

EFFECTS OF ARGININE-ENRICHED ENTERAL NUTRITION ON WALKER TUMOR BEARING RATS IN THE KIDNEY

LÚCIO F.G. SILVA, DANIEL M. M. FÉ, JOÃO L.B.G. CAVALCANTE,
FELIPE S.D. SOARES, MANOEL O. MORAES, PAULO R.L. VASCONCELOS

Laboratory of Experimental Surgery, Department of Surgery, School of Medicine,
Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

ABSTRACT

Objectives: Evaluation of effects of enteral nutrition therapy (ENT) with and without arginine upon rats inoculated with Walker tumor in the right kidney.

Materials and Methods: Wistar rats (n = 32), males, (250-300 g) were divided in four groups: G1 (8 rats inoculated with saline, under standard chow diet), G2 (8 rats bearing tumor, standard chow diet), G3 (8 rats bearing tumor, on ENT + aminoacid solution) and G4 (8 rats bearing tumor, on ENT + arginine). On the day nine post inoculation, seven days after either standard chow diet or enteral feeding was started, rats were studied. Blood was collected from abdominal aorta, and tissues from liver and kidneys. Metabolites were measured through enzymatic technique. Tissues were obtained to perform histopathological studies.

Results: The inoculation of tumor in the right kidney (G2), as compared to injection of saline (G1), in rats under chow diet orally, induced reduction in body weight gain (10 g versus 1.3 g); increase in right kidney volume (0.53 cm³ versus 1.37 cm³); increase in the lactacemia (3.19 µmol/ml versus 7.78 µmol/ml) and ketonemia (0.15 µmol/ml versus 0.33 µmol/ml). ENT offered to tumor bearing animals (G3), as compared to standard chow given orally (G2), induced increase in body weight gain (1.3 g versus 21 g) but no change in right kidney volume; decrease in the lactacemia (7.78 µmol/ml versus 5.17 µmol/ml) and ketonemia (0.33 µmol/ml versus 0.08 µmol/ml). Arginine-enriched enteral nutrition offered to tumor-bearing rats' (G4), as compared to rats under ENT (G3), decreased the lactacemia (5.17 µmol/ml versus 2.94 µmol/ml) and glycemia (6.39 µmol/ml versus 3.69 µmol/ml).

Conclusion: Enteral nutrition therapy maintained nutritional status and promoted body weight gain, avoiding tumor-induced waste syndrome, reduced lactacemia and ketonemia, and did not induce tumor growth. Arginine in supplement to ENT decreased the lactacemia and glycemia.

Key words: kidney; kidney cancer; nutrition; Walker tumor; arginine
Braz J Urol, 27: 178-185, 2001

INTRODUÇÃO

Desnutrição e perda de peso são um achado comum no paciente com câncer (1). Há também alterações metabólicas importantes, favorecendo o tumor, em detrimento do paciente. A competição entre o hospedeiro e o câncer por nutrientes causa catabolismo muscular esquelético e visceral, aumento do débito energético, perda de tecidos nobres e do peso corporal (2).

A glicose é o combustível preferencial dos tumores, predominantemente utilizada via glicólise anaeróbia, produzindo lactato. Este é conduzido ao fígado e reconvertido, no hepatócito, por meio da ativação do ciclo de Cori (3).

Quando se deve instituir terapia nutricional para pacientes com câncer? As últimas evidências sugerem que a terapia nutricional pode ser utilizada para tratar a caquexia do câncer e melhorar o estado nutricional do paciente, e se estimulação tumoral ocor-

rer, a presença de um maior número de células na fase S do ciclo celular (fase de proliferação), poderá ser explorada com o uso de agentes quimioterápicos ciclo-específicos (4).

A arginina, um aminoácido diamino monocarboxílico, isolado pela primeira vez, em sua forma cristalina, em 1886 por Schulze & Steiger, tem atividade imunomoduladora, que parece estar relacionada à produção do hormônio do crescimento, da insulina e da prolactina, da síntese de poliaminas, da liberação de citocinas ou à ativação da via metabólica do óxido nítrico (5).

