

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**EFEITOS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL PÓS-OPERATÓRIA
COM VITAMINAS DO COMPLEXO B SOBRE OS INDICADORES
METABÓLICOS DA VIA SULFURADA E A SOBREVIVÊNCIA DE
PACIENTES COM CÂNCER DE ESÔFAGO**

VÂNIA CRISTINA LAMÔNICA

**BOTUCATU - SP
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**EFEITOS DA INTERVENÇÃO NUTRICIONAL PÓS-OPERATÓRIA
COM VITAMINAS DO COMPLEXO B SOBRE OS INDICADORES
METABÓLICOS DA VIA SULFURADA E A SOBREVIVÊNCIA DE
PACIENTES COM CÂNCER DE ESÔFAGO**

VÂNIA CRISTINA LAMÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia, Área de concentração: Reparação, Regeneração e Transplante de Órgãos e de Tecido, da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Aparecida Arruda Coelho Henry

Co-Orientador:

Prof. Dr. Roberto Carlos Burini

**BOTUCATU - SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Lamônica, Vânia Cristina.

Efeitos da intervenção nutricional pós-operatória com vitaminas do complexo B sobre os indicadores metabólicos da via sulfurada e a sobrevida de pacientes com câncer de esôfago / Vânia Cristina Lamônica. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry

Cooorientador: Roberto Carlos Burini

Capes: 40102068

1. Esôfago – Câncer. 2. Antioxidantes. 3. Nutrição – Avaliação.
4. Vitamina B na nutrição humana. 5. Desnutrição.

Palavras-chave: Câncer de esôfago; Defesa antioxidante; Desnutrição; Metabolismo da glutatona.

DEDICO ESTE TRABALHO:

Aos meus amados pais, **Attílio e Luzia**, pelo apoio e amor incondicional que vocês me dedicaram. Não existe ciência capaz de transmitir o conhecimento de vida e a esperança que vocês me ensinaram. Conhecimento este que não está escrito nesta tese, mas estará marcado para sempre no meu coração;

Ao meu filho **Mateus**, amor e luz que norteia minha vida, por sua compreensão e carinho que me estimularam a seguir em frente, com a certeza que sempre estará ao meu lado;

Aos meus irmãos, **Ana Lúcia e Celso Henrique**, pela confiança, pelo amor e pelo companheirismo que vocês têm por mim, por vocês se orgulharem com mais esta conquista em minha vida e por me ensinarem a olhar sempre em frente;

Às minhas madrinhas, **Ignez e Antonia** (*in memoriam*), pela dedicação e pelo amor despretensioso, sempre me dando incentivo para crescer pessoal e profissionalmente;

Ao meu amor, amigo e companheiro, Marcos, pelo seu amor presente nas horas de felicidade e angústia, pelo seu apoio no término de mais esta etapa em minha vida.

“Ser amado profundamente nos dá força, amar alguém profundamente nos dá coragem.”

(Lao-Tse)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora Titular Dr^a. **Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry**, exemplo de vida e dedicação. Especialmente agradeço por ter aberto as portas do Departamento de Gastrocirurgia, pelos ensinamentos e pela paciência com o meu processo de aprendizagem, por toda ajuda e incentivo durante este tempo de convivência e por ser este exemplo de garra, persistência e determinação admiráveis.

Ao Professor Titular Dr. **Roberto Carlos Burini**, cientista admirável, pela sua incansável busca por novos pesquisadores, sempre acreditando, apoiando e incentivando todos que estão ao seu lado. Agradeço imensamente pela amizade, oportunidade e confiança que sempre demonstrou, pelos conselhos sábios e visionários na condução de minha vida acadêmica. Foi uma satisfação compartilhar momentos enriquecedores ao longo desses anos de convivência.

Não há neste mundo nada capaz de mostrar o sentimento que guardo de vocês pelo carinho e amizade que me deram, sempre acreditando em mim, sempre me estimulando, sempre me mostrando o que não conseguia ver que devido a minha condição de aprendiz.

Meus eternos agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao biomédico Dr. **Fernando Moreto**, pela amizade, pelo apoio e auxílio nas análises bioquímicas e na participação efetiva em todas as etapas deste trabalho. Sem você este trabalho não teria sido possível;

À enfermeira e Coordenadora do Curso de Enfermagem da Universidade Paulista-UNIP, *campus* Bauru, Dr^a. **Rosilene Maria dos Santos Reigota**, pela amizade e compreensão, pelo apoio e carinho em todos os momentos de minha vida acadêmica;

À farmacêutica **Paula Carazzatto**, pela elaboração das fórmulas de vitaminas e placebo;

Ao farmacêutico **Ari Tiago Faustino de Sousa**, pelo auxílio na confecção dos flaconetes da suplementação;

Aos profissionais do **CeMENutri (Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição)**, em especial, ao biomédico **Rodrigo Minoru Manda**, aos nutricionistas **Erick Prado de Oliveira** e **Gabriel Augusto Torezan**, por compartilharem seus conhecimentos comigo e por me auxiliarem nas coletas de sangue, BIA, e ao funcionário **Nelson de Oliveira Machado**, pelo auxílio com as dosagens de B₁₂;

A técnica de laboratório **Silvia Regina Estevan**, pelo auxílio nas análises dos aminoácidos, principalmente pela análise da homocisteína;

Aos todos os funcionários do Setor de pós-graduação, **Janete Aparecida Herculano Nunes da Silva**, **Lílian Cristina Nadal Bianchi**, **Andréa Paula Longo Devidé**, **Márcia Ferreira Quadros**, **Diego Oliveira** e **Natanael Pinheiro Salles**, pelo auxílio com as questões burocráticas nestes longos anos de pós-graduação, e, em especial, a funcionária **Regina Célia Spadin**, pela amizade compartilhada durante minha passagem pela pós graduação;

A funcionária **Márcia Fonseca P. Cruz**, secretária da pós Graduação em Bases Gerais da Cirurgia pelo apoio e amizade;

Aos funcionários do **Departamento de Manometria**, **Amando de Assis Later**, **Daniela Sorrini da Silva**, **Vera Lúcia da Silva Martins**, **Maria de Fátima R**, **Winckler**, pelo apoio e auxílio durante as coletas de dados;

A todos os funcionários do **Departamento de Cirurgia e Ortopedia** da **Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP**, pela acolhida e convivência harmoniosa durante esses anos;

À **Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP** e, em especial, ao **Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia**, pelos ensinamentos ao longo do curso, os quais muito contribuíram para minha formação acadêmica;

À **Fapesp (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo)**, pelo reparo do sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*);

À professora Dr^a. **Marisa Sormani Bastos**, pela amizade e pelo auxílio com a revisão ortográfica desta tese;

À enfermeira **Santina Nunes Casarin** e ao matemático **Dr. Mário Casarin** pelo apoio com a revisão do *abstract*;

Ao serviço da **Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação no campus da Unesp - Botucatu**, pela elaboração da ficha catalográfica;

Aos **sujeitos** deste estudo que, voluntariamente, dispuseram-se a colaborar com o projeto; e

À tantos outros **amigos presentes ou distantes** que, de uma forma ou de outra, sempre me apoiaram e incentivaram a continuar.

"Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra.

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só e não nos deixa só.

Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo.

Essa é a maior responsabilidade da nossa vida e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso. "

(Antoine de Saint-Exupéry, França, 1900 – 1944)

“Considero mais valente aquele que vence seus desejos do que aquele que vence seus inimigos, pois a vitória mais difícil é a vitória sobre si mesmo.”

(Aristóteles)

ABREVIATURAS

ADE: Adenocarcinoma

BIA: Impedância bioelétrica

CAE: Câncer de esôfago

CAT: Catalase

CEC: Carcinoma espinocelular

Col-total: Colesterol total

Cys: Cisteína

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DRIs: *Dietary Reference Intake*

et al: Colaboradores

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

GSH: Glutathione

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

GSSG: Glutathione oxidized

Hcy: Homocysteine

HDL-c: *High Density Lipoprotein*

HOCl: ácido hipocloroso

HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IMC: Índice de Massa Corporal

IMM: Índice de Massa Muscular

LDL-c: *Low Density Lipoprotein*

MDA: Malondialdehyde

Met: Metionina

MLG: Massa Livre de Gordura

MPO: Myeloperoxidase

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NO: Óxido nítrico

OSCC: Carcinoma espinocelular oral

O₂⁻: Ânion Superóxido

PCR-us: Proteína C-Reativa-ultra sensível

RHS: *Halogens*

RNS: *Reactive nitrogen species*

ROS: *Reactive oxygen species*

RS: *Reactive species*

Ser: Serina

SOD: Superóxido dismutase

Tau: Taurina

Tau-Cl: Taurina cloramina

TG: Triacilgliceróis

THF: tetrahydro-folato

TNE: Tumor neuro-endócrino

TNF: Fator de necrose tumoral

TNM: Classificação de Tumores Malignos

UICC: União Internacional Contra o Câncer

VET: Valor Energético Total

WHO: *World Health Organization*

%GC: Porcentagem de gordura corporal

%PP: Porcentagem de Perda de Peso

5-MTHF: 5-metil-tetrahydro-folato

γ-GT: Gama-Glutamil Transferase

Esta tese foi elaborada de acordo com a Instrução Normativa 01/2012 do Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu, visando facilitar futuras publicações. Está subdividida em dois capítulos redigidos como trabalhos independentes, de acordo com as normas internacionais de publicações em periódicos; porém, com conteúdos intimamente relacionados, estando o primeiro na forma de Artigo de Revisão (Capítulo I) e o segundo, na forma de Artigo Original (Capítulo II).

O Capítulo I *“A role of diet in the interplay between sulfur-containing antioxidant compounds and oxidative stress in esophageal cancer”* apresenta o referencial teórico sobre a interação de agentes antioxidantes intracelulares e o estresse oxidativo no câncer de esôfago.

