

Efeitos farmacológicos da suplementação dietética com arginina em ratos com tumor sólido de Walker 256

M.R.C.G.Novaes, L.A.M.Lima, J.E.G.Ribeiro, A.V.Magalhães, M.V.Sousa, L. Morhy

Universidade de Brasília (UnB), Centro Brasileiro de Sequenciamento de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Brasília, D.F. Brasil

RESUMO. Os efeitos da suplementação com arginina na dieta de portadores de câncer são controversos. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da suplementação dietética com arginina no crescimento tumoral, disseminação metastática, metabolismo de aminoácidos, alterações hematológicas, tempo de sobrevivência e peso corporal de ratos Wistar com tumor sólido de Walker 256. Foram administradas soluções por via gástrica, contendo arginina nas concentrações de 4%, 6% e dieta padrão (controle).

A suplementação com arginina inibiu a disseminação de células tumorais no modelo experimental, embora o crescimento tumoral não tenha sido afetado significativamente. O tempo de sobrevivência dos animais com tumor sólido não foi afetado de forma significativa. Foi observado diminuição significativa do peso corpóreo após a administração da arginina a 6% ($p < 0.05$). O metabolismo dos aminoácidos foi estimulado após ingestão de suplementos com arginina, evidenciado pelos aumentos significativos dos níveis sanguíneos de arginina, ornitina, citrulina, prolina e histidina quando comparados ao grupo controle ($p < 0.001$). O grau de anemia no tumor sólido foi menos severo nos grupos que receberam suplementação com arginina, evidenciado através do hemograma ($p < 0.001$) e da análise citológica. Os resultados sugerem que a suplementação dietética com arginina a 6% apresentou algum efeito benéfico no tumor sólido de Walker 256 que ultrapassa o efeito nutricional.

Palavras-chaves: Suplementação com arginina, tumor de Walker 256, metástase, metabolismo de aminoácidos, tempo de sobrevivência.

SUMMARY. Pharmacological effects of arginine supplementation in rats with Walker 256 solid tumor. The effects of diet arginine supplementation for those with cancer are controversial. We evaluate the effects of dietetic supplementation with arginine over body weight, growth of tumor, metastatic dissemination, surviving time, amino acid metabolism, haematological changes of the rats with Walker 256 solid tumor. Intragastrical solutions with arginine at 4% and 6%, a standard diet (control) were administered to the animals. The supplementation with arginine was associated with a lower weight gain during the study period ($p < 0.05$). Surviving time of the rats with solid tumor did not vary significantly between the groups. The rate of metastase was lower in animals with Walker 256 solid tumor supplemented with arginine. The amino acid metabolism was stimulate in the animals after arginine supplementation at 4% and 6%, demonstrated by significant increases in blood levels of arginine, ornitine, citruline, proline and histidine when compared to the control group. Anaemia was less severe in the rats with Walker 256 solid tumor that received arginine supplementation. The results suggest that arginine 6% supplementation may have pharmacologic effect in rats with Walker 256 solid beyond the nutritional one.

Key words: Arginine supplementation, Walker 256 tumor, surviving time, metastases, amino acids metabolism.

INTRODUÇÃO

A influência da arginina sobre o crescimento tumoral e nutrição do hospedeiro tem sido investigada por mais de 60 anos (1-4).

A proposição para o uso de quantidades suplementares de arginina no suporte nutricional do portador de câncer tem sido avaliada como aporte de substrato nitrogenado e por seus efeitos farmacológicos, que possivelmente, ampliam os mecanismos de defesa imunológicos envolvidos e, conseqüentemente, possibilitam a melhora do prognóstico do paciente.

Este aminoácido tem apresentado múltiplas ações fisiológicas e farmacológicas. É precursor metabólico da creatina,

da creatinina, de poliaminas e do óxido nítrico, e tem importante participação no ciclo da uréia. É descrito também como estimulador do hormônio de crescimento hipofisário, e tem sido relacionado ao aumento da atividade das células *killer* e *T-helper*, ao estímulo da produção das citocinas interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), receptor para IL-2, interleucina-6 (IL-6) e ao fator alfa de necrose do tumor (TNF-alfa) que são importantes mediadores na gênese da caquexia (5).

Apesar de serem descritas na literatura muitas ações da arginina, os resultados em portadores de câncer ainda são insuficientes e controversos. *In vitro*, L-arginina pode inibir e estimular linhagens celulares de câncer (7). *In vivo*, estudos experimentais demonstraram também estimulação (4,6,8) e inibição do crescimento tumoral (1,3,9,10).

Neste estudo utilizamos o tumor de Walker 256, sólido, para avaliar os efeitos da suplementação dietética com arginina no crescimento tumoral, disseminação metastática, tempo de sobrevida, peso corporal, metabolismo dos aminoácidos e alterações hematológicas.

