

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Efeitos da suplementação de leucina no coração de ratos tratados com
doxorubicina**

THIAGO MONTES FIDALE

Uberlândia

2017

THIAGO MONTES FIDALE

**Efeitos da suplementação de leucina no coração de ratos tratados com
doxorubicina**

Tese apresentada ao Programa de pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- F449e
2017 Fidale, Thiago Montes, 1979
 Efeitos da suplementação de leucina no coração de ratos tratados
 com doxorrubicina / Thiago Montes Fidale. - 2017.
 74 p. : il.
- Orientador: Elmiro Santos Resende.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Inclui bibliografia.
1. Ciências médicas - Teses. 2. Doxorrubicina - Teses. 3.
 Cardiotoxicidade - Teses. 4. Oncologia. - Teses. I. Resende, Elmiro
 Santos. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Montes Fidale

Efeitos da suplementação de leucina no coração de ratos tratados com doxorubicina

Presidente da Banca: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Titular: Prof^a. Dra. Hanna Karen Moreira Antunes

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Titular: Prof. Dr. Cristhyano Pimenta Marques

Instituição: Faculdade Atenas

Titular: Prof^a. Dra. Érica Carolina Campos Pulici

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Titular: Prof^a. Dra. Nadia Carla Cheik

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Suplente: Prof. Dr. Alexandre Gonçalves

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Suplente: Prof^a. Dra. Lara Ferreira Paraíso

Instituição: Faculdade Presidente Antônio Carlos de Uberlândia (FUPAC)

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, que ilumina o caminho da minha vida e me enche de saúde, força e determinação.

À minha amada **Letícia de Queiroz Martins**, por todo apoio, amor, compreensão e pela companhia ao longo da trajetória que faz parte da concretização deste sonho.

À minha filha **Laís Martins Fidale**, que renova minha vida a cada sorriso.

Aos meus pais **Lerinda Montes Fidale** e **Antônio Roque Fidale**, pelo apoio, encorajamento, amor incondicional e pelos ensinamentos que são os alicerces da minha vida.

Aos meus irmãos, **Rodrigo** e **Beatriz**, pelo exemplo de força, amizade e amor que carrego comigo a cada dia.

Aos amigos, **Juvêncio** e **Aidê**, pelo amor à minha família e apoio incondicional ao longo desta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Elmiro Santos Resende**, os mais sinceros agradecimentos, por sua confiança, pelos ensinamentos e por conduzir minhas ações com brilhantismo e simplicidade, me proporcionando um grande crescimento profissional e pessoal.

À Professora e amiga **Hanna Karen Moreira Antunes**, muito obrigado por trazer tranquilidade nos momentos de dúvidas, por todos os ensinamentos e amizade, fundamentais em todas as etapas desse trabalho.

Ao professor e amigo **Alexandre Gonçalves**, por direcionar minha vida para esse passo tão importante, por sua amizade e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos **Luciano Alex, Fernanda Rodrigues de Souza, Poliana Rodrigues Alves e Leonardo Roever**, pelos conhecimentos compartilhados e alegrias vividas juntas.

À Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à **Gisele de Melo Rodrigues, Viviane Garcia Pires Gonçalves**, todos os **professores e colegas da Pós-Graduação**, pela sabedoria compartilhada e por abrilhantar cada momento dessa caminhada.

Aos colegas de laboratório **Felipe César Gonçalves, Simone Ramos Deconte, Francielle Borges Rosa de Moura e Matheus Matioli Montovani** pelo apoio técnico, ensinamentos e amizade.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta
ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A cardiotoxicidade é um dos efeitos adversos mais significativos do tratamento oncológico com doxorubicina sendo responsável por elevada taxa de morbimortalidade. Entre estes efeitos destaca-se a ocorrência de cardiotoxicidade que pode levar à disfunção ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e, em última instância, à morte. Estudos têm focado os efeitos da suplementação de leucina como estratégia para amenizar e/ou reverter o quadro de proteólise induzido por diversos acometimentos clínicos. Contudo, desconhece-se o impacto da suplementação de leucina na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

Objetivo: O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de leucina na cardiotoxicidade em ratos tratados com doxorubicina. **Material e Métodos:** O experimento

foi realizado no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA-UFU) e teve duração total de 42 dias. Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com peso corporal entre 250 e 300 gramas, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, Controle (8 animais), Doxorubicina (10 animais), Leucina (8 animais) e Leucina + Doxorubicina (10 animais). Os Grupos C e D receberam dieta padrão, enquanto os grupos L e LD receberam dieta rica em leucina (suplementada em 5%). Os animais dos grupos D e LD, receberam injeções intraperitoneais de doxorubicina, três vezes por semana, ao longo de duas semanas, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg. Os grupos C e L receberam solução salina (soro fisiológico a 0,9%), via intraperitoneal, no mesmo volume empregado para os animais tratados com doxorubicina. Ao final do experimento os animais foram anestesiados e submetidos à ecocardiografia transtorácica. Após a eutanásia, o colágeno cardíaco foi quantificado por estudo histopatológico. Para as comparações entre os grupos utilizou-se o Teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA), seguida, quando necessário, pelo teste de Tukey. A significância estatística foi estabelecida para valores de $p < 0,05$. **Resultados:** Em ratos tratados com dose cumulativa de 7,5 mg/kg de doxorubicina, ocorreu dilatação do ventrículo esquerdo (VE) e diminuição da fração de ejeção (FEVE). A leucina suplementada em 5% na ração preveniu a dilatação e a disfunção do VE quando coadministrada com doxorubicina. Alterações no remodelamento da matriz extracelular foram confirmadas pelo aumento das fibras de colágeno no grupo D, efeito este atenuado quando houve suplementação de leucina. Houve diferença significativa no diâmetro transversal dos cardiomiócitos quando se comparou os grupos L, D e LD, com o grupo C, sendo os menores diâmetros encontrados no grupo C. **Conclusão:** A leucina atenua a cardiotoxicidade no

modelo experimental de ratos Wistar tratados com doxorrubicina e este efeito é acompanhado de manutenção da matriz de colágeno.

Palavras Chave: Antraciclinas. Cardiotoxicidade. Aminoácido.

ABSTRACT

Introduction: Cardiotoxicity is one of the most significant adverse effects of oncologic treatment with doxorubicin being responsible for a high morbidity and mortality rate. These effects include the occurrence of cardiotoxicity that can lead to left ventricular dysfunction, heart failure and, ultimately, death. Studies have focused on the effects of leucine supplementation as a strategy to ameliorate and / or reverse the framework of proteolysis induced by various clinical complications. However, the impact of leucine supplementation on cardiotoxicity induced by doxorubicin is unknown. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the effects of leucine supplementation on cardiotoxicity in rats treated with doxorubicin. **Material and Methods:** The experiment was carried out at the Center for Bioterism and Animal Experimentation (CEBEA-UFU) and lasted 42 days. Thirty-six male Wistar rats weighing between 250 and 300 grams were randomly assigned to four groups: Control (8 animals), Doxorubicin (10 animals), Leucine (8 animals) and Leucine + Doxorubicin (10 animals). Groups C and D received standard diet, while L and LD groups received leucine rich diet (supplemented in 5%). The animals of groups D and LD received intraperitoneal injections of doxorubicin three times a week over two weeks, reaching a cumulative dose of 7.5 mg / kg. Groups C and L received saline solution (NaCl 0.9%), intraperitoneally, in the same volume used for animals treated with doxorubicin. At the end of the experiment the animals were anesthetized and submitted to transthoracic echocardiography. At the end of experimental period cardiac collagen was quantified by histopathological study. For the comparisons between the groups, Student's t-Test or analysis of variance (ANOVA) was used, followed, by Tukey's test when necessary. Statistical significance was set at $p < 0.05$. **Results:** In rats treated with a cumulative dose of 7.5 mg / kg doxorubicin, left ventricular (LV) dilation and decreased ejection fraction (LVEF) occurred. Leucine supplemented at 5% in the diet, prevented dilation and LV dysfunction when coadministered with doxorubicin. Changes in extracellular matrix remodeling were confirmed by the increase in collagen fibers in group D, which was attenuated when leucine supplementation occurred. There was a significant difference in the transverse diameter of the cardiomyocytes when the L, D and LD groups were compared with the C group, with the lower diameters found in the C group. **Conclusion:** Leucine attenuates cardiotoxicity in the experimental model of Wistar rats treated with doxorubicin and this effect is accompanied by maintenance of the collagen matrix.

Keywords: Anthracyclines. Cardiotoxicity. Amino Acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da doxorubicina.....	17
Figura 2: Mecanismo de ação das diversas drogas antitumorais.....	23
Figura 3: Doxorubicina mecanismos de ação e toxicidade	24
Figura 4: Aminoácidos de cadeia ramificada alifática	25
Figura 5: Sinalizações envolvidas na síntese proteica pela leucina.....	27
Figura 6: Rack ventilado e caixas de monitoração.	30
Figura 7: Caixa de monitoração.....	30
Figura 8: Caixa de monitoração dentro do gabinete de biossegurança..	31
Figura 9: Gabinete de biossegurança para troca das caixas e procedimentos	31
Figura 10: Material para confecção das rações.	33
Figura 11: Leucina para confecção das rações.	33
Figura 12: Mistura dos ingredientes para confecção da ração.....	35
Figura 13: Pellets levados à estufa	36
Figura 14: Pesagem da ração	36
Figura 15: Armazenagem da ração em câmara fria.	37
Figura 16: Equipamento ESAOTE MyLab 30 VET gold..	39
Figura 17: Software ESAOTE MyLab 30 VET gold.	40
Figura 18: Microscópio óptico Nikon ECLIPSE Ti®.	41
Figura 19: Lesões nos ratos tratados com doxorubicina.	42
Figura 20: Colágeno total (Picrosirius red)	49
Figura 21: Total de fibras de colágeno (polarização).....	50
Figura 22: Diâmetro transversal dos cardiomiócitos.	54
Figura 23: Mecanismos cardiotóxicos da doxorubicina e modulação da síntese proteica por meio da leucina.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Disposição dos animais nos grupos experimentais.....	29
Tabela 2. Dieta AIN-93G	32
Tabela 3. Distribuição percentual de macro nutrientes nas dietas.....	34
Tabela 4. Peso corporal e consumo de ração.....	43
Tabela 5. Consumo diário de ração	43
Tabela 6. Frequência Cardíaca, Fração de Encurtamento e Fração de Ejeção do VE.....	44
Tabela 7. Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e na diástole.....	46
Tabela 8. Quantidade de fibras de colágeno.....	48
Tabela 9. Peso absoluto e relativo do coração.....	52
Tabela 10. Diâmetro dos cardiomiócitos.	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Peso corporal total dos animais no dia da eutanásia (PF).	41
Gráfico 2. Frequência Cardíaca (bpm).	45
Gráfico 3. Fração de Encurtamento do Ventrículo Esquerdo.	45
Gráfico 4. Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo.	46
Gráfico 5. Diâmetro Sistólico Final do Ventrículo Esquerdo.	47
Gráfico 6. Diâmetro Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo.	47
Gráfico 7. Total de fibras de colágeno do coração (Picrosirius red).	49
Gráfico 8. Fibras de colágeno tipo I do coração.	50
Gráfico 9. Fibras de colágeno tipo III do coração.	51
Gráfico 10. Total de fibras de colágeno do coração (Polarização).	51
Gráfico 11. Peso absoluto do coração	52
Gráfico 12. Peso relativo do coração – (peso do coração / comprimento da tíbia)	53
Gráfico 13. Diâmetro transversal dos cardiomiócitos.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO

% Δ D	Fração de encurtamento
%LVEF	Fração de ejeção
4E-BP1	Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E
ACR	Cadeia ramificada e alifática
AIN-93G	<i>American Institute of Nutrition - 93 growth</i>
AMPK	Proteinoquinase ativada por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
BCAA	<i>Branch Chain Amino Acids</i>
CEBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Dieta padrão
DRL	Dieta rica em leucina
eIF4G	Fator de iniciação eucariótico 4G
FC	Frequência cardíaca
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
Kcl	Cloreto de potássio
LVDD	Diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole
LVDS	Diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole
LVVD	Volume do ventrículo esquerdo durante a diástole
LVVS	Volume do ventrículo esquerdo durante a sístole
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
p70S6k	Proteína ribossomal S6 de 70 kDA
PBK	Proteína quinase B
PI3-K	Fosfatidil-inositol-3-quinase
RNA	Ácido Ribonucleico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	167
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Doxorrubicina e Cardiotoxicidade	20
2.2	Aminoácido Leucina	24
3.	OBJETIVO GERAL	28
3.1	Objetivos específicos	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Animais:	29
4.2	Composição e Elaboração das Dietas:	31
4.3	Desenho Esquemático do Protocolo Experimental:	37
4.4	Tratamento com Doxorrubicina:	38
4.5	Estudo Ecocardiográfico:	38
4.6	Finalização do Experimento e Determinação do Peso do Coração:	40
4.7	Análise Histológica do Coração	40
4.8	Análise Estatística	41
5.	RESULTADOS	42
5.1	Observações Gerais	42
5.2	Peso Corporal Total dos Ratos e Consumo de Ração	42
5.3	Frequência Cardíaca, Fração de Encurtamento e Fração de Ejeção do VE	44
5.4	Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Sístole e Diástole	46
5.5	Fibras de Colágeno no Coração	47
5.6	Peso do Coração	52
5.7	Diâmetro Transversal dos Cardiomiócitos	53
6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	56
6.1	Peso Corporal Total e dos Corações dos Ratos e Consumo de Ração	
6.2	Fração de Encurtamento e Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo	56

6.3	Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Sístole e Diástole	58
6.4	Fibras de Colágeno no Coração.	59
6.5	Diâmetro Transversal dos Cardiomiócitos	60
6.6	Relação doxorrubicina e leucina.....	60
7.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	63
8.	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina (ADRIAMYCIN®) é um antibiótico descoberto na década de 50, derivado do pigmento vermelho produzido pelo fungo *Streptomyces peucetius*. Seu uso, como agente antineoplásico, iniciou-se nos anos 60 para tratamento de diversos tipos de câncer, destacando-se os tumores sólidos e as neoplasias hematológicas (TAN, 1967). Devido à composição de sua molécula (Figura 1), geram radicais livres em tecidos normais e malignos (KARIM, 2001; BRUNTON, 2007).

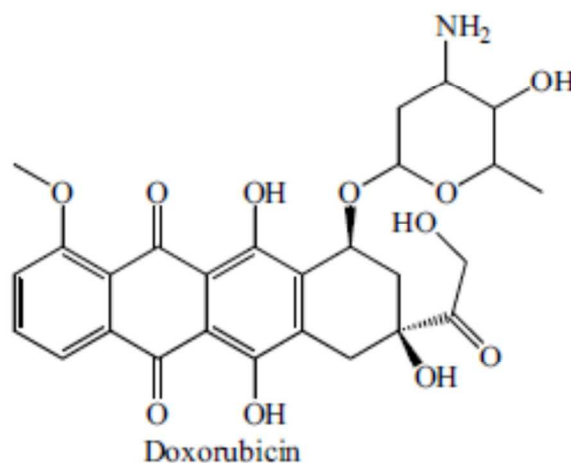


Figura 1: Estrutura química da doxorubicina. (CARVALHO, 2009)

A atividade antineoplásica da doxorubicina deve-se, principalmente, à sua ação junto ao DNA. Embora os mecanismos exatos de ação não estejam completamente elucidados, sabe-se que essa substância se insere entre os pares de base do DNA impedindo a síntese de macromoléculas, induzindo apoptose e gerando radicais livres de oxigênio (ROS) (FERREIRA, 2008; POLEGATO, 2011).

A cardiotoxicidade é um dos efeitos adversos mais significativos do tratamento oncológico e é responsável por uma considerável morbimortalidade (RASCHI, 2010; ADÃO, 2013). Entre os efeitos dos quimioterápicos no sistema cardiovascular, destaca-se, pela sua maior frequência e gravidade, a ocorrência de cardiomiopatia com disfunção ventricular e insuficiência cardíaca, que pode levar, em última instância, à morte (TAKEMURA, 2007; ADÃO, 2013; ALBINI, 2010).

Evidências indicam que a disfunção do VE está intimamente relacionada ao uso de doses cumulativas de antraciclina. Segundo Lefrak e colaboradores (1973), administrações

repetidas de doxorrubicina podem resultar em lesões permanentes a nível celular e intersticial, frequentemente associadas à degeneração e diminuição do número de células musculares cardíacas, perda de elementos contráteis e insuficiência cardíaca.