É substrato comum para duas enzimas: argininase e NO sintase (NOS). Argininase converte arginina em ornitina, precursora de poliaminas, essenciais componente da divisão celular. NOS age sobre a arginina para produzir NO, que por sua vez, inibe a proliferação de muitas linhagens celulares (6).

Este estudo objetiva avaliar os efeitos sobre o crescimento tumoral e as ações nutricionais e metabólicas da terapia nutricional enteral enriquecida com arginina, utilizando um modelo tumoral consistindo do carcinossarcoma 256 de Walker implantado no rim direito de ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e dois ratos Wistar, machos, (250-300 g), foram distribuídos ao acaso, em 4 grupos de estudo, de acordo com a forma de alimentação: terapia nutricional enteral (TNE), usando-se dieta polimérica líquida, contendo 105 calorias/100 ml, com ou sem arginina, ou dieta padrão do biotério, em pellets, contendo 23% de proteína bruta, 12% de umidade e 11% de matéria mineral. Água foi fornecida ad libitum.

Grupo 1)- 8 ratos Wistar, sem tumor, alimentados com dieta oral; grupo 2)- 8 ratos Wistar, com tumor, alimentados com dieta oral; grupo 3)- 8 ratos Wistar portadores de tumor, em TNE enriquecida com solução de aminoácidos, a 5% do valor calórico total; grupo 4)- 8 ratos Wistar portadores de tumor, em TNE enriquecida com L-arginina a 5% do valor calórico total.

A suplementação dietética foi obtida com arginina (1.0 g) (grupo 4) e solução de 20 aminoácidos (1.0 g) (grupo 3), correspondendo a 5% do valor

calórico total, de tal maneira, a manter-se as propriedades isocalóricas, isonitrogênicas e isosmóticas das alimentações.

Os ratos foram mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em gaiolas individuais, em ambiente com ar refrigerado, à temperatura média de 25°C, umidade relativa do ar em torno de 50% e iluminação adequada, obedecendo ao ciclo dos dias e noites.

Dois procedimentos cirúrgicos, sob anestesia com éter etílico, fizeram parte do estudo experimental.

O primeiro consistiu de uma incisão mediana supra-umbilical de 2 cm, para permitir a exteriorização do rim direito, onde era feita a inoculação de 0.3 ml de uma concentração de cerca de 10^6 células tumorais viáveis/ml, nos animais dos grupos 2, 3 e 4. No desenvolvimento do modelo foi observado que 0.3 ml do inoculo era a quantidade ideal para a pega tumoral. A mesma quantidade de solução salina, era inoculada no mesmo órgão, nos animais do grupo 1. Em seguida o estômago era exposto, e realizada gastrostomia com aposição de cateter para alimentação enteral, em todos os animais.

Eles eram mantidos em dieta oral por 48 horas, após o que, a terapia nutricional enteral se iniciava (animais dos grupos 3 e 4), por meio de bomba de infusão peristáltica, na ordem de 4 ml por hora.

O segundo procedimento cirúrgico consistiu de uma incisão, estendendo-se do apêndice xifóide à sínfise púbica, realizada 9 dias após a inoculação e 7 de iniciada a TNE, depois de pesados os animais. Inicialmente o rim direito era inspecionado para constatação macroscópica da pega do tumor. Em seguida a aorta abdominal dissecada, puncionada, e o sacrifício do animal realizado por hipovolemia. O sangue obtido e fragmentos dos rins e o lobo mediano do fígado, eram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

Fragmentos do rim direito com tumor serviam para prova anatomopatológica da pega tumoral.

O crescimento tumoral foi estimado a partir da medida de volume do rim direito, pela fórmula

la; $V = p / 6 \times D1 \times D2 \times D3$ (7) e os metabólitos determinados no sangue periférico, plasma, rins e fígado, de acordo com os métodos descritos por Williamson, Hohorst e Slein, citados por Vasconcelos (8). São eles: piruvato, lactato, glicose e os corpos cetônicos, acetoacetato e 3-OH butirato.