O Capítulo II *“Efeitos da intervenção nutricional pós-operatória de vitaminas do complexo B sobre os indicadores metabólicos da via sulfurada e a sobrevida de pacientes com câncer de esôfago”* mostra os resultados obtidos com a suplementação de vitaminas do complexo B em pacientes com câncer de esôfago avançado, assistidos pelo Departamento de Gastrocirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

<i>A role of diet in the interplay between sulfur-containing antioxidant compounds and oxidative stress in esophageal cancer</i>	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 CELL OXI-REDUCTION HOMEOSTASIS.....	12
2 OXIDATIVE STRESS AND CANCER.....	13
3 OXIDATIVE STRESS AND MACROPHAGES INFILTRATION INTO THE TUMOR.....	13
4 THE ROLE OF SULFUR-CONTAINING ANTIOXIDANTS IN CANCER.....	15
5 SULFUR-CONTAINING ANTIOXIDANT COMPOUNDS.....	15
6 SULFUR-DERIVED REDOX HOMEOSTASIS IN CANCER.....	18
7 THE TRANS-SULFURATION PATHWAY ROLE TO THE TUMOR PROGRESSION.....	19
8 ESOPHAGUS CANCER.....	21
REFERENCES.....	23

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

<i>Efeitos da intervenção nutricional pós-operatória com vitaminas do complexo B sobre os indicadores metabólicos da via sulfurada e a sobrevida de pacientes com câncer de esôfago</i>	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 MÉTODO.....	32
3 RESULTADOS.....	35
4 DISCUSSÃO.....	36
5 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICES.....	45
ANEXOS.....	51



CAPÍTULO I:

Revisão da Literatura

The interplay between sulfur-containing antioxidant compounds and oxidative stress in cancer

Lamônica VC¹, Moreto F^{2,3}, Henry MACA¹, Burini RC³

¹ Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia – Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

² Programa de Pós Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

³ Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri) – Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Endereço para contato: vanialamonica@uol.com.br

RESUMO

Em cada célula existe uma batalha entre a produção de componentes oxidantes provenientes do metabolismo aeróbico e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos naturais. Entre eles, há os compostos sulfurados. O estresse oxidativo desenvolve um papel chave na produção de processos patológicos crônicos como câncer oral. Em uma revisão não sistemática da literatura disponível nós verificamos que o câncer de esôfago é conhecido por sua marcada variação por regiões geográficas e etnia racial e diferenças dietéticas o que poderia contribuir com algumas destas disparidades. Deficiências nutricionais de frutas frescas, vegetais e fibras dietéticas são comumente referidas associadas com a presença de câncer de esôfago. Além disso, consumo pesado de bebidas alcoólicas de tabaco, e outros riscos de câncer podem interferir no consumo de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis e componentes dietéticos com potencial efeito anticancerígeno. Para nosso entendimento a adequação de vitaminas do complexo B poderia permitir o total efeito das defesas antioxidantes dos compostos sulfurados.

Palavras-chave: Homeostase celular oxi-redução; estresse oxidativo no câncer; Via dos antioxidantes sulfurados; fator de risco dietético no câncer de esôfago.

ABSTRACT

In every cell, there is an ongoing battle between the production of oxidants components from the aerobic metabolism and the antioxidants of enzymatic and non-enzymatic nature. Among the later are the sulfur-containing compounds. The oxidative stress plays a key role in production of chronic pathological processes such as oral cancer. In a non-systematic review of the available literature we found that esophageal cancer is known for its marked variation by geographic regions and race ethnicity and the dietary differences may account for at least some of these disparities. Nutritional deficits in fresh fruits, vegetables and dietary fiber are commonly referred as associated with the presence of esophagus cancer. Moreover heavy consumption of alcoholic beverages and tobacco, the other risk factors for the cancer, can interfere with the consumption of liposoluble and hydrosoluble vitamins and dietary components with potential anti-carcinogenic effects. To our understanding the adequacy of B-vitamins would allow the full effects of the sulfur-containing antioxidative defenses.

Key words: cell oxi-reduction homeostasis; oxidative stress in cancer; sulfur antioxidant pathway; dietary risk factor of esophageal cancer.

1 CELL OXI-REDUCTION HOMEOSTASIS

Aerobic life is connected with continuous production of free-radicals and antioxidant defense which deals with reactive oxygen species (ROS) produced as a consequence of aerobic respiration and substrate oxidation also concomitantly exist. Free radicals are defined as molecules having an unpaired electron in the outer orbit of electron shell. There are two facets of free-radicals in biology, they serve as signaling and regulatory molecules at physiologic levels but as highly deleterious and cytotoxic oxidants at pathologic levels¹⁻³.

Reduction-oxidation reactions determine cellular homeostasis. In every cell, there is an ongoing battle between the production of various oxidants like ROS and reactive nitrogen species (RNS) which are invariable components of the aerobic

metabolism (respiratory chain, respiratory burst of phagocytes, autacoids biosynthesis and P450 cytochrome activity) and intracellular antioxidants of enzymatic (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase), and non-enzymatic (vitamin E, different thiols, ferritins removing iron and others) nature⁴. Therefore cells have an elaborate defense against ROS that protects themselves during normal metabolism and after an oxidative insult excessive production of ROS or deficient antioxidant systems leads to cellular damage by oxidative stress. Oxidant-antioxidant imbalance resulting in excessive accumulation of ROS is defined as oxidative stress and is considered to play a key role in promotion of various pathological processes including cancer⁵.

2 OXIDATIVE STRESS AND CANCER

Cancer develops from a clonal proliferation of altered cells at the sight of local tissue injury, inflammation, and genomic instability. Modulation of gene expression by oxidative damage affects carcinogenesis by altering the epigenetic effects and chromosomal rearrangements. Epigenetic effects on gene expression stimulate growth signals and proliferation, while chromosomal rearrangements contribute to neoplastic progression⁶.

It is widely accepted that reactive species (RS) produce a broad range of DNA damage including base and sugar modifications, base-free sites, DNA-protein crosslinks, and strand breaks⁷. The most prevalent damage to purines is 7,8-dehydro-8-oxoguanosine (8-oxoG), while the most common damage to pyrimidines is the formation of thymine glycol (Tg). Modified bases generated by RS are highly mutagenic and can induce base mispairing during DNA replication, generating mutations that affect cellular physiology⁸.

3 OXIDATIVE STRESS AND MACROPHAGES INFILTRATION INTO THE TUMOR

Besides ROS also the generation of halogens (RHS) contribute to tumor development, this time by inducing synthesis of proinflammatory molecules by macrophages.

Hypochlorous acid (HOCl) is a strong oxidant and cytotoxic agent. HOCl can halogenate/oxidize pyrimidine and purine bases of DNA. High levels of HOCl production are associated with chronic inflammation. Hence inflammatory-mediated chlorination of pyrimidine (cytosine) residues in DNA may account for several DNA alterations observed in human tumors⁹. The HOCl is found in phagocytes cells as the final product of the reaction between H₂O₂ and chloride ion that is catalized by myeloperoxidase (MPO).

The infiltration of macrophages into the cellular mass is a common characteristic of tumors and it has been shown that these cells play an important role in initiating and promoting tumor^{10,11}. The induction of a chronic inflammatory process by tumor itself or its leukocyte-infiltrate may accelerate cancer growth and metastasis (12). In both cases, the combined effects of ROS, cytokines as well as angiogenic factors produced by tumor-associated macrophages and other inflammatory cells explains the abnormal growth of healthy cells^{10,13}.

Cellular damage by oxidation of macromolecules such as DNA, proteins or membrane lipids is an important process during early carcinogenesis^{5,14,15}. A significant imbalance between ROS/RNS production and antioxidant defense can explain all findings associating with tumor growth and a state of high oxidative stress¹⁶. The magnitude of the damage is therefore dependent on the body's defense mechanisms against free radicals. The metabolism of ROS in cancer cells is drastically altered favoring at least two mechanisms; cancer cells produce large amounts of ROS compared to non-neoplastic cells and suppression of antioxidant system in cancer cells. ROS and RNS are important agents of DNA damage. They are involved in both initiation and promotion of multi step carcinogenesis⁵.

The main cause of cancer related deaths is metastasis of the primary tumor. The cascade involves detachment of cells from the original tumor, invasion through the basement membrane, intravasation into the blood stream and extravasation from the blood at distant site. Therefore successful metastasis requires remodeling of the extracellular matrix changes in expression and localization of key tumor-related and cytoskeletal proteins, proteases and growth factors. There are findings highlighting the roles of intracellular and extracellular redox state in the induction and maintenance

of oxidative stress associated with cancer and metastasis via activation of survival pathways, disruption of cells death signaling and increase in cell proliferation¹⁷.

4 THE ROLE OF SULFUR-CONTAINING ANTIOXIDANTS IN CANCER

Free radicals are known to be highly reactive species that have been implicated in the pathogenesis of cancer. The removal of free radicals is achieved through enzymatic and non-enzymatic reactions. Superoxide dismutase (SOD) alters toxic superoxide radicals to H_2O_2 . Catalase (CAT) converts H_2O_2 to molecular oxygen and water. Glutathione peroxidase (GPx) also catalyses the conversion of H_2O_2 to water. There are also radical scavengers like vitamins, thiols and others located intra and extracellularly¹⁸. Depending on the order of their corresponding redox potentials, it is common for one antioxidant to regenerate another one from its oxidized species. Studies showed that SOD enzyme activity increases when the effectiveness of other enzymes decrease. The induction of SOD in turn leads to the protection of GPx activity and glutathione (GSH) has a mild sparing effect on vitamins C and E through its role as a reducing agent⁵.

5 SULFUR-CONTAINING ANTIOXIDANT COMPOUNDS

Sulfur-containing compounds are found in all body cells and are indispensable for life. Some of sulfur-containing antioxidant compounds are cysteine (Cys), methionine (Met), taurine (Tau), glutathione (GSH), lipoic acid and mercaptopropionyl glycine. Their antioxidative activities follows a general trend, the more highly reduced forms are stronger antioxidants. Dihydrolipoic acid is the most effective antioxidant. It contains two sulfhydryl groups and can undergo further oxidation reaction to form lipoic acid.

Sulfur, as a part of sulfhydryl groups, forms thioester linkages that are necessary for the activation of molecules such as acetate. Sulfur atoms are also important in the iron-containing flavoenzymes, such as, succinate dehydrogenase and NADH dehydrogenase. In addition, sulfur atoms in Cys are responsible for the major covalent cross-links in protein structures, by the formation of disulfide bridges between two Cys molecules, which are important in stabilizing protein conformation.

Unlike humans, plants can use inorganic sulfur to synthesize sulfur-containing amino acids. Therefore, plants are an important source of sulfur for humans. Fruits and vegetables contribute over 50% of dietary GSH, while meats contribute less than 25%.

The term thiol refers to compounds containing sulfur. Among plasma thiols, total Cys is the most abundant, followed by the Hcy and GSH. These thiols are in a dynamic relationship through thiol-dissulfide exchanges and redox-reactions. The albumin cysteine-34 SH group is believed to be important for protection against oxidative stress. The antioxidant role of albumin in plasma is fortified by its Cys-34 residue, which can directly participate in radical scavenging.

In stressed and inflammatory states, sulfur amino acids metabolism adapts to meet the increased requirements for Cys as a rate-limiting substrate for GSH. Therefore Cys is now widely recognized as a conditionally essential (or indispensable) sulfur-amino acid. It plays a key role in the metabolic pathways involving Met, Tau and GSH (figure 1), and may help fight chronic inflammation by boosting antioxidant status¹⁹.

