

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

**Efeito da suplementação alimentar com leucina no colágeno cardíaco  
e na função ventricular esquerda associada ao uso da doxorrubicina em  
ratos Wistar**

**EDUARDO GASPARETO HADDAD**

**Uberlândia**

**2019**

**EDUARDO GASPARETO HADDAD**

**Efeito da suplementação alimentar com leucina no colágeno cardíaco  
e na função ventricular esquerda associada ao uso da doxorrubicina em  
ratos Wistar**

Dissertação 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 mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Gonçalves

**Uberlândia**

**2019**

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

---

H126e Haddad, Eduardo Gaspareto, 1973-  
Efeito da suplementação alimentar com leucina no colágeno cardíaco e na função ventricular esquerda associada ao uso da doxorubicina em ratos Wistar [recurso eletrônico] / Eduardo Gaspareto Haddad. - 2019.

Orientador: Elmiro Santos Resende.

Coorientador: Alexandre Gonçalves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.3022>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Resende, Elmiro Santos, 1953-, (Orient.). II. Gonçalves, Alexandre, 1977-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU: 61

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Eduardo Gaspareto Haddad

**Efeito da suplementação alimentar com leucina no colágeno cardíaco e na função ventricular esquerda associada ao uso da doxorrubicina em ratos Wistar**

Presidente da Banca: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende

Dissertação 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 mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

### **Banca Examinadora**

**Titular: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende**

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Titular: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érica Carolina Campos Pulici**

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Titular: Prof. Dr. Eduardo Paul Chacur**

Instituição: Universidade Federal de Goiás (UFG)

**Suplente: Dr<sup>a</sup>. Fernanda Rodrigues de Sousa**

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsafamed.ufu.br - copme@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 024/PPCSA				
Data:	31.10.2019	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	12:00h
Matrícula do Discente:	11712CSD011				
Nome do Discente:	Eduardo Gaspareto Haddad				
Título do Trabalho:	Efeito da suplementação com Leucina na estrutura de colágeno cardíaco e sua relação com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo após exposição a doxorubicina				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Remodelação cardiovascular				

Reuniu-se no anfiteatro do Bloco 2H, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Eduardo Paul Chacur (UFG); Érica Carolina Campos (UFU) e Elmiro Santos Resende (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Elmiro Santos Resende, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e

achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Erica Carolina Campos Pulici, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/11/2019, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elmiro Santos Resende, Presidente**, em 06/11/2019, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Paul Chacur, Usuário Externo**, em 06/11/2019, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1663714** e o código CRC **140D64BE**.

Referência: Processo nº 23117.095170/2019-71

SEI nº 1663714

Criado por [viviane.pires](#), versão 4 por [viviane.pires](#) em 01/11/2019 10:57:38.

## DEDICATÓRIA

Não há palavras para verbalizar a gratidão a Deus por ter me conduzido suavemente por todos os caminhos até aqui.

Sou grato a todos os membros do CARDIOEXUFU pelo apoio e por todas as contribuições desde o início até aqui.

Um especial aos técnicos do laboratório que tanto contribuíram para que os dados fossem ao encontro de nossas perguntas.

Aos amigos distantes por todas as palavras de encorajamento que foram enviadas e proferidas em oração.

Aos irmãos da igreja que sempre me encorajaram e me ajudaram a ver algo de positivo em cada decepção e frustrações do caminho.

Ao meu filho, Eduardo, que com seus carinhos e abraços asfixiantes de tanto amor aliviaram o fardo do papai.

A Sâmya, minha filha, no dia em que você nasceu eu disse que você era muito poderosa. Obrigado por todas as maduríssimas palavras de uma menina de 11 anos que foram moldando o papai nessa jornada.

À Carla, minha amada esposa...só você sabe.

## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento ao professor orientador Dr. Elmiro Santos Resende, pelos ensinamentos com paciência, tolerância e humildade. O senhor me ensinou muito mais do que o conteúdo desse trabalho. Deus abençoe sua vida, professor.

Sou eternamente grato ao professor, exemplo e amigo, Dr. Alexandre Gonçalves, pela oportunidade de participar de um grupo onde me transformei e tive um norte para mudar minha vida e retornar a tão amada carreira acadêmica.

Meu amigo professor Dr. Hugo Zanetti; o que teria sido desse mestrado sem sua presença? Devo tanto a você, meu amigo, que mesmo com todas as possibilidades jamais conseguirei retribuir.

A todos os envolvidos no curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Gisele de Melo Rodrigues, Viviane Garcia Pires Gonçalves, meus amados professores e colegas da Pós-Graduação. Vivi com vocês momentos duros de perda familiar e momentos únicos de poder crer em dias melhores. A caminhada ao seu lado foi muito suave.

Ao amigo Dr. Thiago Montes Fidale que, com hombridade, conduziu uma nova maneira de apreciar os passos, as necessidades e as conquistas. Sua colaboração foi uma aula que carregarei para o resto da minha vida em favor de quem precisar de ajuda.