MATERIAIS E METODOS

Preparação dos animais

Ratos Wistar machos e jovens (42-48 dias), pesando 142.34 ± 19.36 g, foram distribuídos em gaiolas contendo em média cinco ratos e mantidos durante dois dias, sob idênticas condições ambientais, com ciclos de luz de 12h/dia, ração e água *ad libitum*.

Procedência, manutenção e inoculação do tumor de Walker 256

A linhagem A do Tumor de Walker 256 (origem: *The Christ Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge, Mass., USA*), foi obtida junto à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e conservada em nitrogênio líquido a -160°C . A técnica de inoculação utilizada nos animais foi multifocal e subcutânea na região dorso-lombar, totalizando 4 inoculações por animal, com aproximadamente 4 milhões de células por inoculação (11).

Dieta dos animais e posologia da arginina

A ração utilizada no estudo (Labina, Agribands Purina do Brasil Ltda), continha em sua composição arginina (1.5%), proteína (23.0%), minerais (8.0%), fibras (9.0%) e vitaminas (traços). A arginina, foi obtida na forma de cloridrato de arginina (Laboratório Ajinomoto do Brasil) e administrada pura, diluída em água destilada, nas concentrações de 4% e 6% das calorias totais estimadas do valor calórico (VCT) de um rato jovem. Um rato jovem consome cerca de 15g/dia de ração o que corresponde aproximadamente 47.3 kcal/dia. A dieta padrão não continha a suplementação de arginina. Todas as soluções foram introduzidas no animal através de entubação gástrica, iniciadas doze horas após a inoculação das células tumorais, mantendo-se esta periodicidade de administração (12/12 horas).

Alteração ponderal e peso da carcaça

A alteração no peso corpóreo foi calculada pela subtração entre a média do peso final (animal morto) e o peso inicial. O peso da carcaça dos animais correspondeu ao último peso do animal subtraindo-se o peso dos tumores.

Exame anatomo-patológico dos animais

A necropsia dos animais foi realizada com evisceração total em monoblocos, os quais foram fixados em formaldeído a 10%. O material selecionado foi incluído em parafina, seccionado em micrótomo rotativo com 5 micrômetros de espessura e corado pelo método da hematoxilina-eosina, para análise histopatológica.

Pesagem e determinação do volume dos tumores

Os tumores foram pesados em balança analítica. O peso final refere-se a média dos quatro tumores de cada rato, conforme validado previamente (11). O volume do tumor foi estimado utilizando-se a fórmula: $V=L.W.D./6$, onde: L é o comprimento, W é a largura e D é a espessura. As medições foram feitas com paquímetro, com precisão de duas casas decimais e aferido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (4, 12).

Dosagem dos aminoácidos plasmáticos

A análise dos aminoácidos foi realizada no analisador Hitachi L-8500, por cromatografia de troca iônica com coluna de alta resolução, seguida da detecção com ninhidrina na fase pós-coluna. O coeficiente de variação do analisador apresentou-se inferior a 0.8%.

Dosagem de creatinina, uréia e glicose no soro

Para a determinação da creatinina foi utilizado o método cinético (LABORLAB, Brasil). Para a determinação de uréia foi utilizado o método cinético UV (urease-GLDH, CELM, Brasil). A determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático (LABORLAB, Brasil). Os valores obtidos foram expressos em mg/dl.

Análise hematológica

Foram colhidos 3ml de sangue venoso com anticoagulante (EDTA a 10%) por punção cardíaca e realizado o hemograma, utilizando-se o Contador diferencial de células (Mod. CDI.)

Análise estatística

A análise estatística foi desenvolvida no software SAS (Statistical Analysis System), versão 6.12. Os dados foram analisados utilizando-se os procedimentos de análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, os testes de Duncan e Student-Newman-Keuls. A significância estatística aceita foi $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efeito da suplementação com arginina no desenvolvimento do tumor sólido de Walker 256 e no tempo de sobrevida dos animais

A arginina não afetou a incidência nem o período de latência, sendo que os tumores tornaram-se palpáveis entre 3 a 4 dias após inoculação.

A suplementação com arginina a 6% tendeu a reduzir o volume do tumor (3.35 ± 0.56 cm³), quando comparado ao grupo que recebeu a suplementação com arginina a 4% (3.51 ± 0.58 cm³) e ao grupo simplesmente tratado com dieta padrão (3.85 ± 0.32 cm³), não atingindo diferença estatística ($p < 0.06$). O peso do tumor também tendeu a apresentar-se menor após a administração de arginina a 6% (4.85 ± 1.51 g), quando comparado às administrações de arginina a 4% (5.01 ± 1.62 g) e com dieta padrão (5.20 ± 1.58 g), não sendo

entretanto esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0.06$), (Tabela 1).