O inóculo tumoral foi obtido de ratos Wistar portando carcinossarcoma de Walker em pata traseira, mantido por sucessivas inoculações.

Todos os experimentos observaram as normas internacionais definidas para experimentação animal e estes receberam cuidados especiais conforme preceitua o guia de cuidados e utili-

RESULTADOS

Neste estudo o carcinossarcoma 256 de Walker, implantado no parênquima do rim direito de ratos Wistar, apresentou índice de pega de 100%, (comprovada por estudo histopatológico minucioso), invadindo profunda e intensamente suas estruturas nobres e destruindo-as.

O implante tumoral causou aumento estatisticamente significativa na concentração sanguínea de lactato e corpos cetônicos, nos animais alimentados com a dieta padrão do biotério, via oral ($p < 0.001$) (Figure-1).

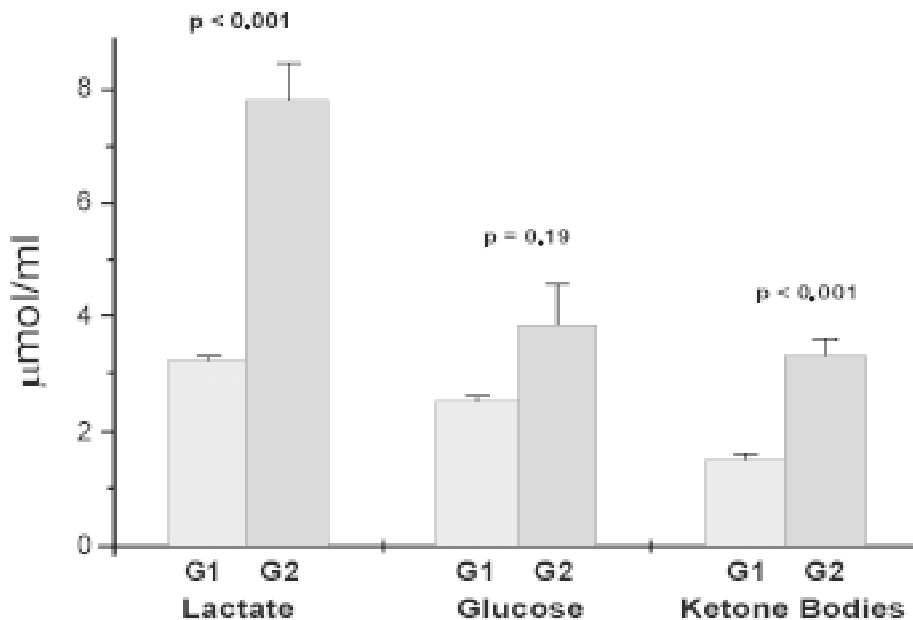


Figure 1 - Tumor effects on blood concentrations of lactate, glucose and ketone bodies. The concentration of ketone bodies is multiplied by the factor 10.

zação dos animais de laboratório do US Department of Health and Human Services (1985).

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média), nas representações gráficas. A análise estatística foi realizada com o software Minitab Statistical Package Macintosh, e em função da não normalidade dos dados, foi empregado o teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos, obedecendo aos níveis de significância $p < 0.05$.

O estudo comparativo da variação de peso corporal demonstrou que o implante tumoral produziu queda significativa no ganho ponderal dos ratos alimentados com a dieta padrão do biotério ($p = 0.03$), enquanto que, a terapia nutricional enteral (TNE) com ou sem arginina aumentou significativamente o ganho de peso dos ratos portadores de tumor ($p < 0.001$) (Figure-2).

