutricional de leucina associadas ao crescimento tumoral: estudo do perfil hormonal de ratos implantados com carcinossarcoma de Walker 256", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes / Aline Tatiane Toneto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 31 de agosto de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1940-1, entitled "Hormonal profile in tumour-bearing rats submitted to leucine-rich diet and physical exercise", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 31, 2009.

Campinas, 31 de agosto de 2009.


 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

7.2. Anexo 2

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism



Applied Physiology,
Nutrition, and Metabolism
Physiologie appliquée,
nutrition et métabolisme

**EXERCISE AND LEUCINE SUPPLEMENTATION AFFECTS THE
METABOLIC RATE IN WALKER 256 TUMOUR-BEARING RATS**

Journal: / Journal :	<i>Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism</i>
Manuscript ID: / ID du manuscrit :	2011-0368
Manuscript Type:	Article / Article
Date Submitted by the Author: / Date de soumission de l'auteur :	06-Dec-2011
Complete List of Authors: / Compléter la liste des auteurs :	Toneto, Aline; State University of Campinas, Physiology and Biophysics Salomao, Emilianne; State University of Campinas, Physiology and Biophysics da Silva, Gisele; State University of Campinas, Physiology and Biophysics Maria Cristina, Cintra Gomes-Marcondes; Unicamp, ; State University of Campinas, Physiology and Biophysics
Keyword:	diet < diet, energy regulation < energy regulation, exercise endocrinology < exercise, exercise therapy < exercise, nutrition < nutrition

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/apnm-pubs>

1 Abstract

2 Cachexia is characterized as a patient's involuntary weight loss, which reduces quality of life
3 and survival in cancer patient. Leucine supplementation stimulates the protein net by
4 decreasing the tissue wasting, and inhibiting tumour growth. Physical exercise can delay the
5 onset of anorexia and cachexia and postpone and/or inhibit the tumour growth, improving the
6 body sources, leading the less fatigue and muscle waste. Physical exercise as well as
7 nutritional supplementation is considered an excellent co-adjutant during cancer treatment.
8 Knowing these facts, we examined the effects of a leucine-rich diet with or without physical
9 aerobic exercise on metabolic rate in Walker tumour-bearing rats. Young rats were distributed
10 into 4 groups submitted or not to light aerobic exercise (swim training) and/or leucine-rich diet
11 during two months. After this time, these animals received or not tumour cell injection,
12 subcutaneously, rearranged into eight groups. Twenty-one days after tumour implant, the
13 tumour-bearing groups showed decreased metabolic rate in relation to their respective controls,
14 probably due to reduction of lean body mass. However, in tumour-bearing exercised and/or
15 nutritional supplemented groups, the metabolic rate tended to be higher when compared to
16 sedentary tumour-bearing animals (W), suggesting a possible recovery of lean body mass
17 and/or improvement of the host adaptive response regarding the deleterious effects of the
18 Walker-256 tumour.

19

20 1. Introduction

21 Cachexia is frequently observed in cancer patients (YOUNES & NOGUCHI, 2000), mainly
22 with gastric, colon or pancreas tumour and is considered the most important factor leading to
23 premature death of these patients. Cachexia is commonly characterized by the development of
24 anorexia/ early satiety, asthenia, weight loss, anaemia, and especially by changes in the
25 metabolism of carbohydrates, fats and proteins (MANTOVANI & MADEDDU, 2010), which are
26 also related to the reduction in the quality and lifetime in these cancer patients (TISDALE,
27 1997).

28 Some hypotheses can explain the appearance of cachexia, which may be due to
29 decrease in food intake, excessive consumption of specific nutrients by the tumour tissue,
30 alterations in intermediary metabolism in the host or the sum of these all factors. Therefore,

2

1 anorexia and catabolism, promoted by tumour presence, are the main factors leading to
2 cachexia state (MANTOVANI & MADEDDU, 2010; TISDALE, 2003; TISDALE, 2005). The
3 anorexia-cachexia syndrome can also be caused by cytokines produced by tumour or released
4 by the host immune system in response to the presence of cancer, which promote lipolysis and
5 proteolysis in these patients (INUI, 1999).