O tempo de sobrevivência dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P < 0.06$), (Tabela 1).

TABELA 1

Efeito da suplementação dietética com arginina em ratos com tumor sólido de Walker 256

	Dietas		Dieta padrão
	Arginina 6%	Arginina 4%	
Peso do tumor (g) *	4.85±1.51	5.01±1.62	5.20±1.58
Volume do tumor (cm ³) ⁺	3.35±0.56	3.51±0.58	3.85±0.52
Tempo sobrevivência (h) ⁺⁺	153.71±67.86	148.31±62.40	107.73±64.10

Análise de variância (ANOVA). Testes aplicados: Duncan, Student-Newman-Keuls. * $P < 0.06$, NS; ⁺ $P < 0.06$, NS; ⁺⁺ $P < 0.06$, NS. Os valores representam a média ±DP (n=52) em cada grupo.

Efeito da suplementação com arginina no desenvolvimento metastático do tumor sólido de Walker 256

Nos animais inoculados com tumor sólido, as células apresentaram-se como uma neoplasia homogênea e monótona, com características poligonais ou irregulares, isoladas ou em pequenos grupos, com limites citoplasmáticos imprecisos. O citoplasma apresentou-se escasso, basofílico; os núcleos volumosos, de tamanhos variados, com nucléolos proeminentes e alto índice mitótico. O tumor infiltrou os feixes musculares e a pele por contiguidade.

No grupo que recebeu simplesmente a dieta padrão, foi observado comprometimento visceral do pulmão e fígado, de intensidade moderada a acentuada, com características histopatológicas semelhantes, em 100% dos animais necropsiados. No pulmão foi observada metástase nodular volumosa peri-brônquica e infiltração nos septos interlobares de intensidade moderada a acentuada, caracterizando provavelmente uma disseminação metastática de origem linfática. No fígado destes animais, foi encontrada hepatoesplenomegalia com infiltração de células neoplásicas, intra, extra-lobular e sinusoidal, de intensidade moderada.

Na análise histopatológica dos animais com tumor de Walker 256, que receberam suplementação com arginina a 4%, foi observado comprometimento pulmonar e hepático de intensidade moderada. No pulmão foi observada metástase nodular de intensidade discreta. Os animais apresentaram esplenomegalia, com infiltração de células neoplásicas intra e extra-lobulares, de intensidade discreta, em 100% dos animais do grupo. No rim foram observadas discretas alterações degenerativas das células tubulares renais, porém com ausência de células tumorais.

O comprometimento pulmonar e hepático também foi encontrado no grupo que recebeu a suplementação com arginina a 6%. No pulmão foi observada infiltração neoplásica perivascular (único nódulo) em 80% dos animais necropsiados, de

intensidade discreta. No fígado destes animais, foi encontrada infiltração neoplásica inter e extra-lobulares, em 80% dos animais necropsiados, de intensidade discreta. No rim, foram notadas as discretas alterações degenerativas das células tubulares renais, descritas anteriormente no grupo que recebeu arginina a 4%.

Efeito da suplementação com arginina no peso corpóreo e peso da carcaça dos animais com tumor sólido de Walker 256

Todos os ratos machos e jovens inoculados com o tumor sólido de Walker 256, apresentaram ganho ponderal, independente da suplementação dietética, todavia a suplementação com arginina esteve associada a um menor ganho ponderal, durante o período de estudo quando comparado aos animais do grupo que recebeu somente a dieta padrão (Tabela 2).

A análise da alteração no peso dos animais possibilitou verificar que um menor ganho ponderal esteve relacionada à dosagem de arginina a 6%, sendo obtida uma pequena alteração corpórea (3.55±16.69g), quando comparado aos grupos suplementados com a concentração a 4% (8.64±16.50g) e com dieta padrão (15.28±20.50g), sendo esta diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos arg 6% x dieta padrão ($p < 0.05$), (Tabela 2).

O peso médio da carcaça decresceu nos animais que receberam a suplementação com arginina a 6% (140.55±20.50g), quando comparado aos animais que receberam a arginina a 4% (145.49±19.40g) e a dieta padrão (152.87±22.68g), sendo a diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos que receberam a arginina 6% e a dieta padrão ($p < 0.05$), (Tabela 2).