A principal hipótese para explicar a cardiotoxicidade da doxorrubicina é aquela que a relaciona ao estresse oxidativo (DOROSHOW, 1983; TAKEMURA, 2007). Existe um composto denominado cardiolipina, presente no interior das mitocôndrias, que exerce poder atrativo nas antraciclinas. Assim, no interior das células, as moléculas da droga ligam-se ao ferro, formando complexos ferro-antraciclina que, por mecanismo oxidativo catalisado pelo ferro, resultam na formação de superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxil, que são radicais livres (KAPUSTA, 2001).

Outros mecanismos tóxicos induzidos pela ação das antraciclinas estão relacionados ao comprometimento da síntese de importantes fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes cardioespecíficos (LEFRAK, 1973; ITO, 1990; GIANNI, 2008). Esta diminuição na expressão proteica acoplada a um aumento da degradação de miofilamentos leva a um balanço negativo das proteínas sarcoméricas nas células cardíacas (JEYASEELAN, 1997) e causa a diminuição da interação entre os filamentos de actina e miosina com desorganização da miosina sarcomérica (BOTTONNE, 1998).

Neste contexto, estudos têm focado os efeitos da suplementação de leucina, um aminoácido de cadeia ramificada alifática do grupo dos BCAA (*Branch Chain Amino Acids*), que é utilizado como estratégia para amenizar e/ou reverter o quadro de proteólise. Além da proteólise atribuída ao desequilíbrio no estresse oxidativo estar presente na toxicidade produzida pela doxorrubicina, ela é também encontrada em diversas outras situações clínicas, como o hipertireoidismo (FIDALE, 2016), condições de desuso muscular (KOBAYASHI, 2006), tratamentos com dexametasona (SHAH, 2000) e evolução de tumores (VENTRUCI, 2001), todas estas condições onde existe elevado catabolismo. Estudos demonstraram que a suplementação com leucina foi eficaz em minimizar tais acometimentos também nestas outras condições.

Informações obtidas de modelos animais nos permitem estudar as cardiopatias e o efeito de intervenções com terapias medicamentosas e alternativas. A cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina em ratos é um destes modelos que reproduz uma situação patológica na qual pode ser estudada a insuficiência cardíaca em seus múltiplos aspectos fisiopatológicos e terapêuticos. Apesar dos significativos avanços terapêuticos conseguidos nas últimas décadas, a mortalidade por insuficiência cardíaca continua elevada e a morbidade dela decorrente piora a qualidade de vida (VENTRUCI, 2001).

Neste aspecto, várias tentativas para o controle dos sintomas e da evolução ou reversão da insuficiência cardíaca vêm sendo propostas utilizando-se novos conceitos farmacológicos e estratégias terapêuticas inovadoras. Evidências sugerem que os BCAA, em especial a leucina, podem ser benéficos no tratamento de doenças humanas (ZANCHI, 2009), contudo desconhece-se o efeito dos mesmos na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina.

Analizados estes aspectos, o atual estudo se justifica como uma contribuição para um melhor entendimento da fisiopatologia da cardiotoxicidade crônica e da disfunção ventricular, bem como dos efeitos da leucina administrada no contexto do tratamento com doxorrubicina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Doxorrubicina e Cardiotoxicidade

Nos últimos anos muitos avanços ocorreram no campo da terapia oncológica. O desenvolvimento de novos fármacos e de técnicas de diagnóstico e tratamento melhorou substancialmente o prognóstico dos pacientes oncológicos (MINAMI, 2010). Porém, mesmo com os inquestionáveis benefícios, é importante avaliar o perfil de segurança referente ao emprego destes tratamentos, pois o mecanismo de ação de muitos fármacos podem causar colateralmente efeitos devastadores no sistema cardiovascular (YEH, 2009; RASCHI, 2010).

Mesmo com o avanço das terapias, a cardiotoxicidade derivada dos antineoplásicos ainda representa um grande fator limitador no prognóstico dos pacientes e durante décadas tem sido associada ao uso das antraciclinas (VIALE, 2008). Grande parte da literatura científica referente às terapias oncológicas e aos efeitos colaterais observados no sistema cardiovascular tratam principalmente da ocorrência de cardiomiopatia. Existem, porém, outros efeitos destas terapias que não a cardiomiopatia e que também podem comprometer a função cardiovascular (EWER, 2010).

Efeitos sobre o sistema vascular que resultam em alterações pressóricas e isquemia (LÓPEZ, 2001), podem causar hipertrofia cardíaca e instabilidade elétrica gerando arritmias em pacientes com predisposição à formação de focos ectópicos cardíacos (BARBEY, 2001). Proteger a função cardíaca representa um grande desafio para a indústria farmacêutica e para os médicos que se defrontam, na prática clínica, com reações adversas aos agentes terapêuticos disponíveis (RASCHI, 2010).

A avaliação dos doentes, análise dos riscos, prevenção e redução dos danos cardíacos e a monitoração da função cardíaca durante e após o tratamento do câncer, propiciou o desenvolvimento de uma vasta área de investigação científica denominada cardio-oncologia (EWER, 2010; ESCHENHAGEN, 2011) que, empregando abordagens multidisciplinares, engloba a ciência básica, oncológica e cardiovascular, propondo ações preventivas e tratamentos direcionados à cardiotoxicidade e a outros efeitos cardiovasculares indesejáveis induzidos por agentes antineoplásicos. (ADÃO, 2013).

A doxorrubicina pertence ao grupo farmacológico das antraciclinas e é muito usada no tratamento de uma ampla variedade de neoplasias (ADÃO, 2013; RASCHI, 2010) existindo uma grande preocupação quanto à sua cardiotoxicidade. Os mecanismos de ação relacionados ao desenvolvimento deste efeito ainda não foram completamente elucidados.

As primeiras evidências de cardiomiopatia relacionada ao uso das antraciclina indicaram que a disfunção sistólica do VE está intimamente ligada à terapia com doses cumulativas desta substância (LEFRAK, 1973). Uma limitação importante para o seu uso é, portanto, a cardiotoxicidade relacionada à dose. Esforços para a compreensão da base bioquímica dos efeitos tóxicos proporcionaram estratégias atualmente em uso clínico para reduzir a toxicidade cardíaca que incluem limitar a exposição à dose terapêutica limite, encapsulação em lipossomas para reduzir a captação miocárdica, administração simultânea com o quelante de ferro dexrazoxano para induzir a formação de espécies reativas de oxigênio catalisadas por ferro livre e modificar a estrutura da molécula (ADÃO, 2013; SAWYER, 2010).

A cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina é classificada em aguda ou crônica progressiva que pode ter início precoce e/ou tardio (GIANTRIS, 1998). Elas diferem entre si quanto às características clínicas e o risco associado.

A forma aguda é rara, transitória e independe da dose utilizada. Caracteriza-se por alterações súbitas da despolarização ventricular acompanhadas por arritmias ventriculares e supraventriculares, síndrome coronariana aguda, pericardite e miocardite. Estas alterações são geralmente observadas desde o início do tratamento até 14 dias após o término do mesmo (STEINBERG, 1987).

A segunda forma clínica é progressiva, evolui cronicamente e é dependente da dose usada. Inicia-se durante ou após a quimioterapia podendo surgir até mais de um ano depois do encerramento do tratamento (GIANTRIS, 1998). A manifestação mais característica da cardiotoxicidade crônica é a disfunção ventricular, sistólica ou diastólica, que pode levar à insuficiência cardíaca grave e até à morte (RASCHI, 2010; ALBINI, 2010).

A dose cumulativa total da doxorrubicina é o principal fator de risco para a ocorrência de insuficiência cardíaca congestiva crônica (RYBERG, 1998). Não existe, no entanto, nenhuma dose absolutamente segura do medicamento que possa evitar o aparecimento da cardiotoxicidade. Por este fato a administração dos fármacos deve ser sempre acompanhada de perto levando-se em conta seu grau de eficácia antineoplásica e de seus efeitos indesejáveis (LIPSHULTZ, 2005). Além destes cuidados, a duração do tratamento também pode influenciar o risco relativo de desenvolvimento da cardiotoxicidade. De fato, o uso de tratamentos que implicam em administração prolongada tem reduzido o grau de lesões cardíacas (HORTOBAGYI, 1989). Por outro lado, indivíduos tratados numa idade mais jovem parecem ser mais propensos à cardiotoxicidade (KREMER, 2001).

Os fatores de risco cardiovascular e outros ligados à forma de tratamento estão intimamente relacionados à incidência da cardiotoxicidade crônica e não têm relação com a forma aguda (RASCHI, 2010). A progressão e o grau de cardiotoxicidade são variáveis entre indivíduos e relacionam-se à idade, sexo, modo de administração do medicamento, dose cumulativa, doenças cardiovasculares prévias, bem como com a própria predisposição genética (RASCHI, 2010) sendo a dose cumulativa total o principal fator de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva (RYBERG, 1998).

Os principais mecanismos fisiopatológicos propostos ou identificados pelos quais a doxorrubicina afeta os cardiomiócitos envolvem desequilíbrios do estresse oxidativo e, em particular, da peroxidação lipídica (SAWYER, 2010; ITO, 1990). Estes mecanismos comprometem a síntese de DNA, RNA e de várias proteínas (OLSON, 1990), assim como dos fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes cardioespecíficos (ITO, 1990; JEYASEELAN, 1997). A diminuição da expressão proteica associada ao aumento da degradação de miofilamentos leva a um balanço sarcomérico negativo nas células cardíacas (LIM, 2004). Detalhes quanto ao mecanismo de ação dos diversos agentes antitumorais encontram-se na Figura 2. Interações específicas da doxorrubicina que resultam na inibição do DNA, RNA e síntese proteica, levando em última análise à morte celular (CUTTS, 1996, 2005) estão descritos na Figura 3.

Além destes mecanismos, as antraciclina também causam um desequilíbrio na regulação dinâmica da função cardíaca, com alterações importantes na homeostase do cálcio (TAKAHASHI, 1998; DODD, 1993).

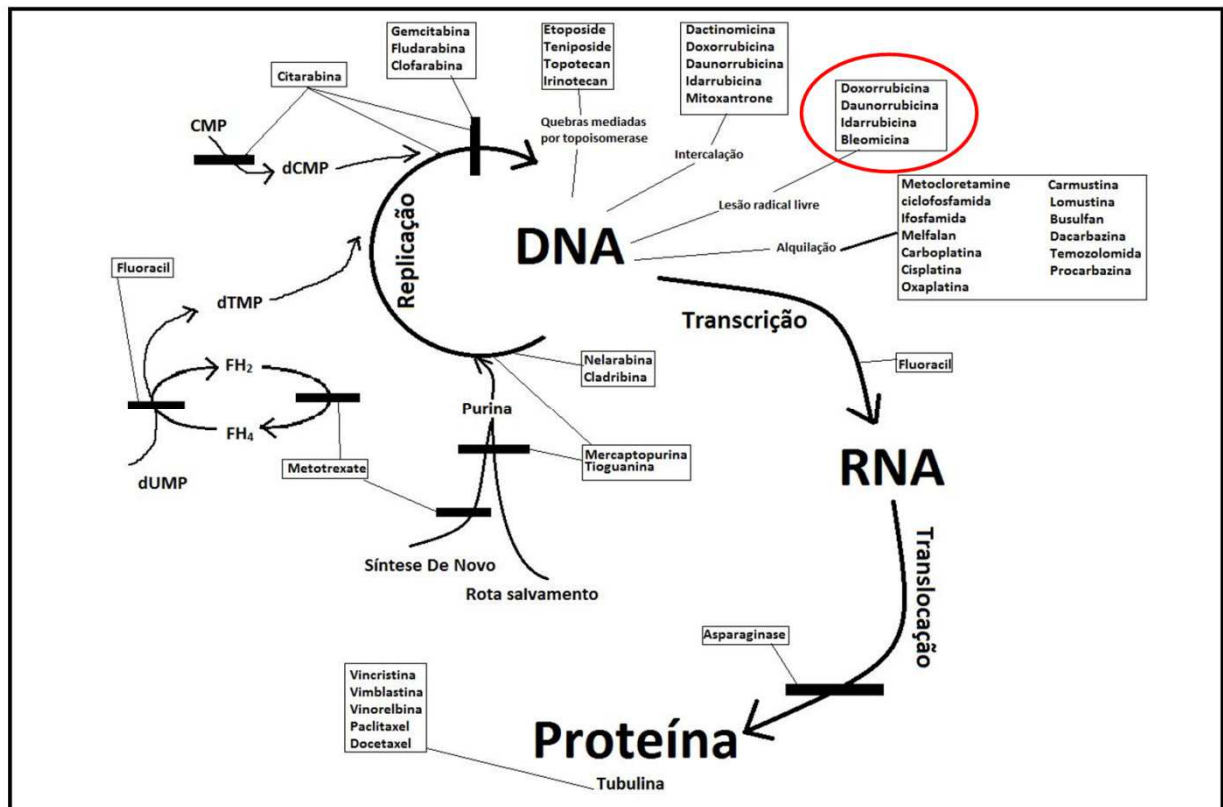


Figura 2: Mecanismo de ação dos diversos agentes antitumorais, A doxorrubicina liga-se avidamente ao DNA, por intercalação, entrando no interior da dupla hélice, clivando-a e religando-a, causando, assim, destruição celular (Modificado de PIZZO, 2005).

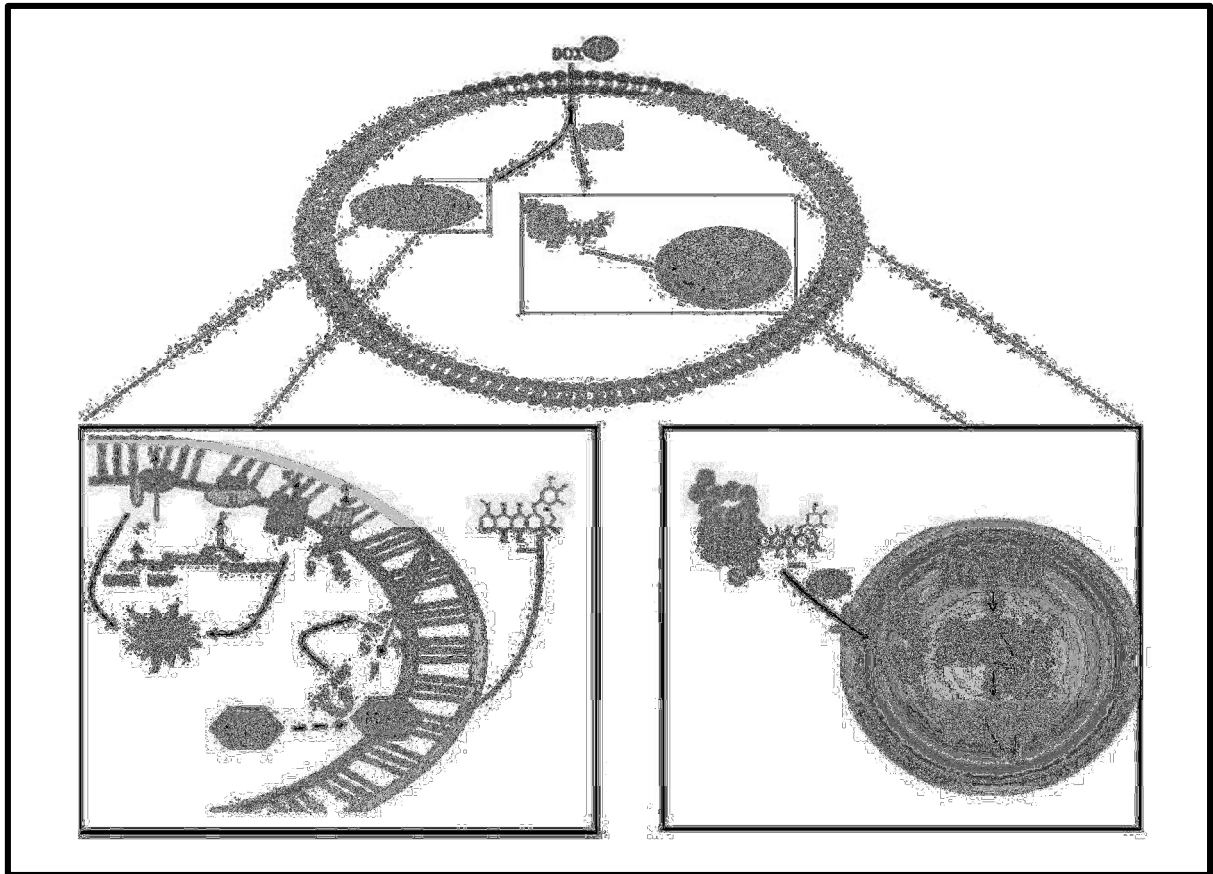


Figura 3: Doxorubicina mecanismos de ação e toxicidade. Um mecanismo importante diz respeito à sua capacidade de intercalar na hélice do DNA e ligar-se às proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA. A doxorubicina entra nas células por difusão simples e se liga ao proteossoma no citoplasma (passo 1). Em seguida, liga-se à subunidade proteossômica 20S, formando um complexo proteossoma doxorubicina que se transloca no núcleo por meio de poros nucleares (passo 3). Finalmente, se dissocia do proteossoma e se liga ao DNA por maior afinidade (passo 3). A doxorubicina também pode interagir com as mitocôndrias e se ligar à cardiolipina bloqueando a ligação da creatina quinase mitocondrial (MtCK) às membranas mitocondriais, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). NADH (dinucleótido de nicotinamida adenina reduzido); NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado); ADP (difosfato de adenosina); ATP (trifosfato de adenosina); Pi (fosfato inorgânico). Fonte: (CARVALHO, 2009).