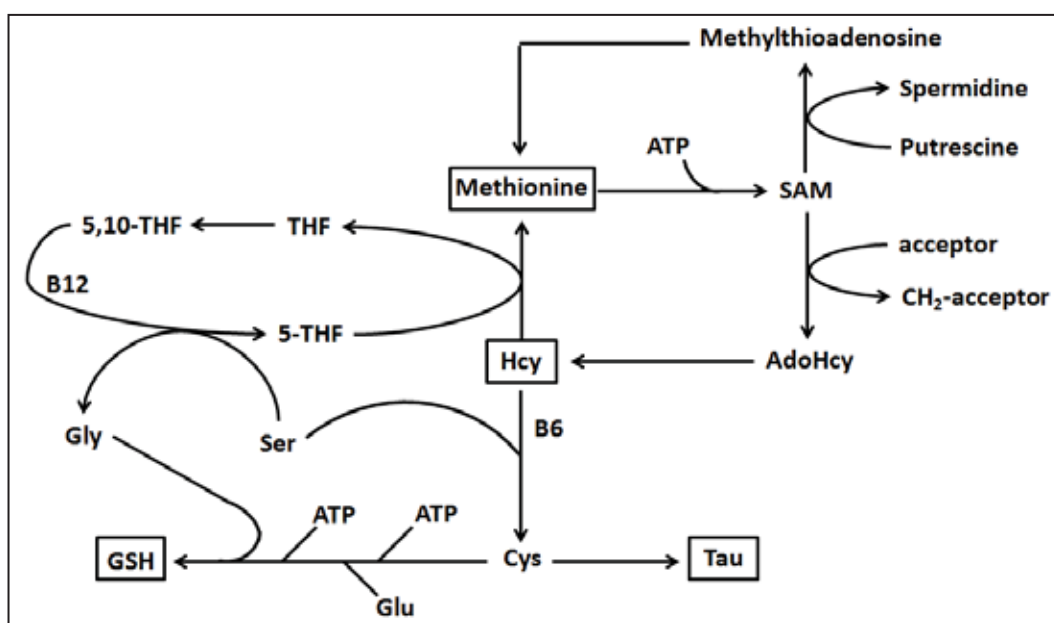


Figure 1: The methionine cycle and derived synthesis of homocysteine, glutathione and taurine.

GSH, a Cys containing tripeptide is the most abundant endogenous non-protein thiol in cells. GSH is a major component of the cellular antioxidant system. Depletion of GSH results in increased vulnerability of the cell to oxidative stress. The GSH levels of tissue are not regulated by synthesizing enzymes alone, but rather by the combination of a sulfur-containing amino acid supply and metabolism. Sulfur containing amino acids play a role in determining the flux of Cys between Cys catabolism and GSH synthesis.

The GSH synthesis pathway is one of the five major biochemical pathways of the methionine metabolism (figure 1). GSH synthesis is preceded by transmethylation/remethylation pathway (through folate/B12 dependent reactions) and trans-sulfuration pathway (through vitamin B6 dependent reactions). Hcy is formed from transmethylation of Met to S-adenosyl-methionine (SAM) and Hcy is mostly remethylated to Met and minorly trans-sulfurated to Cys which can be further incorporated to protein or GSH or metabolized to Tau (figure 1).

Tau, a non-protein sulfur amino acid, is the most abundant free amino acid in the body. It is derived from Met and Cys metabolism *in vivo* (figure 1), and is also readily absorbed from the diet. Tau is present in high concentrations in most tissues, particularly in pro-inflammatory cells, such as polymorphonuclear phagocytes and in retina. Tau scavenges HOCl and therefore partially scavenges ROS and prevents changes in membrane permeability following oxidant injury.

Sulfur-containing amino acids homeostasis

The Met salvage pathway is important for Met conservation in cells that synthesize large amounts of polyamines (putrescine and spermidine) (figure 1) for the cells cycle²⁰. Deficiencies in the salvage pathway are responsible for many kinds of tumors.

The Met cycle is responsible for synthesis of SAM, the major biological methyl donor for molecules such as DNA (trans-methylation pathway). The Met cycle is also responsible for producing Hcy, for converting 5MTHF into THF which is used in the remethylation reaction of Hcy to Met²¹. The trans-sulfuration pathway connects the Met metabolic pathways to the generation of Cys, GSH and Tau. The first step of

trans-sulfuration involves the formation of cystathionine from Hcy and Ser. Once formed cystathionine is cleaved releasing free Cys⁹ (figure 1).

When Hcy levels are low, Cys flux through the trans-sulfuration pathway becomes down regulated in order to conserve Hcy for the Met cycle. In the presence of high Cys levels cystathionine is directed into the GSH and Tau synthesis pathways. Thus, Cys levels are considered the limited step in liver GSH synthesis (major source of plasma GSH). Approximately half of the Cys used for GSH anabolism is derived from Met that was synthesized from the trans-sulfuration pathway²². On the other hand, half of the circulating Cys is derived from GSH breakdown.

Hcy can enter the trans-sulfuration pathway (10%) and be metabolized into cystathionine or be re-methylated (90%) into Met (figure 1). The existence of multiple routes for Hcy metabolism is consistent with the requirement for efficient product removal to prevent its accumulation in the cell⁹.

The trans-sulfuration pathway is sensitive to pro- and antioxidants, which enhance or diminish Hcy flux²³. On the other hand, trans-sulfuration pathway provide the amount of Cys required to synthesize the cellular redox-controlling molecules like GSH and Tau, that protect the molecular constituents of cells against RS-induced damages.

6 SULFUR-DERIVED REDOX HOMEOSTASIS IN CANCER

Alterations in intracellular redox homeostasis increase the rate of base mispairing due to base oxidation, alterations in gene expression and chronic inflammatory processes thus inducing tumor progression⁹. The increase in oxidized protein level resulted by the depletion of functional proteins by RS leads to higher recycling of oxidized proteins by the ubiquitin system, increasing the amino acid requirement for protein synthesis, specially Met and Cys²⁴.

The Met cycle plays an important role in cell physiology. It is place where SAM biosynthesis occurs in a reaction catalyzed by methionine adenosyltransferase.

SAM is the major biological methyl donor for other molecular such as DNA²⁵ resulting Hcy from this transmethylation reaction (figure 1).

Furthermore Met is produced by remethylation of Hcy in a Met synthase reaction using Tetrahydrofolate (THF) as cofactor (figure 1). It is demonstrated that approximately 50% of all tumors are incapable of proliferation when Met is replaced by Hcy, resulting in cell arrest, and eventual death²⁶. It is likely that the elevated production of Hcy by cancer cells is an adaptation that has allowed tumor cells to survive and colonize⁹. The absolute requirement for Met by tumor cells is known as “Met-dependency” or “Met-stress”²⁷. The molecular mechanism is not completely known but may be triggered by high transmethylation rates and hyper production of Hcy²⁰. The accumulation and export of Hcy probably impairs Cys biosynthesis possibly affecting the major enzymes in the trans-sulfuration pathway⁹.

Hcy has auto-oxidative potential, since free Hcy contains a free thiol group, this molecule can react with itself to form homocystine or albumin and Cys to increase ROS/RNS production to enhance oxidative stress²⁸.

The first step of trans-sulfuration pathway (cystathionine β -synthase; CS) is activated by SAM in order to remove Hcy. Redox regulation of CS activity to pro- and antioxidants, enhances or diminishes Hcy flux through the trans-sulfuration²³.

7 THE TRANS-SULFURATION PATHWAY ROLE TO THE TUMOR PROGRESSION

The trans-sulfuration pathway is necessary to maintain intracellular redox homeostasis controlling the tumor progression. This pathway is necessary for cellular physiology because it connects the Met metabolic pathways to the generation of Cys, GSH and Tau as well as conserving or accelerating Hcy utilization. Moreover Cys is the amino acid limited for GSH formation and half of Cys levels are maintained by the breakdown of GSH²⁹.

Alterations in GSH levels are associated with numerous human disease, including cancer. Considering the homeostatic redox buffer function of GSH and its role in inactivating some carcinogens and protecting cells against DNA-damaging

free radicals and lipid peroxidation, it is plausible that tumor cells may need more GSH for their survival than other cell types⁹. Tumors that are multidrug and radiation resistant are found to have high GSH content³⁰. Under metastatic conditions, high levels of GSH can support a rapid cell cycle, an elevated rate of DNA synthesis and a block in cell apoptosis³¹. Thus, GSH can be characterized as a double edge sword, protecting non-tumor cells against oxidative stress induced by metabolism (e.g. Hcy) or exogenous compounds and at the same time, protecting tumor cells from apoptosis and chemotherapeutic treatments, though furthering tumor development and metastasis⁹.

The precise molecular mechanisms of macrophage inducing tumor remain poorly understood, but it is well established that once a cellular mass becomes infiltrated by macrophages, the ability of tumor tissue to survive the immune response increases exponentially. Hence, considering that Met-dependent tumors produce large amounts of Hcy from Met, it is plausible that Hcy is one of the signals required to recruit macrophages to the site of tumor cells⁹.

Since reduced free Hcy contains a free thiol group, this molecule can react with itself to form homocystine and increase RS production. Plasma levels of reduced free Hcy are found to enhance oxidative stress²⁸.

It is possible that tumor cells induce a local hyper homocyst(e)ine that recruits a sub population of macrophages. Once established, the macrophages trigger a series of biochemical events that result in the increased synthesis of proinflammatory molecules, RS, halogenated pyrimidines, angiogenic and growth factors, and create an optimal cellular microenvironment. This way lead to the selection and stimulation of cells with the ability to evade the immune system and colonize other tissues. Thus metabolic deficiencies in the trans-sulfuration pathway, especially those resulting cellular homocyst(e)ine accumulation, are directly correlated with chronic inflammation and it is likely that the elevated production of Hcy by Met-dependent cancer is an adaptation that allows tumor cells to survive and colonize a constantly changing, biological environment⁹.

On the other hand, under normal conditions Tau controls cells and tissue levels of chloride and HOCl by reacting with these molecules to generate taurine chloramines (Tau-Cl). Hence Tau can protect cells from oxidant-induced injury by forming Tau-Cl. Tau-Cl is formed by the direct reaction of Tau with hypochlorous acid, which is generated by the myeloperoxidase-catalyzed oxidation of H₂O₂ during the respiratory burst. Chlorotaurine decreases both nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF) secretion by the activated macrophages in a manner that involves changes at the transcriptional and translational levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF expression respectively, as well as by inhibiting iNOS itself³².

The Tau-Cl downregulates the immunologic response by reducing the production of proinflammatory mediators like nitric oxide, tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2 and monocyte chemotactic protein 1, which blocks the cascade effect of chronic inflammation that leads to tumor progression³³.

Thus it seems that tumor cells control their proliferation by increasing Met availability and transmethylation while the higher Hcy formation is useful to attract residual macrophages and blood phagocytes that allow growth factors and cytokines necessary for inflammation and tumor progression. The trans-sulfuration pathway (through Hcy removal and formation of Cys and Tau) along with folate-stimulated remethylation of Hcy would impair these tumor-favored redox homeostasis probably favoring the tumor-host.

8 ESOPHAGUS CANCER

Increased oxidative stress associated with disturbances in antioxidant defense system has been implicated in the pathogenesis of several diseases, most notably oral cancer⁵.

The primary targets of peroxidation by ROS are the polyunsaturated fatty acids in the membrane lipids. The decomposition of these lipids yields a variety of end products such as lipid hydroperoxides and malondialdehyde (MDA). The levels of these end products indicate the extent of lipid peroxidation and serve as a marker of cellular damage caused by free radicals. Increased levels of MDA and NO

indicated an increase in the oxidative stress in oral-squamous cell carcinoma (OSCC) patients associated with a deficient antioxidant defense mechanism⁵.

Cancer remains one of the top killers despite the many breakthroughs in our understanding of the biology and molecular pathogenesis of this disease. OSCC is the sixth most common malignancy and a major cause of morbidity and mortality³⁴.