6 The energy metabolism is defined as the integration of complex chemical reactions by
7 which obtaining energy from nutrients, the host could maintain the proper functioning of all
8 biological processes. One of the determinants of weight loss during cancer cachexia, is the
9 increased energy expenditure (TISDALE, 2005; TISDALE, 1999b), which is determined by the
10 type of tumour (TISDALE, 2009).

11 The main component of daily energy expenditure is the rest metabolic rate (RMR) that
12 can be altered by various factors such as time of day, food intake, type of exercise and stress.
13 The RMR tends to decrease with age and with reduced body mass especially lean body mass
14 (FOUREAUX *et al.* 2006),.

15 The basal metabolic rate is the amount of energy required for maintenance of body
16 functions added to RMR that should be measured in plain conditions of fasting, physical and
17 mental rest. Useful for diagnostic purposes as nutrition and some pathological conditions, the
18 measurement of basal metabolic rate is usually calculated by measuring the oxygen
19 consumption (VO_2) and carbon dioxide elimination (VCO_2) (WAHRLICH & ANJOS, 2001).

20 Protein synthesis needs the right amino acids levels balance, which are decreased,
21 especially the branched chain amino acids, in patients with cachexia (ELEY *et al.*, 2007).
22 Studies show the benefits of semi-purified diet containing high content of leucine on the
23 biochemical changes related to protein metabolism in young tumour-bearing rats submitted to
24 aerobic exercise (SALOMÃO *et al.*, 2010) and leucine also produced small but significant
25 inhibition of tumour growth (ELEY *et al.*, 2007).

26 In addition, exercises have positive or even negative effects, based on intensity and
27 duration of in cancer patients. This clearly depends on the type and progression of cancer and
28 the course of clinical treatment (KNOLS *et al.*, 2005). Spontaneous physical exercise can delay
29 the anorexia and cachexia onset. Aerobic exercise leads to improved physical performance and
30 body energy sources, reducing fatigue and muscle loss, thus improving quality of life in cancer

1 patients (SALOMÃO *et al.*, 2010; VENTRUCCI *et al.*, 2004; KNOLS *et al.*, 2005; CREVENNA *et*
2 *al.*, 2003). Therefore, supervised physical exercise can be an excellent support during the
3 cancer treatment and rehabilitation process by improving the physiologic and psychological
4 state of a patient (SEGAL *et al.*, 2001; SEGAR *et al.*, 1998).

5 The aim of this study was to establish physical conditioning in rats after aerobic training
6 and measure the metabolic rate and biochemical parameters, under nutritional supplementation
7 and analyse the waste effects of Walker 256 tumour, assuming the hypothesis that exercise and
8 nutritional supplementation can improve the cachectic state and energy homeostasis of this
9 animal.

10

11 **2. Methods**

12

13 **2.1 Animals and Diets**

14 Wistar male rats (21 days old), obtained from the animal facilities at the State University
15 of Campinas, UNICAMP, Brazil, were housed in collective cages during the entire experimental
16 period. They received diet and water *ad libitum* under control of light and darkness (12-12
17 hours) and temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). The Normoprotein (C) and leucine-rich (L) semipurified
18 diets are shown in Table 1 and in accordance to AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993). Casein is the
19 sole source of protein, which contains 1.54% L-leucine. The adjustment in the amino acid-rich
20 diet was made to reduce the amount of carbohydrates, having similar quantities of cornstarch to
21 become isocaloric diets. The amino acids (L-leucine) and cornstarch were provided by
22 Ajinomoto Interamericana Ind. and Com. Ltda and Corn Products Brazil Ingredients,
23 respectively.

24 **2.2 Experimental protocol**

25 Young rats were first distributed into the following 4 groups, according to the diet
26 regimen: sedentary animals were fed with control or leucine-rich diet (C and L groups) and
27 exercised animals were fed with control or leucine-rich diet (EC and EL groups). After 60 days
28 on the regimen, rats were redistributed into 8 groups based on whether or not they received
29 Walker 256 tumour cells (W), corresponding to the following groups (Figure 1): 4 groups that
30 received the control diet: control (C) $n=11$, exercised (EC) $n=11$, tumour-bearing (W) $n=9$ and

1 exercised tumour-bearing (EW) $n=9$ and 4 groups that were supplemented with leucine-rich
2 diet: rats supplemented with leucine-rich diet (L) $n=13$, exercised rats supplemented with
3 leucine-rich diet (EL) $n=10$, tumour-bearing rats supplemented with leucine-rich diet (WL) $n=9$
4 and exercised tumour-bearing rats supplemented with leucine-rich diet (EWL) $n=7$. The body
5 weights were evaluated three times a week. Twenty-one days after tumour implant, rats were
6 sacrificed, which was carried out 24 hours after the final exercise protocol to avoid any acute
7 inflammatory stimulus.