Quando avaliados os volumes dos rins direitos, o implante de tumor de Walker causou incremento significativo nestes órgãos (inoculados

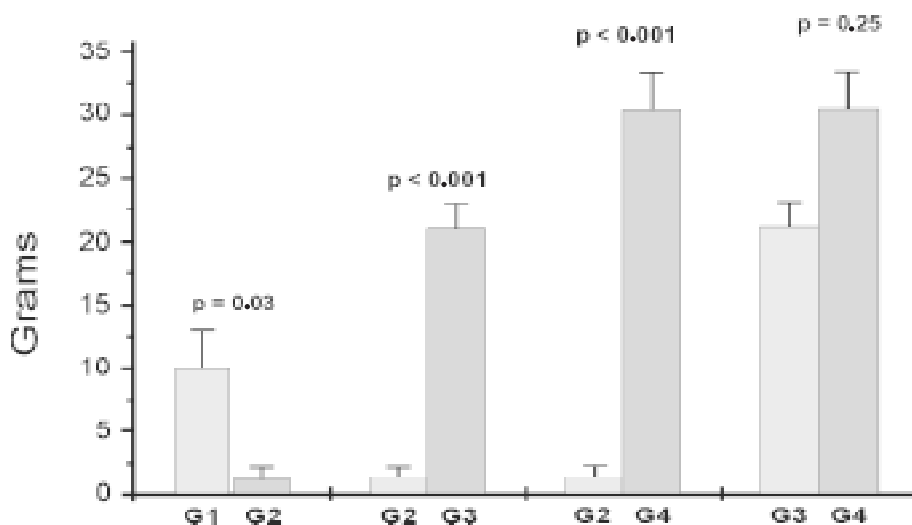


Figure 2 - Variations of the animals' body weight from the beginning to the end of the experiment.

com tumor), nos animais alimentados com dieta via oral ($p < 0.001$). A terapia nutricional enteral com ou sem arginina não produziu modificações nestas medidas volumétricas, ($p = 0.12$ e $p = 0.52$) (Figure-3).

Os animais portadores de tumor, alimentados com a dieta padrão, via oral, apresentaram aumentos significativos na concentração sanguínea de lactato e de corpos cetônicos, quando comparados com os do grupo controle – sem tumor e alimentados de modo similar. A terapia nutricional enteral com ou sem arginina causou diminuição na concentração de lactato e de corpos cetônicos ($p < 0.01$ e $p < 0.001$).

Arginina em suplementação à TNE diminuiu as taxas glicêmicas ($p = 0.03$) (Figure-4).

As concentrações hepáticas de lactato e glicose aumentaram significativamente nos animais portadores de tumor em relação ao grupo controle (sem tumor, com a mesma dieta padrão via oral) ($p < 0.001$ e $p < 0.01$). A terapia nutricional enteral com ou sem arginina, diminuiu as concentrações hepáticas dos substratos lactato e corpos cetônicos, nos animais portadores de tumor ($p < 0.01$ e $p < 0.005$). A arginina em suplementação diminuiu a concentração hepática de glicose nos animais portadores de tumor alimentados com TNE ($p < 0.005$) (Figure-5).

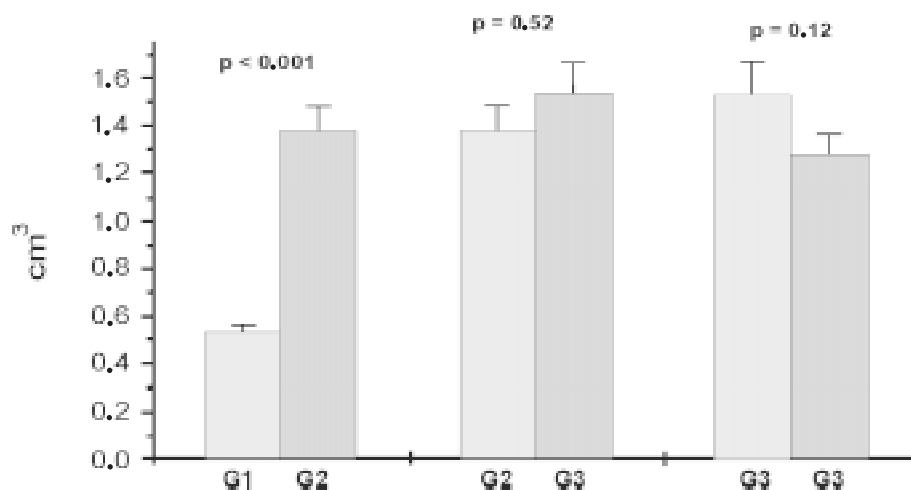


Figure 3 - Variations of the right kidney weight from the beginning to the end of the experiment.