Prevalence and risk factors

Esophageal cancer is known for its marked variation by geographic regions race ethnicity and gender. In the US it accounts for only 1% of all diagnosed cancers, however, it is the seventh leading cause from cancer among men³⁵. Esophageal cancers are predominately squamous cell carcinoma (SCC) and use of tobacco, moderate to heavy alcohol ingestion, low income and infrequent consumption of raw fruits and vegetables accounted for more than 98% of the SCC rates among both white and African American men³⁶.

The highest incidence of esophageal SCC is found in northwestern China where the main risk factors are described of drinking very hot and salted tea, boiled with milk, a diet rich in meat, specially salted, dry and/or smoked meta, and dairy products³⁷.

Nutritional deficits in fresh fruits, vegetables and dietary fiber are commonly referred as associated with the presence of esophagus cancer in americans³⁶, germans³⁸, chinese³⁷. The protective effects of fruits and vegetables were seen specially those eaten raw.

Fruits and vegetables contain various micronutrients and dietary components with potential anti-carcinogenic effects. One of these micronutrients, vitamin C, blocks the endogenous formation of N-nitroso compounds, which are linked to risk of esophageal cancer³⁹.

Dietary differences may account for at least some of the disparity in esophageal cancer incidence among racial and ethnic groups. Moreover it is difficult to disentangle the influence of dietary and nutritional factors from the potent effects of

alcohol and tobacco. In particular, heavy consumption of alcoholic beverages can interfere with the consumption and use of a variety of nutrients, including liposoluble and hydrosoluble vitamins, zinc and protein⁴⁰. Smokers appear to have lower intake of several nutrients including vitamin C, than non-smokers⁴¹.

In conclusion, dietary deficiency of vitamin sources would play a major role in OSCC by impairing sulfur-antioxidant pathway and thus oral-supplementation of pathway-related B-vitamins would be worthwhile for patients survival.

REFERENCES

1. Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, Lee SY, Furukawa M. Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2000;89(4):715-23.
2. Grek CL, Tew KD. Redox metabolism and malignancy. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(4):362-8.
3. Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(3):357-71.
4. Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(2):351-78.
5. Gokul S, Patil VS, Jaikhani R, Hallikeri K, Kattappagari KK. Oxidant-antioxidant status in blood and tumor tissue of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Dis* 2010;16(1):29-33.
6. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):37-56.
7. Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 2003;531(1-2):37-80.
8. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003;531(1-2):231-51.
9. Rosado JO, Salvador M, Bonatto D. Importance of the trans-sulfuration pathway in cancer prevention and promotion. *Mol Cell Biochem* 2007;301(1-2):1-12.
10. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2006;80(4):705-13.

11. Heidland A, Klassen A, Rutkowski P, Bahner U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? *J Nephrol* 2006;19 Suppl 10:S102-9.
12. Schwartzburd PM. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(1):95-102.
13. Smith GR, Missailidis S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J Inflamm (Lond)* 2004;1(1):3.
14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
15. Nowsheen S, Aziz K, Kryston TB, Ferguson NF, Georgakilas A. The interplay between inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Curr Mol Med* 2012;12(6):672-80.
16. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011;711(1-2):193-201.
17. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(2):243-8.
18. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001;85 Suppl 2:S67-74.
19. McPherson RA, Hardy G. Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14(6):562-8.
20. Cellarier E, Durando X, Vasson MP, Farges MC, Demiden A, Maurizis JC, et al. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2003;29(6):489-99.
21. Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet* 2005 Apr 15;14 Spec No 1:R139-47.
22. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000;39(42):13005-11.
23. Zou CG, Banerjee R. Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem* 2003;278(19):16802-8.
24. Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 2004;24:539-77.

25. Mato JM, Corrales FJ, Lu SC, Avila MA. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J* 2002;16(1):15-26.
26. Lu SC, Huang HY. Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1994;47(5):859-69.
27. Kokkinakis DM. Methionine-stress: a pleiotropic approach in enhancing the efficacy of chemotherapy. *Cancer Lett* 2006;233(2):195-207.
28. Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002;322(1-2):21-8.
29. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134(3):489-92.
30. Perry RR, Mazetta JA, Levin M, Barranco SC. Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer* 1993;72(3):783-7.
31. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43(2):143-81.
32. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000;72(2 Suppl):653S-69S.
33. Park E, Park SY, Wang C, Xu J, LaFauci G, Schuller-Levis G. Cloning of murine cysteine sulfinic acid decarboxylase and its mRNA expression in murine tissues. *Biochim Biophys Acta* 2002;1574(3):403-6.
34. Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*. 2003 Apr;39(3):213-21.
35. Munoz N, Kato I, Peraza S, Lopez G, Carrillo E, Ramirez H, et al. Prevalence of precancerous lesions of the stomach in Venezuela. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(1):41-6.
36. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11(2):235-56.
37. Zheng S, Vuitton L, Sheyhidin I, Vuitton DA, Zhang Y, Lu X. Northwestern China: a place to learn more on oesophageal cancer. Part one: behavioural and environmental risk factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22(8):917-25.
38. Wolfgarten E, Rosendahl U, Nowroth T, Leers J, Metzger R, Holscher AH, et al. Coincidence of nutritional habits and esophageal cancer in Germany. *Onkologie* 2001;24(6):546-51.
39. Brown LM, Blot WJ, Schuman SH, Smith VM, Ershow AG, Marks RD, et al. Environmental factors and high risk of esophageal cancer among men in coastal South Carolina. *J Natl Cancer Inst* 1988;80(20):1620-5.

-
40. Wu-Williams AH, Yu MC, Mack TM. Life-style, workplace, and stomach cancer by subsite in young men of Los Angeles County. *Cancer Res* 1990;50(9):2569-76.
 41. Block G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 1991;53(1 Suppl):270S-82S.



CAPÍTULO II:

Artigo Científico

Efeitos da intervenção nutricional pós-operatória com vitaminas do complexo B sobre os indicadores metabólicos da via sulfurada e sobrevida de pacientes com câncer de esôfago

Lamônica VC¹, Moreto F^{2,3}, Henry MACA¹, Burini RC³

¹ Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia – Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

² Programa de Pós Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

³ Centro de Metabolismo em Exercício e Nutrição (CeMENutri) – Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Endereço para contato: vanialamonica@uol.com.br

RESUMO

Objetivo: verificar a influência da suplementação das vitaminas B₂, B₆, B₁₂ e folato na via metabólica dos aminoácidos sulfurados. **Método:** foram triados 26 pacientes (58,4 ± 11,8 anos) com câncer de esôfago (CAE) e 20 indivíduos adultos saudáveis (27 ± 8,4 anos) para controle. Após o diagnóstico de CAE os pacientes foram submetidos à avaliação nutricional, exames bioquímicos gerais e avaliação do metabolismo sulfurado no momento M0 e distribuídos aleatoriamente em dois grupos G1 e G2 para receberem suplementação com placebo e vitaminas (B₂, B₆, B₁₂ e folato) por 15 dias (M1), com inversão da suplementação nos 15 dias subsequentes (M2). **Resultados:** houve predominância masculina, raça branca, tabagismo, etilismo, tipo histológico carcinoma espinocelular e estadiamento EIV. A sobrevida média foi de 7,1±6,0 meses. O índice de massa corporal (IMC) em 46% dos pacientes = <18 kg/m² (15,9 ± 1,7 kg/m²); A global porcentagem de perda de peso = 21,3±13,4%. As comparações estatísticas mostraram albuminemia, glicemia, colesterolemia, folacemia, valores de metionina, homocisteína (Hcy), glutamato e glutatona (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) semelhantes entre os grupos. Houve diferenças entre os grupos nos valores de B₁₂, γ-glutamilttransferase, taurina, serina,

glicina e glutamina. Após a intervenção observou-se elevação de HDL-colesterol, Leucócitos, B₁₂ e diminuição de Linfócitos e Hcy sem afetar os valores de malondialdeído (MDA), GSH e GSSG. **Conclusão:** a suplementação vitamínica promoveu modificações de indicadores do estado de oxi-redução associados à melhoria da saúde, porém sem alterações significativas com a sobrevida.

Palavras-chave: Câncer de esôfago; Defesa antioxidante; Desnutrição; Metabolismo da glutathione

ABSTRACT

Purpose: To assay the effect of vitamins B₂, B₆, B₁₂ and folate supplementation in the metabolic pathway of sulfur amino acids. **Methods:** We were screened 26 patients (58.4 ± 11.8 years) with esophageal cancer (CAE) and 20 healthy adult subjects (27 ± 8,4 years) were used as a control group. After the diagnosis of CAE the patients underwent nutritional assessment, general biochemical exams and general sulfur metabolism at M0. All the subjects were randomly assigned into two groups G1 and G2 to receive supplementation with placebo and vitamins (B₂, B₆, B₁₂ and folate) for 15 days (M1) with inversion of supplementation in the next 15 subsequent days (M2). **Results:** There was a predominance of male, white race, smoking, alcohol consumption, squamous cell carcinoma histology and staging EIV. The average survival time was 7.1±6.0 months. The body mass index (BMI) in 46% of patients was <18kg/m² (15.9±1.7kg/m²); the percentage of overall weight loss= 21.3±13.4%. Statistical comparisons showed albumin, glucose, cholesterol, folacemia, methionine, homocysteine, glutamate glutathione (GSH) and glutathione oxidized (GSSG) values similar between the groups. There were differences between the groups in the levels of B₁₂, γ-glutamyl transferase, taurine, serine, glycine, glutamine, GSH and GSSG. After the intervention there was an increase of HDL-cholesterol, leukocytes and B₁₂ and decreased lymphocytes and Hcy without affecting the values of malondialdehyde, GSH and GSSG. **Conclusion:** the vitamin supplementation promoted changes in indicators of redox status associated with

improved health (increased B12 and HDL cholesterol and decreased Hcy), but no significant changes with survival.

Key words: Esophageal cancer; Antioxidant defense; Undernutrition; Glutathione metabolism

1 INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de câncer que acometem homens e mulheres, o câncer de esôfago (CAE) é o 8º mais incidente e o 6º em mortalidade no mundo¹. No Brasil, é o 8º tipo mais incidente, correspondendo a um risco estimado de 8/100 mil casos novos em homens e 3/100 mil casos novos em mulheres. É mais preponderante em pessoas acima de 50 anos e parece estar relacionado à condição socioeconômica baixa, à etnia afro-americana e ao gênero masculino^{2,3,4}. A etiologia do CAE envolve associação de diversos fatores de risco intrínsecos como história familiar, genética, idade, e fatores extrínsecos, como: consumo de álcool, tabagismo, ingestão de bebidas e/ou alimentos muito quentes, exposição a nitrosaminas, infecções locais por fungos, deficiências de vitaminas (por diminuição de frutas e vegetais frescos). Outros fatores, como a inflamação provocada pela doença do refluxo, esofagite e esôfago de Barrett, também podem iniciar o processo de carcinogênese^{3,5,6}.