2.2 Aminoácido Leucina

Aminoácidos são as unidades básicas que compõem uma proteína. Em humanos, nove deles são considerados essenciais, pois não são produzidos pelo próprio organismo devendo, portanto, ser absorvidos a partir da dieta. Dentre os nove aminoácidos essenciais existem três de cadeia ramificada alifática (BCAA). São eles a leucina, valina e a isoleucina (Figura 4) que correspondem a cerca de 35% dos aminoácidos essenciais nas proteínas musculares (MARCHINI, 1998; WAGENMAKERS, 1998). Em indivíduos adultos, os BCAA são relevantes para a manutenção da proteína corporal, além de serem fontes de nitrogênio para a

síntese de alanina e glutamina. Existem evidências demonstrando o papel fundamental dos BCAA – especialmente a leucina – na regulação de processos anabólicos envolvendo tanto a síntese quanto a degradação proteica muscular (SHIMOMURA, 2006).

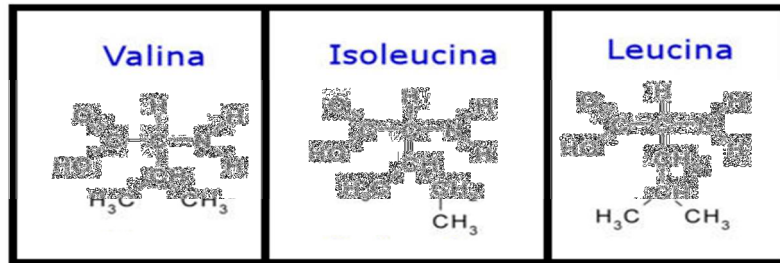


Figura 4: Aminoácidos de cadeia ramificada alifática (BCAA)

A administração endovenosa de aminoácidos de cadeia ramificada em ratos privados de alimentação aumenta a síntese proteica no músculo esquelético tão eficientemente quanto uma mistura contendo glicose e todos os demais aminoácidos, sugerindo que o efeito anabólico pode ser reproduzido pelo fornecimento apenas dos aminoácidos de cadeia ramificada (GARLICK, 1998). O incremento da síntese proteica pode ser atribuído à leucina uma vez que, em estudo com músculo esquelético perfundido, foi verificado que o fornecimento de leucina isoladamente estimula a síntese proteica tão efetivamente como a mistura dos três aminoácidos de cadeia ramificada (LI, 1978).

A ação da leucina se dá a nível pós-transcricional durante a fase de tradução do RNA-mensageiro em proteína. O mecanismo pelo qual a leucina estimula a produção de proteínas está relacionado ao aumento da eficiência traducional ativando a proteína denominada *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). A mTOR estimula a síntese proteica através de três proteínas reguladoras-chave: a proteína ribossomal S6 de 70 kDa (p70S6k), a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (ANTHONY, 2001; ANTHONY, 2002).

A 4E-BP1 é inibidora do fator de iniciação da tradução proteica; sua fosforilação é necessária para a continuação da etapa de iniciação da tradução do RNA-mensageiro em proteína. A proteína mTOR também ativa a p70S6k, que estimula a iniciação da tradução, bem como a elongação da síntese proteica, por diferentes mecanismos. Consistentemente com esses fatos, a administração de leucina para ratos induz hiperfosforilação da 4E-BP1 e da p70S6k, estimulando a síntese proteica. (KIMBALL, 2006a; KIMBALL, 2006b; SHAH, 2000).

A regulação da hipertrofia celular, da fibrose, da apoptose e do metabolismo são complexos na insuficiência cardíaca mas evidências sugerem que esses processos podem ser modulados por macronutrientes vitais introduzidos na dieta, incluindo aminoácidos (LAYMAN, 2003; KIM, 2011). Os BCAA (*Branch Chain Amino Acids*) são atualmente utilizados no tratamento de diversas doenças humanas (AQUILANI, 2004; KAWAGUCHI, 2008; DE BANDT, 2006). No entanto, eventuais benefícios dos BCAA no tratamento de insuficiência cardíaca não são bem conhecidos. Há evidências de que a leucina tem um efeito anabólico direto sobre o *turnover* de proteínas em corações isquêmicos de seres humanos (YOUNG, 1991). Além disso, embora ocorra uma redução de todos os BCAA circulantes em humanos após um infarto do miocárdio, a maior diminuição percentual ocorre na circulação de leucina no primeiro dia pós-infarto retornando ao normal após três dias de evolução (SZPETNAR, 2004).

Estudos em roedores mostram que os BCAA reduzem as arritmias e a disfunção cardíaca na isquemia miocárdica experimental (URETZKY, 1989; SCHWALB, 1987), diminuem a captação miocárdica de lactato (DAVIS, 1993) e podem servir como um substrato energético alternativo proporcionando metabólitos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) (MARAZZI, 2008). Dos BCAA, a leucina é o único aminoácido que estimula a síntese de proteínas através da ativação da mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) (MEIJER, 2004). A mTOR é um componente central de muitas sinalizações intracelulares sobrepostas às vias que modulam o metabolismo celular (CARON, 2010) e a apoptose (ANANDHARAJ, 2011). A ativação da mTOR também é importante mediadora da hipertrofia cardíaca fisiológica (KEMI, 2008) prevenindo disfunção cardíaca em face à sobrecarga de pressão (SONG, 2010).

Escobar e colaboradores (2006) estudaram os efeitos dos BCAA no músculo cardíaco e esquelético e seus resultados sugerem que a infusão pós-prandial de leucina atue como um sinal nutricional nestes sítios em porcos recém-nascidos aumentando a disponibilidade do fator de iniciação eucariótica (eIF4B) que participa da síntese proteica.

Neste mesmo sentido, Canedo e colaboradores (2010) mostraram, em experimento *in vitro*, que após a perfusão com leucina (10 mM) no coração de ratos adultos, ocorre ativação da via p70S6K. Também foi verificado, *in vivo*, que a injeção de leucina em ratos provoca um aumento de até quatro vezes da atividade da via p70S6k e da mTOR cardíaca.

Estudos relacionados a condições de desuso muscular, em tratamentos com dexametasona e em processos tumorais que levam ao aumento da proteólise e diminuição da síntese proteica, demonstraram que a suplementação nutricional com leucina é eficaz na

reversão de tais situações (ELEY, 2007; HAN, 2007; KOBAYASHI, 2006; VENTRUCCI, 2001; SHAH, 2000).

Segundo Zanchi e colaboradores (2009), a suplementação com leucina deixou de ser considerada apenas uma estratégia de oferta de aminoácidos essenciais ramificados e apresenta-se como uma promissora terapia anti-catabólica capaz de inibir a proteólise muscular. Tal possibilidade se deve aos potentes efeitos que a suplementação de leucina provoca nos sistemas de síntese e de degradação proteica, conforme descrito.

Na Figura 5 são evidenciadas as principais vias de sinalização que estão envolvidas na síntese proteica mediadas por leucina, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e exercício de força.

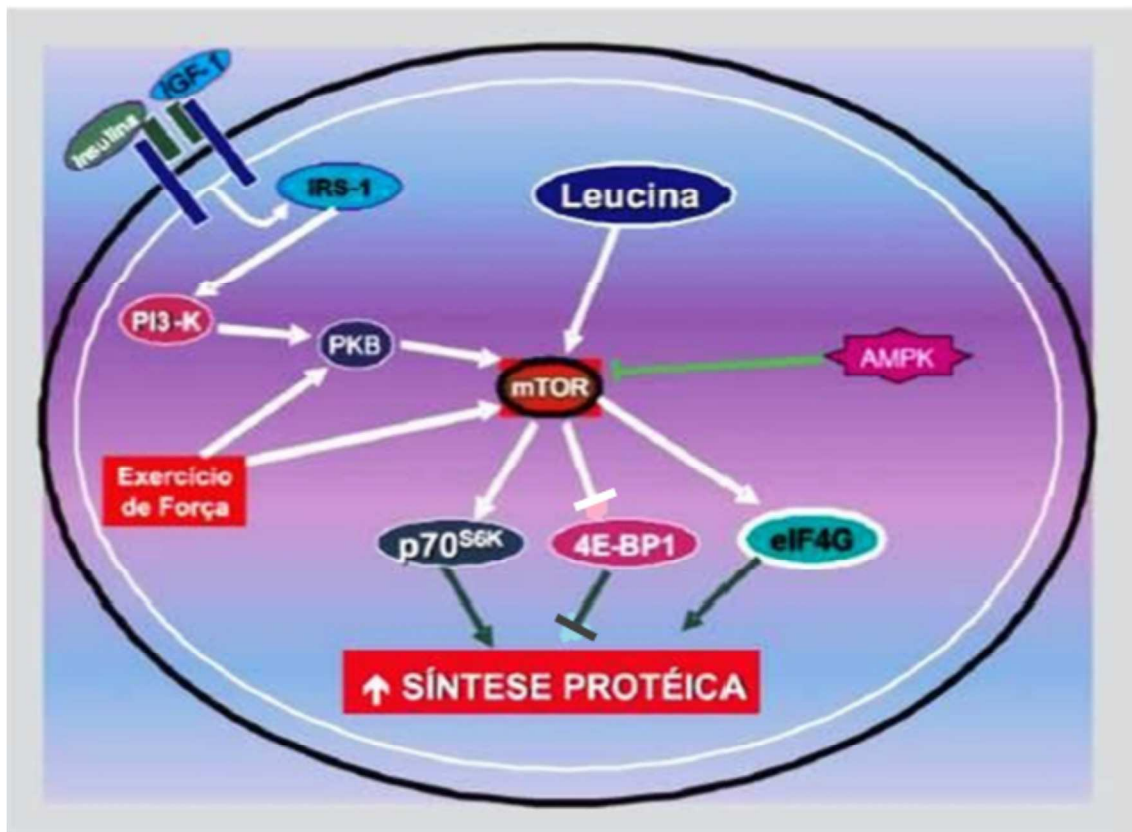


Figura 5: Sinalização envolvida na síntese proteica mediada por leucina, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e exercício de força. (mTOR= proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos; p70S6k = proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA; eIF4G= fator de iniciação eucariótico 4G; 4E-BP1= inibidor do fator de iniciação da tradução proteica denominada eIF4E; AMPK= proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMP); PKB= proteína quinase B; IRS-1 substrato do receptor de insulina 1; PI3-K= fosfatidil-inositol-3-quinase). (→ indica ativação; ⊥ indica inibição). Fonte: (Adaptado de ROGERO, 2008).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de leucina na cardiotoxicidade em ratos tratados com doxorrubicina.

3.1 Objetivos específicos

- Verificar a função do ventrículo esquerdo de ratos Wistar após tratamento com doxorrubicina e suplementação de leucina;
- Verificar a quantidade total de fibras de colágeno , colágeno tipo I e tipo III no coração de ratos Wistar tratados com doxorrubicina e suplementação de leucina;
- Verificar o diâmetro transversal dos cardiomiócitos de ratos Wistar tratados com doxorrubicina e suplementação de leucina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEBEA-UFU) e teve duração de 42 dias. As condições ambientais foram controladas durante o período experimental no que se refere à temperatura, pressão, nível de ruído e luminosidade.

Todas as intervenções seguiram as resoluções brasileiras específicas de bioética de pesquisa com animais: Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU), sob parecer nº115/14, em 15/12/2014.

4.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com peso corporal entre 250 e 300 gramas, provenientes do CEBEA-UFU, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, conforme Tabela 1, alojados em caixas coletivas de monitoração com até cinco animais por caixa e colocados em rack ventilado AI20 (ALESCO®) de alta biocontenção, com temperatura, ventilação e pressão controladas, conforme Figuras 6 e 7.

As caixas de monitoração e garrafas de água eram trocadas por material esterilizado duas vezes por semana, conforme protocolo do CEBEA. A ração era trocada na mesma frequência para todos os grupos e as sobras eram descartadas. Todas as trocas foram feitas em um gabinete de biossegurança com fluxo de ar BS60 BioSafety Cabinet (Tecniplast®), conforme Figuras 8 e 9.

Tabela 1: Disposição dos animais nos grupos experimentais

Grupo	Controle (C)	Doxorrubicina (D)	Leucina (L)	Leucina + Doxorrubicina (LD)
Nº	8	10	8	10
Suplementação	-	-	Leucina	Leucina
Tratamento	-	Doxorrubicina	-	Doxorrubicina

Descrição dos grupos: Controle (C), composto por oito ratos, com acesso livre a ração de acordo com *American Institute of Nutrition* (AIN-93G); Doxorrubicina (D), composto por dez ratos, em tratamento com doxorrubicina e com acesso livre à ração (AIN-93G); Leucina (L), composto por oito ratos, com acesso livre a ração (AIN-93G) suplementada com 5% de leucina; Grupo Leucina + Doxorrubicina (LD), composto por dez ratos em tratamento com doxorrubicina e com acesso livre a ração (AIN-93G) suplementada com 5% de leucina. Todos os animais tiveram acesso livre à água.

Figura 6: Rack ventilado e caixas de monitoração



Figura 7: Caixa de monitoração



Figura 8: Caixa de monitoração dentro do gabinete de biossegurança.



Figura 9: Gabinete de biossegurança para troca das caixas e procedimentos



4.2 Composição e Elaboração das Dietas

Para a elaboração da dieta seguiu-se o recomendado pelo *American Institute of Nutrition* (REEVES, 1993), que estabelece, como base, a formulação AIN-93G, adequada ao crescimento, gestação e lactação de roedores. A lista de ingredientes da AIN-93G está especificada na Tabela 2 e foi adquirida da empresa RHOSTER®, indústria e comércio de ração para animais de laboratório, conforme Figura 10. A caseína utilizada na elaboração da dieta apresentou concentração de proteína adequada (85,07%), conforme laudo do fornecedor.

Tabela 2: Dieta AIN-93G formulada para fases de crescimento, gestação e lactação de roedores.

Ingredientes	g/100g de dieta
Caseína	20,0
Amido de milho dextrinizado	13,2
Sacarose	10,0
Óleo vegetal (soja)	7,0
Celulose	5,0
Mistura salínica	3,5
Mistura vitamínica	1,0
L-cistina	0,3
Bitartarato de colina	0,25
Terbutilhidroquinona (BHT)	0,0014
Amido (q.s.p. 100)	39,75

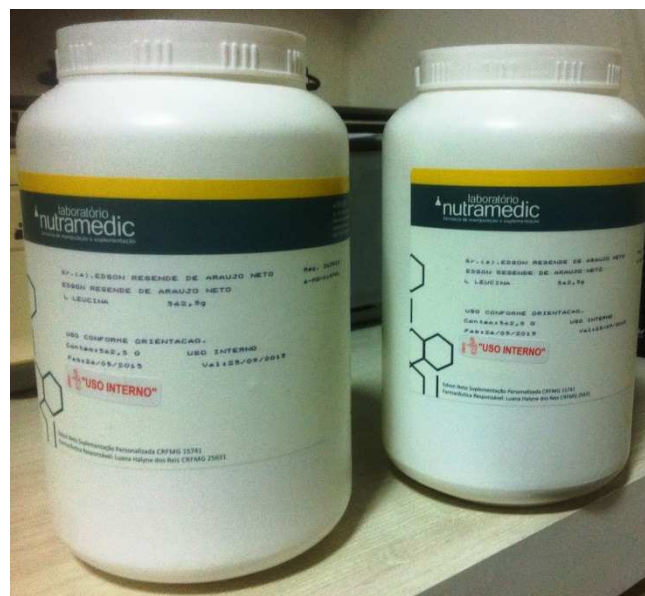
Fonte: Modificado de Reeves e colaboradores (1993).