## RESUMO

**Introdução:** Os tratamentos anticâncer com uso da doxorubicina têm como efeito colateral a indução de cardiotoxicidade, que pode se manifestar anos após o encerramento do ciclo de tratamento. Dentre as diferentes expressões da cardiotoxicidade, a disfunção ventricular e o surgimento de fibrose miocárdica são características proeminentes. Algumas estratégias para conter e/ou reverter este quadro têm sido propostas. A leucina é um aminoácido essencial que estimula a síntese proteica, mas o seu exato papel na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina não é totalmente conhecido. **Objetivo:** Verificar os efeitos da suplementação dietética de leucina na produção de colágeno cardíaco e sua relação com a função ventricular esquerda, após exposição à doxorubicina em ratos Wistar. **Material e Métodos:** O experimento foi realizado no REBIR-UFU e teve duração de 42 dias. Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com peso corporal entre 250 e 300 gramas, divididos aleatoriamente em quatro grupos: Controle (C n=8), Doxorubicina (D n=10), Leucina (L n=8) e Doxorubicina + Leucina (DL n=10). Aos Grupos C e D foi ofertada dieta padrão e os grupos L e LD receberam dieta enriquecida com 5% de leucina. Os grupos D e LD receberam injeções intraperitoneais de doxorubicina, três vezes por semana, ao longo de duas semanas, até atingir-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg. Os grupos C e L receberam solução salina via intraperitoneal, em volume semelhante ao utilizado como veículo da doxorubicina. Ao final do período experimental os animais foram anestesiados e submetidos à ecocardiografia transtorácica para avaliação do ventrículo esquerdo. Após a eutanásia, cortes do ventrículo esquerdo foram obtidos para análise histológica e quantificação do colágeno em coloração pelo *Picrosirius red*. Os resultados foram registrados fotograficamente (objetiva de 10X, ocular de 10X) em microscópio Nikon eclipse® TS 100. Para comparação estatística entre os grupos experimentais foi utilizado o modelo linear generalizado univariado complementado pelo teste de Tukey. A significância estatística foi estabelecida para valores de  $p < 0,05$ . **Resultados:** Houve aumento do colágeno total no grupo D em relação ao C, L e LD ( $4,00 \pm 2,68$  x  $2,37 \pm 1,50$  x  $1,94 \pm 1,34$  x  $2,50 \pm 1,61$ ;  $p = 0,01$ ). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi mais elevada no grupo LD em relação ao D ( $72,75 \pm 2,87$  x  $65,37 \pm 2,87$ ;  $p=0,01$ ). **Conclusão:** A suplementação dietética com 5% de leucina atenuou o acúmulo de colágeno total e preservou a função ventricular esquerda quando foi administrada em associação com a doxorubicina em ratos Wistar.

**Palavras Chave:** Doxorubicina, Cardiotoxicidade, Leucina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Anti-cancer treatments using doxorubicin have the side effect of inducing cardiotoxicity, which may manifest itself years after the end of the treatment cycle. Among the different expressions of cardiotoxicity, ventricular dysfunction and the onset of myocardial fibrosis are prominent features. Some strategies to contain and/or reverse this framework have been proposed. Leucine is an essential amino acid that stimulates protein synthesis, but its exact role in doxorubicin-induced cardiotoxicity is not fully known. **Objective:** To verify the effects of dietary leucine supplementation on cardiac collagen production and its relationship with left ventricular function after exposure to doxorubicin in Wistar rats. **Material and Methods:** The experiment was conducted at REBIR-UFU and lasted 42 days. Thirty-six male Wistar rats weighing between 250 and 300 grams were randomly divided into four groups: Control (C n = 8), Doxorubicin (D n = 10), Leucine (L n = 8) and Doxorubicin + Leucine. (DL n = 10). Groups C and D were offered a standard diet and groups L and LD received a diet enriched with 5% leucine. Groups D and LD received intraperitoneal injections of doxorubicin three times a week over two weeks until the cumulative dose of 7.5 mg / kg was reached. Groups C and L received saline solution intraperitoneally, similar in volume to that used as a doxorubicin vehicle. At the end of the experimental period, the animals were anesthetized and submitted to transthoracic echocardiography for left ventricular evaluation. After euthanasia, left ventricular sections were obtained for histological analysis and quantification of collagen staining by Picrosirius red. The results were recorded photographically (10X objective, 10X eyepiece) under a Nikon eclipse® TS 100 microscope. For statistical comparison between experimental groups, the univariate generalized linear model complemented by Tukey test was used. Statistical significance was established for p values <0.05. **Results:** There was an increase in total collagen in group D compared to C, L and LD ( $4.00 + 2.68 \times 2.37 \pm 1.50 \times 1.94 + 1.34 \times 2.50 + 1.61$  (p = 0.01). Left ventricular ejection fraction was higher in the LD group than in the D group ( $72.75 \pm 2.87 \times 65.37 \pm 2.87$ ; p = 0.01). **Conclusion:** Dietary supplementation with 5% leucine attenuated total collagen accumulation and preserved left ventricular function when administered in combination with doxorubicin in Wistar rats.