Entre os tipos histológicos mais frequentes que acometem este câncer, o carcinoma espinocelular (CEC) parece estar diminuindo em detrimento ao aumento do adenocarcinoma (ADE) em países ocidentais^{3,5}. De acordo com Kubo *et al.* (2010)⁷, a incidência do tipo ADE de esôfago aumentou 500% nas últimas décadas. Diferentemente do CEC, o ADE é mais incidente em homens caucasianos, do que em negros afro-americanos⁷.

O quadro clínico característico desta doença consiste em disfagia seguida pela diminuição progressiva de alimentos sólidos para líquidos, com importante perda de peso. Estima-se que a sobrevida média após o aparecimento dos sintomas seja de oito meses para casos não tratados; no entanto, de acordo com o INCA

(2012)², a sobrevida acima de cinco meses é rara. Este prognóstico ruim está relacionado ao estágio avançado da doença no momento do diagnóstico, à baixa ingestão de alimentos e às alterações metabólicas decorrentes do desenvolvimento da doença^{2,8}.

Em publicação anterior⁹, foi encontrado que os pacientes, quando procuram o sistema de saúde, apresentam estado avançado da doença (grau III e IV de acordo com TNM/UICC)¹⁰ e com perda de peso grave (>10%), o que favorece o aumento das complicações pós-cirúrgicas e a mortalidade precoce.

Fatores como deficiências nutricionais por decorrência da diminuição de frutas frescas, vegetais e fibras alimentares são comumente referidos como associados com a presença de CAE em americanos¹¹, alemães¹², chineses¹. Os efeitos protetores de frutas e vegetais são vistos, especialmente, quando estes alimentos são consumidos crus¹⁰. Frutas e verduras contêm vários micronutrientes e componentes alimentares com potenciais efeitos anticancerígenos. Um desses micronutrientes, a vitamina C, bloqueia a formação endógena de compostos N-nitrosos, que estão ligados ao risco de CAE¹⁰.

Diferenças na dieta podem ser responsabilizadas por algumas disparidades na incidência de CAE entre os grupos raciais e étnicos. Além disso, é difícil separar a influência de fatores alimentares e nutricionais dos potentes efeitos do álcool e do tabaco. Em particular, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas pode interferir no consumo e na utilização de uma variedade de nutrientes, incluindo as vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis, zinco e proteína. Adicionalmente, os fumantes parecem ter menor ingestão de vários nutrientes, incluindo a vitamina C, do que os não fumantes¹⁰.

O consumo de alimentos frescos, principalmente frutas e verduras cruas, é importante veículo de compostos antioxidantes com capacidade de inibir e/ou diminuir o desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (ROS/RNS), bem como outros tipos de radicais livres. Estes radicais, geralmente quando em excesso, reagem com o DNA, RNA,

proteínas e/ou lipídios favorecendo danos importantes ao metabolismo celular proporcionando a transformação maligna^{13,14}.

Baixas quantidades de ROS/RNS são bem toleradas pelas células; no entanto, a formação excessiva destas espécies reativas, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o anion superóxido (O_2^-) induzem ao estresse oxidativo. A glutathiona (GSH), juntamente com superóxido dismutase (SOD), catalase, tioredoxina redutase e outros compostos intracelulares com função redox atuam como detoxificadores de ROS/RNS e protegem a célula do dano oxidativo. A GSH pode diretamente limpar os radicais livres e peróxidos que se acumulam na célula durante o estresse oxidativo, por meio da formação de dissulfeto ou pela sua oxidação à glutathiona oxidada (GSSG). Esta função redox da GSH é a sua função mais importante, cujas reações são catalisadas pelas enzimas glutathiona oxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR)¹⁵. A síntese de GSH ocorre no final do metabolismo da Met, cuja via é dependente de algumas vitaminas do complexo B (B_2 , B_6 , B_{12} e folato).

Mostrou-se, anteriormente, que pacientes com câncer de esôfago apresentam concentrações plasmáticas elevadas de taurina (Tau) e homocisteína (Hcy)¹⁶. A hiperhomocisteínemia pode estar refletindo possível deficiência vitamínica, visto que esses pacientes frequentemente apresentam privação alimentar devido à disfagia, além de ser comum a incidência de hipovitaminose (B_2 , B_6 , B_{12} e folato) em consumidores de álcool^{17,18}. Essas vitaminas desempenham função no metabolismo da Hcy, por meio das vias de remetilação e transulfuração. Após a transmetilação da metionina, cuja reação produzirá homocisteína e adenosina, a homocisteína pode seguir dois caminhos: ser convertida novamente em metionina em reação dependente de folato e vitamina B_{12} (via da remetilação); ou condensar-se com a serina e produzir cistationa, cuja reação é dependente de vitamina B_6 (via da transulfuração)^{19,20}.

No CAE, há predomínio do estado pró-oxidante, tendo em vista que esta doença pode ser classificada como inflamação crônica. Seus portadores apresentam, geralmente, deficiências nutricionais importantes, favorecendo o comprometimento da capacidade antioxidante e do estado imunológico, com

diminuição de qualidade de vida e com baixa sobrevida. Há, na literatura, evidências de associação da alteração do padrão dietético com o CAE. Visto que o estado de deficiência nutricional pode afetar a via sulfurada com consequências antioxidantes e imunitárias, uma suplementação de vitaminas envolvidas no sistema de proteção celular, como o sistema GSH, poderia melhorar a capacidade orgânica contra o desenvolvimento do câncer. No entanto, não foram encontrados trabalhos com intervenção de vitaminas do complexo B (B₂, B₆, B₁₂ e folato) no CAE e/ou no sistema GSH/GSSG. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a influência da suplementação das vitaminas hidrossolúveis na via metabólica dos aminoácidos sulfurados e na sobrevida de pacientes com CAE.

2 MÉTODO

O presente trabalho consistiu de estudo observacional, prospectivo e cruzado com placebo realizado em pacientes portadores de CAE avançado, internados na enfermaria de gastrocirurgia do Hospital das Clínicas de Botucatu. A amostra foi espontânea e o tamanho amostral foi estabelecido de acordo com a demanda de pacientes admitidos na enfermaria de gastrocirurgia, no período de maio/2009 a maio/2011. O tamanho amostral foi de 26 pacientes (24 homens e duas mulheres), com idade média de $58,4 \pm 11,8$ anos. Dos 26 pacientes que iniciaram o estudo, 14 faleceram antes de completar a intervenção (momento M1) e um paciente faleceu antes de terminar o protocolo completo de suplementação. Portanto, 11 pacientes completaram o estudo (Figura 1). O grupo controle saudável consistiu em 20 adultos (10 homens e 10 mulheres) com idade média de $27 \pm 8,4$ anos, também utilizado em publicação anterior²¹. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP - Of.403/08-CEP (Anexo 1). Todos os sujeitos concordaram em participar do estudo e, em anuência, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os pacientes foram avaliados por meio de endoscopia, biópsia, broncoscopia e tomografia computadorizada toraco-abdominal para certificação do diagnóstico de CAE e determinação do estadiamento, conforme a classificação TNM¹⁰. A partir do diagnóstico, os pacientes foram submetidos a avaliação nutricional, exames bioquímicos gerais e avaliação do metabolismo sulfurado, no

momento basal (M0) e em dois outros momentos (M1, M2), após serem distribuídos em dois grupos aleatoriamente para receberem suplementação com vitamina (G1) e placebo (G2) por 15 dias (M1), com inversão das suplementações nos 15 dias subsequentes (M2). A sobrevivência foi determinada pela data da endoscopia até a data do óbito.

Os pacientes foram acompanhados ambulatorialmente. A suplementação vitamínica seguiu de acordo com as recomendações da *Dietary Reference Intake* (DRI)²² para homens e mulheres adultos. Cada participante recebeu um conjunto 15 flaconetes com vitaminas ou placebo. Os flaconetes com vitaminas continham 10 ml de solução de xarope contendo as seguintes vitaminas: riboflavina (B₂), piridoxina (B₆), cobalamina (B₁₂) e ácido fólico. Os flaconetes placebo continham 10 ml de solução de glicose com corante com cor, sabor e textura semelhante ao xarope com vitaminas (Anexo 2). Cada paciente foi orientado a ingerir um flaconete por dia, junto com sua dieta oral ou enteral e guardarem os flaconetes vazios para serem entregues à pesquisadora no momento da próxima avaliação.

Protocolo de Avaliação

A avaliação nutricional foi constituída de antropometria (peso, altura e IMC - quilograma/m²), sendo os resultados comparados aos da *World Health Organization* (WHO)²³; porcentagem de perda de peso - %PP (peso habitual – peso atual x 100 ÷ peso atual), cujos resultados foram classificados de acordo com os critérios proposto por Blackburn *et al.* (1977)²⁴ composição corporal obtido pelo exame de bioimpedância elétrica (BIA) por meio do aparelho modelo Biodinâmics® (modelo 450, USA)²⁵; Avaliação Nutricional Subjetiva (ANS)²⁶; anamnese alimentar por meio do recordatório de 24h, em que as medidas caseiras foram convertidas em gramas ou mililitros, com a finalidade de possibilitar a análise química do consumo alimentar, por meio do programa Nutrilife versão 8 (2012). Os valores de referência das vitaminas do complexo B foram determinados conforme DRIs²². Para o Valor Energético Total (VET) utilizou-se a recomendação de 20 a 45 kcal/kg/dia e, para as proteínas considerou-se a recomendação de 1,0 a 2,0 g/kg/dia conforme o Consenso Nacional de Nutrição Oncológica²⁷. Durante o período de estudo, foi recomendado aos pacientes manterem as orientações nutricionais recebidas dos

nutricionistas assistentes do Ambulatório de Gastrocirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Os exames bioquímicos foram realizados em amostras de sangue coletadas por meio da punção venosa, após jejum de 12 horas. Os indicadores de filtração glomerular (creatinina e ureia), de função hepática (γ -glutamilttransferase – γ -GT), albumina, cálcio, glicose, perfil lipídico (triacilgliceróis, colesterol e frações) e ácido úrico foram mensurados dentro de 4 horas após a coleta, por meio do método de química seca (*Vitros System, Johnson & Johnson, USA*). Proteína-C-reativa ultrasensível (PCR-us), insulina, vitamina B₁₂ e folato foram analisados utilizando método de quimiluminescência (*Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics, Germany*). O índice de resistência insulínica HOMA-IR foi obtido por meio de cálculo descrito por Levy *et al.* (1998)²⁸. As análises dos aminoácidos (metionina (Met), cisteína (Cys), serina (Ser). Glicina (Gly), glutamina (Gln), glutamato (Glu), Hcy, Tau), bem como das concentrações de malonildialadeído (MDA), GSH e GSSG foram realizadas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*), utilizando sistema *Shimadzu*.

Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Para cada indivíduo, foi calculada a variação relativa das variáveis, definida por: $G1 = X_{15\text{dias}} - X_{0\text{dias}} / X_{0\text{dias}}$ e $G2 = X_{30\text{dias}} - X_{15\text{dias}} / X_{15\text{dias}}$

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a homogeneidade da amostra. Para comparação entre as suplementações (placebo e vitamínica), efeito das suplementações (G1 e G2) foi feita análise de variância (ANOVA – *one way*), seguida de teste *post hoc* HSD de Turkey.