Figura 10: Material para confecção das rações adquiridos da empresa RHOSTER®.



Como descrito por Reeves e colaboradores (1993), a dieta padrão (DP) apresenta em sua composição a concentração mínima de Leucina de 1,54g/100g (1,5%). Para o grupo tratado com dieta rica em Leucina (DRL) foi fornecida dieta padrão acrescida de 5,0g/100g (5%) de Leucina do total de nutrientes da dieta, como já demonstrado em experimento realizado por Witham e colaboradores (2013). A leucina foi adquirida do Laboratório NUTRAMEDIC®, conforme Figura 11.

Figura 11: Leucina para confecção das rações adquirida do laboratório NUTRAMEDIC®.



As dietas foram semelhantes no que diz respeito ao fornecimento de calorias, sendo 395,0kcal/100g de dieta. Já o conteúdo de macronutrientes apresentou pequena variação no

percentual de distribuição devido ao acréscimo de Leucina na DRL, os quais corresponderam na DP (~ 20%), (~ 64%) e (~ 16%) e na DRL (~ 25%), (~ 59%) e (~ 16%) de proteína, carboidrato e lipídio, respectivamente, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição percentual de macro nutrientes nas dietas padrão (DP) e dieta rica em Leucina (DRL)

Macronutrientes	DP			DRL		
	g	Kcal	%	G	Kcal	%
Proteína	20,00	80,00	20	25,00	100,00	25
Carboidrato	62,95	251,79	64	57,95	231,79	59
Lipídio	7,00	63,00	16	7,00	63,00	16

As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Medicina Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia utilizando utensílios exclusivos e com cuidados no controle de riscos de contaminação química e biológica. Os ingredientes foram misturados dos menores para os maiores volumes sendo colocado, por último, o óleo, conforme Figura 12.

Figura 12: Mistura dos ingredientes para confecção da ração.



Todos os ingredientes foram passados por peneira até completa homogeneização. Depois de misturados, foi acrescentada água filtrada até o ponto de massa homogênea e firme. Foi utilizado um funil plástico para moldar a massa em forma de *pellets*, que foram dessecados em estufa de ar circulante a 60°C, por 12h e, após resfriada, acondicionada em sacos plásticos escuros em câmara fria, conforme Figuras 13 a 15.

Figura 13: Pellets levados à estufa de ar circulante por 12 horas.



Figura 14: Pesagem da ração após resfriamento e acondicionamento em sacos plásticos.



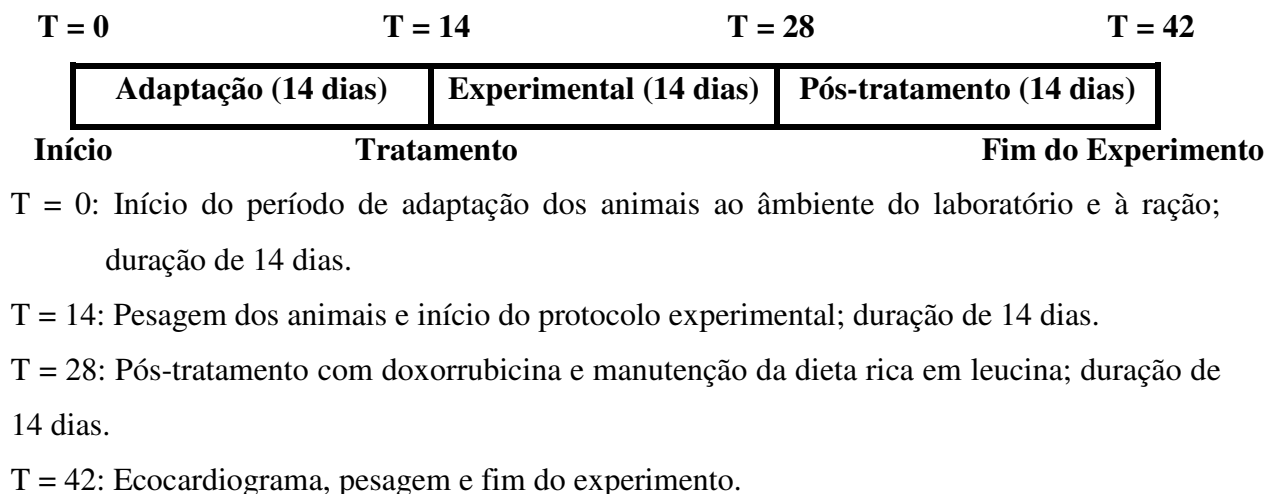
Figura 15: Armazenagem da ração em câmara fria após pesagem.



As dietas foram distribuídas entre os quatro grupos experimentais, sendo que os Grupos Controle e Doxorubicina receberam DP, enquanto os Grupos Leucina e Leucina + Doxorubicina receberam DRL.

As dietas e água foram oferecidas *ad libitum*, sendo que os animais dos quatro grupos experimentais receberam suas respectivas dietas durante 14 dias de adaptação antes de iniciado o tratamento com doxorubicina e durante os próximos 28 dias após o início do tratamento, totalizando 42 dias de experimento.

4.3 Desenho Esquemático do Protocolo Experimental:



Durante o período experimental, as caixas foram trocadas duas vezes por semana por caixas esterilizadas, assim como as garrafas de água e a ração. O consumo de ração e o peso corporal dos animais foram verificados semanalmente, em balança de precisão Marte® AS 500. Não tivemos morte de nenhum animal durante o experimento, os resíduos sólidos da criação foram colocados em um saco branco, congelados e posteriormente incinerados.

4.4 Tratamento com Doxorrubicina:

Todos os animais dos grupos Doxorrubicina e Leucina + Doxorrubicina, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina (Fauldoso, Libbs Farmacêutica®), três vezes por semana, ao longo de duas semanas, totalizando seis injeções de 2,25 mg/kg atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg, reproduzindo-se um modelo crônico de cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina em ratos e proposto anteriormente nos estudos de Campos e colaboradores (2011). O grupo Controle e o grupo Leucina receberam solução salina (soro fisiológico a 0,9%) via intraperitoneal no mesmo volume empregado como veículo nos animais tratados com doxorrubicina. Todas as injeções foram preparadas em condições estéreis imediatamente antes das aplicações.

4.5 Estudo Ecocardiográfico:

Para a realização do exame, os animais foram anestesiados com uma dose de 0,1 ml/100g de Cetamina a 10%, associada à mesma dose de Xilazina a 2%. A ecocardiografia foi realizada no 28º dia após o início do tratamento com doxorrubicina no laboratório clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

Foi realizado tricotomia da face anterior do tórax com os animais colocados em decúbito lateral de 45°. Utilizamos o equipamento disponível (ESAOTE *MyLab 30 VET gold*) capaz de produzir imagens nos modos uni e bidimensional. Utilizou-se um transdutor de 8,0 MHz, profundidade de 3,0cm, e ângulo setorial de 75°. No modo M, ao corte transversal paraesternal direito, no plano das cordas tendíneas, foi mensurado o diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole (DDVE) e sístole (DSVE) para posterior cálculo da fração de encurtamento (% ΔD) pela fórmula $\% \Delta D = [(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$. No mesmo corte foram calculados os volumes diastólico (VDVE) e sistólico (VSVE), pelo método de Teicholz (1976), para posterior cálculo da fração de ejeção (%FEVE) pela fórmula $\% FEVE = [(VDVE - VSVE) / VDVE] \times 100$, conforme Figuras 16 e 17.

4.6 Finalização do Experimento e Determinação do Peso do Coração:

Ao final da do experimento, os animais foram anestesiados com uma dose de 0,1 ml/100g de Cetamina a 10%, associado à mesma dose de Xilazina a 2%, 0,1 ml/100g, sendo o animal eutanasiado por exsanguinação. Foi realizada a retirada dos corações, sendo os órgãos cuidadosamente lavados em solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%), pesados em balança de precisão Marte® AS 500 e posteriormente armazenados em formol a 10%. O peso relativo do coração foi obtido dividindo-se o peso absoluto do coração do animal em miligramas pelo comprimento da tíbia do animal em centímetros.

4.7 Análise Histológica do Coração

Para a preparação das peças para o estudo histopatológico, foram feitos três cortes coronais, dividindo-se as peças em quatro pedaços (base, médio proximal, médio distal e ápice) que foram fixados em solução de formalina a 10%, por 48 horas. O processamento do material seguiu as etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo (secções de 5 μ). As lâminas foram coradas com tricrômico de Gomori para avaliação dos cardiomiócitos e com picrosirius red para avaliação da deposição de colágeno.

Para a coloração com o tricrômio de Gomori, foram obtidos cinco cortes da porção médio proximal de cada ventrículo e medidos, em cada corte, os menores diâmetros de cinco células cortadas perpendicularmente e identificadas em cinco campos microscópicos diferentes. As medidas foram feitas em condições que não permitiam a identificação prévia a qual grupo o corte pertencia. A medida dos diâmetros das células foi realizada em imagens digitalizadas capturadas a partir de microscópio binocular Olympus BX40, com objetiva de 40x, acoplado à câmera Olympus OLY-200 ligada a um computador através de placa digitalizadora Data Translation 3153. As mensurações foram realizadas utilizando-se o software HL Image (Western Vision),

Os cortes corados em picrosirius red foram analisados ao microscópio óptico e registrados fotograficamente (objetiva de 40X, ocular de 10X). Em cada corte foi obtido o registro fotográfico de pelo menos 10 campos, até ser percorrida toda a área do tecido, para quantificar o colágeno total, excluindo as regiões perivasculares. Para quantificar o colágeno I e colágeno III, os cortes foram analisados ao microscópio óptico sob luz polarizada e registrados fotograficamente (objetiva de 20X, ocular de 10X) microscópio Nikon TS 100 (Figura 18), conforme proposto por Junqueira e colaboradores (1979).

Toda a preparação e leitura do material histológico foi realizada no Laboratório de Histologia (UFU).

Figura 18: Microscópio óptico *Nikon ECLIPSE Ti®* utilizado na captação das imagens.



4.8 Análise Estatística.

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A normalidade foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk. Para os dados normais, as comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, se necessário, ou pelo Teste t de Student. A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism (versão 5.0). A significância estatística foi estabelecida para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Observações Gerais

Não ocorreu óbito de animais durante o experimento. Os animais em tratamento com doxorrubicina apresentaram menor movimentação associada à exsudação periocular e nasal e lesões nas patas. Estes achados estão ilustrados na Figura 19.

Figura 19: Lesões nasais, perioculares e nas patas dos ratos tratados com doxorrubicina após a segunda semana de tratamento.



5.2 Peso Corporal Total dos Ratos e Consumo de Ração

Na Tabela 4 estão registrados as médias e desvios padrão relativos ao peso corporal total dos animais no início do tratamento com doxorrubicina e ao final do experimento. No Gráfico 1 observamos o peso corporal total dos animais

Tabela 4: Peso corporal total dos animais e consumo diário de ração por grupo experimental

Grupos	Peso Corporal Total		
	N	PI (g)	PF (g)
Controle (C)	8	332,6±46	434,9±37
Leucina (L)	8	360,7±30	432,4±49
Doxorrubicina (D)	10	340,8±42	363,7±38*†
Leucina + Doxorrubicina (LD)	10	329,8±22	356,1±35*†

PI: Peso corporal no início do tratamento com doxorrubicina; PF: Peso corporal ao final do experimento; CR: Consumo diário de ração por animal ao longo dos 42 dias de tratamento.

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão para, peso corporal total dos animais. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Controle e $\dagger p < 0,05$ em relação ao Grupo Leucina.

O peso inicial dos animais foi similar nos quatro grupos.

Houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal total dos animais ao final do experimento quando se comparou os grupos doxorrubicina e leucina + doxorrubicina, aos grupos controle e leucina, com os menores pesos encontrados em doxorrubicina ($16\% < C$; $16\% < L$) e leucina + doxorrubicina ($18\% < C$; $17\% < L$).

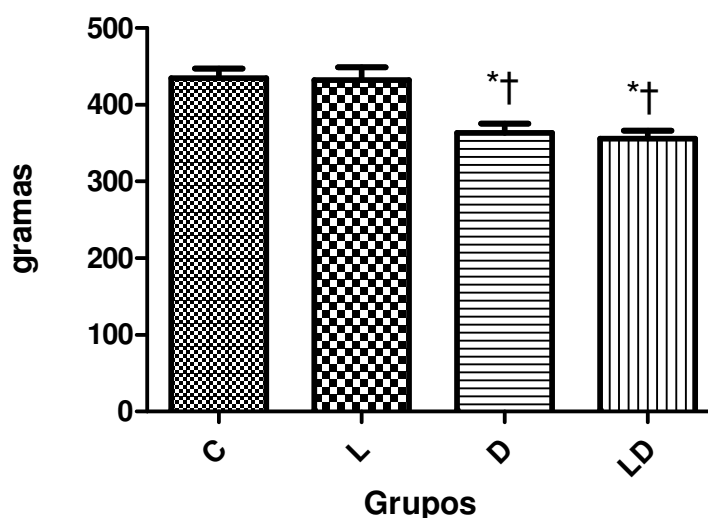
Podemos observar na tabela 5 a média do consumo diário de ração em cada um dos grupos experimentais ao longo das 6 semanas do experimento.

Tabela 5: Média do consumo diário de ração por grupo

Grupos		Média do consumo Diário de Ração					
Semana	N	1	2	3	4	5	6
Controle (C)	8	23,6	28,3	33,1	38,1	40,5	43,2
Leucina (L)	8	26,2	31,5	36,4	39,7	41,3	42,0
Doxorrubicina (D)	10	28,6	31,3	34,1	35,1	35,0	35,3
Leucina + Doxorrubicina (LD)	10	27,5	29,7	32,6	33,8	34,5	34,0

Consumo diário de ração por animal ao longo dos 42 dias de tratamento. Valores expressos em média

Gráfico 1 – Peso corporal total dos animais no final do experimento (PF).



Peso corporal ao final do experimento C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorrubicina; LD: grupo leucina + doxorrubicina. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Controle; † $p < 0,05$ em relação ao Grupo Leucina.

5.3 Frequência Cardíaca, Fração de Encurtamento e Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo.

A Tabela 6 e os Gráficos 2, 3 e 4, apresentam os valores das médias e desvio padrão referentes às variáveis: Frequência cardíaca, Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e Fração de ejeção do ventrículo esquerdo no final do experimento.

Tabela 6: Frequência cardíaca, Fração de encurtamento e Fração de ejeção do ventrículo esquerdo no final do experimento.

Grupos	N	FC (bpm)	% ΔD (%)	%FEVE (%)
Controle (C)	8	345,2 $\pm$ 50	42,5 $\pm$ 8	78,0 $\pm$ 7
Leucina (L)	8	311,7 $\pm$ 57	43,5 $\pm$ 9	78,8 $\pm$ 9
Doxorrubicina (D)	10	312,4 $\pm$ 24	30,7 $\pm$ 2†	64,5 $\pm$ 2*†
Leucina + Doxorrubicina (LD)	10	315,4 $\pm$ 28	40,2 $\pm$ 15	72,8 $\pm$ 17

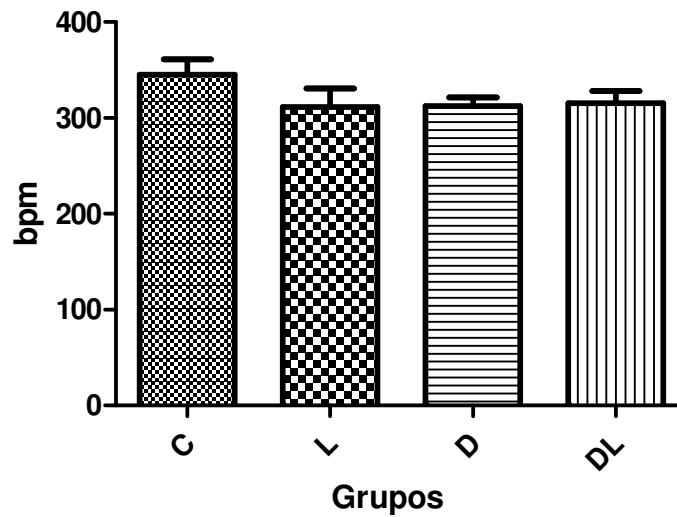
FC: frequência cardíaca; % ΔD : fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; %FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Controle; † $p < 0,05$ em relação ao Grupo Leucina.