DISCUSSÃO

Trabalho publicado em 1998 demonstrou proliferação em 100% das inoculações de tumor de Walker em estômago de ratos Wistar (9). Outro autor, trabalhando com o mesmo tipo de tumor em subcutâneo de ratos Sprague-Dawley, obteve 95 a 100% de pega, sem metástases e invasões a órgãos adjacentes e sobrevida de 14 ± 1 dia (10).

O presente estudo mostrou que o carcinossarcoma de Walker implantado no rim direito de ratos (grupos 2, 3 e 4), apresentou índice de pega de 100%. Os achados histopatológicos foram compatíveis com invasão tumoral difusa do parênquima renal com destruição de túbulos e glomérulos.

atividade do ciclo de Cori. A glicose não se elevou significativamente no sangue dos animais portadores de tumor, talvez por conta de sua maior captação e utilização pelas células tumorais (Figure-1).

No câncer, o fator de necrose tumoral (TNF) suprime a lipogênese e ativa a enzima lipase hormônio sensível causando aumento da lipólise (12). Os corpos cetônicos, originados da oxidação parcial dos ácidos graxos liberados, são substratos energéticos utilizados pelos tumores (11).

No estudo ora apresentado ocorreu hiperetonemia nos animais com tumor, refletindo aumento da cetogênese conseqüente à disponibilidade de ácidos graxos liberados do tecido adiposo, via lipólise, induzida pela neoplasia (Figure-1).

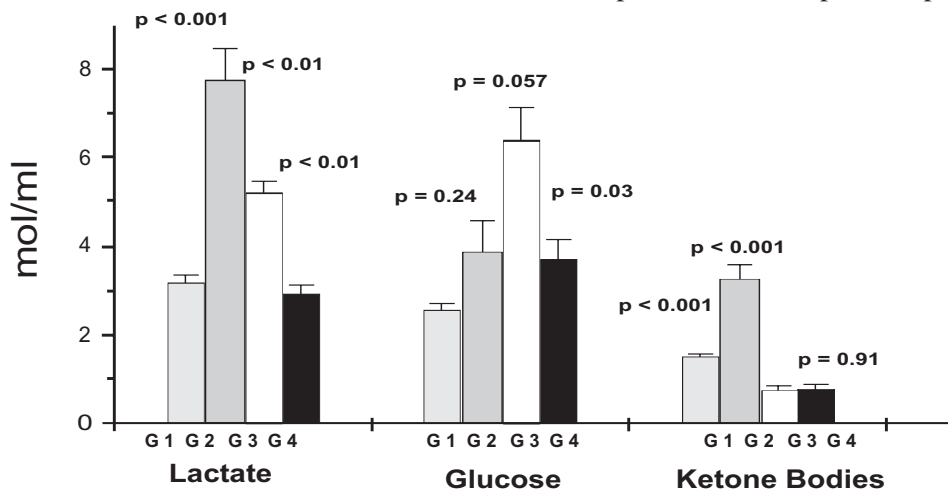


Figure 4 - Blood concentrations of lactate, glucose and ketone bodies. The “p” values are referred to the comparison between G1xG2, G2xG3 and G3xG4. The concentration of ketone bodies is multiplied by the factor 10.

Um trabalho in vitro e in vivo com 2 tipos de canceres humanos, transplantados para ratos deficientes de células T, mostrou aumento do consumo de glicose e lactacemia em 97% dos tumores (11). Outros autores demonstraram aumento na concentração de glicose devido ao desenvolvimento de resistência insulínica mediada por substâncias oriundas do tumor (2).