**Key words:** Doxorubicin, Cardiotoxicity, Leucine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rack ventilado e caixas de monitoração.....	25
Figura 2- Caixa de monitoração dentro do gabinete de biossegurança .....	26
Figura 3 - Desenho Esquemático do Protocolo Experimental.....	29
Figura 4 - Balança de precisão Marte® AS 500 utilizada para as pesagens .....	29
Figura 5 - Equipamento ESAOTE MyLab 30 VET gold, utilizado para a realização do ecocardiograma.....	31
Figura 6 - Microscópio óptico Nikon ECLIPSE Ti®, utilizado na captação das imagens histológicas .....	32
Figura 7 - Ratos submetidos à ação da doxorrubicina com exsudação periocular e nasal e lesões nas patas.....	34
Figura 8 - Fibras de colágeno coradas com Picosirius Red.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Disposição dos animais nos grupos experimentais .....	24
Tabela 2 - Dieta AIN-93G formulada para fases de crescimento, gestação e lactação de roedores .....	27
Tabela 3 - Distribuição percentual de macronutrientes nas dietas padrão (DP) e dieta rica em leucina (DRL) .....	28
Tabela 4 - Comparação das frações de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e do colágeno total (CT) por meio do modelo linear generalizado e pós teste de Tukey.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - A suplementação de leucina foi capaz de atenuar o aumento de fibras colágenas no coração de ratos Wistar.....35
- Gráfico 2 - A suplementação com leucina (grupo DL) preservou o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo dos ratos Wistar submetidos ao tratamento com doxorubicina .....37
- Gráfico 3 - A suplementação com leucina (grupo DL) preservou o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo dos ratos Wistar submetidos ao tratamento com doxorubicina. ....37

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Justificativa para o estudo.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	16
2.1	Doxorrubicina e Fibrose na Cardiotoxicidade.....	16
2.2	Aminoácidos de cadeia carbônica ramificada – Leucina .....	19
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral .....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	Animais.....	24
4.2	Composição e Elaboração das Dietas .....	26
4.3	Tratamento com Doxorrubicina.....	30
4.4	Estudo Ecocardiográfico.....	30
4.5	Eutanásia dos Animais .....	31
4.6	Análise Histológica do Coração .....	31
4.7	Análise Estatística .....	32
5	RESULTADOS .....	34
5.1	Observações Gerais .....	34
5.2	Fibras de Colágeno no Coração.....	34
6	DISCUSSÃO.....	38
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	43
8	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que atinge a população mundial com uma abrangência e diversidades avassaladoras. No ano de 2018 foram registrados cerca de 9,6 milhões de mortes no mundo todo em função de diferentes tipos de cânceres (STEWART; WILD, 2014).

A doxorubicina é um fármaco anticâncer do grupo das antraciclina obtido a partir do fungo *Streptomyces peucetius*. Foi descoberto na década de 1950 e é comercializado como Adriamycin® ou Doxil®. Vem sendo utilizado desde 1969 como droga antineoplásica na quimioterapia de diversos tipos de câncer (RENU et al., 2017; TAN et al., 1967). Este fármaco tem sido amplamente usado nas intervenções quimioterápicas de câncer de mama e reduzem em cerca de 33% a mortalidade em mulheres (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP - EBCTCG, 2012).

A sua ação se deve ao fato dessa droga se inserir entre os pares de bases do DNA impedindo a síntese de macromoléculas, induzindo a apoptose, a geração de radicais livres de oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA; MATSUBARA, 2008; POLEGATO, 2011) e induzindo a morte celular (CHEUNG et al., 2015).

Em função dessas características, seus efeitos colaterais tóxicos são relativamente frequentes. Existe uma incidência variável, porém alta, da cardiotoxicidade que ocorre em 3% a 26% dos indivíduos tratados com o quimioterápico (BONITA; PRADHAN, 2013). A cardiotoxicidade é um dos destes efeitos mais significativo, sendo responsável por uma considerável morbimortalidade (ADÃO et al., 2013; ALBINI et al., 2010; NOVO; NUGARA; LANCELLOTTI, 2019; RASCHI et al., 2010; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). O quadro clínico da cardiotoxicidade tem expressão variada e inclui arritmias, cardiomiopatia com disfunção ventricular esquerda e fibrose miocárdica (MITRY; EDWARDS, 2016), sendo a insuficiência cardíaca a forma mais grave de apresentação, podendo evoluir para o óbito do paciente (ADÃO et al., 2013; ALBINI et al., 2010; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007).