TABELA 2

Alteração ponderal corpórea nos animais inoculados com tumor sólido de Walker 256, após suplementação dietética com arginina

Peso (g)	Dietas		Dieta padrão
	Arginina 6%	Arginina 4%	
Peso inicial	141.85±16.41	141.86±16.24	142.79±22.40
Peso final	145.40±20.50	150.50±19.40	158.07±22.68
Alteração no peso ⁺	3.55±16.69	8.64±16.50	15.28±20.50
Peso da carcaça ⁺	140.55±20.50	145.49±19.40	152.87±22.68

Análise de variância (ANOVA). Testes aplicados: Duncan, Student-Newman-Keuls. ⁺arg 6% x dieta padrão, $p < 0.05$. Demais relações NS. Os valores representam a média ±DP (n=52) em cada grupo.

Efeito da suplementação com arginina nas concentrações plasmáticas dos aminoácidos nos animais com tumor de Walker 256

Foi observado um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de arginina, citrulina, ornitina, prolina e histidina (arg 6% x arg 4% x dieta padrão, $p < 0.001$), (Tabela 3).

TABELA 3

Alterações na concentração plasmática dos aminoácidos (AA) plasmáticos após a suplementação com arginina, em ratos com tumor sólido de Walker 256

AA (nmol/l)	Dieta		
	Arginina 6%	Arginina 4%	Dieta Padrão
Arginina*	157.68±15.39	123.70±11.91	101.50±13.38
Omitina*	156.00±10.77	107.40±12.79	80.07±14.35
Citulina*	78.96±17.55	66.69±14.99	53.80±11.46
Lisina	174.18±10.51	159.83±11.29	143.35±12.64
Histidina*	79.00±16.47	57.98±17.16	41.20±10.08
Prolina*	163.90±14.86	157.00±15.20	114.11±15.71
Valina	181.24±13.28	160.63±18.71	151.73±12.91
Metionina	67.27±21.18	50.86±11.00	48.26±18.51
Isoleucina	72.57±17.77	64.47±26.99	60.60±11.74
Leucina	151.80±12.49	120.42±20.47	132.64±25.49
Feniltilamina	77.62±26.42	68.58±19.28	65.12±13.87
Treonina	151.71±14.54	148.19±26.62	133.69±20.51
Glicina	339.20±17.67	322.97±13.18	318.68±12.48
Alanina	229.57±23.34	217.40±21.91	209.70±22.48

Análise univariada (ANOVA). Testes aplicados: Duncan, Student-Newman-Keuls. *Arg 6% x dieta padrão (P<0.001); *arg 6% x arg 4% (P<0.001); *arg 4% x dieta padrão (P<0.001). Demais relações NS. Os valores representam a média ± DP (n=20) em cada grupo.

Dosagem de uréia, creatinina e glicose nos animais com tumor de Walker 256

Não foram encontradas alterações significativas nos níveis de uréia (P<0.09) e creatinina (P<0.12) e glicose (P<0.16) nos animais suplementados com arginina, quando comparados ao grupo que recebeu apenas a dieta padrão (Tabela 4).

TABELA 4

Concentração de uréia, creatinina e glicose após a suplementação dietética com arginina em ratos com tumor sólido de Walker 256

	Dieta		
	Arginina 6%	Arginina 4%	Dieta Padrão
Uréia*	119.00±8.9	113.00±7.1	110.00±9.0
Creatinina ⁺	71.00±21.0	67.00±25.0	64.00±19.0
Glicose ⁺⁺	181.00±11.0	175.00±16.0	170.00±14.0

Análise univariada (ANOVA). Testes aplicados: Duncan, Student-Newman-Keuls. *P<0.09, NS; ⁺P<0.12, NS; ⁺⁺P<0.16, NS. Os valores representam a média ±DP (n=20) em cada grupo. Unidade de referência: mg/dl.

Alterações hematológicas obtidas após a suplementação com arginina nos animais inoculados com tumor de Walker 256

O grupo de animais que recebeu dieta padrão apresentou menores índices hematimétricos quando comparados aos grupos que receberam arginina (p<0.001). O número de leucócitos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (P<0.06), (Tabela 5).

TABELA 5

Alterações hematológicas após a suplementação com arginina em ratos com tumor sólido de Walker 256

	Dieta		
	Arginina 6%	Arginina 4%	Dieta Padrão
Eritrócitos*	3.02±0.21	2.77±0.17	2.47±0.17
Hemoglobinas*	6.77±0.34	6.06±0.18	5.75±0.18
Hematócrito*	24.25±0.51	23.75±0.21	23.20±0.64
Leucócitos*	5.65±0.58	5.57±0.48	5.50±0.40
Neutrófilos*	6.00±0.83	4.90±0.95	4.00±0.80
Linfócitos*	4.10±0.26	2.70±0.45	2.40±0.32

Análise univariada (ANOVA). Testes aplicados: Duncan, Student-Newman-Keuls. *Arg 6% x arg 4%, P<0.001; arg 6% x dieta padrão, P<0.001 e arg 4% x dieta padrão, P<0.001. Demais relações NS. Os resultados representam a média±DP (n=20) em cada grupo.