Não houve diferença estatisticamente significativa para a frequência cardíaca entre os grupos.

Houve diferença estatisticamente significativa para a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo quando se comparou o grupo doxorrubicina ao grupo leucina, com menor % ΔD apresentado pelo grupo doxorrubicina (13% < L).

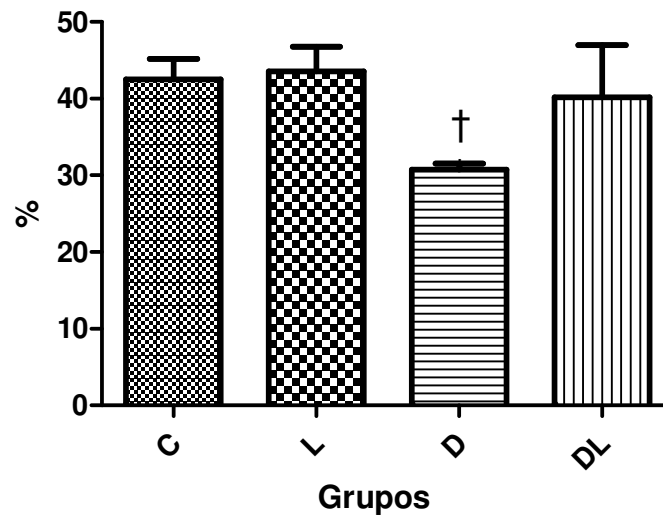
Quanto à Fração de Ejeção, houve diferença significativa ao compararmos o grupo doxorrubicina com os grupos leucina e controle, com menores valores de FEVE registrada no grupo doxorrubicina (13,5% < C; 14,3% < L).

Gráfico 2 – Frequência cardíaca – (batimentos por minuto - bpm).



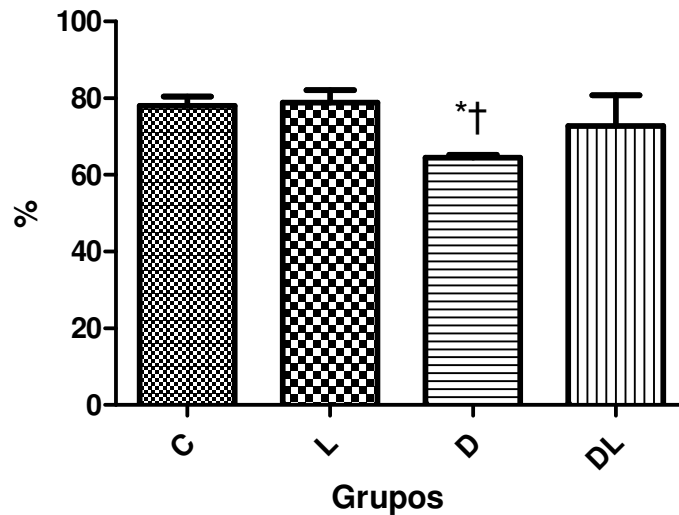
Frequência cardíaca dos animais ao final do experimento. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. Não houve diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 3 – Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo ao final do experimento.



C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. † $p < 0,05$ em relação ao grupo leucina.

Gráfico 4 – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo ao final do experimento.



Fração de ejeção do ventrículo esquerdo. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; † $p < 0,05$ em relação ao grupo leucina.

5.4 Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Sístole e Diástole

A Tabela 7 e os Gráficos 5 e 6 apresentam os valores das médias e desvio padrão referentes ao diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole e a diástole.

Tabela 7: Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e na diástole ao final do experimento.

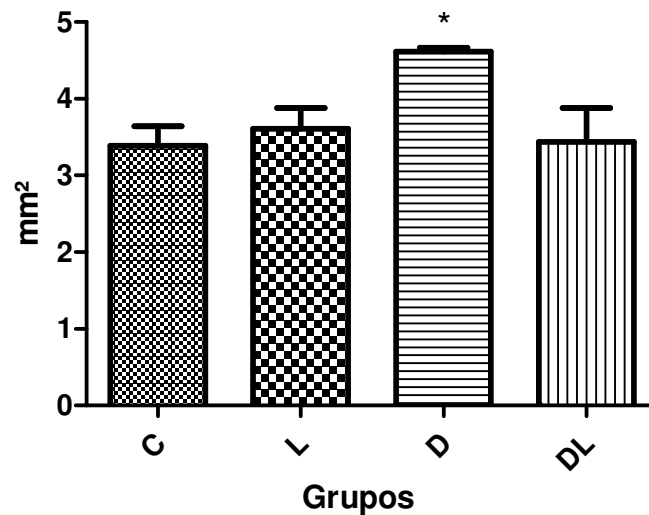
Grupos	N	DSVE (mm ²)	DDVE (mm ²)
Controle (C)	8	3,39±0,7	5,76±0,7
Leucina (L)	8	3,61±0,8	6,32±0,6
Doxorrubicina (D)	10	4,61±0,1*	6,72±0,3*
Leucina + Doxorrubicina (LD)	10	3,44±0,9	5,82±1,0

DSVE: diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole. DDVE: diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole. Valores expressos em média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao Grupo Controle.

Houve diferença estatisticamente significante no diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e na diástole, quando se comparou o grupo doxorubicina ao grupo controle com os

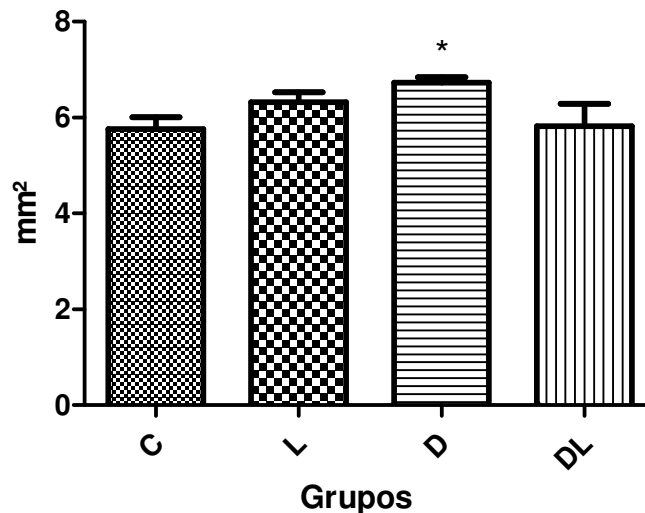
maiores valores dos diâmetros apresentados pelo grupo doxorrubicina (36% > C na sístole e 17% > C na diástole).

Gráfico 5 – Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo ao final do experimento.



C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorrubicina; LD: grupo leucina + doxorrubicina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Gráfico 6 – Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo ao final do experimento.



C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorrubicina; LD: grupo leucina + doxorrubicina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.5 Fibras de Colágeno no Coração

A Tabela 8, Figuras 20 e 21 e os Gráficos 7, 8, 9 e 10 apresentam os valores das médias e desvio padrão referentes à quantidade de fibras de colágeno no coração dos animais.

Tabela 8: Quantidade de fibras de colágeno total e do colágeno tipo I e III.

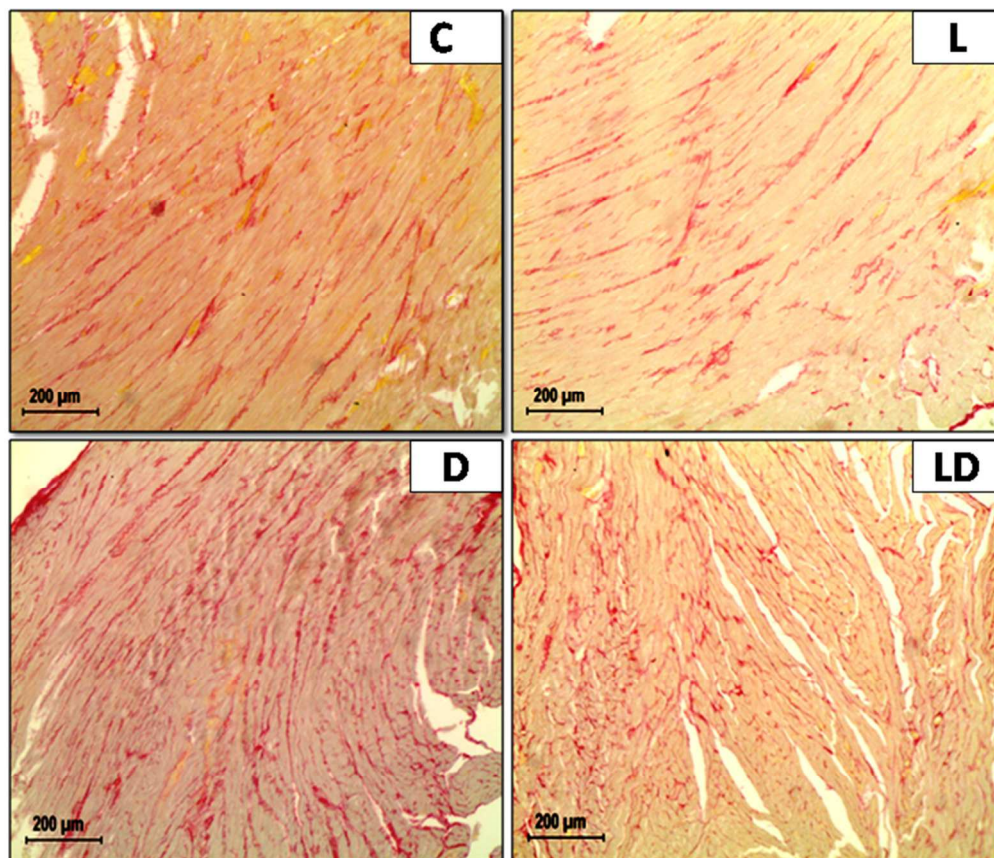
Grupos	Fibras de colágeno em % da área marcada				
	N	Picrosirius red (Total)	Polarização I	Polarização III	Polarização (Total)
Controle (C)	8	2,85±1,3	1,81±0,5	4,15±1,0	5,93±1,47
Leucina (L)	8	2,34±1,3	1,56±0,6	3,12±1,4	4,68±2,02
Doxorrubicina (D)	10	4,55±2,6*†§	2,83±1,3†	6,05±2,8†	8,89±4,12†
Leucina + Doxorrubicina (LD)	10	2,97±1,5	1,87±0,7	4,06±1,4	5,94±2,17

Valores expressos em média ± desvio padrão para fibras de colágeno; *p<0,05 em relação ao Grupo Controle (ANOVA); †p<0,05 em relação ao Grupo Leucina (ANOVA) e §p<0,05 Grupo Doxorrubicina x Grupo Leucina + Doxorrubicina (Teste *t* de Student).

Houve diferença estatisticamente significativa no colágeno total (picrosirius red) quando se comparou o grupo doxorrubicina aos demais grupos com maior valor encontrado no grupo doxorrubicina (60% > C; 94% > L; 53% > LD), em todas as situações analisadas.

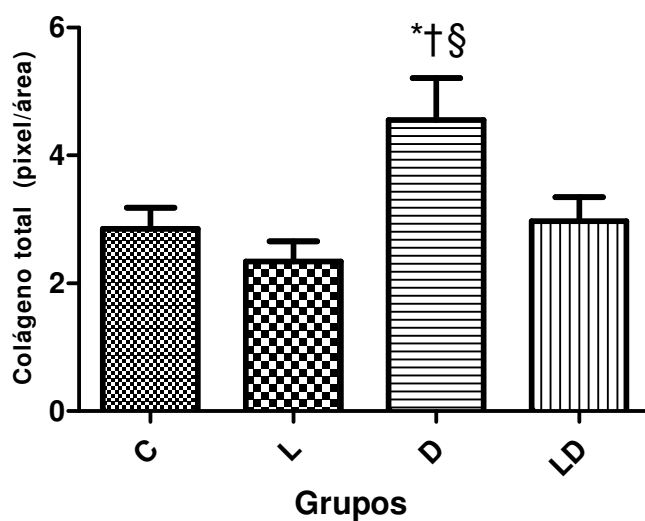
Para o colágeno tipo I e tipo III, foram encontradas diferenças significantes ao se comparar o grupo doxorrubicina ao grupo leucina, com a maior quantidade de colágeno no grupo doxorrubicina (81% > L Tipo I); (93% > L / Tipo III). Também foram encontradas diferenças significantes para o colágeno total (polarização), quando se comparou o grupo doxorrubicina ao grupo leucina (p<0,05), com os maiores valores apresentados pelo grupo doxorrubicina (89% > L).

Figura 20: Colágeno total (Picrosirius red)



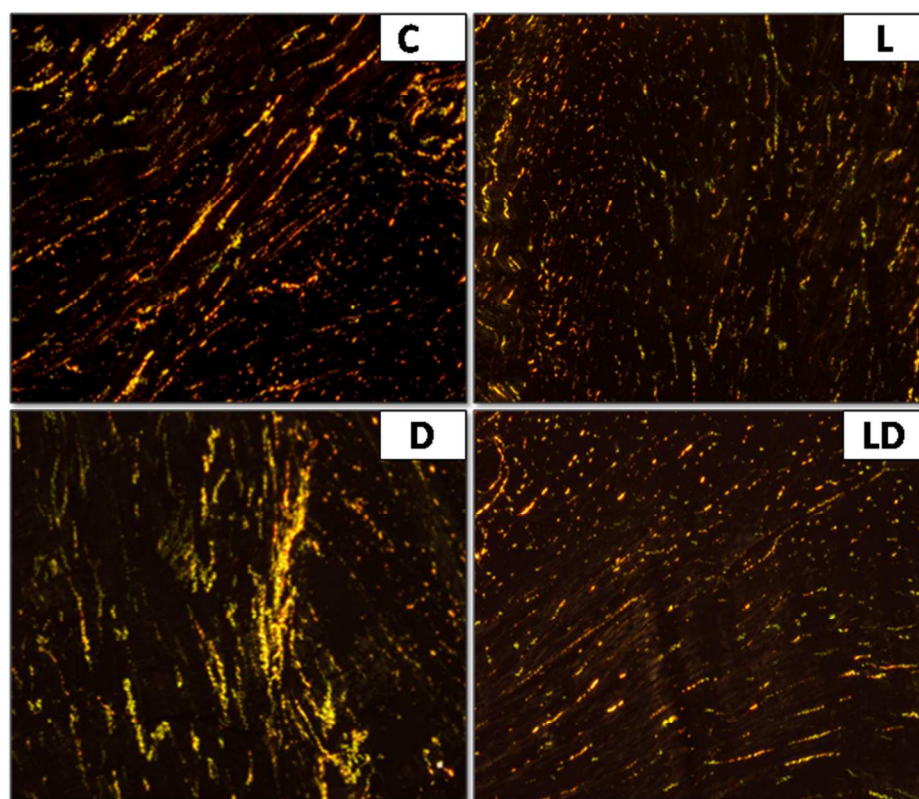
Imagens com objetiva de 10 x para melhor ilustrar as fibras de colágeno coradas com *Picrosirius red*. Observadas maiores concentrações no grupo submetido ao tratamento com doxorrubicina, sem suplementação de leucina (Grupo D).

Gráfico 7 – Total de fibras de colágeno no coração (Picrosirius red).



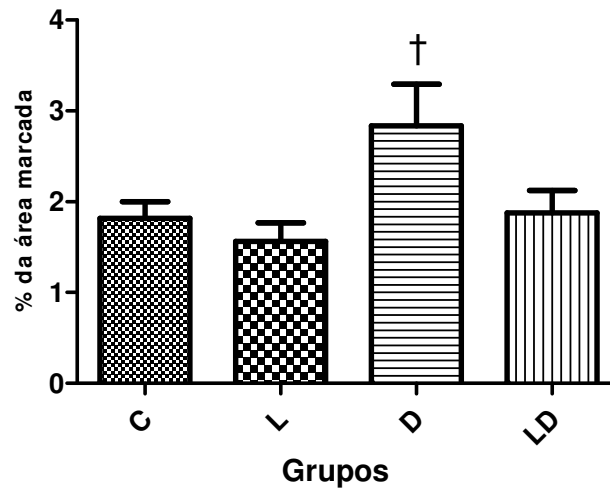
Fibras de colágeno. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorrubicina; LD: grupo leucina + doxorrubicina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, † $p < 0,05$ em relação ao grupo leucina e § $p < 0,05$ em relação ao grupo leucina + doxorrubicina.