As evidências mostram que a disfunção do ventrículo esquerdo ocorre em função de doses cumulativas de antraciclina (CAMPOS et al., 2011; FIDALE et al., 2018; LI; HILL, 2014; SUN; ZHOU; KANG, 2001; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). As doses repetidas desses fármacos, como é indicado na maioria dos procedimentos, podem resultar em lesões permanentes em nível celular e intersticial frequentemente associadas à degeneração, apoptose e diminuição do número de células musculares cardíacas (LEFRAK et al., 1973).

Outros mecanismos da cardiotoxicidade envolvem o comprometimento da síntese de importantes fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes específicos de células cardíacas (ITO et al., 1990; GIANNI et al., 2008; LEFRAK et al., 1973). A diminuição de tais genes associada a um aumento da degradação de miofilamentos leva a um balanço negativo das proteínas sarcoméricas nas células cardíacas (JEYASEELAN et al., 1997) causando diminuição da interação entre os filamentos de actina e miosina e desorganização da miosina sarcomérica com perda da função contrátil (BOTTONE; VOEST; DE BEER, 1998). Os efeitos citotóxicos da doxorubicina envolvem a geração de radicais livres de oxigênio que são a principal causa de apoptose dos cardiomiócitos. Ao perder os cardiomiócitos, o coração desenvolve cardiomiopatia e insuficiência cardíaca (LIN; LENGACHER, 2019).

Uma vez que o quadro clínico envolve a perda proteica, parece importante considerarmos elementos que possam interferir positivamente na síntese proteica. Nesse contexto a leucina chama a atenção pois é um aminoácido essencial de cadeia ramificada do grupo dos BCAAs (*Branch Chain Amino Acids*) e que apresenta atividade moduladora da síntese proteica e vários estudos (CRUZ et al., 2019; MIYAGUTI; OLIVEIRA; GOMES-MARCONDES, 2019; VIANA et al., 2019; WILKINSON et al., 2018) demonstraram sua ação em aprimorar o anabolismo proteico. Outros trabalhos demonstraram os efeitos da sua suplementação para amenizar a proteólise que ocorre em situações clínicas como em tratamentos com dexametasona (SHAH et al., 2000), na evolução de tumores (VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2001), em condições de desuso muscular (KOBAYASHI et al., 2006) e no hipertireoidismo (FIDALE et al., 2016). Estes estudos demonstraram que a suplementação com leucina foi eficaz em minimizar o catabolismo proteico.

Acredita-se que um terço dos sobreviventes de câncer morrerão de doenças cardiovasculares (BARROS et al., 2018). Cuidados cardíacos se tornam necessários e a detecção precoce das disfunções cardíacas pode conduzir ao uso estratégias para proteção antes que os danos irreversíveis de fato se instalem. Em função das propriedades atribuídas à leucina e às características da cardiotoxicidade adquirida em decorrência do uso das antraciclina, cogitou-se a possibilidade de associá-la como coadjuvante ao tratamento com a doxorubicina na tentativa de reduzir os efeitos deletérios cardíacos deste medicamento.



## 1.1 Justificativa para o estudo

Desde o desenvolvimento inicial das antraciclina à partir do *Streptomyces peucetius* até agora, mais de 50 anos de investigação sobre os mecanismos responsáveis pela cardiotoxicidade não foram capazes de elucidá-los integralmente (RASCHI et al., 2010). Ainda assim, a evolução do entendimento da cardiotoxicidade induzida por este grupo de medicamentos pode trazer oportunidades que possibilitem o seu controle e melhore sua evolução. Além disso, as experiências adquiridas com associação de outros agentes terapêuticos em protocolos de uso dos quimioterápicos podem minimizar a cardiotoxicidade convertendo-os em agentes mais seguros (ZHANG et al., 2009).

Uma vez que a cardiotoxicidade produzida pelas antraciclina, com todas as suas consequências, trazem, em seu amplo e complexo lastro fisiopatológico, a proteólise das fibras musculares cardíacas decorrentes de vários mecanismos propostos, é plausível testar-se a hipótese de utilizar-se a leucina em dieta enriquecida após o uso do quimioterápico na tentativa de reduzir ou reverter os efeitos cardíacos deletérios. As ações anabolizantes da leucina, já descritos acima, podem ser úteis na tentativa de amenizar o quadro clínico da cardiotoxicidade.

O presente estudo poderá contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia da lesão cardíaca associada ao uso de doxorubicina.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Doxorrubicina e Fibrose na Cardiotoxicidade

O desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas e o uso de protocolos terapêuticos incluindo diferentes fármacos antitumorais inegavelmente propiciaram um novo horizonte no tratamento de pacientes oncológicos, além de melhorar substancialmente o prognóstico (HRDINA et al., 2000; MINAMI; MATSUMOTO; HORIUCHI, 2010; SONGBO et al., 2019). As antraciclina fazem parte desse avanço, porém, sob o ponto de vista cardiovascular, seus efeitos colaterais são fatores limitantes ao seu uso, particularmente em relação à cardiotoxicidade (FRANGOIANNIS, 2019; RASCHI et al., 2010; RENU et al., 2017).