No hemograma do grupo suplementado com arginina a 6% a citomorfologia dos eritrócitos indicou policromasia (52.6%±0.30) e eritroblastose (40.0%±0.44) em quantidade que tendeu a ser superior a observada no grupo suplementado com arginina a 4% (46.0%±0.63 e 34.0%±0.62) e que recebeu somente a dieta padrão (39.0%±0.30 e 31.0%±0.52).

DISCUSSÃO

Desenvolvimento do tumor sólido de Walker 256 e tempo de sobrevida dos animais

O tumor de Walker 256 apresenta efeitos sistêmicos variados, como anorexia, alterações imunológicas e hidroeletrólíticas. Buscando obter maior sincronismo no desenvolvimento tumoral entre os animais do mesmo grupo, foi utilizada a técnica de inoculação multifocal, validada anteriormente (11).

No presente estudo, a arginina não afetou o período de latência (4 a 5 dias) ou a incidência do tumor (100%) nos grupos estudados, sugerindo que a arginina não previniu a iniciação do tumor após a inoculação das células tumorais. Esta observação apresentou-se semelhante à relatada previamente (3).

A influência da arginina também não foi notada no desenvolvimento inicial do tumor de Walker 256, o qual apresentou um padrão de desenvolvimento idêntico nos grupos. O crescimento tumoral seguiu um padrão de evolução típico, com um período inicial livre de efeitos sistêmicos detectáveis (período subclínico), seguido por um período

sintomático (período clínico), caracterizado por uma fase de sintomas moderados e uma fase grave, com diminuição da ingesta de ração, pouca reação ao estímulo externo e ao manuseio, depressão, seguida da morte do animal.

A suplementação com arginina a 6%, possivelmente, prolongou a duração das fases finais de desenvolvimento tumoral, sendo constatado aumento no tempo de sobrevivência médio neste grupo quando comparado aos demais grupos, porém sem significado estatístico ($P < 0.06$). O aumento da sobrevida dos animais com câncer, após a suplementação com arginina, foi relatado anteriormente (7,13).

No presente estudo, houve uma tendência a diminuição no peso e volume do tumor após utilização da arginina, porém as diferenças não se apresentaram estatisticamente significativas, quando foram comparados os grupos suplementados com arginina (6% e 4%) e que recebeu simplesmente a dieta padrão.

Embora as ações farmacológicas deste aminoácido não tenham sido ainda totalmente elucidadas, os efeitos observados podem ser explicados por várias hipóteses, entre elas, pelo conceito, que o crescimento tumoral é um processo dinâmico envolvendo uma competição entre células imunocompetentes e células neoplásicas, nas quais o crescimento é a soma da destruição e proliferação celular. Neste modelo, é sugerido que a progressão do tumor depende da capacidade do sistema imune em reconhecer e destruir as células neoplásicas, sendo que esta capacidade pode estar relacionada ao grau de imunogenicidade do tumor (9, 14).

Tem sido sugerido também que se o tumor for fracamente imunogênico, a suplementação com L-arginina pode estimular o crescimento tumoral devido à falta de reconhecimento do sistema imune, relatado em certos tumores humanos. Por outro lado, descreveu-se também que se o tumor for fortemente imunogênico, como tumores transplantáveis em animais, após a suplementação com arginina, as defesas do organismo podem predominar, resultando em inibição do crescimento tumoral (9).

Complementando o mecanismo de ação sugerido, a arginina é precursora do óxido nítrico (ON), cujas ações farmacológicas têm sido relacionadas à inibição do crescimento de células tumorais *in vitro* (5,14,15), citotoxicidade dos macrófagos ativados e inibição da agregação dos neutrófilos (5), além de participar em vários fenômenos fisiológicos incluindo a regulação da pressão arterial, neuro-transmissão e imunidade celular (16).

Muitos mecanismos tentam explicar a ação do ON na inibição do crescimento tumoral *in vitro*. Entre estes, que o ON interage com proteínas que contêm ferro necessárias à respiração e replicação celulares, incluindo a enzima do ciclo do ácido cítrico: aconitase e a enzima da síntese do DNA: ribonucleotídeo redutase, exercendo efeito inibitório sobre o crescimento tumoral. Além disso, o ON exógeno produzido por macrófagos, como também o endógeno produzido por

células tumorais, tem capacidade de induzir a apoptose ou morte celular programada em tumores (5).