Para a comparação entre os dois momentos de suplementação (G1 e G2), foi plicado teste *t* de *Student* pareado.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ (5%). O tratamento estatístico foi realizado pelo *software* STATISTICA 5,0.

3 RESULTADOS

As características demográficas e comportamentais do grupo de pacientes são apresentadas na Tabela 1. Houve predominância masculina (92,3%), raça branca (84,6%), hábitos de tabagismo e etilismo frequentes, 88,5% e 84,6%, respectivamente. Localização no terço médio do esôfago, tipo histológico CEC e estadiamento E IV foram as características clínico-patológicas predominantes. Os sintomas mais frequentes foram a disfagia e a odinofagia com duração média de $3,6 \pm 2,7$ meses.

A média de sobrevida dos 26 pacientes foi de $7,1 \pm 6,0$ (1 - 24) meses, sendo que a maioria (81%) não ultrapassou a média do grupo, conforme apresentado na Tabela 2.

O diagnóstico nutricional mostrou que a média do IMC foi de $20,5 \pm 5,9$ kg/m² (Tabela 3); no entanto, 46% dos pacientes apresentaram desnutrição proteico-energética com IMC abaixo de 18 kg/m² ($15,9 \pm 1,7$ kg/m²). Quanto à perda ponderal, a %PP foi em média de $21,3 \pm 13,4\%$ nos seis meses anteriores ao diagnóstico. Os dados levantados pela avaliação nutricional subjetiva mostraram que 100% dos pacientes substituiu a dieta de hipocalórica para líquida, sendo que, por este modelo de diagnóstico, 58% ($n = 15$) destes pacientes estavam em estado de desnutrição grave e 40% ($n = 11$) em desnutrição moderada.

O recordatório de 24h mostrou, nos momentos M0, M1 e M2, que os valores do VET encontrados mostraram variação de 650 kcal/dia a 1851 kcal/dia em que a média foi de 1200 ± 372 kcal/dia. A média de proteína ingerida por dia foi de $1,1 \pm 0,6$ g/dia; porém, a distribuição dos carboidratos e lipídios e vitaminas B₂, B₆, B₁₂ dos pacientes apresentava-se dentro das recomendações das DRIs para a idade, exceto pela ingestão média de folato, que ficou abaixo da necessidade estimada, 182 ± 81 µg/d (DRI 320 µg/d).

Comparativamente ao grupo controle, os pacientes eram mais idosos, de menor IMC, com albuminemia, glicemia, colesterolemia, trigliceridemia e folacemia semelhantes, assim como as concentrações plasmáticas dos metabolitos

nitrogenados (Tabela 3). Entretanto, o grupo de pacientes apresentou diferenças com o grupo controle para vitamina B₁₂ e γ -GT (Tabela 3). Adicionalmente, os grupos foram semelhantes em Met, Hcy, Glu e GSSG/GSH. Para os demais aminoácidos, GSH e GSSG, os valores observados nos pacientes foram sempre menores (Tabela 4).

O efeito da intervenção tanto vitamínica, quanto placebo resultou em redução de massa corporal e ureia plasmática. Com a suplementação vitamínica houve elevação do HDL-c e dos leucócitos totais, com redução dos linfócitos (Tabela 5). Adicionalmente, a suplementação vitamínica resultou em redução da Hcy e elevação da vitamina B₁₂, sem afetar significativamente as concentrações de GSH, MDA e GSSG (Tabela 6).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo obedeceu ao delineamento cruzado (*crossover*) com a finalidade de verificar os efeitos de uma intervenção das vitaminas participantes no metabolismo sulfurado em pacientes com CAE. O delineamento *crossover* oferece a possibilidade de intervenção contando com o grupo placebo em amostras de tamanho limitado²⁹. Em trabalho anterior¹⁶ mostrou-se a dificuldade em reunir número expressivo de paciente com CAE pois, por se tratar de uma doença silenciosa e de evolução lenta, os portadores desta afecção somente procuram o serviço de saúde quanto estão em estado avançado da doença e, geralmente, com grau de desnutrição grave, desencadeando o óbito. Dados semelhantes foram encontrados no estudo retrospectivo de Marin *et al.* (2010)⁹ realizado também neste Hospital das Clínicas, mostrando que a sobrevida média dos pacientes com CAE e com pós-operatório de cirurgia de pequeno porte (ostomias) foi de 3,5 meses. No estudo de Oliveira e Aarestrup (2012)³⁰, avaliando pacientes com câncer colerretal, de 28 pacientes selecionados, foi verificado que apenas nove concluíram o estudo de três meses de intervenção (com simbióticos), por óbito, falta de aderência ao tratamento ou razões pessoais.

As vitaminas suplementadas foram as participantes das vias de remetilação (folato, B₂, B₆ e B₁₂) e da trans-sulfuração da Hcy.

As características demográficas dos pacientes deste estudo foram semelhantes às dos trabalhos anteriores^{9,16} e estão em consonância com outros estudos nacionais e internacionais com a maioria dos pacientes do gênero masculino, raça branca, idade superior a 50 anos, consumo excessivo de álcool e tabaco, estadiamento grau III e IV (Classificação TNM-UICC)^{3,31,32}.

A disfagia é o sintoma mais frequentemente relatado pela literatura^{3,31,32}. No presente estudo, a disfagia e a odinofagia foram relatadas por todos os pacientes ($n=26$) no momento do diagnóstico. Essas manifestações clínicas são comuns aos portadores de CAE, uma vez que o esôfago não possui barreira serosa; consequentemente, isto favorece o crescimento tumoral circunferencialmente, fator que obstrui a passagem de alimentos, dificultando a deglutição de alimentos sólidos e, progressivamente, líquidos. No entanto, devido à característica anatômica do esôfago, os sintomas só aparecem quando a circunferência foi comprometida em 60%. Este fato favorece a acentuada perda de peso observada nesses pacientes, no momento em que procuram o serviço de saúde, corroborando com o diagnóstico tardio da doença³.

O curso silencioso de CAE, cujos sintomas se manifestam quando o tumor adquire tamanho suficiente para obstrução alimentar, leva o paciente a alterar seu padrão dietético: primeiramente, ocorre mudança na consistência das refeições (de sólidas para pastosas) e, posteriormente, observa-se que há mudança na qualidade da composição alimentar (substituição por caldos coados, sucos adicionados de água e em pequena quantidade). No presente trabalho, houve diferença significativa com relação ao IMC entre os pacientes e o grupo controle, mostrando que alterações do padrão alimentar comprometem a manutenção adequada de peso.

A perda ponderal é esperada em pacientes com neoplasias do trato digestório, em especial CAE, devido à baixa ingestão de alimentos por conta da sintomatologia da doença. O valor energético da dieta desses pacientes supriu, em média, 60% das necessidades calóricas desta população, fato este, provavelmente, relacionado às características da própria doença, que determina alterações nutricionais, metabólicas e funcionais. No entanto, a ingestão de proteínas estava dentro dos teores recomendados. Este fato poderia estar relacionado com a conduta

clínica adotada, em que a maioria dos pacientes recebem alta hospitalar com prescrição de dieta enteral. A prescrição de dieta enteral é comum a esses pacientes, pois em sua maioria, devido à gravidade da doença e do prognóstico, são submetidos a terapias paliativas, como as ostomias, eficazes no restabelecimento de uma via alternativa de alimentação³⁴.

Os valores de albumina e glicose plasmáticos (indicadores de desnutrição proteico-energética crônica) desses pacientes encontravam-se dentro dos limites aceitáveis de composição corporal. Dados semelhantes foram encontrados nos pacientes analisados nos trabalhos anteriores, a saber Lamônica-Garcia *et al.* (2008)¹⁶, que, avaliando 18 pacientes com CAE, mostrou que a média de albumina plasmática foi de 3,5 g/dL. Valores semelhantes foram encontrados por Marin *et al.* (2010)⁹ que, analisando 101 prontuários de pacientes com CAE, verificou que a média de albumina plasmática foi de 3,47 a 3,99 g/dL. No entanto, a sobrevida foi maior no grupo de pacientes com albuminemia >3,5 g/dL. Assim como a albumina aqui, as concentrações de Met, Hcy e Glu foram semelhantes em pacientes e controles. Entretanto, os demais aminoácidos apresentaram valores menores nos pacientes. Embora os valores de vitamina B₁₂ tenham sido dispares entre os grupos, ambos podem ser considerados dentro da faixa de normalidade (117 – 1158 pg/ml)³⁵.

Acompanhando a semelhança entre grupos para a Hcy, também os valores de folacemia foram estatisticamente semelhante, permitindo a remetilação da Hcy à Met. Esse processo controlado pelo folato com participação da Ser constitui a principal via de formação endógena da Met, ao mesmo tempo que reduz a Hcy (e o estado pró-oxidante) intracelular.

O tempo médio de sobrevivência observada nos pacientes deste estudo (7,1 ± 6,0 meses) foi semelhante ao encontrado no estudo anterior (7,9 ± 6,7 meses)¹⁶ concordando com a literatura consultada². Períodos menores de sobrevida foram associados: à maior incidência de desnutrição grave no momento do diagnóstico; e ao maior número de complicações pós-cirúrgicas⁹. A desnutrição proteico-energética nos pacientes com CAE é associada ao aumento da perda de peso e à redução da ingestão alimentar; entretanto esses pacientes estão sujeitos não somente aos

efeitos dietéticos decorrentes da obstrução do canal alimentar; eles sofrem alterações que podem ser ocasionadas pela anorexia mediada por citocinas, hipermetabolismo e alterações no metabolismo proteico³⁴. No trabalho anterior¹⁶, foi mostrado que houve correlação entre a contagem de linfócitos totais e a sobrevida dos pacientes; entretanto, no presente trabalho, os linfócitos mostraram-se diminuídos em comparação aos do grupo controle, assim como os valores de GSH, não se mostraram diferentes em comparação aos do grupo controle. Os menores valores de GSH foram acompanhados de menores valores também na forma oxidada em igual proporção (relação GSSG/GSH), assim como dos demais aminoácidos precursores da GSH, Cys e Gly. No presente caso, o déficit destes precursores pode ser atribuído à sua menor formação no caso da Cys (pois Met e Hcy são semelhantes aos do controle) e da Tau (reduzida) e, ao maior consumo no caso da Gly, esta atendendo a maior formação de Ser para os processos de remetilação da Hcy e transulfuração (para gerar Cys). Os valores menores de Gln podem ser atribuídos a maior utilização na formação (e normalização) do Glu, na tentativa de restabelecer a normalidade de GSH.

A maioria dos pacientes (73%) do presente estudo foi submetida a quimio/radioterapia. Visto que os metabolitos destas terapias são metabolizados pelo fígado, a elevação significativa do γ -GT em comparação à do grupo controle poderia estar relacionada com a agressão hepática a que esses pacientes são submetidos. Tsuboya *et al.* (2012)³⁶, analisando japoneses prospectivamente, por nove anos, mostrou que há correlação positiva entre a elevação do γ -GT e a incidência de cânceres relacionados ao consumo corrente de álcool, como é o caso da maioria dos nossos pacientes. No entanto, há evidências na literatura da participação do γ -GT no estresse oxidativo. A principal função do γ -GT é servir como precursor de aminoácidos para a síntese de GSH intracelular. O aumento de γ -GT poderia ser interpretado como um mecanismo de defesa antioxidante, uma vez que ele poderia diminuir o estresse oxidativo, facilitando a regeneração da GSH intracelular³⁶.