Os estudos relacionados à cardiomiopatia devida ao uso das antraciclina mostraram a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (VE) como sendo um componente do quadro clínico da cardiotoxicidade (LEFRAK et al., 1973). O envolvimento do VE é evidente quando a doxorrubicina é usada no tratamento antineoplásico (ADÃO et al., 2013; RASCHI et al., 2010). Na tentativa de reduzir a incidência da disfunção cardíaca e melhorar a sua evolução, algumas estratégias, atualmente em uso clínico, foram incorporadas ao tratamento, a saber: menor tempo de exposição à dose limite, encapsulamento do quimioterápico em lipossomos para reduzir a captação miocárdica, administração simultânea do quelante de ferro dexrazoxano para reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio catalisadas por ferro livre e modificação na estrutura química da antraciclina (SAWIER et al., 2010).

A cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina pode se apresentar em qualquer estágio do tratamento e é classificada como aguda, subaguda e crônica (HRDINA et al., 2000). A forma aguda de apresentação clínica ocorre em até três dias de administração da droga (RENU et al., 2017), é grave, mas, felizmente, tem um curso breve e é independente da dose utilizada. Ela pode se manifestar por alterações eletrocardiográficas súbitas, com arritmias supraventriculares e ventriculares, vasodilatação e hipotensão, síndromes coronarianas agudas, pericardite e miocardite (STEINBERG et al., 1987). A forma subaguda é mais rara e se expressa com miocardite e pericardite.

A cardiotoxicidade crônica é a forma mais comum e ocorre em semanas ou meses após o uso do fármaco (RENU et al., 2017). A apresentação clínica é a de uma cardiomiopatia dilatada que se desenvolve mais tardiamente após o tratamento. É dependente da dose cumulativa do quimioterápico (GIANTRIS et al., 1998) e a manifestação mais característica é

a disfunção ventricular sistólica e/ou diastólica que pode levar à insuficiência cardíaca grave e ao óbito (ALBINI et al., 2010; RASCHI et al., 2010). Uma outra manifestação da cardiotoxicidade crônica é aquela que ocorre muito tardiamente podendo se manifestar 10 a 15 anos após o término do tratamento quimioterápico (SONGBO et al., 2019). Como existem várias outras etiologias de cardiomiopatia dilatada que podem desencadear disfunção cardíaca similar às das antraciclina, permanece a dúvida quanto a real existência desta forma crônica variante.

O efeito das doses cumulativas de antraciclina tem sido citado como o principal fator de risco para a ocorrência de insuficiência cardíaca crônica (RYBERG et al., 1998). Não existe, no entanto, a descrição de dose segura e capaz de evitar o aparecimento da cardiotoxicidade (LIPSHULTZ et al., 2005).

Todos os fatores de risco cardiovascular estão intimamente relacionados à cardiotoxicidade crônica mas não com aquela que surge de forma aguda (RASCHI et al., 2010). A progressão e o grau de cardiotoxicidade inerentes ao uso destes fármacos são variáveis entre indivíduos e relacionam-se a diversos fatores de risco como idade, sexo, modo de administração do medicamento, dose cumulativa, doenças cardiovasculares prévias, bem como com a própria predisposição genética (RASCHI et al., 2010) ainda não localizada.

Os principais mecanismos fisiopatológicos propostos e já identificados pelos quais as antraciclina afetam preferencialmente os cardiomiócitos envolvem a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (OLSON; MUSHLIN, 1990; RENU et al., 2017; SAWYER et al., 2010).

A peroxidação lipídica pode causar injúria à camada fosfolipídica da célula através de radicais livres derivados de oxigênio (MARAZZI et al., 2008). Estes mecanismos comprometem a síntese de DNA, RNA e de várias proteínas estruturais, assim como dos fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes específicos do coração (ITO et al., 1990; JEYASEELAN et al., 1997; OLSON; MUSHLIN, 1990). Foi proposto que a doxorrubicina também causa cardiotoxicidade por meio de sua interferência na topoisomerase II  $\beta$  pois, em camundongos com o gene *nocauteado* para esta enzima, notou-se um atraso na destruição dos cardiomiócitos na presença da doxorrubicina (YEH; BICKFORD, 2009).

Entende-se como estresse oxidativo o desequilíbrio provocado entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes (ALEXIEVA et al., 2014; RENU et al., 2017). Como referido anteriormente, o aumento do estresse oxidativo ocorre durante exposição à doxorrubicina (DOROSHOW, 1983). As espécies reativas de oxigênio geradas no miocárdio não são removidas pelos mecanismos antioxidantes na presença de

doxorrubicina e são consideradas a causa principal da cardiotoxicidade (RENU et al., 2017; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007).