Histopatologia do tumor e desenvolvimento de metástases no tumor sólido de Walker 256

A origem e determinação histopatológica deste tumor não é consensual na literatura sendo defendida as características carcinomatosa, adenomatosa, linfóide e até hematopoética por diferentes autores (17). No presente estudo, foi constatado em todos os grupos estudados, que o tumor pode ter se originado como um tumor misto, sugerindo ser semelhante a um *stem-cell* multipotencial capaz de dar origem a diversos tipos de tumores malignos. Ao exame microscópico, os padrões de um carcinoma ou sarcoma mostram-se como entidades individuais e independentes.

Na presente investigação, foi observado que nos animais que receberam a suplementação com arginina a 6% apresentaram comprometimento discreto das vísceras necropsiadas, quando comparado aos grupos que receberam a suplementação a 4% ou a dieta padrão (controles), sugerindo desta forma, que a utilização dietética da arginina apresentou-se benéfica na prevenção de metástases, no tumor sólido de Walker 256, corroborando com dados obtidos anteriormente, (10,18), embora o relato de literatura não seja consensual (5,13).

Na presente investigação, foram observadas alterações degenerativas das células tubulares renais, com ausência de células tumorais, em todos os animais que receberam suplementação com arginina. Este fato poderia estar relacionado, eventualmente, a toxicidade da arginina em grau não estabelecido até o presente.

Alterações ponderais nos animais com tumor sólido de Walker 256

A literatura não se apresenta consensual quanto aos efeitos benéficos da arginina na variação ponderal dos animais. O efeito catabólico da arginina no portador de câncer tem sido defendido por alguns autores (19, 20) e refutado por outros (12, 21).

Foi observado na presente investigação, que todos os animais com tumor sólido de Walker 256 apresentaram ganho ponderal, independentemente da suplementação dietética. Este fato ocorreu possivelmente devido aos animais serem jovens, em fase de crescimento. Foi notado também que a suplementação dietética com arginina na concentração de 6% proporcionou um menor ganho ponderal, quando comparada aos demais grupos.

A explicação dos efeitos observados ainda não foi elucidada, e desta forma especulamos que a arginina esteve associada ao menor desenvolvimento tumoral nos grupos com tumor sólido refletindo menor alteração ponderal, ou ainda, a arginina em altas concentrações, pode ocasionar toxicidade e inibição do crescimento celular dos animais jovens, proporcionando diminuição do ganho ponderal.

Em animais jovens, incluindo roedores, a arginina juntamente a outros nove aminoácidos (leucina, isoleucina, lisina, cistina, treonina, triptofano, tirosina e valina) são considerados essenciais (22). Em muitos casos, é sugerido a suplementação dietética destes aminoácidos para que o animal exiba melhor desempenho no crescimento, embora não tenha sido estabelecido a concentração ideal (22,23). Foi sugerido apenas que a administração de altas concentrações de aminoácidos proporcionou efeitos tóxicos em roedores (24).

Metabolismo dos aminoácidos nos animais com tumor sólido de Walker 256

Os aminoácidos circulantes servem como substrato para a síntese de proteínas, gluconeogênese, ureagênese e catabolismo oxidativo, os quais constituem processos metabólicos que podem estar significativamente alterados no câncer (25-27). Mudanças no metabolismo dos aminoácidos têm sido descritas nos tumores (28,29), como também no hospedeiro (25,30).

Apesar dos trabalhos revistos utilizarem amostragens pequenas e falta de detalhes metodológicos, os estudos realizados utilizando como modelo experimental o tumor de Walker 256, indicaram diminuição na concentração plasmática dos aminoácidos, especialmente aminoácidos essenciais (13,31). Este decréscimo na concentração plasmática observado nos animais com tumor de Walker 256, sem a suplementação dietética, deve-se, possivelmente, à utilização dos aminoácidos pelos tumores malignos, uma vez que os tumores precisam de aminoácidos como fonte de nitrogênio para a síntese proteica e fonte de energia para o metabolismo através da gluconeogênese (13,25,30,32).

Foi observado na presente investigação que a suplementação dietética com arginina a 6% resultou em uma tendência de aumento na concentração plasmática de todos os aminoácidos, nos animais com tumor sólido de Walker 256. Porém, foram obtidas alterações significativas nos quantitativos da arginina, histidina, prolina ornitina e citrulina ($P < 0.001$).

Entre os aminoácidos que sofreram alteração, a arginina, histidina e prolina são classificados como glicogênicos, ou seja, são aminoácidos cujo catabolismo origina piruvato ou um dos intermediários do ciclo de Krebs. Estes intermediários são substratos importantes para a gliconeogênese e responsáveis por estimular a formação de glicogênio no fígado e músculo dos animais (23).