No presente estudo os níveis sanguíneos de lactato encontraram-se elevados em animais portadores de tumor, em relação aos controles, no 9º dia pós-implante, demonstrando um aumento da

Zylics et al., em 1990, reportaram que ratos com carcinossarcoma de Walker na coxa direita, perderam até o 10º dia da inoculação cerca de 2.5 g, enquanto que seus controles, sem tumor, ganharam 20 g, em média, no mesmo período (13).

Igualmente, neste estudo, no 9º dia da inoculação, os ratos portadores de tumor de Walker, apresentaram ganho de peso de, somente 1.3 ± 1 g, contrastando com o ganho ponderal dos animais controles, sem tumor, que foi de 10 ± 3 g ($p < 0.01$) (Figure-2). Não foi observado nenhum caso grave de caquexia, similar aos achados de Zylics et al. que

encontraram diminuição abrupta do consumo de alimentos e acentuada perda de peso, somente a partir do dia 13 pós-inoculação (13).

A perda de peso foi acompanhada de aumento de volume do rim inoculado, refletindo o crescimento tumoral (Figure-3). Estas medidas não se modificaram quando aos animais foi ofertada terapia nutricional enteral sem ou com suplementação de arginina. O aminoácido arginina em suplementação à TNE não pareceu agir sobre o crescimento tumoral (Figure-3).

Torosian et al. realizando experimentos com ratos portadores de tumor de Walker alimentados com nutrição parenteral total, não demonstraram efeito de estimulação do crescimento tumoral (7).

crescimento tumoral, em experimentos in vitro e in vivo (15).

A terapia nutricional enteral com ou sem arginina foi capaz de promover ganho de peso corporal dos animais portadores de tumor (30 ± 3 e 21 ± 2 g) em 7 dias, mantendo o status nutricional (Figure-2). Este aumento de peso deveu-se aos nutrientes ofertados pela TNE, associados aos efeitos anabólicos da arginina.

Aumento de peso corporal com terapia nutricional enteral pode ocorrer mesmo na vigência de quimioterapia, devido principalmente à acumulação de gordura (16).

Emery et al. (1989) estudando ratas portadoras de tumores coloretais, induzidos por injeções sub-

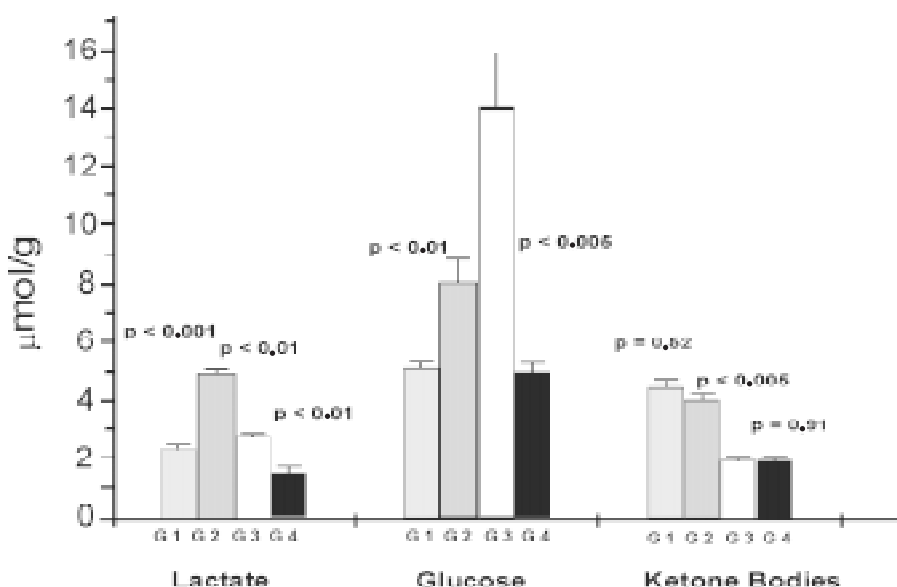


Figure 5 - Hepatic concentrations of lactate, glucose and ketone bodies. The “p” values are referred to the comparison between G1xG2, G2xG3 and G3xG4. The concentration of ketone bodies is multiplied by the factor 10.