De uma forma resumida, o estresse oxidativo exacerbado produzido pela doxorrubicina é desencadeado por reações químicas que envolvem o ferro ativado na mitocôndria e produzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) sob ação da SOD (superóxido dismutase) (SONGBO et al., 2019). O acúmulo de  $H_2O_2$  gera radicais tóxicos (hidroxila -  $OH^\cdot$ ) resultando em mais espécies reativas de oxigênio. Associa-se a isto o fato da doxorrubicina reduzir expressivamente os níveis de antioxidantes endógenos, a saber, glutatona e a catalase. (SANGOMLA et al., 2018).

Muitos radicais livres são produzidos pelo ciclo redox da doxorrubicina que é catalisado pela nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NADPH) na mitocôndria. Mioblastos que são afetados pela doxorrubicina apresentam aumentos de NADPH oxidase que induz aumento do estresse oxidativo por aumento das espécies reativas de oxigênio (GILLERON et al., 2009). Durante o tratamento com doxorrubicina ocorre aumento da angiotensina II que ativa a NADPH oxidase e eleva a produção de mais espécies reativas de oxigênio (RENU et al., 2017).

A cardiotoxicidade e a cardiomiopatia dilatada uma vez presentes promovem remodelação cardíaca e insuficiência cardíaca (CHIRINOS, 2019). Diversos estudos mostraram o efeito de remodelação reversa e melhora na sobrevivência promovidas por fármacos utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca. Tem sido demonstrado que diferentes medicamentos podem modificar a remodelação ventricular, prevenindo ou retardando a dilatação e têm sido propostos no tratamento da cardiomiopatia da doxorrubicina (SABBAH et al., 1994). Os inibidores da ECA que atuam promovendo redução da angiotensina II, reduzem a dilatação cardíaca e, nas formas iniciais, promovem remodelação reversa (KONSTAM et al., 2000; REIS FILHO et al., 2015). As pesquisas com os bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA) mostraram também benefícios em relação à remodelação ventricular, com prevenção da dilatação cardíaca. Não houve diferença de resposta entre o inibidor da ECA e o BRA (KONSTAM et al., 2000). Em função disso, os agentes antagonistas do sistema renina-angiotensina-aldosterona são indicados no tratamento da insuficiência cardíaca com remodelação cardíaca (AKOLKAR et al., 2015).

Estudos mostraram que os bloqueadores beta adrenérgicos proporcionam uma reversão mais intensa da dilatação cardíaca quando comparados aos inibidores da ECA (AKOLKAR, et al., 2015). No entanto, é possível que o sistema adrenérgico não seja um determinante

importante de prognóstico nas formas iniciais da disfunção ventricular pois o seu bloqueio nas formas assintomáticas de disfunção ventricular não promoveu redução de mortalidade (COSTALUNGA; GAVAZZI, 2001).

Além destes efeitos tóxicos descritos, uma outra ação das antraciclinas é a de suprimir fatores de transcrição e induzir a morte dos miócitos e à sarcopenia (OLSON; MUSHLIN, 1990). No coração e em outros tecidos, as antraciclinas ao se intercalarem com os ácidos nucleicos causam supressão da síntese do DNA, do RNA, de várias proteínas estruturais (OLSON; MUSHLIN, 1990), assim como dos fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes específicos do coração (SAWYER et al., 2010). A diminuição na expressão proteica associada ao aumento da degradação de miofilamentos leva a um balanço sarcomérico negativo nas células cardíacas (LIM et al., 2004). Há ainda um desequilíbrio na regulação da função cardíaca, com comprometimento no metabolismo do cálcio (DODD et al., 1993; TAKAHASHI et al., 1998;). Devido à limitada capacidade de síntese e regeneração das células cardíacas, ocorre redução do número de cardiomiócitos promovendo remodelação cardíaca (SAWYER et al., 2010).

O prognóstico desfavorável dos pacientes submetidos ao tratamento oncológico está diretamente relacionado à intensidade da cardiotoxicidade advinda do uso dos quimioterápicos (VIALE; YAMAMOTO, 2008). A fibrose decorre dos efeitos cardiotoxícos e é uma complicação preocupante pois compromete a função sistólica e diastólica sendo de difícil controle e reversão (REIS-FILHO et al., 2015; ZORNOFF et al., 2002). Na cardiomiopatia associada à doxorubicina observa-se fibrose intersticial e perivascular (RENU et al., 2017). Este efeito decorre do aumento da expressão do *FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA* (TGF- $\beta$ ) e fósforo-SMAD3, resultando em aumento de fibroblastos ativos derivados da transformação fenotípica de miofibroblastos e deposição de colágeno (RENU et al., 2017)

