

## Deficiência aguda de tiamina: Efeitos no crescimento e resposta quimioterápica de um fibro-histiocitoma maligno de rato\*

PAULO SCHOR<sup>1</sup>, RONALDO A. RIBEIRO<sup>2</sup>, SÉRGIO ZUCOLOTO<sup>3</sup>

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) - Ribeirão Preto, SP.

### Resumo

Os objetivos do presente trabalho foram estudar os efeitos da deficiência aguda de tiamina no crescimento e na resposta quimioterápica de um fibro-histiocitoma maligno no rato. Para tanto, ratos foram inoculados por via subcutânea com suspensão de células tumorais e divididos em quatro grupos, de 10 animais cada: DCT - alimentados com dieta sem tiamina; DVC - alimentados com dieta sem tiamina e tratados com sulfato de vincristina (SVC); TGT - Alimentados com dieta-controle; e TVC - alimentados com dieta-controle e tratados com SVC.

Os animais tratados com SVC (DVC e TVC) apresentaram diminuição de volume tumoral quando comparados com os não tratados (DCT e TGT). Entretanto, não houve alteração no volume tumoral de animais carentes em tiamina e tratados (DVC) em relação àqueles tratados e com dieta-controle (DCT). Estes dados indicam que a deficiência aguda de tiamina per se não altera o crescimento do FHM como também não modifica a resposta do tumor frente à quimioterapia com SVC.

**Unitermos:** deficiência aguda em tiamina; fibro-histiocitoma maligno; quimioterapia

### Introdução

A maioria das neoplasias malignas no homem é refratária ao tratamento quimioterápico. As drogas antitumorais conhecidas não são seletivas das células tumorais, apresentando muitos efeitos colaterais. Tem-se também dando ênfase à associação de quimioterápicos para tornar mais eficiente o tratamento antitumoral [1].

As células tumorais consomem nutrientes do hospedeiro, deixando-o com deficiências nutricionais das mais variadas e chegando geralmente a um quadro final de desnutrição multicarencial grave [2]. A má nutrição de *per si* atrasa o tratamento de pacientes internados, aumentando sobremaneira a taxa de mortalidade [3, 4]. Deficiência de tiamina frequentemente acompanha o quadro multicarencial [5].

Sabe-se que a deficiência aguda de tiamina induz grave atrofia do epitélio do tubo digestivo de rato [6],

sendo portanto possível que tal deficiência possa causar alterações no crescimento de células tumorais, modificando por conseguinte o tratamento quimioterápico do indivíduo com beri-beri. A deficiência de tiamina diminui o metabolismo da glicose, diminuindo conseqüentemente a quantidade de ATP da célula. O metabolismo da célula tumoral não é conhecido em tal deficiência. Kovacevic e McGivan [7] afirmaram que a glicose não é a maior fonte de energia para alguns tipos de tumores; todavia outros autores sugerem que a glicólise aeróbica e anaeróbica ocorrem em todas as partes viáveis da neoplasia e que os tumores sólidos são muito sensíveis à anoxia [8-11].

Os objetivos do presente trabalho foram estudar os efeitos da deficiência aguda de tiamina no crescimento e na resposta à quimioterapia de um fibro-histiocitoma maligno (FHM) de aparecimento espontâneo, bem caracterizado e mantido por meio de transplante em rato [12-14].

<sup>1</sup>Acadêmico de Medicina; <sup>2</sup>Professor Assistente da UFC; <sup>3</sup>Prof. Adjunto da USP - Endereço do autor para correspondência: Deptº de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, Avenida Bandeirantes, 3.900, Monte Alegre. CEP 14049 - Ribeirão Preto - SP

## Material e Métodos

**Ratos:** foram utilizados 40 ratos machos da raça Wistar, recém-desmamados, pesando em média cerca de 50 g, que receberam transplante de FHM e foram divididos em quatro grupos com 10 animais cada: DCT - alimentados com dieta sem tiamina; DVC - alimentados com dieta sem tiamina e tratados com sulfato de vincristina (SVC); TCT - alimentados com dieta-controle; TVC - alimentados com dieta-controle e tratados com SVC.

**Dieta:** a dieta-controle continha todos os nutrientes e a dieta experimental a mesma composição que a controle menos tiamina [15]. Todos os grupos ingeriram dieta e água potável *ad libitum*.

**Transplante tumoral:** o FHM foi retirado de um rato, fragmentos do tumor foram tratados com tripsina [16] e as células foram novamente suspensas em meio Hanks glutamina a 4°C e em 1 ml desta suspensão foram contadas as células. Cerca de 10<sup>9</sup> células viáveis foram injetadas no tecido celular subcutâneo do dorso de cada rato.