Estudo in vitro com células de câncer de bexiga, sob várias concentrações de arginina, demonstrou que a atividade da forma constitutiva de NOS, em células estimuladas por citocinas, promove proliferação celular, e a produção de NO pela forma induzível de NOS, estimulada por citocinas, inibe o crescimento tumoral (14).

Edwards trabalhando com linhagens murinas de tumores mamários produtoras de NO, encontrou que a arginina tem ação estimuladora do

cutâneas de dimetil-hidrazina, usando a mesma dieta polimérica empregada no presente estudo, porém dada por via oral na água ad libitum, encontrou aumento de peso, diário, em torno de 5 g (17).

Estudos comparando a eficácia metabólica da terapia nutricional enteral em pacientes desnutridos com câncer e em pacientes sem câncer demonstraram em ambos os grupos uma supressão da produção de glicose endógena, e da conversão de alanina à glicose. Ocorreu balanço nitrogenado positivo e eli-

minação do catabolismo protéico. Entretanto, após duas semanas, os pacientes portadores de neoplasia se comportaram diferentemente, exibindo aumento da concentração sangüínea de lactato, diminuição da concentração de glicina, no sangue, e inabilidade de repor os estoques de gordura mobilizados (18).

Neste estudo a concentração sangüínea de lactato diminuiu em animais portadores de tumor submetidos à TNE, enquanto que a concentração sangüínea de glicose não se modificou significativamente (Figure-4). É provável que o aumento do consumo de glicose pelo tecido tumoral tenha impedido o incremento da glicemia que se poderia esperar da oferta de nutrientes.

A suplementação de arginina na TNE em ratos portadores de tumor produziu queda significativa nas concentrações sangüíneas, de lactato e de glicose, comparadas às concentrações encontradas em animais portadores de tumor alimentados com TNE sem suplementação deste aminoácido (Figure-4). É possível que a suplementação de arginina tenha causado aumento da insulinemia e da liberação de IGF-1, um hormônio com capacidade hipoglicemiante e anabólico. Segundo trabalho publicado em 1995, a suplementação oral com arginina (17 g de arginina livre) em humanos, durante duas semanas, levou a significativa elevação sérica do Insulin-like growth factor (IGF-1), com melhora do balanço nitrogenado e diminuição do colesterol total (19).

Foi observado no presente estudo, queda na concentração de corpos cetônicos, no sangue, quando aos animais portadores de tumor foi oferecida a TNE (Figure-4). Tal evento deveu-se, possivelmente, à liberação continuada de insulina (efeito prandial contínuo), diminuindo a lipólise e consequentemente a oferta de ácidos graxos para o fígado, com subsequente decréscimo na síntese de corpos cetônicos.

No trabalho ora apresentado, houve queda na concentração hepática de lactato quando a TNE com ou sem arginina foi ofertada aos animais com tumor (Figure-5). A suplementação de arginina à terapia nutricional enteral nos ratos portadores de tumor produziu queda na concentração hepática de glicose, semelhante ao que ocorreu com a glicemia. Talvez isso tenha acon-

tecido pela ação hipoglicemiante da arginina via IGF-1 (Figure-5).

A ação hipoglicemiante da arginina neste estudo abre perspectivas para novas pesquisas envolvendo este aminoácido no campo do diabetes mellitus.