8

9 **2.3 Tumour implantation**

10 The tumour-bearing rats received implant of approximately 0.25×10^6 suspension of
11 Walker 256 carcinoma cells, subcutaneously in the right flank (GOMES-MARCONDES *et al.*,
12 1998). The rats without tumours were sham receiving 0.5 mL NaCl solution (0.9%) injection
13 (subcutaneous) without anaesthesia. The manipulation of animals followed the general
14 guidelines of the UKCCCR (United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research,
15 1998) (VALE *et al.*, 2005), and the experimental protocol was approved by the institutional
16 Committee for Ethics in Animal Research (CEEA-IB/UNICAMP, number 1402-1).

17

18 **2.4 Exercise protocol**

19 Rats were submitted to light swim training for 8 wk (60 days) in a 1 m^3 container at $30 \pm 2^\circ\text{C}$.
20 The training was performed 5 days/wk in the morning, starting with 5min initially and
21 progressively increasing the time until the rats could swim 45 min/day of exercise with no body
22 weight overload, which was maintained until the end of the experiment. To avoid thermal stress
23 after swimming, all exercised animals were gently dried out and kept in a warmed room. Their
24 body temperature was measured to confirm body temperature maintenance.

25

26 **2.5 Measurement Metabolic Rate**

27 Individually, animals were placed in metabolic cages, coupled to a hermetically sealed
28 compartment measuring the CO_2 produced and O_2 consumed by Mocon Pack Check analyzer
29 (Minneapolis, USA). The analyses were assessed in two stages: 1st time post-training (after
30 eight weeks of swimming) and 2nd at pre-agonic state before the sacrifice, accounting for about

1 21 days after tumour implant. Thus, we calculated measures of metabolic rate using the
2 following formula:

$$\text{MR} = \left(\frac{\text{Displacement pressure measure (\% O}_2\text{)} \times 4,85 \text{ Kcal of O}_2 \text{ consumed} \times 60 \text{ min}}{\text{body weight (g)}} \right) \times 100$$

6 **2.6 Biochemical Analysis of Hormones**

7 Analysis of serum hormones adrenocorticotropin (ACTH) was performed using immunoassay
8 kits (Linco/Millipore) and fluorescent flow cytometry using Luminex equipment (Millipore,
9 USA). The adrenal catecholamine content was assessed by fluorimetric assay (IZQUIERDO et
10 al, 1968; CURI et al, 1990) and the ascorbic acid content was performed by colorimetric assay
11 (CURI et al, 1990).

13 **2.7 Statistical Analysis**

14 The results were expressed as the mean + SEM. Data were analysed statistically and the
15 comparisons with control and tumour-bearing groups were made using a two-way ANOVA
16 followed by a post-hoc Bonferroni's multiple comparison test (Graph Pad Prism software, v3.00
17 for Windows 98, USA). Results were considered statistically when the P value was less than 5%
18 (GAD. & WEIL, 1994).

20 **3. Results**

21 The evolution of body weight of experimental animals showed increase and gradually
22 growth throughout the experimental period corresponding to 110 days-old (Figure 2). The
23 training period (60 days), the experimental groups comprehended by controls - sedentary (C)
24 and submitted to dietary supplementation with leucine - sedentary (L) (Figure 2A) and exercised
25 (EC) and subjected to nutritional supplementation with leucine exercised (EL) (Figure 2B)
26 showed no significant differences in the evolution of weight between the sedentary and
27 exercised. After 60 days of training, the groups were redistributed in tumour-bearing and non-
28 tumour-bearing, sedentary or exercised and the corresponding tumour-bearing groups – fed
29 control diet (W and EW) and leucine-rich diet (LW and EWL) – showed a deep decrease in body
30 weight as compared to non-tumour-bearing animals (Figure 2A and 2B).