A literatura evidencia elevada incidência de insuficiência renal em pacientes com câncer, visto que aproximadamente 50% dos fármacos utilizados na terapia

anticâncer são excretados predominantemente pela urina³⁸. A evolução do CAE favorece a perda de peso e, consequentemente, de massa magra, a elevação dos valores de ureia dos pacientes poderia estar refletindo a perda de peso como consequência do estado catabólico dos pacientes. No entanto, é comum atribuir a diminuição da filtração glomerular ao envelhecimento o que favorece, consequentemente, aumento dos solutos no plasma. Considerando a faixa etária da população deste estudo, poder-se-ia inferir que o aumento da ureia observada nos pacientes seria esperado mais devido a idade do que devido à menor filtração glomerular. Contribui para esse raciocínio o fato de a creatinina, outro marcador da filtração glomerular, ter sido semelhante à encontrada no grupo controle, após a suplementação vitamínica.

A maioria dos tumores possui caráter catabólico consumindo massa magra e promovendo perda de peso. Este fato foi observado, na presente pesquisa durante o curso da doença, independente do tipo de suplementação. De forma diferenciada, a suplementação vitamínica promoveu modificações de indicadores associados a melhor saúde (elevação do HDL, da vitamina B₁₂ e redução da Hcy) e outros de interpretação controversa (elevação dos leucócitos e redução dos linfócitos). Do ponto de vista do equilíbrio redox, o maior nível de HDL e a redução da Hcy podem denotar menor ação pró-oxidante e, com isso, menor progressão do tumor e maiores chances de sobrevida do hospedeiro. Entretanto, essa possibilidade não foi reforçada pelo comportamento apresentado por GSH e Tau (continuaram abaixo dos controles), respectivamente responsáveis antioxidante e anti-inflamatório do infiltrado tumoral.

5 CONCLUSÃO

Diferentemente do trabalho anterior¹⁶, em que foi observada elevação nos teores plasmáticos da Tau e Hcy, a via sulfurada dos pacientes apresentou-se preservada, pois não foram encontradas diferenças significativas dos aminoácidos sulfurados entre o grupo de pacientes e o grupo controle saudável. Bem como não foram observadas alterações significantes entre os indicadores analisados e o tempo de sobrevida desses pacientes.

Assim, do objetivo de verificar a influência da suplementação de vitaminas hidrossolúveis na via metabólica dos aminoácidos sulfurados e GSH e a sobre vida dos pacientes com CAE, observou-se apenas a redução de Hcy.

REFERÊNCIAS

1. Zheng S, Vuitton L, Sheyhidin I, Vuitton DA, Zhang Y, Lu X. Northwestern China: a place to learn more on oesophageal cancer. Part one: behavioural and environmental risk factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22(8):917-25.
2. INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2012: Incidências de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>. Acesso em: 16/07/2012.
3. Monteiro MNL, Araujo DL, Soares-Bassetti E, Vieira JPFB, Santos MRM, Oliveira Junior PPL, *et al.* Câncer de esôfago: perfil das manifestações clínicas, histologia e comportamento metastático em pacientes submetidos à tratamento oncológico em um centro de referência em Belo Horizonte. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2009;55(1):27-32.
4. Cariatì A, Casano A, Campagna A, Cariatì E, Pescio G. Prognostic factors influencing morbidity and mortality in esophageal carcinoma. *Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo* 2002;57:201-4.
5. Berretta M, Lleshi A, Fisichella R, Berretta S, Basile F, Volti GL, *et al.* The role of nutrition in the development of esophageal cancer: what do we know? *Frontiers in Bioscience* 2012;E4(1):351-7.
6. Xiang Y, Zhang T, Zhang H, Hu A, Guo W, *et al.* Comparison of lifestyle and environment among high risk immigrant and low risk host residents: implications for esophageal cancer etiology. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2010;11:1-6.
7. Kubo A, Corley DA, Jensen CD, Kaur R. Dietary factor and risks of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Nutr Res Rev* 2010; 23(2):230-26.
8. Argilés J, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano F. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition* 2005;21:977-85.
9. Marin FA, Lamônica-Garcia VC, Henry MACA, Burini RC. Grade of esophageal cancer and nutritional status impact of postsurgery outcomes. *Arq Gastroenterol* 2010;47(4):348-53.
10. INCA – Instituto Nacional de Câncer. TNM: Classificação de tumores malignos. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

11. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11(2):235-56.
12. Wolfgarten E, Rosendahl U, Nowroth T, Leers J, Metzger R, Holscher AH, *et al.* Coincidence of nutritional habits and esophageal cancer in Germany. *Onkologie* 2001;24(6):546-51.
13. Nowsheen S, Aziz K, Kryston TB, Ferguson NF, Georgakilas A. The interplay between inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Curr Mol Med* 2012;12(6):672-80.
14. Gokul S, Patil VS, Jailkhani R, Hallikeri K, Kattappagari KK. Oxidant-antioxidant status in blood and tumor tissue of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Dis* 2010;16(1):29-33.
15. Singh S, Khan AR, Gupta AK. Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions 2012. *Journal of experimental therapeutics and oncology* 2012;9:303-16.
16. Lamônica-Garcia VC, Marin FA, Lerco MM, Moreto F, Henry MACA, Burini RC. Níveis plasmáticos de taurina e de seus precursores em pacientes com câncer de esôfago. *Arq Gastroenterol* 2008;45(3):199-203.
17. Guimarães GC, Oliveira T, Aibara EH, Lopes A, Montagnini AL. Nutrição e câncer. *Acta Oncol Bras* 2002;22(1):227-32.
18. Pelucchi C, Talamini R, Negri E, Levi F, Conti E, Franceschi S, La Vecchia C. Folate intake and risk of oral and pharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2003;14: 1677-81.
19. Venâncio LS, Burini RC, Yoshida WB. Hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. *J Vasc Bras* 2004;3(1):21-7.
20. Borges-Santos MD, Burini RC. Bases metabólicas da suplementação de cisteína. *Rev Bras Nutr Clín* 2005;20(4):259-64.
21. Borges-Santos MD, Moreto F, Pereira PCM, Ming-Yu Y, Burini RC. Plasma glutathione of HIV⁺ patients responded positively and differently to dietary supplementation with cysteine or glutamine. *Nutrition* 2012;28(1):753-6.
22. FINIC – Food and Nutrition Information Center. NAL/USDA – National Agricultural Library/United States Department of Agriculture. DRI Tables – 2002. Disponível em: <http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>. Acessado em: 18/07/2012
23. World Health Organization - WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva; 1995
24. Blackburn GL, Bistrian BR, Maini BS, Schlamm HT, Smith MF. Nutritional and metabolic assessment of hospitalized patients. *J Parenter Enteral Nutr* 1977;1:11-32.

25. Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI, Hodgdon JA, Van Itallie TB. Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study. *Am J Clin Nutr* 1988;47:7-14.
26. Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is subjective global assessment of nutritional status? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987;11:8-13
27. INCA – Instituto Nacional de Câncer. Consenso Nacional de Nutrição Oncológica. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
28. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998;21(12):2191-2.
29. Hussey MA, Hughes JP. Design and analysis of stepped wedge cluster randomized trials. *Contemporary Clinical Trials* 2007;28:182-91.
30. Oliveira AL, Aasestrup FM. Avaliação nutricional e atividade inflamatória sistêmica de pacientes com câncer colorretal submetidos à suplementação com simbiótico. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2012;25(3):147-53.
31. Araujo ES, Duval PA, Silveira DH. Sintomas relacionados à diminuição de ingestão alimentar em pacientes com neoplasia do aparelho digestório atendidos por um programa de internação domiciliar. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2012;58(4):639-46.
32. Deans DAC, Tan BH, Wigmore SJ, Ross JA, Beaux AC, Paterson-Brown S, et al. The influence of systemic inflammation, dietary intake and stage of disease on rate of weight loss in patients with gastro-oesophageal cancer. *British Journal of Cancer* 2009;100:63-9.
33. Fonseca CAM, Andrade-Sobrinho J, Pesciotto A, Rapoport A. O tubo gástrico isoperistáltico no tratamento paliativo do câncer do esôfago. *Rev Col Bras Cir* 2002;29:202-8.
34. Leandro-Merchi, VA, Tristão, AP; Moreto, MC, Fugulin NM; Portero-McLellan KC; Aquino JLB. Estudo comparativo de indicadores nutricionais em pacientes com neoplasias do trato digestório. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2008;21(3):114-9.
35. Galukande M, Jombwe J, Baingana R, Gakwya A. Reference values for serum levels of folic acid and vitamin B₁₂ in a young adult Ugandan population. *African Health Sciences* 2011;11(2):240-3.
36. Tsuboya T, Kuriama S, Nagai M, Hozawa A, Sugawara Y, Tomata Y, et al. Gamma-glutamyltransferase and cancer incidence: the Ohsaki cohort study 2012;22(2):144-50.
37. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs Jr DR. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radical Research* 2004;38(6):553-39.

-
38. Janus N, Launay-vacher V, Byloos E, machiels JP, Duck L, Keger J, *et al.* Cancer and renal insufficiency results of BIRMA study. *British Journal of Cancer* 2010;103:1815-21.

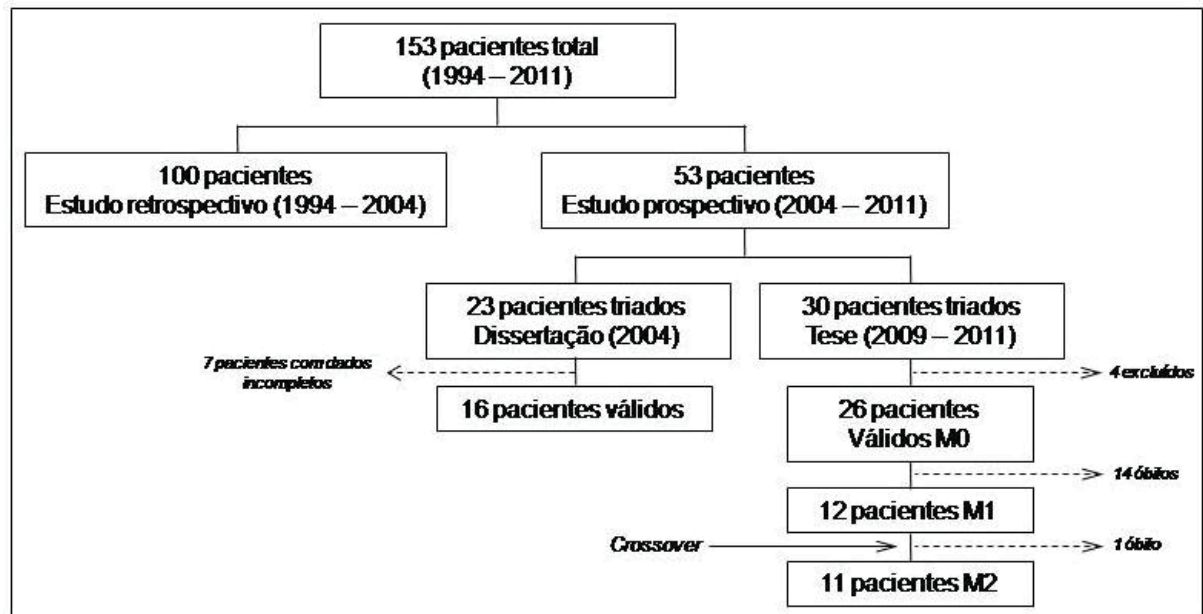


Figura 1 - Representação gráfica do *flow chart* do tamanho amostral

Tabela 1 – Caracterização demográfica, comportamental e histológica do grupo de estudo no momento basal.