Figura 21: Total de fibras de colágeno (polarização)



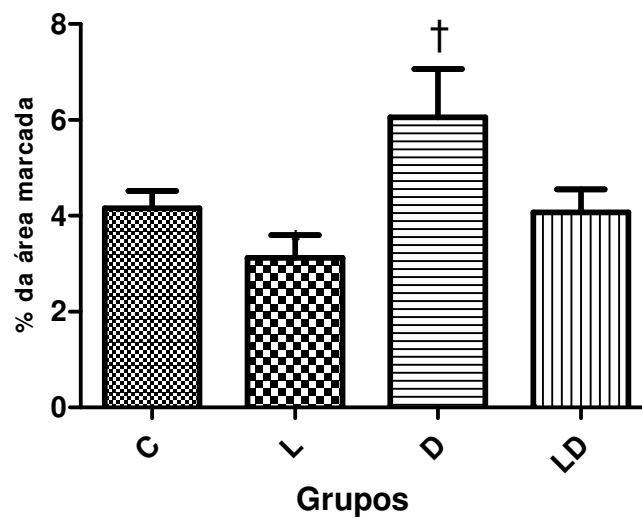
Imagens com objetiva de 10 x ilustrando as fibras de colágeno quantificadas pelo método de polarização. Observadas maiores concentrações no grupo submetido ao tratamento com doxorrubicina, sem suplementação de leucina (Grupo D).

Gráfico 8 – Fibras de colágeno tipo I no coração.

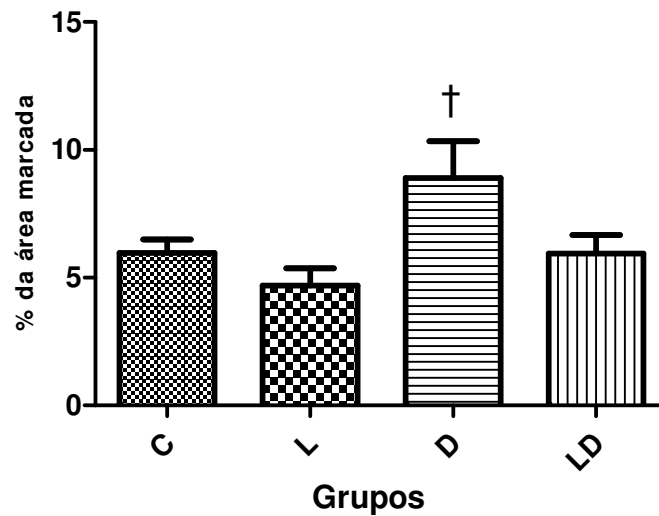


Fibras de colágeno tipo I. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. [†]p<0,05 em relação ao grupo leucina.

Gráfico 9 – Fibras de colágeno tipo III no coração.



Fibras de colágeno tipo III. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. [†]p<0,05 em relação ao grupo leucina.

Gráfico 10 – Total de fibras de colágeno no coração (polarização).

Total de fibras de colágeno. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. †p<0,05 em relação ao grupo leucina.

5.6 Peso do Coração.

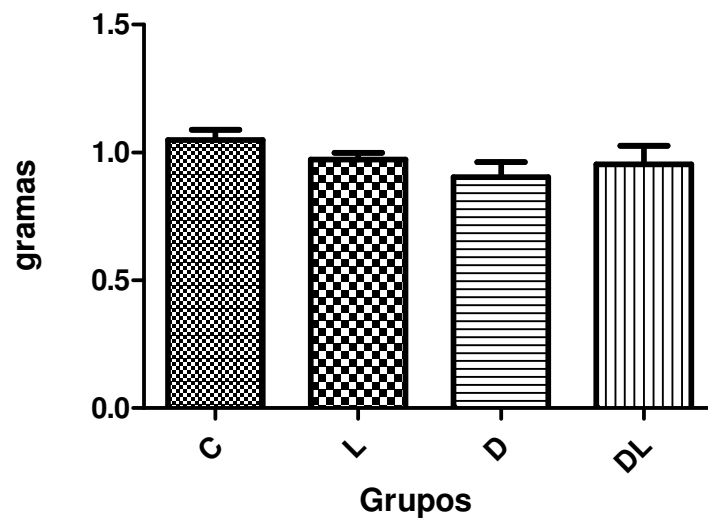
Na Tabela 9 e Gráficos 11 e 12 são observados os valores de média e desvio padrão do peso absoluto e peso relativo do coração (coração/comprimento da tíbia).

Tabela 9. Peso absoluto e relativo do coração.

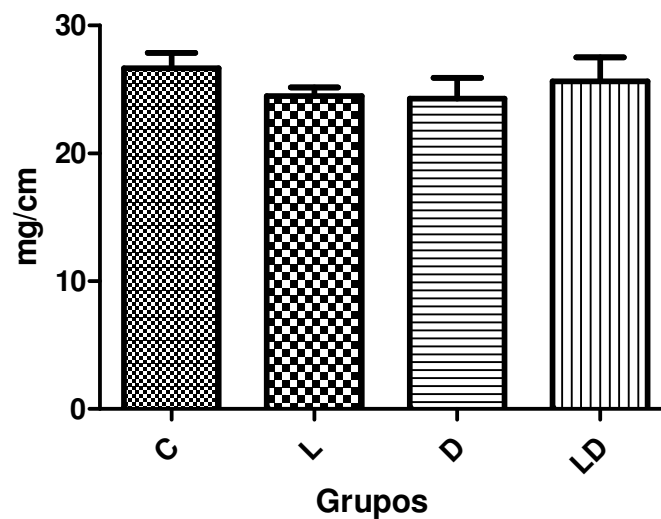
Grupos		Peso absoluto (g)	Peso relativo (mg/cm)
N			
Controle (C)	8	1,04±0,12	26,67±3,34
Leucina (L)	8	0,97±0,07	24,50±1,85
Doxorrubicina (D)	10	0,90±0,18	24,29±5,12
Leucina + Doxorubicina (LD)	10	0,95±0,21	25,63±5,65

Valores expressos em média ± desvio padrão para peso absoluto do coração e peso relativo do coração; *p<0,05 em relação ao Grupo Controle, †p<0,05 em relação ao Grupo Leucina.

Não houve diferença estatisticamente significativa para o peso absoluto e peso relativo do coração.

Gráfico 11 – Peso absoluto do coração

Peso absoluto do coração. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina.

Gráfico 12 – Peso relativo do coração – (peso do coração / comprimento da tibia)

Peso relativo do coração. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina.

5.7 Diâmetro Transversal dos Cardiomiócitos.

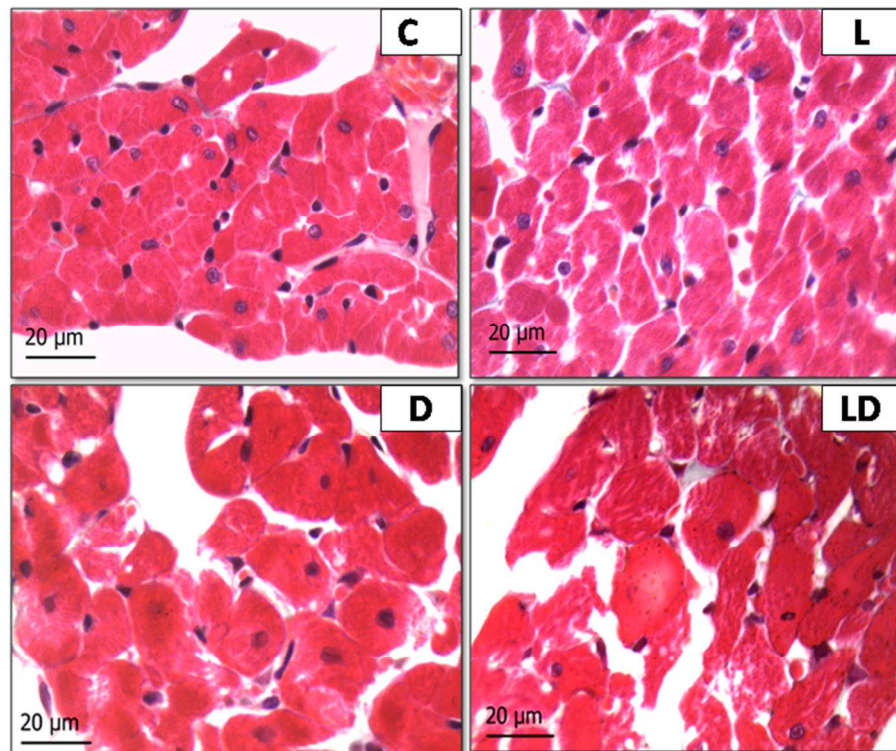
Na Tabela 10, Figura 22 e Gráfico 13 observam-se os valores de média e desvio padrão do diâmetro transversal dos cardiomiócitos dos animais.

Tabela 10. Diâmetro dos cardiomiócitos.

Grupos	Diâmetro transversal dos cardiomiócitos (μ)	
	N	
Controle (C)	8	75,95 $\pm$ 4,35
Leucina (L)	8	86,29 $\pm$ 8,44*
Doxorrubicina (D)	10	88,71 $\pm$ 9,36*
Leucina + Doxorrubicina (LD)	10	91,12 $\pm$ 8,89 *†

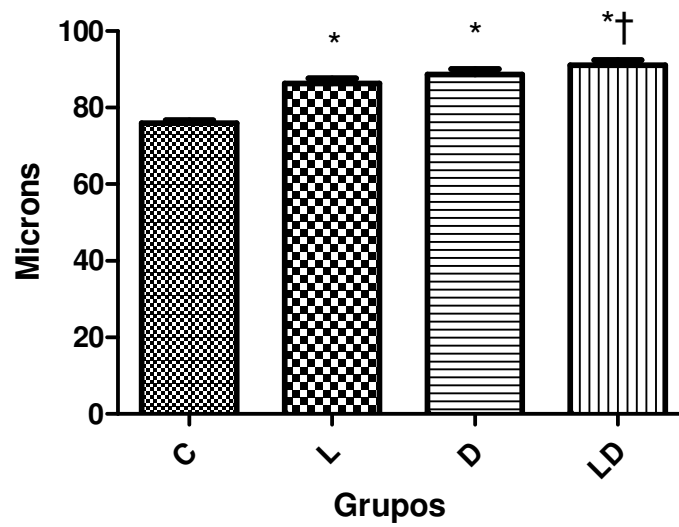
Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão para diâmetro transversal dos cardiomiócitos; *p<0,05 em relação ao Grupo Controle.

Houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro transversal dos cardiomiócitos quando se comparou os grupos leucina, doxorrubicina e leucina + doxorrubicina com o grupo controle com menores diâmetros encontrados no grupo C (14%< L; 17% < D; 20%<LD). Também houve diferença significativa quando se comparou o grupo LD ao grupo L com os maiores diâmetros encontrados no grupo LD (5,5% > L).

Figura 22: Diâmetro transversal dos cardiomiócitos.

Observados na imagem aumento dos diâmetro transversal dos cardiomiócitos nos grupos submetidos ao tratamento com doxorrubicina e suplementação de leucina. (Grupos C, L, D; LD)

Gráfico 13 – Diâmetro transversal dos cardiomiócitos.



Diâmetro transversal dos cardiomiócitos. C: grupo controle; L: grupo leucina; D: grupo doxorubicina; LD: grupo leucina + doxorubicina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e † $p < 0,05$ em relação ao grupo leucina.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Peso Corporal Total e dos Corações dos Ratos e Consumo de Ração

No presente estudo observou-se menor ganho de peso corporal nos animais dos grupos Doxorubicina (16% < C; 16% < L) e Leucina + Doxorubicina (18% < C; 17% < L), quando comparados aos do grupo Controle. Campos e colaboradores (2011) estudaram ratos tratados com três diferentes doses de doxorubicina e, em conformidade com nossos achados, observaram também redução no peso corporal dos ratos que receberam 3,75, 7,5 e 15 mg/kg de doxorubicina.

O menor ganho ponderal pode ter decorrido da doxorubicina uma vez que após uma semana de tratamento os animais apresentaram hipocinesia, lesões na face e nas patas, além de redução do consumo de ração.

A dieta padrão (DP) utilizada apresenta concentração mínima de leucina de 1,54g/100g (1,5%). Para o grupo tratado com dieta enriquecida com 5,0g/100g (5%) de leucina (DRL) totalizou-se 6,5g/100g (6,5%). Considerando a ingestão de dieta do rato Wistar que é em torno de 30g/dia, cada animal dos grupos com DP fez ingestão equivalente a 0,5 g/dia de leucina e os animais do grupo com DRL 2,0 g/dia. Mesmo com a ingestão aumentada de leucina, o grupo LD não teve o mesmo ganho ponderal dos grupos controle e leucina, o que parece indicar que a doxorubicina impede a ativação metabólica derivada da leucina provavelmente pelos mecanismos discutidos anteriormente. É importante assinalar que a leucina isoladamente também não aumentou o ganho ponderal em relação ao controle sendo este um aspecto interessante visando futuras aplicações deste aminoácido. Neste sentido, Ito e colaboradores (1990) também observaram o efeito de diferentes concentrações de doxorubicina (0,2 μ M. e 0,5 μ M) na síntese de proteínas em cultura de células cardíacas, após incorporação de leucina à cultura por 4 h. Após 24 horas de tratamento com doxorubicina, a síntese proteica estimulada pela leucina foi inibida em 41% e 68%, respectivamente.

A doxorubicina e a leucina, isoladamente ou em associação, não aumentaram o peso do coração indicando não ter havido resposta hipertrófica quando se considera o órgão como um todo.

6.2 Fração de Encurtamento e Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

No presente estudo foi encontrada menor fração de encurtamento e de ejeção do ventrículo esquerdo no grupo doxorubicina (13% < L; % Δ D) (13,5% < C; 14,3% < L; %FEVE). Esses achados da ecocardiografia transtorácica indicam uma diminuição

significante da função ventricular esquerda e demonstram que os efeitos cardiotoxícos da doxorubicina estavam presentes no modelo experimental.

Em acordo com nossos achados, Campos e colaboradores (2011) também encontraram uma redução significativa da fração de ejeção do ventrículo esquerdo no grupo de ratos tratados com dose cumulativa de 15 mg/kg de doxorubicina. Nestas condições, a fração de ejeção foi menor que o controle sete dias após a última administração do fármaco e os grupos tratados com 3,75 mg/kg e 7,5 mg/kg apresentaram redução significativa da fração de ejeção e da fração de encurtamento em relação ao controle, registradas 14 dias após a última injeção de doxorubicina. Estes achados demonstram que a cardiotoxicidade depende da dose cumulativa empregada e do tempo decorrido após o encerramento da administração do medicamento.

Ito e colaboradores (1990) observaram em um modelo de cultura celular de músculo cardíaco de ratos, que o tratamento com doxorubicina resulta numa diminuição rápida e seletiva da expressão de genes cardíacos específicos. A doxorubicina diminuiu seletivamente os níveis de mRNA para os genes sarcoméricos α -actina, troponina I e cadeia leve de miosina. Essas mudanças no músculo cardíaco precedem às mudanças ultraestruturais associadas à perda miofibrilar e às perdas funcionais refletidas na diminuição da fração de encurtamento e de ejeção, em concordância com os resultados do presente estudo.

Arai e colaboradores (1998) estudaram coelhos tratados com doxorubicina (2,5 mg / kg), uma vez por semana, durante oito semanas, e encontraram diminuição do débito cardíaco associada à redução dos níveis de mRNA para o retículo sarcoplasmático, canais rianodina, bomba de cálcio e fosfolambam. Estas descobertas sugerem que uma diminuição seletiva na expressão de mRNA para as proteínas responsáveis pelo controle do cálcio está associada ao prejuízo da função cardíaca encontrada na cardiomiopatia induzida pelo tratamento com doxorubicina. Todos estes achados parecem explicar e corroborar nossos resultados.