1 The percentage of body weight gain shows that during the period of tumour development
2 (approximately 21 days), the tumour-bearing sedentary groups (W and WL) had significantly
3 lower body weight gain mainly in the W group ($W = 77.7 \pm 2.8\%$, and WL group ($84.5 \pm 2.0\%$)
4 which corresponded to 22% and 14% less, respectively, than C group). But this reduction in
5 weight gain in the exercised animals, regardless of whether or not supplementation with leucine,
6 was less pronounced in EW ($82.0 \pm 2.5\%$) and EWL ($81.4 \pm 1.1\%$) groups when compared to
7 group W. Therefore, the tumour weight in all experimental groups (exercised or not,
8 supplemented or not with leucine) showed an exponential growth evolution, indicating a very
9 aggressive pattern in terms of percentage, being above 10% for all groups (Figure 2C).

10 The standard metabolic rate was based on the volume of consumed O_2 and released CO_2
11 measurements assessed by Mocon Pac Check analyser observing each animal/minute (%) as
12 an average during five days, proceeded the first measurement after training period and the
13 second before pre-agonic state (Figure 3). The standard metabolic rate in the training period ,
14 (60 days of experiment) in all animals, before tumour inoculation, showed no significant
15 differences among the groups, but we observed that leucine supplementation and physical
16 activity provided modest increase in metabolic rate of animals when compared with sedentary
17 control group (C) (Figure 3B). After tumour evolution, the standard metabolic rate in the pre-
18 agonic state was decreased in all tumour-bearing animals compared to non-tumour-bearing
19 animals (Figure 3A). However, when we analyzed the tumour-bearing animals exercised and/or
20 supplemented with leucine, we found that the metabolic rate tends to be higher when compared
21 to sedentary tumour-bearing animals (W) (Figure 3C).

22 Tumour development increased the stress-related hormones release such as
23 catecholamine, corticosterone and ACTH (Tisdale, 2003, 2005, 2009). The tumour-bearing rats
24 showed significant changes in serum stressed-related hormones. The adrenal catecholamine
25 content was decreased in W and EWL tumour groups compared to C and EL groups, indicating
26 that the gland release was increased, but the exercise associated or not with leucine-rich diet
27 modulated this host response (EW and WL maintained the adrenal catecholamine content,
28 indicating lower release, and also considering the EWL group in correspondence to C group)
29 (Figure 4A). The adrenal ascorbic acid content decreased in W, EW and EWL, indicating higher

1 corticosterone release (Figure 4B). This pattern can be confirmed by serum ACTH content
2 which was increased in all tumour bearing groups (Figure 4C).

3 **4. Discussion**

4 The cancer evolution cause important physiological changes depending on their stage of
5 development, the initial and final evolution of disease and nutritional status of the host. Often,
6 depending on the type of cancer, there are strongest changes in the metabolism of
7 carbohydrates, fats and proteins, among other complications, leading the cachexia
8 development.

9 The present work showed that Walker tumour-bearing animals present cachectic state,
10 showing deep reduction in body weight and also in metabolic rate as a consequence of tumour
11 waste effects. Despite having tumour, groups submitted to exercise and/or nutritional
12 supplementation could improve the body weight gain, reflecting an increase in metabolic rate
13 especially when fed leucine-rich diet. Many authors, including our group, have shown that
14 Walker tumours induce deep body weight loss associated with fast tumour growth, and tumour
15 Walker is considered an experimental model of cachexia (EMERY, 1999). In this paper we
16 showed tumour development (21 days after implantation) has affected especially body weight
17 gain severely. In cancer patients, severe body mass loss, particularly skeletal muscle, is direct
18 proportional to the increase of the mass lesion, during the reduction of protein synthesis and
19 increased proteolysis (INUI, 1999; TISDALE, 2009; TISDALE, 2000).