O tumor foi medido com auxílio de paquímetro em seu diâmetro maior, bem como no menor, de dois em dois dias, a partir do 4.º dia de transplante, e o volume foi calculado de acordo com Stell [17]. Os pesos corporais foram anotados diariamente e os ratos dos grupos DVC e DCT passaram a apresentar, a partir do 12º dia do experimento, ganho ponderal menor que os TCT e TVC, com significância estatística. No 13.º dia foi estabelecido o tratamento quimioterápico para os grupos DVC e TVC, injetando-se 1 mg de sulfato de vincristina (Oncovin-Laboratório Eli Lilly)/kg de peso corporal por via intraperitoneal em dose única [18]. No

16º dia foi estabelecida a recuperação dos animais carentes em tiamina, substituindo o regime para dieta-controle. Para que a recuperação fosse mais rápida foram injetados 100 mg de tiamina/rato intraperitonealmente em todos os animais.

**Estatística:** os dados relativos aos volumes tumorais foram apresentados como valores medianos percentuais em relação ao dia do tratamento. O nível de significância foi de 5% para o teste das medianas de Kruskal-Wallis. Em relação à diferença de peso usou-se o teste t com mesmo nível de significância.

## Resultados

Observou-se que o peso dos ratos alimentados com dieta sem tiamina (grupos DCT e DVC) tornou-se significativamente menor que o dos ratos alimentados com dieta-controle (TVC e TCT) já no 8º dia de experimento (Tabela 1).

O crescimento tumoral foi semelhante durante o período inicial em todos os grupos. Até o 12º dia de experimento não houve diferença estatística dos volumes tumorais nos diversos grupos, porém após o tratamento com sulfato de vincristina as diferenças entre os grupos tornaram-se evidentes.

Os volumes tumorais dos ratos tratados com quimioterápico (grupos TVC e DVC) mostraram-se significativamente menores em comparação com os não tratados (grupos DCT e TCT). A deficiência de tiamina não alterou o crescimento do tumor, pois os grupos DCT e TCT foram semelhantes, como também não houve modificações no crescimento do volume tumoral com o tratamento (grupos TVC e DVC foram semelhantes) (Figura 1).

**Tabela 1.** Efeito da deficiência aguda de tiamina no peso corporal médio (em gramas) em ratos alimentados com dieta sem tiamina (grupos DCT mais DVC) em relação aos ratos alimentados com dieta-controle (TCT mais TVC).

Dieta	Tempo de experimento (dias)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Controle	x	72,7	75,4	77,9	78,0	80,0	83,5	89,1	93,3	97,0	100,9	106,6	111,1
	s	4,6	5,3	10,3	7,4	6,8	7,8	9,8	12,1	13,7	15,0	18,7	17,6
Sem tiamina	x	70,6	72,8	74,3	74,1	76,3	78,3	81,2	83,4	86,5	87,5	87,5	90,7
	s	5,2	8,2	12,9	11,0	10,4	12,0	12,9	14,3	15,1	16,0	16,8	14,3
p		NS*	NS*	NS*	NS*	NS*	NS*	NS*	S**	S**	S**	S**	S**

x = média aritmética

s = Desvio padrão

\*NS = Não significativo

\*\*S = Significativo

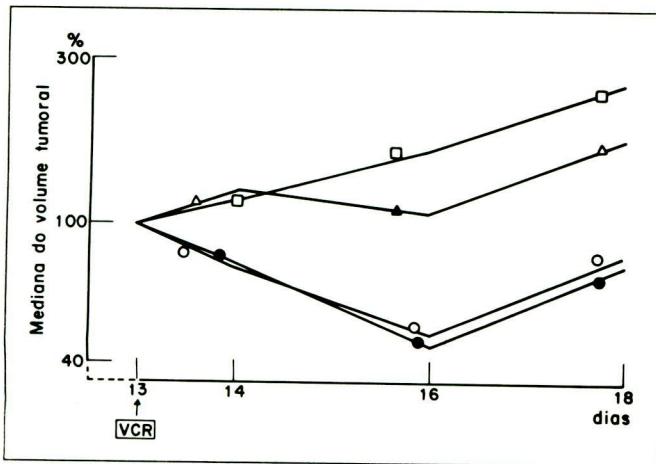


Figura 1. Mediana do volume tumoral (porcentagem do volume inicial) em relação ao tempo pós-tratamento com sulfato de vincristina (SVC) em ratos previamente deficientes em tiamina. Volume tumoral no 13.º dia pós-transplante = 100%. TCT (□ - □), DCT (○ - ○), TVC (● - ●), DVC (▲ - ▲). TCT x DCT; TVC x DVC = não significativa. TCT e DCT x TVC e DVC = significativa a partir do 14.º dia do experimento.