Os aumentos na concentração dos aminoácidos citrulina, ornitina e arginina devem-se, provavelmente, às relações metabólicas que estes aminoácidos possuem entre si no organismo dos animais. A arginina além de ser derivada da dieta, é também formada através da citrulina como resultado de várias reações inter-órgãos (20). A citrulina sintetizada no fígado dos animais é parcialmente convertida em ornitina, a qual é transformada em arginina e uréia, através da enzima ornitina carbamoiltransferase. A citrulina excedente é absorvida pelo rim. O rim converte a citrulina em arginina. Parte da arginina é utilizada na síntese de proteína e parte é distribuída

a outros tecidos do organismo. Na literatura, o aumento destes aminoácidos tem sido relacionado ao aumento na atividade das enzimas ornitina carbamoiltransferase e arginina sintetase no rim de ratos submetidos a altas dietas protéicas (22).

Análise hematológica nos animais com tumor sólido de Walker 256

A anemia é uma complicação comumente observada em pacientes oncológicos (33-35). Os mecanismos responsáveis pela anemia no portador de câncer são normalmente extrínsecos ao tumor e devidos a vários mecanismos. No paciente caquético com câncer é observada uma ineficiência na utilização dos nutrientes pelo organismo, além de alterações na ingestão, digestão e absorção dos alimentos, podendo também contribuir no estado anêmico dos animais (34).

No presente estudo, foi notado que todos os animais com tumor sólido de Walker 256, em estágio avançado, apresentaram ao exame palidez acentuada das mucosas e orelhas, pelos opacos e sem brilho, movimentos lentos ao toque ou aproximação, diminuição na ingestão da ração e eliminação das fezes.

O número de eritrócitos, a quantidade de hemoglobina, o hematócrito e os números absolutos de leucócitos, neutrófilos e linfócitos, aumentaram com a suplementação com arginina a 6% quando comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta padrão, sendo este aumento dose-dependente ($p < 0.001$).

A citologia demonstrou no grupo suplementado com arginina a 6% que cerca de 39.0% dos ratos apresentaram policromasia e aproximadamente 31.0% dos animais apresentaram eritroblastose, indicando possivelmente efeito da arginina na regeneração das células do sistema hematopoético. A leucocitose, com a presença de células mais jovens da linhagem neutrofílica (mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes) foi observada em todos os grupos.

Os resultados indicam que a arginina ocasionou alterações hematológicas nos animais, sendo que o efeito apresentou-se dose-dependente quando comparado aos grupos de estudo ($p < 0.001$).

Os achados sugerem que a suplementação dietética com arginina a 6%, pode apresentar algum efeito benéfico no câncer que ultrapassa o aspecto nutricional.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal e do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico do Brasil para a realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 Beard H.H. The effect of parenteral injection of synthetic amino acids upon the appearance, growth and disappearance of emg sarcoma in rats. Arch Biochem., 1943; 1:177-186.