20 LORITE and colleagues found severe body weight loss in mice bearing colon
21 adenocarcinoma - MAC16, which is considered an experimental model of cachectic state.
22 Similar effects were also observed in our work, but with Walker tumour growth up to 10% of
23 body weight. This state of deep body weight loss, or cachexia, is often associated by anorexia,
24 in the animals with tumour (preliminary study show these facts, VENTRUCCI *et al.*, 2002;
25 GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003) and asthenia due to muscle loss (SALOMÃO *et al.*, 2010)
26 and this reduction of lifetime (period of survival of Walker tumour-bearing animals
27 comprehended by 26-30 days after tumour inoculation) (GOMES-MARCONDES *et al.*, 1998;
28 GOMES-MARCONDES *et al.*, 2003). Walker tumour is considered an experimental model of
29 cachexia, showing very fast development, with a percentage of tumour weight on carcass
30 weight rather high, being independent of nutritional or physical training scheme.

1 Leucine is used as an energy source by skeletal muscle, and when combined with
2 resistance exercise this amino acid becomes a potent stimulator to increase muscle mass,
3 participating in the signalling process of translation and gene transcription by inhibiting the
4 degradation and/or stimulating muscle protein synthesis. As a consequence, these effects
5 induced increase in metabolic rate which is probably due to the increase of the most
6 metabolically active tissue, as a result of increased muscle mass in these animals
7 (DRUMMOND *et al.*, 2009). The standard metabolic rate evolution in the pre-agonic state
8 decreased in these tumour-bearing animals in relation to control groups, probably due to the
9 depletion of carcass as a consequence of lean body mass reduction, evidencing damages
10 caused by tumour growth, as observed in other studies (Foureaux *et al.*, 2006). Foureaux and
11 colleagues proposed that metabolic rate can be changed in situations of stress and tends to
12 decrease with the reduction of body weight.

13 However, when we analyzed the tumour-bearing animals exercised supplemented or not
14 with leucine after 21 days of tumour growth, we found that the metabolic rate was higher when
15 compared with sedentary animals with tumour (W). Thus, we consider that the changes in
16 metabolic rate of these groups were a result of physical exercise and leucine nutritional
17 supplementation inducing an increase in the metabolically active tissue mass (muscle mass).

18 Some hypotheses consider major factor to explain the cachexia, the excessive
19 consumption of nutrients by the tumour tissue there is excessive spoliation of host tissue,
20 providing amino acids or glucose for tumour cells development. Furthermore, there is an
21 increase in catabolism due to the intense tumour growth added to cytokines, produced by the
22 tumour or released by the host immune system. These cytokines, among other events, can
23 change the energy metabolism in the cancer-bearing host, as verified in the present work.
24 Some studies indicate that weight loss in cancer cachexia is due to increased energy
25 expenditure (TISDALE, 2005; TISDALE, 1999b), although the present study showed decreased
26 metabolic rate, it must be considered as an intense wasting process that reduction could
27 represent the higher spoliation process. The increased concentration of ACTH in tumour-
28 bearing animals (W, EW and ELW) suggested greater stimulation of the adrenal cortex. We
29 observed reduction in ascorbic acid content, in W, EW and ELW groups, suggesting a higher
30 release of corticosterone hormone and in parallel the catecholamine release followed this

1 similar pattern in tumour-bearing rats. The process of carcinogenesis often involves oxidative
2 stress and thereby release various catabolic hormones, and many pro-inflammatory cytokines,
3 which in many events promote even greater loss associated with tumour development. In rats,
4 the plasma concentration of catabolic hormones, glucocorticoids, catecholamine and glucagon,
5 appear enlarged helping to promote the catabolism of reserves of nutrients in the body. But
6 more important in parallel to catabolic hormones is hypoinsulinaemia situation which occurs
7 preferentially in tumour-bearing. Importantly, this pattern of metabolic changes occurs mainly in
8 experimental models of animals with different tumour types (BACURAU and COSTA ROSA,
9 1997); additionally in the present work the association between leucine-rich diet and the
10 exercise modulated host response (EW and ELW maintained the adrenal catecholamine
11 content, indicating lower release).

12 Program of aerobic exercise assessed in this work had the objective to reduce thus of
13 gluconeogenic amino acids supply in order to synthesis new glucose within the animal body
14 from precursors other than carbohydrates especially by the liver and kidney using amino acids
15 from proteins, glycerol from fats, or lactate produced by muscle during anaerobic glycolysis for
16 tumour growth, since, there is high substrates demand by neoplastic cells. Thus, deviating from
17 these amino acids during exercise conditions, they stimulate protein synthesis and indirectly
18 decrease tumour growth reducing its nutritional supply, therefore, a better physical performance
19 as well as body reserves, reduce fatigue, muscle loss, thus increase quality of life in cancer
20 patients (SALOMÃO *et al.*, 2010; KNOLS *et al.*, 2005; CREVENNA *et al.*, 2003; TISDALE,
21 2000).