Variáveis		<i>n</i>	%
Gênero	masculino	24	92,3
	feminino	2	7,7
Raça	branca	22	84,6
	não branca	4	15,4
Etilista	sim	22	84,6
	não	4	15,4
Tabagista	sim	23	88,5
	não	3	11,5
Localização	superior	2	7,6
	médio	16	61,5
	distal	8	30,8
Histologia	CEC	20	77,0
	ADE	5	19,2
	TNE	1	3,8
Estadiamento	E IIa	1	3,8
	E III	8	30,8
	E IV	17	65,4

CEC = carcinoma espinocelular; ADE = adenocarcinoma; TNE = tumor neuro-endócrino;

Tabela 2 – Número e porcentagem da sobrevida dos pacientes considerando data da endoscopia e data do óbito

Sobrevida	<i>n</i>	%
≤ 7 meses	21	80,8
> 7 meses	5	19,3
<i>Total</i>	26	100,1

n = número de pacientes; % = porcentagem em relação ao total de pacientes.

Tabela 3 – Comparativos dos indicadores analisados entre o grupo controle e o grupo de pacientes no momento basal.

	Controles	Pacientes	p
Idade (anos)	27,3 ± 8,4	58,4 ± 11,8	< 0,001
IMC (Kg/m ²)	25,01 ± 3,2	20,5 ± 5,9	0,004
Glicose (mg/dL)	87,3 ± 5,0	91,7 ± 34,8	0,06
Albumina (g/dL)	4,1 ± 0,3	3,8 ± 0,8	0,07
Triacilgliceróis (mg/dL)	88 (67 - 118)	107 (92 - 160)	0,05
Col-total (mg/dL)	166 ± 27	187 ± 50	0,09
HDL-c (mg/dL)	52,5 ± 20	48,2 ± 23,4	0,52
LDL-c (mg/dL)	90,5 ± 32,9	114 ± 34,7	0,03
Ureia (mg/dL)	29 ± 7,5	33,6 ± 16,9	0,26
Creatinina (mg/dL)	0,94 ± 0,19	0,85 ± 0,22	0,14
Ác. Úrico (mg/dL)	4,7 ± 1,2	5,0 ± 1,7	0,49
γ-GT (UL)	20,0 (16,5 - 29)	50 (28 - 96,7)	< 0,001
Folato (ng/mL)	8,02 ± 3,12	8,76 ± 4,28	0,64
B₁₂ (pg/mL)	288 ± 130	533 ± 230	< 0,001

Teste *t* de *Student* independente (variáveis com distribuição normal) e teste de Mann-Whitney (variáveis de distribuição não normal). *p* < 0,05.

IMC = índice de Massa Corpórea; Col-total = Colesterol total; HDL-c = HDL colesterol; LDL-c = LDL colesterol; γ-GT = Gama Glutamil Transferase.

Tabela 4 – Demonstrativo dos valores dos aminoácidos e os indicadores do estresse oxidativo entre o grupo de pacientes no momento basal e o grupo controle.

	Controles ($\mu\text{mol/L}$)	Pacientes ($\mu\text{mol/L}$)	<i>p</i>
Metionina	30,8 $\pm$ 8,9	26,7 $\pm$ 10,2	0,13
Homocisteína	13,9 $\pm$ 5,5	15,2 $\pm$ 3,2	0,26
Serina	108,2 $\pm$ 7,8	45,3 $\pm$ 38,2	<0,001
Cisteína	533,6 $\pm$ 53,9	198,4 $\pm$ 84,7	<0,0001
Taurina	63,3 $\pm$ 3,9	27,0 $\pm$ 14,5	<0,001
Glutamina	305,1 $\pm$ 50,2	106,4 $\pm$ 65,8	<0,001
Glutamato	56,8 $\pm$ 9,6	93,6 $\pm$ 98,5	0,051
Glicina	485,1 $\pm$ 68,510	164,5 $\pm$ 115,6	<0,001
GSH	9,21 $\pm$ 2,1	4,85, $\pm$ 1,9	<0,001
GSSG	0,81 $\pm$ 0,92	0,26 $\pm$ 0,1	0,006
GSSG/GSH	0,06 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,07	0,37

Teste *t* de *Student* independente. *p* <0,05

Tabela 5 – Demonstrativo dos valores encontrados no grupo de pacientes no momento basal e após a suplementação.

	M0	Placebo	Supl vitamínica	p
IMM	63,6 ± 20,3 a	54,4 ± 12,9 b	55,4 ± 12,6 b	0,05*
IMC (kg/m ²)	21,8 ± 7,4	18,6 ± 4,8	19,0 ± 4,8	0,11
Creatinina (mg/dL)	0,76 ± 0,11	0,82 ± 0,35	0,80 ± 0,25	0,76
Uréia (mg/dL)	27,5 ± 5,6 a	41,4 ± 16,6 b	36,2 ± 19,0 b	0,04*
Ác. úrico (mg/dL)	4,5 ± 1,5	4,2 ± 1,4	4,7 ± 1,5	0,48
Cálcio (mg/dL)	9,5 ± 0,5	9,0 ± 1,0	9,5 ± 0,3	0,16
Albumina (g/dL)	4,4 ± 0,7	3,9 ± 0,5	4,1 ± 0,4	0,11
PCR-us (mg/dL)	1,5 (1,1 - 1,7)	1,4 (0,6 - 1,9)	1,4 (0,6 - 2,1)	0,97
γ-GT (UL)	52,0 (27,3-73,5)	52,5 (33,0-85,5)	58 (42,5-76,0)	0,96
Glicose (mg/dL)	95,9 ± 23,3	92,9 ± 50,6	90,0 ± 29,7	0,94
Insulina (nUI/ml)	6,06 ± 3,26	7,00 ± 3,36	6,53 ± 3,25	0,76
HOMA-IR	1,42 ± 0,69	1,93 ± 0,95	1,46 ± 1,15	0,15
TG (mg/dL)	118,2 ± 47,3	108,9 ± 41,4	105,8 ± 60,3	0,68
Col. total (mg/dL)	196,3 ± 52,5	196,0 ± 50,9	213,5 ± 50,1	0,42
HDL (mg/dL)	43,0 (33,0-63,2)a	45,0 (34,0-71,0)a	60,5 (42,0-82,0)b	0,04*
LDL (mg/dL)	123,3 ± 39,4	112,1 ± 39,7	118,4 ± 38,2	0,48
Leucócitos (mm ³)	8111 ± 1112 a	7325 ± 2506 a	11250 ± 4443 b	0,02*
Linfócitos (mm ³)	1802 ± 1475 a	1504 ± 727 a	1394 ± 804 b	0,05*

Testes = ANOVA *one-way* (variáveis de distribuição normal) e ANOVA *on-ranks* (variáveis de distribuição não normal). *p* < 0,05

IMM = Índice de Massa Muscular; IMC = índice de Massa Corpórea; PCR-us = proteína C reativa ultra sensível; γ-GT = gama glutamil transferase; TG = triacilgliceróis; Col total = colesterol total; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; MDA = malonildialdeído; GSH = glutatona; GSSG = glutatona oxidada.

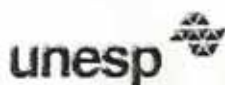
Tabela 6 – Demonstrativo dos valores encontrados entre os aminoácidos e os indicadores de estresse oxidativo após *crossover*.

	Placebo (G1) <i>n</i> = 8	Vitamina (G2) <i>n</i> = 5	<i>p</i>
Metionina (μmol/L)	-0,0036 ± 0,25	0,120 ± 0,26	0,3
Homocisteína (μmol/L)	0,236 ± 0,56	-0,311 ± 0,16	0,03
Serina (μmol/L)	0,260 ± 0,95	0,477 ± 0,95	0,94
Cisteína (μmol/L)	0,194 ± 0,43	0,180 ± 0,57	0,96
Taurina (μmol/L)	-0,050 ± 0,27	0,004 ± 0,03	0,64
Glicina (μmol/L)	0,379 ± 0,65	0,034 ± 0,76	0,71
Glutamina (μmol/L)	0,719 ± 2,80	0,668 ± 1,37	0,97
Glutamato (μmol/L)	0,017 ± 0,76	0,779 ± 1,17	0,13
GSH (μmol/L)	0,131 ± 0,33	0,106 ± 0,37	0,88
GSSG (μmol/L)	0,055 ± 0,13	-0,005 ± 0,15	0,42
MDA (μmol/L)	-0,136 ± 0,19	0,424 ± 0,83	0,18
Folato (ng/mL)	0,059 ± 0,26	0,241 ± 0,26	0,15
B₁₂ (pg/mL)	-0,250 ± 0,40	2,07 ± 4,55	0,02

Teste = ANOVA *one way*, *post hoc* Turkey. *p* <0,05

GSH = glutathiona; GSSG = glutathiona oxidada; MDA = malonildialdeído

ANEXO 1 – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.



**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de outubro de 2008

Of. 403/08-CEP

Ilustríssima Senhora

Profª Drª Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry
Departamento de Cirurgia e Ortopedia
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Maria Aparecida,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa **"Efeitos da intervenção nutricional pós-operatória com vitaminas do complexo B sobre indicadores metabólicos da via sulfurada e a sobrevida de pacientes com cancer de esôfago"**, a ser conduzido por Vânia Cristina Lamônica Garcia, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 06/10/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.**

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

ANEXO 2 – Fórmulas dos suplementos nutricionais utilizados no projeto**Fórmula do conteúdo dos flaconetes com vitaminas:**

- Vitamina B ₂ (riboflavina cloridrato)	1,3mg
- Vitamina B ₆ (piridoxina cloridrato)	1,7mg
- Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	2,4mg
- Ácido fólico	400µg
- Flavorizante morango com corante vermelho 3%	0,1ml
- Xarope simples *qsp	10ml

Fórmula do conteúdo dos flaconetes com placebo:

- Corante amarelo de tartazina solução 2%	0,1ml
- Flavorizante morango com corante vermelho 3%	0,3ml
- Xarope simples *qsp	10ml

Fórmula do xarope simples:

- Sacarose	85%
- Metilparabeno (conservante)	0,15%
- Água destilada qsp	100ml
- Corante amarelo – Amarelo de tartazina – Color Index 19140	
- Corante vermelho – Vermelho crepon – Color Index 16255	