## Discussão

É patente quanto o parasitismo tumoral debilita o organismo hígido. Pode-se supor que a rápida perda de peso dos ratos alimentados com dieta sem tiamina, em relação aos animais alimentados com dieta-controle, seja conseqüência do metabolismo tumoral aumentado, já que a literatura nos indica perda significativa de peso (nos ratos sem tumor) somente a partir do 12.º dia de alimentação [15].

A carência de tiamina causa grandes transtornos metabólicos na célula, acarretando depressão da atividade de três enzimas (transcetolase, piruvato desidrogenase e alfacetogluturato desidrogenase), que necessitam de tiamina como coenzima. A diminuição da atividade da transcetolase induz decréscimo da síntese de pentose e de NADPH, essenciais para a produção de RNA e DNA. A diminuição da atividade de piruvato desidrogenase e da alfacetogluturato desidrogenase causa queda na produção de ATP, bloqueando a glicólise [15]. Tecidos com alta produção celular, como o epitélio do jejuno proximal, mostraram, nesta fase inicial da carência em tiamina, atrofia da unidade cripta-vilosidade [6], mas no presente trabalho não houve alteração no crescimento do FHM. Utilizando técnicas histoenzimológicas, foi demonstrado no tecido de FHM fraca glicogenólise, moderada glicólise, atividades aumentadas das enzimas das vias das pentoses, da ATPase e das fosfatases [19]. As atividades das enzimas possivelmente bloqueadas

na carência de tiamina não foram estudadas no presente trabalho. Como no tecido do FHM é moderada a glicólise no rato alimentado com dieta-controle [19], provavelmente tal via na carência de tiamina está bem menos ativa e, como o FHM não alterou o volume, outras vias energéticas que não a glicolítica devem ter sido ativadas.

Sabe-se que em alguns tumores a fonte energética não é a glicólise [7, 20], e os aminoácidos são importantes como fonte energética e conseqüentemente na proliferação das células tumorais [21]. O indivíduo com neoplasia maligna tem balanço negativo de nitrogênio com perda de peso corporal, porém no tecido neoplásico há aumento de consumo de nitrogênio [22]. O mecanismo bioquímico deste fenômeno não é ainda claro, porém vários aminoácidos podem ter importância neste metabolismo [23-27]; todavia, a mais importante fonte de energia é a glutamina, sendo que em certos tumores é considerada a maior [7, 21]. Células do tumor Ehrlich oxidam a glutamina e outros aminoácidos em alta porcentagem [24, 26]. Tumores em cultura consomem muito mais glutamina do que glicose [7]. Células de linfoma 6C3HED, *in vitro*, consomem 70-80% de energia proveniente da glutamina e muito pouca glicose é oxidada no ciclo de Krebs [28]. Células HeLa cultivadas com glicose, galactose ou frutose como fontes de energia cresceram com taxas semelhantes nos três substratos, e a contribuição da glutamina na produção de energia foi de 65% na presença de glicose e quase 100% na presença de frutose [29].

Recentemente, notou-se que a proliferação celular jejunal de rato com deficiência aguda em tiamina não alterou-se quando foi utilizado sulfato de vincristina como bloqueador de mitose, mesmo diante de intensa atrofia do epitélio [6]. No presente trabalho, a carência aguda de tiamina não interferiu no tratamento quimioterápico do FHM, utilizando-se o mesmo agente. É bastante conhecido o efeito bloqueador do sulfato de vincristina em neoplasias malignas [18, 30, 31]; todavia, os seus mecanismos de ação, como os de todos os vinca-alcalóides, não são claros. Parece haver inter-relação com o dímero tubulina dos microtúbulos, resultando em despolarização e ruptura da rede microtubular celular, incluindo o fuso mitótico [32, 33], inibem a biossíntese de RNA, DNA, proteína e lipídes [34-36]; afeta o metabolismo do AMP cíclico e glutatona [37-39], e inibição do transporte de cálcio [40].

Em conclusão, os dados obtidos no presente trabalho indicam que a carência aguda de tiamina não altera o crescimento de fibro-histiocitoma maligno, como também esta carência não afeta o tratamento quimioterápico, quando utilizado o sulfato de vincristina.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP e CNPq pelo suporte econômico deste trabalho, como também à Srt.<sup>a</sup> Laura Midori Kawasse pela assistência técnica e à Sr.<sup>a</sup> Márcia Aparecida Oliva Destido pelo serviço de datilografia.