22 Nutritional supplementation with leucine associated with exercise probably provided
23 better adaptation of these animals, resulting in lower spoliation of lean body mass and/or better
24 adaptation to energy expenditure imposed by tumour growth, thus ensuring better response of
25 host tissues against the neoplastic growth. Recent studies show us that leucine
26 supplementation and/or glutamine provides improvement in some parameters such as
27 biochemical changes related to protein metabolism in young animals submitted to aerobic
28 exercise, the higher protein synthesis was associated with reduced protein wasting in these
29 Walker 256 tumour-bearing rats (SALOMÃO *et al.*, 2010).

1 Through the results we presented calculations of metabolic rate from the standardization
2 of this rate with the determination of the percentage concentration of O₂ consumed and CO₂
3 released, and we obtained results that demonstrate the efficacy of physical exercise and
4 supplementation leucine, improving the body mass of these animals, showed by a slight
5 increase in metabolic rate of animals exercised and/or supplemented with leucine-rich diet.
6 Despite of having tumour, a slightly increase in expenditure energy imposed by tumour growth
7 under exercise and nutritional supplementation could be related to more metabolically active
8 tissue such as muscle mass, as proposed that the association between leucine-rich diet and
9 exercise would improve responses of these animals to the tumour condition. Further
10 investigations are now underway in our laboratory to better elucidate how leucine
11 supplementation combined with aerobic exercise could neutralize the intense mobilization of
12 substrates in the tumour bearing rats during the development of cancer cachexia.

13

14 **5. Acknowledgements**

15 The authors are thankful to Mirna Gigante, PHD Faculty of Food Engineering (FEA) -
16 UNICAMP (State University of Campinas), for borrowing the equipment Mocon PAC CHECK
17 used for standardization of metabolic rate; Dr J Marcondes for statistical assistance; the
18 Ajinomoto Interamericana Ind. and Com. Ltda; Corn Products Brazil Ingredients and the
19 financial support of FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo,
20 2007/05074-1; 2009/11993-5; 2010/11328-9).

21

22 **6. References**

23 CREVENNA, R.; SCHMIDINGER, M.; KEILANI, M.; NUR, H.; ZOCH, C.; ZIELINSKI, C.;
24 FIAKAMOSER, V.; QUITTAN, M. 2003. Aerobic exercise as additive palliative treatment for a
25 patient with advanced hepatocellular cancer. *Wien. Med. Wochenschr.* **153**(9-10):237-40.

26 DRUMMOND, M.J.; DREYER, H.C; FRY, C.S.; GLYNN, E.L.; RASMUSSEN, B.B. 2009.
27 Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1
28 signaling. *J Appl Physiol.* **106**(4):1374-84.

29 ELEY, H.L.; RUSSEL, S.T.; TISDALE, M.J. 2007. Effect of branched-chain amino acids on
30 muscle atrophy in cancer cachexia. *J. Biochem.* **407**:113-120.