## **2.2 Aminoácidos de cadeia carbônica ramificada – Leucina**

As unidades químicas básicas que formam as proteínas em nosso corpo são os aminoácidos. Dentre os diferentes aminoácidos envolvidos neste processo, nove são classificados como essenciais, ou seja, nosso organismo não é capaz de sintetizá-los. A

maneira mais simples de fornecê-los é administrá-los na dieta. Dos aminoácidos essenciais, três deles são de cadeia carbônica ramificada: a leucina, isoleucina e valina (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). Estes três aminoácidos correspondem a cerca de 35% dos aminoácidos essenciais existentes nas proteínas musculares (MARCHINI et al., 1998; WAGENMAKERS, 1998) e têm efeitos potentes sobre o turnover de proteínas (LI; JEFFERSON, 1978). Sabe-se que o tecido muscular estriado tem a síntese e degradação proteicas moduladas pelos aminoácidos essenciais (FAVERO, 2017). De maior interesse neste estudo, a leucina reúne evidências crescentes que demonstram o seu papel de estimuladora dos processos de síntese proteica e regulação anabólica (SHIMOMURA; HARRIS, 2006). No músculo esquelético a leucina é única em sua capacidade de iniciar vias de transdução de sinal que modulam a iniciação da tradução do mRNA (ANTHONY et al., 2001).

Dietas mal balanceadas em termos de macronutrientes ou com grandes porções de leucina diminuem os níveis de valina e isoleucina livres em decorrência do aumento da oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada, o que estimula a síntese e inibe a degradação proteica (SHIMOMURA; HARRIS, 2006). Qualquer aumento da ingestão de aminoácidos essenciais induz aumento correspondente em seu metabolismo em detrimento de outros macronutrientes. Esta propriedade dos aminoácidos essenciais de se tornarem substrato metabólico é particularmente importante pois a baixa acidificação celular auxilia na manutenção do tecido muscular cardíaco (DRAKE et al., 2012).

A oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada tem como primeiro passo uma transaminação reversível na qual o BCAA é convertido em seus respectivos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAs). Essa conversão é catalisada pela aminotransferase de cadeia ramificada (BCAT). A maioria das enzimas catabólicas dos BCAAs, exceto a BCAT, estão contidas nos espaços intramitocondriais, evidenciando o potencial metabólico delas, independentemente da função mitocondrial (BISWAS; LUKE; THOMAS, 2019).

Foi observado que com o aumento de BCKAs há comprometimento da função cardíaca sistólica e surgimento de insuficiência cardíaca. A suplementação inicial de BCAA resultou em preservação da função cardíaca, diminuição da frequência cardíaca e aumento da sobrevivência, sugerindo que os BCAAs, pelo menos em um estágio inicial de insuficiência cardíaca, podem ser benéficos (BISWAS; LUKE; THOMAS, 2019; DRAKE et al., 2012). Em condições saudáveis o metabolismo energético cardíaco é versátil e pode usar como substrato a glicose, ácidos graxos, corpos cetônicos e aminoácidos. Porém, na insuficiência cardíaca

instalada, ocorre perda dessa versatilidade havendo preferência pelo metabolismo glicolítico (LEHRKE, 2019).

Não foram encontradas informações relativas aos efeitos da suplementação de leucina neste regime de restrição metabólica embora algumas observações indiquem um potencial terapêutico benéfico. A leucina aumenta a síntese proteica no músculo esquelético de maneira similar ao que ocorre quando se administra uma solução de aminoácidos com glicose e isto sugere um o efeito indutor do anabolismo, ação anticatabólica e melhora do *turnover* proteico. Estes efeitos podem ser reproduzidos pelo fornecimento apenas dos aminoácidos de cadeia ramificada (GARLICK; GRANT, 1998; LI; HILL, 1978; ZANCHI et al., 2009) mas pode-se atribuí-los apenas à leucina uma vez que ela, isoladamente, estimula a síntese proteica de forma tão eficiente como a mistura dos três aminoácidos de cadeia ramificada (LI; HILL, 1978). No cenário do câncer, o uso de dietas enriquecidas com leucina altera a morfologia e função mitocondrial aprimorando o metabolismo oxidativo e atenuando o consumo de glicose em células tumorais (VIANA et al., 2019).

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 anticatabólica, inibindo a proteólise muscular. O consumo de dietas enriquecidas com leucina tende a suprimir marcadores de lesão tecidual após exercício intenso, podendo atenuar as injúrias musculares e dar suporte à recuperação muscular (MATSUI et al., 2019). Tal ação se deve aos potentes efeitos fisiofarmacológicos que a suplementação de leucina provoca nos sistemas de síntese e de degradação proteica.

A leucina é o aminoácido de cadeia ramificada mais usado e estudado para a preservação da massa magra corporal (TONETO et al., 2016). A leucina age em nível pós-transcricional e na fase de iniciação da tradução do RNA-mensageiro. O aumento da concentração intracelular desse aminoácido promove a ativação da proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian Target of Rapamycin - mTOR*).