## Summary

The present investigation has been carried on to study the effects of acute thiamine deficiency on the growth and response to chemotherapy of a malignant fibrohistiocytoma (MFH).

Rats were inoculated subcutaneously with a tumoral cell suspension and divided into four groups of 10 animals each: animals fed with a thiamine-free diet (TFD); animals fed with a thiamine-free diet and treated with vincristine sulfate (TFV); animals fed with a control diet (CD); and animals fed with a control diet and treated with vincristine sulfate (TFD).

The animals treated with vincristine sulfate (TFV and CDV) showed a decrease in tumoral volume when compared to untreated animals (TFD and CD).

The thiamine-deficient and the treated rats (TFV) showed no difference in tumoral volume when compared to animals receiving control diet and treated with vincristine sulfate (TFD).

These data led us to conclude that acute thiamine deficiency per se does not alter MFH growth and does not modify the response of the tumor to chemotherapy with vincristine sulfate.

**Key words:** thiamine deficiency; experimental cancer

## Referências bibliográficas

- FARMER PB. Cancer chemotherapy I: Design and mechanism of action cytotoxic drugs. In: Farmer PB, and Walker JM (Editors), The molecular basis of cancer. Croom Helm, London and Sydney 1985: 259-286.
- VINCENT MD. The clinical problem: In Farmer PB and Walker JM. (Editors). The Molecular Basis of Cancer. Croom Helm, London and Sydney, 1985: 1-236.
- BRISTRIAN RR, BLACKBURN GL, VITLATLE J, COCHRAN D, NAYLOR J. Prevalence of malnutrition in general medical patients. Journal American Medical Association 1976; 235: 1567-1570.
- WEINSIER RL, HUNKER EM, KRUNDIECK CL, RUTTERWORD CE. A prospective evaluation of general medical patients during the course of hospitalization. American Journal of Clinical Nutrition, 1979; 32: 418-426.
- LEEVY CM, CARDI L, FRANK O, GELLENE R, BECKER H. Incidence and significance of hypovitaminemia in a randomly selected municipal hospital population. American Journal of Clinical Nutrition 1965; 17: 259-271.
- CIPRIANO TC, ZUCOLOTO S, MUCCILLO G. Acute thiamin deficiency: a morphometric and cell proliferation study of jejunum epithelial cell. International Journal for Vitamin and Nutrition Research 1987: 151-154.
- KOVACEVIC Z AND McGIVAN JD. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. Physiological Reviews 1983; 63: 547-605.
- THOMLINSON RH, GRAY LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. British Journal of Cancer 1955; 9: 539-549.
- GOLDACRE RJ, SYLVEN B. On the access of blood-borne dyes to various tumor regions. British Journal of Cancer 1962; 16: 306-322.
- GULLENO PM. The internal milieu of tumors. Progress of Experimental Tumor Research 1966; 8: 1-25.
- TANNOCK IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor. British Journal of Cancer 1968; 22: 258-273.
- RIBEIRO RA, BEZERRA DE ARAÚJO RW, FONTELES MC, FERREIRA FVA, ZUCOLOTO S, ROSSI MA. Tumor fibrohistiocítico (TEGS-2047) transplantável em ratos Wistar - Histopatologia, ultra-estrutura, citoquímica enzimática e potencial metastático. Rev Bras Cancerol 1986a; 32(2): 159.
- RIBEIRO RA, ZUCOLOTO S, CIPRIANO TC, LEITÃO MC, FONTELES MC. Tumor fibro-histocítico (TEGS-2047) transplantável em ratos Wistar - Estudo cinético com bloqueador de mitose. Rev Bras Cancerol 1986b; 32(2): 160.
- RIBEIRO RA, FONTELES MC, ZUCOLOTO S, BACCHI CE. Imunohistochemical identification of lysozyme and Vimentin in an experimental malignant fibrous histiocytoma. Brazilian J Med Biol Res 1988; 21: 995-997.
- HENDERSON GI, DILLON M, SCHENKER S. Effect of diet-induced thiamine deficiency on visceral DNA synthesis and tissue composition. Biochem Pharmacol 1976; 25: 2275-2284.
- PAUL F. Cell on tissue culture. Churchill Livingstone, New York 1975; 219-231.
- STEEL GG. Growth kinetics of tumors. Clarendon Press, Oxford 1977: 5-55.
- FÉAUX DE LACROIX W, WEYER M, SCHULT A, LENNARTZ KJ. Age-dependent change of the effect of a cytostatic during on the proliferation kinetics of a solid tumours of the mouse. Journal Cancer Research Clinical Oncology 1979; 94: 29-35.
- ARAÚJO RWB, ZUCOLOTO S, FERREIRA FVA, CIPRIANO TC, MELLO DE OLIVEIRA, ROSSI MA CONACCHIONI ALB. Estrutura, perfil histoquímico e comportamento biológico de tumor espontâneo da região da glândula salivar de rato (TEGS-2047). Anais do XVI Congresso Brasileiro de Patologia, 1985; pág. 131.
- PEDERSON PL. Tumor mitochondrial and the bioenergetics of cancer cells. Progress Experimental Tumor Research 1978; 22: 190-274.
- RIVERA S, LÓPEZ-SORRANO FJ, AZCON-BIETS J, ARGILES JM. Blood amino acid compartmentation in mice bearing lewis lung carcinoma. Cancer Research 1987; 47: 5644-5646.
- CURRIE G, CURRIE A. Cancer the biology of malignant disease. Castlefield Press. Northhampton, England 1982; pp. 39.
- CLARCK CM, GOODLAD GAC. Depletion of protein of phasic and tonic muscle in tumor bearing rats. European Cancer 1971; 7: 3-9.
- KOVACEVIC Z. Properties and intracellular localizations of Ehrlich