- 1 EMERY, P.W. 1999. Cachexia in experimental models. *Nutr.* **15**:600–603.
- 2 FOUREAUX, G.; PINTO, K.M.C.; DAMASO, A. 2006. Efeito do Consumo Excessivo de
3 Oxigênio após Exercício da Taxa Metabólica de Repouso no Gasto Energético. *Rev. Br. Med.*
4 *Esp.* **12**(6):393-398. <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbme/v12n6/a18v12n6.pdf>
- 5 GAD, S.C. & WEIL, C.S. 1994. Statistic for toxicologists. *In: Wallace H (editor), Principles and*
6 *Methods of toxicology.* Raven Press Ltda., New York, 221-274.
- 7 GOMES-MARCONDES, M.C.; CURY, L.; CURI, R. 1998. Consequences of Walker 256 tumour
8 grown for the placental/fetal development in rats. *Cancer Res. Ther. Cont.* **5**: 277-283.
- 9 GOMES-MARCONDES, M.C.C.; VENTRUCCI, G.; TOLEDO, M.T.; CURY, L.; COOPER, J.C.
10 2003. A leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young
11 tumour-bearing rats. *Braz J Med Biol Res*; **36**:1589–1594.
- 12 INUI, A. 1999. Cancer anorexia-caquexia syndrome. *Cancer Res.* **59**: 4493-4501.
- 13 KELNER, K.L.; LEVINE, R.A.; MORITA, K.; POLLARD, H.B. 1985. A comparison of
14 trihydroxyindole and HPL/electrochemical methods for catecholamines measurement in adrenal
15 chromaffin cells. *Neurochem. Int.* **7**:373-376.
- 16 KNOLS, R.; AARONSON, N.K.; UEBELHARI, D.; FRANSEN, J.; AUFDENIKANPE, G. 2005.
17 Physical exercise in cancer patients during and after medical treatment: A systematic review of
18 randomized and controlled clinical trials. *J. Clin. Oncol.* **23**(16): 3830-3841.
- 19 LORITE, M.J.; THOMPSON, M.G.; DRAKE, J.L.; CARLING, G.; TISDALE, M.J. 1998.
20 Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. *Br. J. Cancer.*
21 **78**(7): 850-856.
- 22 MANTOVANI, G.; MADEDDU, C. 2010. Cancer cachexia: medical management. *Support. Care*
23 *Cancer.* **18**:1-9.
- 24 MINDLIN, R.L.; BUTTLER A.M. The determination of ascorbic acid in plasma. A micromethod.
25 *J. Biol. Chem.*, **122**: 673-85, 1938

- 1 REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, J. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents:
2 final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation
3 of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.* **123**: 1939-1951.
- 4 SALOMÃO, E.M.; TONETO, A.T.; SILVA, G.O.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. 2010. Physical
5 exercise and a leucine-rich diet modulate the muscle protein metabolism in Walker tumour-
6 bearing rats. *Nutr. Cancer.* **62**(8):1095-104.
- 7 SEGAL, R.; EVANS, W.; JOHNSON, D.; SMITH, J.; COLLETTA, S.; GAYTON, J.; WOODARD,
8 S.; WELLS, G.; REID, R. 2001. Structured exercise improves physical functioning in women
9 with stages I and II breast cancer: results of a randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol.* **19**(3):
10 657-665.
- 11 SEGAR, M.L.; KATCH.; ROTH, R.S.; GARCIA, A.W.; PORTNER, T.I.; GLICKMAN, S.G.;
12 HASLANGER, S.; WILKINS, E.G. 1998. The effects of aerobic exercise on self-esteem and
13 depressive and anxiety symptoms among breast cancer survivors. *Oncol. Nurs. Forum.* **25**(1):
14 107-113.
- 15 TISDALE, M. J. 1997. Cancer cachexia: Metabolic alterations and clinical manifestations. *J.*
16 *Nutr.* **13**:1-7.
- 17 TISDALE, M. J. 1999. Wasting in cancer. *J. Nutr.* **129**(1S Suppl):243S-246S.
- 18 TISDALE, M.J. 2000. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *J.Nutr.* **16**:1013-1014.
- 19 TISDALE, M. J. 2003. The 'cancer cachectic factor'. *Support. Care Cancer.* **11**(2):73-8.
- 20 TISDALE, M. J. 2005. Molecular pathways leading to cancer. *Physiol.* **20**:340-348.
- 21 TISDALE, M. J. 2009. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol. Rev.* **89**:381-410.
- 22 VALE, C.; STEWART, L.; TIERNEY, J.; UK COORDINATING COMMITTEE FOR CANCER
23 RESEARCH NATIONAL REGISTER OF CANCER. 2005. Trends in UK cancer trials: results
24 from the UK Coordinating Committee for Cancer Research National Register of Cancer Trials.
25 *Br. J. Cancer.* **92**(5):811-4.