CONCLUSÃO

A terapia nutricional enteral e a terapia nutricional enteral enriquecida com arginina administradas a ratos Wistar portadores de tumor de Walker implantado no rim direito, promoveram ganho de peso corporal, preservação do estado nutricional, redução de hiperlactacemia e hiperacetonemia. Além disso, não modificaram o volume do rim direito inoculado com tumor, permitindo concluir-se que a oferta de nutrientes exógenos não estimulou o crescimento tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Heys SD, Gough DB, Eremin O: Is nutritional support in patients with cancer undergoing surgery beneficial? *Eur J Surg Oncol*, 22: 292-297, 1996.
2. Albrecht JT, Todd W: Cachexia and anorexia in malignancy. *Hematol/Oncol Clin North Am*, 10: 791-800, 1996.
3. Incelet RI, Peacock J, Gorschboth C, Norton J: Gluconeogenesis in the tumor-influenced rat hepatocyte: importance of tumor burden, lactate, insulin and glucagon. *J Natl Cancer Inst*, 79: 1039-1046, 1987.
4. Frank JL, Lawrence W Jr, Banks WL JR: Modulation of cell cycle Kinetics in human cancer with total parenteral nutrition. *Cancer*, 69: 1858-1864, 1992.
5. Britenden SD, Heys J, Ross KGM, Park KGM, Eremin O: Nutritional pharmacology: effects of L-arginine on host defences, response to trauma and tumor growth. *Clinical Science*, 86: 123-132, 1994.
6. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G: N(omega)-hydroxyl-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res*, 60: 3305-3312, 2000.

7. Torosian MH, Tsou KC, Daly JM: Alteration of tumor cell kinetics by total parenteral nutrition: potential therapeutic implications. *Cancer*, 53: 1409-1415, 1984.
8. Vasconcelos PRL: *Hepatic Metabolism During Sepsis*. Oxford, University of Oxford, 1987, pp. 188, Thesis.
9. Oliveira PFM, Henriques IA, Rodrigues Filho F, Almeida PRC, Moraes MO: Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação de Tumor de Walker em estômago de ratos Wistar. *Acta Cir Bras*, 13: 243-249, 1998.
10. Guitani A, Rechia M, Carli M, Rocchetti M, Barto S, Garatini S: Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia e cachexia. *Oncology*, 39: 173-178, 1982.
11. Kallinowski P, Vaupel S, Runkel G, Berg HP, Fortmeyer KH, Baessler K, Wagner W, Muller-Klieser W, Walenta S: Glucose uptake, lactate release, ketone body turnover, metabolic micromilieu and pH distributions in human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res*, 48: 7264-7272, 1988.
12. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT: Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia e inflammation. *J Exp Med*, 167: 1211, 1988.
13. Zylics Z, Schwantje O, Theo Wagner DJ, Folgering HTM: Metabolic response to enteral food in different phases of cancer cachexia in rats. *Oncology*, 47: 87-91, 1990.
14. Ma Q, Williamson KE, O'rourke D, Rowland BJ: The effects of L-arginine n crypt cell hyperproliferation in colorectal cancer. *J Surg Res*, 81: 181-188, 1999.
15. Edwards PD, Topping D, Kontaridis MI, Moldawer LL, Copeland EM 3rd., Lind DS: Arginine-enhanced enteral nutrition augments the growth of a nitric oxide producing tumor. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 21: 251-219, 1997.
16. Bozzetti F: Effects of artificial nutrition on nutritional status of cancer patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 13: 61-74, 1989.
17. Emery PW, Ward MW, Lewib MR: Effect of nutrition supplementation on protein synthesis in tumor and host tissues of rats with colonic cancer. *Br J Surg*, 76: 790-792, 1989.
18. Dresler CM, Jeevanandam M, Brenam MF, Ansley J: Metabolic efficacy of enteral feeding in malnourished cancer and non cancer patients. *Metabolism*, 36: 82-88, 1987.
19. Hurson M, Regan MC, Kirks J, Wasserkrug HL, Barbul A: Metabolic effects of arginine in a healthy elderly population. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 19: 227-230, 1995.

Received: June 30, 2000

Accepted after revision: April 20, 2001

Correspondence address:

Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva
 Rua Dr. José Lino, 141/1002
 Fortaleza, CE, 60165-270, Brazil
 Fax: + + (55) (85) 242-2190