- ascites tumor cells glutaminase. *Cancer Research* 1974; 34: 3403-3407.
25. LAZO PA. Tumor induction of host leucine starvation. *FEBS Letters*, 1981; 229-231.
26. CARRASCOSA JM, MARTINS P AND NUÑEZ DE CASTRO I. Nitrogen movement between host and tumor in mice inoculated with Ehrlich ascitic tumor cells. *Cancer Research* 1984; 44: 3831-3835.
27. HAYES KC. Taurine in metabolism. *Annual Review of Nutrition* 1986; 1: 401-425.
28. LAVIETES BB, REGAN DH, DEMOPOULOS HB. Glutamate oxidation in 6C3HED lymphoma: Effects of L-asparaginase on sensitive and resistant lines. *Proceedings National Academy of Sciences* 1974; 71: 3993-3997.
29. REITZER LJ, WICE BM AND KENNEL D. Evidence that glutamine, not sugar is the major energy source for cultured HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry* 1979; 254: 2669-2676.
30. CAMPLEJOHN RS, SCHULTZE B, MAVRER W. An in vivo double labelling study of the subsequent fate of cells arrested in metaphase by vincristine in the J.B. 1 mouse ascites tumor. *Cells Tissue Kinetic* 1980; 13: 239-245.
31. FÉAUX DE LACROIX W, MALLMAN H. Comparative investigations on the effect of different dose schedules of the phase-specific during vincristine (VCR) on the proliferation kinetics of a solid experimental tumour. *Cell Tissue Kinetic* 1984; 583-591.
32. OWELLEN RJ, OWENS AH JR., DONIGIAN DW. The bindings of vincristine, vinblastine and colchicine to tubulin. *Biochemical and Biophysical Research Community* 1972; 47: 685-691.
33. OWELLEN RJ, HARTKE CA, DICKERSON RM, HAINS FO. Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the vinca alkaloid class. *Cancer Research* 1976; 36: 1499-1502.
34. CREASEY WA. Modifications in biochemical pathways produced by the vinca alkaloids. *Cancer Chemotherapeutic* 1968; 52: 501-507.
35. WAGNER EK, ROIZMAN B. Effects of the vinca alkaloids on RNA synthesis in human in vivo. *Science* 1968; 162: 569-570.
36. RICHARDS JF. Biochemical studies with the vinca alkaloids. *Cancer Chemotherapeutic Report* 1968; 52: 463-467.
37. Howards SMH, Theologides A and Sheppard JR. Comparative effects of vindesine, vinblastina and vincristine on mitotic arrest and hormonal response of L1210 leukemia cells. *Cancer Research* 1980; 40: 2695-2700.
38. SEPPARD JR. Effects of vinca alkaloids on cyclic AMP metabolism of mouse splenic lymphocytes. *Contribution of Oncology* 1980; 6: 27-36.
39. BECK WT. Increase by vinblastine of oxidized glutathione in cultured mammalian cells. *Biochemistry Pharmacology* 1980; 29: 2333-2337.
40. GIETZAN K, WUTRICH A, BODER H. Effects of microtubular inhibitors on plasma membrane calmodullin-dependent  $Ca^{2+}$  - transport ATPase. *Molecular Pharmacology* 1982; 22: 413-420.