- 1 VENTRUCCI, G.; MELLO, M.A.R.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. 2002. Effects of leucine
- 2 supplemented diet on intestinal absorption in tumour bearing pregnant rats. B. M. C. Cancer.
- 3 2:1-8.
- 4 VENTRUCCI, G.; MELLO, M.A.R.; GOMES-MARCONDES, M.C.C. 2004. Proteasome activity
- 5 is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats fed a leucine-rich diet. End. Rel.
- 6 Câncer. 11:887-895.
- 7 WAHRLICH, V.; ANJOS, L.A. 2001. Aspectos históricos e metodológicos da medição e
- 8 estimativa da taxa metabólica basal: uma revisão da literatura. Cad. Saúde Pública. 17(4): 801-
- 9 817. <http://www.scielo.org/pdf/csp/v17n4/5287.pdf>
- 10 YOUNES, R. N.and NOGUCHI, Y. 2000. Pathophysiology of cancer cachexia. Rev. Hosp. Clin.
- 11 55, (5): 181-193.

1 **Figures Legend**

2

3 **Figure 1:** Experimental design.

4 **Figure 2:** Evolution of body weight (grams) of experimental animals subjected to leucine-rich
5 diet, physical training and tumour implantation, during only growth of tumour period. **A** –
6 sedentary animals, **B** - exercised animals during the whole experimental period, which
7 corresponds to 110 days old. The thick bar corresponds to tumour evolution at 88th day to 109th
8 day in the pre-agonic state. **C** – Tumour weight in relation a weight carcass (%) in animals
9 subjected to leucine-rich diet and physical training. Results are expressed as means + standard
10 deviation. **Legend:** (C) sedentary control, (W) tumour sedentary, (L) leucine sedentary, (WL)
11 tumour leucine sedentary, (EC) exercised control, (EW) exercised tumour, (EL) exercised
12 leucine, (EWL) exercised tumour leucine. * P<0.05 statistical difference compared to respective
13 non-tumour-bearing group; ^a P<0.05 difference between W and EW groups.

14 **Figure 3:** Evolution of slandered metabolic rate (MR) (Kcal/100g/h) (A) in all experimental
15 animals submitted to leucine-rich diet and physical exercise, 1st measure at tumour implant and
16 after 60 days of training, 2nd measure at pre-agonic state, around 21 days after tumour implant.
17 **B** - Evaluation of metabolic rate analysis before tumour implantation and **C** – metabolic rate in
18 all tumour-bearing rats at pre-agonic state in experimental animals subjected to leucine-rich
19 diet, physical training and tumour implant. **Legend:** (C) sedentary control, (W) tumour
20 sedentary, (L) leucine sedentary, (WL) tumour leucine sedentary, (EC) exercised control, (EW)
21 exercised tumour, (EL) exercised leucine, (EWL) exercised tumour leucine. * P<0.05 statistical
22 difference compared to respective non-tumour-bearing group. * P<0.05 statistical difference
23 compared to respective non-tumour-bearing group; # P<0.05 difference WL and EW *versus* W
24 group.

25 **Figure 4:** Analysis of hormones in all experimental animals subjected to leucine-rich diet,
26 physical training and tumour implantation. **A** – Analysis of Catecholamine and **B** – Ascorbic
27 Acid, both of homogenized gland adrenal. **C**- Analysis of ACTH in serum samples. **Legend:** (C)
28 sedentary control, (W) tumour sedentary, (L) leucine sedentary, (WL) tumour leucine sedentary,

- 1 (EC) exercised control, (EW) exercised tumour, (EL) exercised leucine, (EWL) exercised tumour
- 2 leucine. * $P < 0.05$ statistical difference compared to respective non-tumour-bearing group. *
- 3 $P < 0.05$ statistical difference compared to respective non-tumour-bearing group.

For Review Only

Table 1: Semi-purified diet composition

Components	Normoproteic 18% ^a (g.Kg ⁻¹ diet)	Leucine-rich 3% (g.Kg ⁻¹ diet)
Cornstarch	397.5	387.5
Casein ^b	200	200
Dextrinized cornstarch	132	122
Sucrose	100	90
Fiber	50	50
Mineral mix (AIN-93G)	35	35
Vitamin mix (AIN-93)	10	10
L-Cystine	3	3
Choline hydrochloride	2.5	2.5
Soybean oil	70	70
L-Leucine	---	30

^a – according to the American Institute of Nutrition -AIN-93 G (Reeves *et al*, 1993).

^b – Commercial casein; values corrected by the total amount of protein (> 85% of protein).