Um achado importante do presente estudo é a interação da leucina com a doxorubicina expressa na fração de encurtamento e fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Podemos observar que o grupo leucina + doxorubicina, não apresentou diferença significativa nos valores de fração de encurtamento e fração de ejeção cardíaca, em relação ao grupo controle, indicando um efeito protetor da função cardíaca.

Estudos (ESCOBAR, 2006; CANEDO, 2010) sugerem que a leucina atue como um sinal nutricional para estimular a síntese protéica no músculo cardíaco, aumentando a disponibilidade do fator de iniciação eucariótica (eIF4B) e ativando a via p70S6K e mTOR cardíaca, fato que pode ter atenuado a ação danosa observada no grupo doxorubicina.

Estes resultados sugerem uma ação da leucina como agente inibidor dos eventos catabólicos sobre as proteínas contráteis do coração induzidos pela doxorubicina. As implicações clínicas deste fato, aqui descrito pela primeira vez, são, no entanto, desconhecidas e a relação eventual com o mecanismo da leucina são, no máximo, de natureza especulativa.

6.3 Diâmetro do Ventrículo Esquerdo na Sístole e Diástole

Observou-se também no presente estudo maiores diâmetros transversais do ventrículo esquerdo durante a sístole e a diástole no grupo doxorubicina, quando comparado ao grupo controle (36% > C; sístole) (17% > C; diástole). Este resultado reproduz observações anteriores da função cardíaca na presença de doxorubicina que evidenciaram cardiomiopatia dilatada possivelmente causada pelos danos estruturais seletivos às proteínas sarcoméricas citadas por Ito e colaboradores (1990) e pelos distúrbios do metabolismo do cálcio, conforme Arai e colaboradores (1998).

De forma complementar, Campos e colaboradores (2011) observaram perda de distrofina no sarcolema do coração de ratos tratados com doses de 3,75, 7,5 e 15 mg/kg de doxorubicina. A distrofina, uma proteína localizada abaixo do sarcolema, liga a actina à matriz extracelular através das glicoproteínas da membrana celular e é a estrutura mais importante do citoesqueleto. A redução da distrofina pode representar a base para o desenvolvimento da cardiomiopatia dilatada (DANIALOU, 2001; LAPIDOS, 2004; TIDBALL, 2007; WALLACE, 2009).

Outro aspecto a ser considerado no modelo de cardiomiopatia dilatada é o comportamento do cálcio. As concentrações deste íon no citosol são baixas durante a diástole e aumentam cerca de dez vezes durante a sístole. No entanto, a sobrecarga de cálcio ativa proteases, tais como a calpaína, que degradam proteínas do citoesqueleto e da membrana plasmática, inclusive a distrofina (BELCASTRO, 1994; CHEN, 2003; LIM, 2004; WHITEHEAD, 2006; WILLIS, 2009). Estudos em cardiomiócitos cultivados e tratados com doxorubicina demonstraram liberação aumentada de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático através dos canais rianodina, fato que leva a danos estruturais e à diminuição da contratilidade cardíaca (EMANUELOV, 2010).

Polegato (2011), em concordância com nossos achados, investigou um grupo de 35 ratos Wistar submetidos à infusão intraperitoneal de dose única de 20 mg/kg de doxorubicina. Os animais foram estudados ao ecocardiograma 48 horas após injeção da medicação tendo sido observadas disfunções diastólica (aumento do tempo de relaxamento

isovolumétrico) e sistólica do ventrículo esquerdo (diminuição da fração de encurtamento, do débito cardíaco e da fração de ejeção).

De fato, a cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina, na sua forma clínica mais comum, cursa com cardiomiopatia dilatada. Estudo realizado por Dazzi e colaboradores (2001), em autópsias de pacientes com leucemia e que estavam em tratamento com doxorrubicina, evidenciaram a presença de dilatação ventricular em 50% deles confirmando, assim, este aspecto.

6.4 Fibras de Colágeno no Coração.

A complacência da parede ventricular depende da quantidade, da distribuição e da composição do colágeno que forma o estroma conjuntivo (MILANEZ 1995; FRIMM, 1998).

Em nossas observações, maiores quantidades de fibras de colágeno total (método do picrossírius) foram encontradas no coração dos animais do grupo doxorrubicina, quando comparado aos grupos controle e leucina ($60\% > C$; $94\% > L$, $53\% > LD$). Campos e colaboradores (2011) também observaram aumento das fibras de colágeno intersticial no coração de ratos tratados com doxorrubicina, na dose de 15 mg/kg, quando comparados aos seus controles. Porém, em grupos tratados com 3,75 e 7,5 mg/kg não foram observadas diferenças estatísticas. Estes dados reforçam a relação dose-dependente com os possíveis danos cardíacos.

Os tipos I e III de colágeno podem ser identificados e quantificados pela polarização da luz ao microscópio óptico, conforme descrito por Junqueira e colaboradores (1979). O colágeno tipo I, que constitui cerca de 80% do colágeno cardíaco, é o mais rígido de todos, sendo o principal responsável pela resistência da câmara cardíaca. O colágeno do tipo III forma agregados mais finos e constitui cerca de 12% do colágeno cardíaco. O colágeno do tipo III forma pontes entre os feixes de colágeno do tipo I que se alinham longitudinalmente ao longo dos cardiomiócitos (PELOUCH, 1994).

Em concordância com o presente estudo, Oliveira e colaboradores (2017) estudaram ratos tratados com diferentes doses cumulativas de doxorrubicina, administradas ao longo de oito semanas, totalizando 8 mg/kg, 12 mg/kg e 16 mg/kg. Estes autores também encontraram uma maior área de fibrose nestes animais.

Utilizando a metodologia de polarização, nossos achados indicam diferenças entre os grupos doxorrubicina e leucina quanto ao teor de colágeno tipo I, com maior quantidade encontrada no grupo doxorrubicina ($81\% > L$). Também foram encontradas maiores quantidades de colágeno tipo III no grupo doxorrubicina, quando comparado ao grupo leucina

(93% > L). Esta alteração evidencia lesões estruturais e mudanças funcionais causados pelo tratamento com a doxorrubicina também na matriz de colágeno que podem estar ligadas aos demais danos cardíacos já previamente descritos.

Outro achado importante do presente estudo é observado quando se compara o teor de colágeno do grupo leucina + doxorrubicina ao grupo controle, Esta comparação não mostrou diferença significativa entre estes grupos o que pode indicar um possível efeito cardioprotetor adicional da leucina.

Um outro efeito cardioprotetor relacionado à leucina foi relatado pelo nosso grupo (FIDALE, 2013) ao observarmos redução significativa da creatinofosfoquinase-fração cardíaca (CK-MB) plasmática, um biomarcador de dano ao tecido cardíaco, em ratos aos quais se havia administrado doses suprafisiológicas de hormônio tireoidiano. Este resultado, se confirmado, poderá também contribuir para um melhor entendimento no que diz respeito a aspectos protetores relacionados à associação da leucina à doxorrubicina.

6.5 Diâmetro Transversal dos Cardiomiócitos

O diâmetro transversal dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foi significativamente maior no grupo doxorrubicina, quando comparado ao controle (17% > C) evidenciando que 28 dias de exposição à doxorrubicina modificou o padrão do metabolismo das células musculares, provocando alterações celulares estruturais e caracterizando também um modelo de hipertrofia cardíaca.

Campos e colaboradores (2011) também observaram alterações microscópicas nos corações de ratos tratados com doxorrubicina caracterizadas por miócitos edemaciados e vacuolados, perda ou desorganização das miofibrilhas, edema intersticial e infiltração intersticial por células linfomononucleares e fibroblastos.

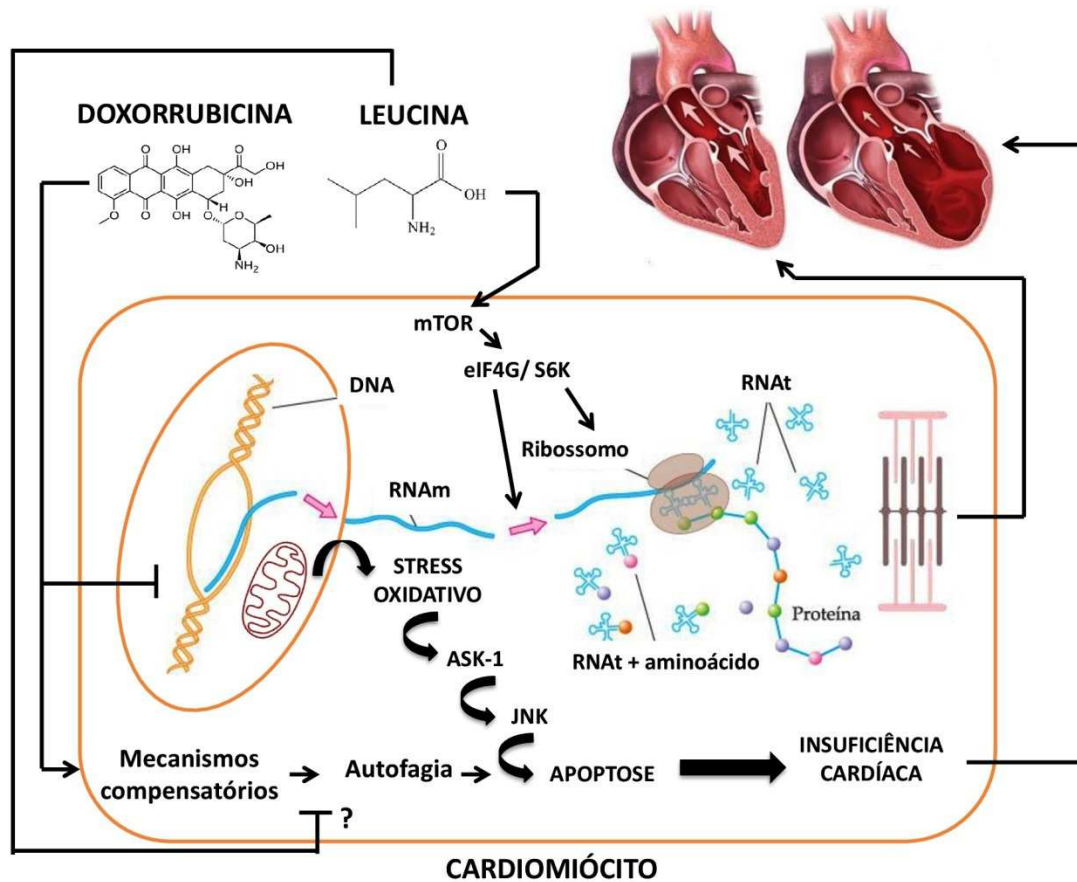
Observou-se também aumento no diâmetro transversal dos cardiomiócitos nos grupos leucina, doxorrubicina e leucina + doxorrubicina, quando comparados ao grupo controle (14%, 17 e 20%, respectivamente). Estudos sugerem que a leucina atue como um sinalizador nutricional para estimular a síntese protéica no músculo cardíaco aumentando a disponibilidade do fator de iniciação eucariótica (eIF4B) e ativando a via p70S6K e mTOR cardíaca (ESCOBAR, 2006; CANEDO, 2010). O resultado final desta ativação pode estar implicado na resposta hipertrófica dos cardiomiócitos nos grupos suplementados com leucina.

6.6 Relação doxorrubicina e leucina

Na Figura 23 é apresentada uma síntese do que se pode observar na análise das vias de sinalização e respostas celulares à doxorubicina e à leucina já descritas na literatura. Em resumo, a doxorubicina inibe a transcrição gênica de proteínas sarcoméricas cardíacas importantes e aumenta a degradação dos miofilamentos, produzindo um balanço sarcomérico negativo. Estes efeitos decorrem, em grande parte, da formação de uma grande quantidade de radicais livres de oxigênio aumentando o estresse oxidativo e provocando alterações na homeostase do cálcio, fato que desencadeia a via de morte celular mediada pela proteína quinase reguladora do sinal apoptótico (ASK-1) e proteína quinase jun N-terminal (JNK), culminando com a apoptose dos cardiomiócitos. (ADÃO, 2013; FUJIWARA, 2007; LEFRAK, 1973; ITO, 1990; BOTTONE, 1998; JEYASEELAN, 1997).

É possível que a leucina atenua a cardiotoxicidade da doxorubicina preservando os elementos contráteis sarcoméricos por meio de um aumento na eficiência traducional, aumentando a atividade da proteína mTOR, proteína ribossomal (S6) e fator de iniciação eucariótico (eIF4G), promovendo a manutenção da síntese proteica e a contratilidade cardíaca (KIMBALL, 2006a, 2006b; SHAH, 2000). Efeitos redutores do estresse oxidativo também podem estar presentes e precisam ser melhor estudados.

Figura 23: Mecanismos cardiotoxícos da doxorubicina e modulação da síntese proteica por meio da leucina.



Possível mecanismo de proteção cardíaca pela leucina, aumentando a eficiência traducional, modulando a síntese proteica e diminuindo a autofagia como mecanismo compensatório pela ação da doxorubicina. mTOR = alvo mecanicista da rapamicina; eIF4G = fator de iniciação eucariótico 4g; S6K = proteína quinase ribossomal S6; DNA = ácido desoxirribonucleico; RNA = ácido ribonucleico; RNAt = ácido ribonucleico transportador; RNAm = ácido ribonucleico mensageiro; ASK-1 = proteína quinase reguladora do sinal apoptótico; JNK = proteína quinase jun N-terminal.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Algumas limitações estão presentes no presente estudo. A primeira delas diz respeito à amostra. A doxorubicina é rotineiramente administrada a pacientes com câncer, enquanto em nosso estudo investigamos a cardiotoxicidade experimental em ratos hígidos. Este fato pode ter influenciado os resultados obtidos mesmo tendo nosso trabalho sido desenhado para identificar, especificamente, o efeito da leucina sobre a cardiotoxicidade e sobre a matriz de colágeno induzida e alterada pela doxorubicina.

Outro aspecto a ser destacado é que este estudo não buscou identificar as eventuais vias de ação da doxorubicina sobre as quais a leucina pode ter atuado e melhorado as condições cardíacas dos animais. Neste sentido, novos estudos devem ser conduzidos para se mapear as diversas vias de síntese proteica e de morte celular influenciadas pela leucina e determinar se houve modulação do estresse oxidativo classicamente responsabilizado pela maior parte das ações tóxicas da doxorubicina.

Implicações clínicas podem advir destes estudos que poderão identificar possíveis ações protetoras da leucina na estrutura e função cardíacas e eventualmente prevenir ou atenuar a cardiotoxicidade provocada pela doxorubicina.

8. CONCLUSÕES

Em ratos tratados com dose cumulativa de 7,5 mg/kg de doxorubicina por um período de duas semanas e estudados quatorze dias após o término do tratamento (28 dias de experimento) ocorre diminuição do peso corporal total, cardiotoxicidade caracterizada pela diminuição da fração de encurtamento e de ejeção do ventrículo esquerdo, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole e a diástole, aumento das fibras de colágeno no coração e do diâmetro transversal dos cardiomiócitos.

A leucina atenua os danos cardíacos induzidos pelo tratamento com a doxorubicina, sendo este efeito refletido na quantidade de colágeno que se torna similar à do grupo controle e na manutenção da função cardíaca evidenciada pela preservação da fração de encurtamento e de ejeção do ventrículo esquerdo.

Vários aspectos ligados a estas respostas ainda permanecem desconhecidos e novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesta resposta à leucina. Estes estudos poderão também indicar novas vias de intervenção com o objetivo de minimizar os efeitos cardiotóxicos relativamente comuns no tratamento com a doxorubicina.