2. Weisburger JH, Yamamoto RS & Glass RM. Prevention by Arginine Glutamate of the carcinogenicity of acetamide in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1969; 14:163.
3. Takeda Y, Tominaga T, Tei N, Kitamura M & Taga S. Inhibitory effect of L-arginine on growth of rat mammary tumors induced by 7,12-Dimethylbenz (a) Anthracene. *Cancer Res*, 1975; 35:2390-2393.
4. Novaes MRCG. Efeitos da suplementação nutricional com L-Arginina no tumor de Walker 256. Tese de Doutorado. Universidade De Brasília, 1999.
5. Senkal M, Kemen M, Homann HH, Eickhoff U, Baier J & Zumtobel V. Modulation of postoperative immune response by enteral nutrition with a diet enriched with arginine, RNA, and Omega-3 Fatty Acids in patients with upper gastrointestinal cancer. *Eur J Surg*, 1995; 161:115-122.
6. Cho-Chung YS, Clair T & Bodwin JS. Arrest of mammary tumor in vivo by L-arginine: Stimulation of NAD-dependent activation of adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1980; 95:1306-1310.
7. Park KGM, Hayes PD, Garlick PJ, Sewell H & Eremin O. Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine. *Lancet*, 1991; 337:645-646.
8. Yeatman JT, Risley GL & Brunson ME. Depletion of dietary arginine inhibits growth of metastatic tumor. *Arch Surg*, 1991; 126:1376-1382.
9. Tachibana L, Mukai K, Moriguchi S, Takama S & Kishino Y. Evaluation of the effect of arginine-enriched amino acid solution on tumor growth. *J Parenter Enteral Nutr*, 1985; 9:428-434.
10. Milner JA & Stepanovich LV. Inhibitor effect of dietary arginine on growth of Ehrlich Ascites Tumor cells in mice. *J Nutr*, 1979; 109:489-494.
11. Rettori O, Vieira-Matos AN & Tahin QS. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by Walker 256 tumor progression in rats. *Tumori*, 1995; 81:370-377.
12. Reynolds JV, Daly JM, Shou J, Sigal R, Ziegler MM & Naji A. Immunological effects of arginine supplementation in tumor bearing and non tumor bearing hosts. *Ann Surg*, 1990; 211:202-210.
13. Ye SL, Istafan NW, Drriscoll DF & Bistran BR. Tumor and host response to arginine and branched chain amino acid enriched total parenteral nutrition. *Cancer*, 1992; 69:261-270.
14. Konur A, Krause SW, Reahli M, Kreutz M & Andreessen R. Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide. *J Immunology*, 1996; 2110-2115.
15. Carmo A, Lopes C, Santos M, Proença R, Cunha-Vaz J & Carvalho A. Nitric Oxide Synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced rats. *General Pharmacology*, 1998; 30:319-324.
16. Tozer GM, Prise VE & Chaplin DJ. Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. *Cancer Research.*, 1997; 57:948-955.
17. Seifter E, Rettura G & Barbul A. Arginine: An essential amino acid for injured rats. *Surgery*, 1978; 84:224-230.
18. Kirk SJ & Barbul A. Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. *J Parenter Enteral Nut.*, 1990; 14(5):226s-229s.
19. Milner JA, Wakeling AE & Visek WJ. Effect of arginine deficiency on growth and intermediary metabolism in rats. *J Nutrition*, 1974; 104(12):1681-1689.
20. Rogers QR, Freedland RA & Symmons RA. In vivo synthesis and utilization of arginine in the rat. *Amer J Physiology*, 1972; 223(1):236-240.
21. Champe P & Harvey RA. *Bioquímica Ilustrada*. In: Aminoácidos. Ed. Artes Médicas Sul Ltda. 2 Ed., Porto Alegre, 1997, 7-15, 91 p.
22. Barbul A. Arginine: Biochemistry, Physiology and therapeutic implications. *J Parenter Enteral Nutr*, 1986; 10:227-238.
23. Guitani A, Recchia M, Carli M, Rocchetti M, Bartosek I & Garattini S. Walker Carcinoma 256: A Model for studies on tumor anorexia and cachexia. *Oncology*, 1982; 39:173-178.
24. Hester JE & Fee WE. Effect of arginine on growth of squamous cell carcinoma in the C3h/Km mouse. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995; 121 (2):193-196.
25. Clarke EF, Lewis AM & Waterhouse C. Peripheral amino acid levels in patients with cancer. *Cancer*, 1978; 42:2909-13.
26. Lundholm K, Edstrom S, Karlberg I, Ekman L & Schersten T. Relationship between food intake, body composition and tumor growth to host metabolism in nongrowing mice with sarcoma. *Cancer Res.*, 1980; 40:2516-2522.
27. Pisters PW & Pearlstone DB. Protein and amino acid metabolism in cancer cachexia: Investigative techniques and therapeutic interventions. *Crit Rev In Clin Lab Sciences.*, 1993; 30(3):223-272.
28. Rivera S, Azcón-Bieto J, López-Soriano FJ, Miralpeix M & Argilés JM. Amino acid metabolism in tumor-bearing mice. *Biochem J*, 1988; 249:443-449.
29. Marquez J, Sánchez-Jiménez F, Medina MA, Quesada AR, Nuñez CL. Nitrogen metabolism in tumor bearing mice. *Arch Biochem Biophys*, 1989; 268:667-675.
30. Kurzer M, Janiszewski J, Meguid MM. Amino acid profiles in tumor-bearing and pair-fed nontumor-bearing malnourished rats. *Cancer*, 1988; 62:1492-1496.
31. Tayek JA, Istfan NW, Jones CT, Harmawy KJ, Bistran BR, Black-Burn GL. Influence of the Walker256 carcinosarcoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. *Cancer Res*, 1986; 46:5649-5654.
32. Norton JA, Gorschboth CM, Wesley RA, Burt ME, Brennan MF. Fasting plasma amino acid levels in cancer patients. *Cancer*, 1985; 56:1181-1186.
33. Theologides A. Pathogenesis of cachexia in cancer: A review and a hypothesis. *Cancer*, 1972; 20:484-488.
34. Saba HI. Anemia in cancer patients. Introduction an overviews. *Cancer Control*, 1998, 5:3-5.
35. Zuckerman KS. Hematopoietic abnormalities in patients with cancer. *Cancer Control*, 1998; 5:6-11.
36. Bach JS & Lasnitzki I. Some aspects of the role of arginine and arginase in mouse Carcinoma 63. *Enzymology*, 1953; 12:198-205.

Recibido:17-08-1999

Aceptado:26-06-2000