REFERÊNCIAS

- ADÃO, R.; KEULENAER, G.; MOREIRA, A. L. et al. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. **Rev Port Cardiol.**, v. 32, n. 5, p. 395-409, abr. 2013.
- ALBINI, A.; PENNESI, G.; DONATELLI, F. et al. Cardiotoxicity of anticancer drugs: The need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. **J Natl Cancer Inst.**, v. 102, n. 1, p. 14-25, jan. 2010.
- ANANDHARAJ, A.; CINGHU, S.; PARK, W. Y. Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy. **Acta Biochim Biophys Sin.**, v. 43, n. 4, p. 292–300, abr. 2011.
- ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S. R. et al. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J. Nutr.**, v. 131, n. 3, p. 856S-860S, 2001.
- ANTHONY, J. C.; LANG, C. H.; CROZIER, S. J. et al. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, n. 5, p. E1092-E1101, 2002.
- AQUILANI R. Oral amino acid administration in patients with diabetes mellitus: supplementation or metabolic therapy? **Am J Cardiol.**, v. 93, n. 8, p. 21–22, abr. 2004.
- ARAI, M.; TOMARU, K.; TAKIZAWA, T. et al. Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 30, n. 2, p. 243-254, fev. 1998.
- BARBEY, J. T.; SOIGNET, S. Prolongation of the QT interval and ventricular tachycardia in patients treated with arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. **Ann Intern Med.**, v. 135 p. 842-843, 2001.
- BELCASTRO, A. N.; GILCHRIST, J. S.; SCRUBB, J. A. et al. Calcium-supported calpain degradation rates for cardiac myofibrils in diabetes. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 135, n. 1, p. 51–60, jun. 1994.
- BOTTONE, A. E.; VOEST, E. E.; de BEER, E. L. Impairment of the actin–myosin interaction in permeabilized cardiac trabeculae after chronic doxorubicin treatment. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, n. 4, p. 1031–1037, abr. 1998.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw, 2007. p. 1068-1070.

CAMPOS, E. C.; O'CONNELL, J. L.; MALVESTIO, L. M. et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Eur J Pharmacol.**, v. 670, n. 2-3, p. 541–553, nov. 2011.

CANEDO, C. S.; DEMEULDER, B.; GINION, A. et al. Activation of the cardiac mTOR/p70S6k pathway by leucine requires PDK1 and correlates with PRAS40 phosphorylation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 298, n. 4, p. 761-769, jan. 2010.

CARON, E.; GHOSH, S.; MATSUOKA, Y. et al. A comprehensive map of the mTOR signaling network. **Mol Syst Biol.**, v. 6, n. 453, dez. 2010.

CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S. et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2009.

CHEN, F.; CHANG, R.; TRIVED, M. et al. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 9, p. 6848–6853, fev. 2003.

CUTTS, S.; PARSONS, P.; STURM, R. et al. Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 5422-5429, 1996.

CUTTS, S.; SWIFT, L.; REPHAELI, A. et al. Recent advances in understanding and exploiting the activation of anthracyclines by formaldehyde. **Curr. Med. Chem. AntiCancer Agents**, v. 5, p. 431-447, 2005

DANIALOU, G.; COMTOIS, A. S.; DUDLEY, R. et al. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. **FASEB J.**, v. 15, n. 9, p. 1655–1657, jul. 2001.

DAVIS, T. A.; FIOROTTO, M. L.; NGUYEN, H. V. et al. Enhanced response of muscle protein synthesis and plasma insulin to food intake in suckled rats. **Am J Physiol.**, v. 265, n. 2, p. 334–340, ago. 1993.

DAZZI, H.; KAUFMANN, K.; FOLLATH, F. Anthracycline-induced acute cardiotoxicity in adults treated for leukaemia - Analysis of the clinico-pathological aspects of documented

acute anthracycline-induced cardiotoxicity inpatients treated for acute leukaemia at the University Hospital of Zurich, Switzerland, between 1990 and 1996. **Ann Oncol.**, v. 12, n. 7, p. 963-966. Jul. 2001.

DE BANDT, J. P.; CYNOBER L. Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma, and sepsis. **J Nutr.**, v. 136, n. 1, p. 308–313S, jan. 2006.

DODD, D. A.; ATKINSON, J. B.; OLSON, R. D. et al. Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. **J Clin Invest.**, v. 91, p. 1697-1705, 1993.

DOROSHOW, J. H. Effect of anthracyclines antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Res.**, v. 43, n. 2, p. 460–472, fev. 1983.

ELEY, H. L.; RUSSELL, S. T.; TISDALE, M. J. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. **Biochem J.**, v. 407, n. 1, p. 113-120, out. 2007.

EMANUELOV, A. K.; SHAINBERG, A.; CHEPURKO, Y. et al. Adenosine A3 receptor mediated cardioprotection against doxorubicin-induced mitochondrial damage. **Biochem. Pharmacol.**, v. 79, n. 2, p. 180–187, jan. 2010.

ESCOBAR, J.; FRANK, J. W.; SURYAWAN, A. ET AL. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 290, n. 4, p. 612–621, nov. 2006.

ESCHENHAGEN, T.; FORCE, T.; EWER, M. S. et al. Cardiovascular side effects of cancer therapies: A position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. **Eur J Heart Fail.**, v. 13, n. 1 p. 1-10, 2011.

EWER, M. S.; EWER, S. M. Cardiotoxicity of anticancer treatments what the cardiologist needs to know. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 7, p. 564-574, ago. 2010.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B. Anthracycline-induced cardiotoxicity. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.**, v. 6, n. 4, p. 278-281, out. 2008.

FIDALE, T. M.; GONÇALVES, A.; PARANHOS, L. T. et al. Efeito da leucina na hipertrofia cardíaca e na concentração sérica de creatina quinase em ratos wistar em hipertireoidismo experimental, **Bioscience J.**, v. 29, n. 2, p. 499-505, Abr. 2013.

FIDALE, T. M.; GONÇALVES, A.; HADDAD, E. G. et al. Action of leucine in heart hypertrophy induced by thyroid hormone in rats. **Bioscience J.**, v. 32, n. 4, ago. 2016.

FRIMM, C. C. Disfunção sistólica e diastólica na hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia ventricular esquerda. **Hiperativo.**, v. 5, n. 3, p. 189-94, set.1998.

GARLICK, P. J.; GRANT, I. Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. **Biochem. J.**, v. 254, n. 2, p. 579-584, 1998.

GIANNI, L.; HERMAN, E.H.; LIPSHULTZ, S. E. et al. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 22, p. 3777–3784, ago. 2008.

GIANTRIS, A.; ABDURRAHMAN, L.; HINKLE, A. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 27, n. 1, p. 53–68, jan. 1998.

HAN, B.; MA, C.; ZHU, M.J. et al. Leucine supplementation mitigates atrophy of non-weight-bearing skeletal muscle in rats. **The FASEB J.**, v. 21, n. 6, a.1205, abr. 2007.

HORTOBAGYI, G. N.; FRYE, D.; BUZDAR, A. U. et al. Decreased cardiac toxicity of doxorubicin administered by continuous intravenous infusion in combination chemotherapy for metastatic breast carcinoma. **Cancer.**, v. 63, n. 1, p. 37—45, jan. 1989.

ITO, H.; MILLER, S. C.; BILLINGHAM, M. E. et al. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 87, n. 11, p. 4275-4279, jun. 1990.

JEYASEELAN, R.; POIZAT, C.; WU, H. Y. et al. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 9, p. 5828---5832, fev. 1997.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTAN, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.**, v. 11, n. 4, p. 447-455, jul. 1979.

KAPUSTA, L.; THIJSEN, J. M.; GROOT-LOONEN, J., VAN DRUTEN, J. A., DANIELS, O. Discriminative ability of conventional echocardiography and tissue Doppler imaging techniques for the detection of subclinical cardiotoxic effects of treatment with

anthracyclines. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 1605-1614, 2001.

KARIM, S.; BHANDARI, U.; KUMAR, H.; SALAM, A.; SIDDIQUI, M. A. A.; PILLAI, K. K. Doxorubicin induced cardiotoxicity and its modulation by drugs. **Indian Journal of Pharmacology**, Pondicherry, v. 33, p. 203-207, 2001.

KAWAGUCHI, T.; NAGAO, Y.; MATSUOKA, H. et al. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. **Int J Mol Med.**, v. 22, n. 1, p. 105–112, jul. 2008.

KEMI, O. J.; CECI, M.; WISLOFF, U. et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. **J Cell Physiol.**, v. 214, n. 2, p. 316–321, fev. 2008.

KIM, J. Y.; BURGHARDT, R. C.; WU, G. et al. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophectoderm cell signaling, proliferation, and migration. **Biol Reprod.**, v. 84, n. 1, p. 62–69, jan. 2011.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, n. 2, p. 500S-507S, 2006a.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **J. Nutr.**, v. 136, p. 227S-231S, 2006b.

KOBAYASHI, H.; KATO, H.; HIRABAYASHI, Y. et al. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. **J Nutr.**, v. 136, n. 1, p. 234-236, jan. 2006.

KREMER, L. C.; VAN DELEN, E. C.; OFFRINGA, M. et al. Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: Long-term follow-up study. **J Clin Oncol.**, v. 19, n. 1, p. 191-196, jan. 2001.

LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circ. Res.**, v. 94 n. 8, p. 1023–1031, abr. 2004.

LAYMAN, D. K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **J Nutr.**, v. 133, n. 1, p. 261–267, jan. 2003.

LEFRAK, E. A.; PITHA, J.; ROSENHEIM, S. et al. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer.**, v. 32, n. 2, p. 302-314, ago. 1973.

LI, J. B.; JEFFERSON, L. S. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. **Biochim Biophys. Acta.**, v. 544, n. 2, p. 351-359, 1978.

LIM, C. C.; ZUPPINGER, C.; GUO, X. et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 9, p. 8290–8299, fev. 2004.

LIPSHULTZ, S. E.; LIPSITZ, S. R.; SALLAN, S. E. et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol.**, v. 23, n. 12, p. 2629---36, abr. 2005.

MEDRANO, F. L.; MUNOZ, A. S.; SÁNCHEZ, V. S. et al. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil: Ischemia or myocardial toxicity? **Rev Clin Esp.**, v. 201 n. 2, p. 106-107, 2001.

MARCHINI, J. S.; MORIGUTI, J. C.; PADOVAN, G. J. et al. Métodos atuais de investigação do metabolismo proteico: Aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. **Medicina.**, v. 31, n. 1, p. 22-30, 1998.

MARAZZI, G. ROSANIO, S.; CAMINITI, G. et al. The role of amino acids in the modulation of cardiac metabolism during ischemia and heart failure. **Curr Pharm Des.**, v. 14, n. 25, p. 2592–2604, set. 2008.

MEIJER, A. J.; DUBBELHUIS, P. F. Amino acid signalling and the integration of metabolism. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 313, n. 9, p. 397–403, jan. 2004.

MILANEZ, M. C. **Efeitos do uso de captopril sobre o conteúdo de colágeno cardíaco e em parâmetros ponderais e hemodinâmicos após infarto do miocárdio em ratos.** 1995. 128f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 1995.

MINAMI, M.; MATSUMOTO, S.; HORIUCHI, H. Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy. **Circ J.**, v. 74, p. 1779-1786, 2010.

OLIVEIRA, L. F. L.; O'CONNELL, J. L.; CARVALHO, E. E. V. et al. Comparação entre a Ventriculografia Radioisotópica e a Ecocardiografia na Quantificação da Função Sistólica

Ventricular Esquerda em Ratos Expostos à Doxorubicina. **Arq Bras Cardiol.**, v. 108, n. 1, p. 12-20, jan. 2017.

OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: Analysis of prevailing hypotheses. **FASEB J.**, v. 4, n. 3, p. 3076-3086, 1990.

PELOUCH, V.; DIXON, I. M. C.; GOLFMAN, L. et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function. **Mol Cell Biochem.**, v. 129 n. 2, p. 101-120, dez. 1994.

PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. Principles and practice of pediatric oncology. **Lippincott Williams & Wilkins.**, 1780p, 2005.

POLEGATO, B. F. **Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.**, 2011, 73f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

RASCHI, E.; VASINA, V.; URSINO, M. G. et al. Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. **Pharmacol Ther.**, v. 125, n. 2, p. 196-218, fev. 2010.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J. Nutr.**, v. 123, n. 11, p. 1939 – 1951, nov. 1993.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 44, n. 4, out/dez, 2008.

RYBERG, M.; NIELSEN, D.; SKOVSGARD, T. et al. Epirubicin cardiotoxicity: An analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. **J Clin Oncol.**, v. 16, n. 11, p. 3502-8, nov. 1998.

SAWYER, D. B.; PENG, X.; CHEN, B. et al. Mechanisms of Anthracycline Cardiac Injury: Can We Identify Strategies for Cardioprotection? **Prog Cardiovasc Dis.**, v. 53, n. 2, p. 105–113, out. 2010.

SCHWALB, H.; KUSNIR, T.; NAVON, G. et al. The protective effect of enriched branched chain amino acid formulation in the ischemic heart: a phosphorous-31 nuclear magnetic resonance study. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 19, n. 10, p. 991–998, out. 1987.

SHAH, O. J.; ANTHONY, J. C.; KIMBAL, S. R. et al. Glucocorticoids oppose translational control by leucine in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 279, n. 5, p. 1185-1190, fev. 2000.

SHIMOMURA, Y.; HARRIS, R. A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. **J. Nutr.**, v. 136, n. p. 232S-233S, 2006.

SONG, X.; KUSAKARI, Y.; XIAO, C. Y. et al. mTOR attenuates the inflammatory response in cardiomyocytes and prevents cardiac dysfunction in pathological hypertrophy. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 299, n. 6, p. 1256–1266, nov. 2010.

STEINBERG, J. S.; COHEN, A. J.; WASSERMAN, A. G. et al. Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. **Cancer.**, v. 60, n. 6 p. 1213–1218, set. 1987.

SZPETNAR, M.; PASTERNAK, K.; BOGUSZEWSKA, A. Branched chain amino acids (BCAAs) in heart diseases (ischemic heart disease and myocardial infarction). **Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.**, v. 59, n. 2, p. 91–95, fev. 2004.

TAKAHASHI, S.; DENVIR, M. A.; HARDER, L. et al. Effects of in vitro and in vivo exposure to doxorubicin (adriamycin) on caffeine-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum and contractile protein function in 'chemically-skinned' rabbit ventricular trabeculae. **Jpn J Pharmacol.**, v. 76, n. 4, p. 405-413, 1998.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 49, n. 5, p. 330–352, mar. 2007.

TAN, C.; TASAKA, H.; YU, K. P. et al, Daunomycin an antitumor antibiotic in treatment of neoplastic disease - clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. **Cancer.**, v. 20, n. 3, p. 333-53, mar. 1967.

TEICHOLZ, L. E.; KREULEN, T.; HERMAN, M. V. et al, Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiocardiographic correlations in the presence or absence of asynergy. **Am J Cardiol.**, v. 37, p. 7-11, 1976.

TIDBALL, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. **J. Appl. Physiol.**, v. 102, n. 4, p. 1677–1686, abr. 2007.

URETZKY, G.; VINOGRAD, L.; FREUND, H. R. et al. Protective effect of branched chain-enriched amino acid formulation in myocardial ischemia. **Isr J Med Sci.**, v. 25, n. 1, p. 3-6, jan. 1989.

VENTRUCCI, G.; MELLO, M. A. R.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Effect of a leucine-supplemented diet on body composition changes in pregnant rats bearing walker 256 tumor. **Braz J Med Biol Res.**, v. 34, n. 3, p. 333-338, mar. 2001.

VIALE, P. H.; YAMAMOTO, D. S. Cardiovascular toxocoty associated whitth câncer treatment. **CJON.**, v. 12, n. 4, p. 627-638, 2008.

WAGENMAKERS, A. J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 26, n. p. 287-314, 1998.

WALLACE, G. Q.; MCNALLY, E. M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration and repair in the muscular dystrophies. Annu. **Rev. Physiol.**, v. 71, p. 37-57, mar. 2009.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n. 7, p. 657-662, jul. 2006.

WILLIS, M. S.; SCHISLER, J. C.; PORTBURY, A. L. et al. Build it up-tear it down: protein quality control in the sarcomere. **Cardiovasc. Res.**, v. 81, n. 3, p. 439-448, fev. 2009.

WITHAM, W. G.; YESTER, K. A.; MCGAFFIN, K. R. A high leucine diet mitigates cardiac injury and improves survival after acute myocardial infarction. **Metabolism.**, v. 62, n. 2, p. 290-302, fev. 2013.

YEH, E. T.; BICKFORD, C. L. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy Incidence, Pathogenesis, Diagnosis, and Management **J. Am Coll Cardiol.**, v. 53, n. 24, p. 2231-2247, 2009

YOUNG, L. H.; MCNUTLY, P. H.; MORGAN, C. et al. Myocardial protein turnover in patients with coronary artery disease. Effect of branched chain amino acid infusion. **J Clin Invest.**, v. 87, n. 2, p. 554-560. Fev. 1991.

ZANCHI, N. E.; NICASTRO, H.; LIRA, F. S. et al. Suplementação de Leucina: nova estratégia antiatrófica? **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte.** v. 1 n. 8 p. 113-122, 2009.