A síntese proteica é estimulada pela mTOR agindo sobre a proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA (p70S6k), pela ação da proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e pelo fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (DA MATA et al., 2012). Consistentemente com estes fatos, a administração de leucina em ratos induz aumento da fosforilação da 4E-BP1 e da p70S6k estimulando a síntese proteica (CARON et al., 2010; KIMBALL; JEFFERSON, 2006a; KIMBALL; JEFFERSON, 2006b; SHAH et al., 2000).

A regulação metabólica no tecido cardíaco em condições de insuficiência cardíaca é complexa e pode, em parte, ser modulada pela administração de substratos disponíveis na forma de macronutrientes inseridos na dieta, incluindo aí os aminoácidos (FILLMORE et al., 2018; KIM et al., 2011; LAYMAN, 2003). Estudos em animais mostram que os aminoácidos de cadeia ramificada reduzem os sinais de comprometimento cardíaco em condições de isquemia experimental (URETZKY et al., 1989; SCHWALB et al., 1987), diminuem a captação miocárdica de lactato, além de poderem ser utilizados como substrato energético no coração e no músculo esquelético (DAVIS et al., 1993; MARAZZI et al., 2008).

Em humanos existem estudos referentes ao emprego de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs-*Branch Chain Amino Acids*) no tratamento de diversas doenças (AQUILANI, 2004; DE BANDT; CYNOBER, 2006; KAWAGUCHI et al., 2008;). Há evidências de que a leucina tem um efeito anabólico direto sobre o *turnover* de proteínas na presença de isquemia miocárdica (YOUNG et al., 1991) e dados indicam a sua participação na evolução do infarto agudo do miocárdio quando ocorre diminuição expressiva dos seus níveis plasmáticos no primeiro dia pós- infarto e restabelecimento da condição inicial após três dias (SZPETNAR; PASTERNAK; BOGUSZEWSKA, 2004).

Em resumo, a leucina é um aminoácido de cadeia ramificada que estimula a síntese proteica ativando a m-TOR (MEIJER; DUBBELHUIS, 2004). A ativação da mTOR é a sinalização desencadeadora da hipertrofia cardíaca não associada à doenças (KEMI et al., 2008) e ameniza respostas inflamatórias miocárdicas encontradas na insuficiência cardíaca (SONG et al., 2010). A administração pós-prandial de leucina estimula a síntese proteica nos músculos estriados (cardíaco e esquelético) aumentando a proteína denominada fator de iniciação eucariótica (eIF4B), que participa da síntese proteica (ESCOBAR et al., 2006). A administração de leucina em ratos promove aumento da síntese proteica por elevação da atividade da proteína ribossomal p70S6k, (proteína quinase associada a síntese proteica) e da mTOR cardíaca (CANEDO et al., 2010). Quando se faz suplementação dietética com leucina em humanos há redução da proteólise em condições de imobilização e de câncer (ELEY; RUSSELL; TISDALE, 2007; HAN et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2006; SHAH et al., 2000; VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2001). Segundo Zanchi e colaboradores (2009), a suplementação com leucina é uma terapia anticatabólica capaz de inibir a degradação proteica muscular.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietética de leucina no colágeno cardíaco e na função ventricular esquerda em ratos Wistar expostos à doxorrubicina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar os efeitos da doxorrubicina e da leucina na quantidade de colágeno do ventrículo esquerdo;
- Quantificar os efeitos da doxorrubicina e da leucina na função ventricular esquerda.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) e teve duração de 42 dias. As condições ambientais foram controladas durante o período experimental, no que se refere à temperatura, nível de ruído e luminosidade.

Todas as intervenções seguiram as resoluções brasileiras específicas de bioética em pesquisa com animais: Lei nº 6.638, de 8 de março de 1979 e Decreto nº 645, de 10 de julho de 1945. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na utilização de Animais (CEUA-UFU) sob o Parecer nº115/14, em 15/12/2014.

### 4.1 Animais

Para a realização do experimento foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com peso corporal entre 250 e 300 gramas, provenientes do REBIR-UFU. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, conforme disposto na Tabela 1, alojados em caixas coletivas de monitoração contendo até cinco animais por caixa e colocados no rack ventilado AI20 (ALESCO®) de alta biocontenção, com temperatura e ventilação controladas e com alternância de ciclos claro-escuro, conforme Figura 1.

**Tabela 1 - Disposição dos animais nos grupos experimentais**

Grupo	Controle (C)	Doxorrubicina (D)	Leucina (L)	Leucina + Doxorrubicina (LD)
N <sup>o</sup>	8 animais	10 animais	8 animais	10 animais

Fonte: Própria, 2019.

Grupo Controle (C) composto por oito ratos, com acesso livre a ração de acordo com *American Institute of Nutrition* (AIN-93G).

Grupo Doxorrubicina (D) composto por dez ratos que receberam doxorrubicina e com acesso livre à ração (AIN-93G).

Grupo Leucina (L) composto por oito ratos, com acesso livre a ração (AIN-93G) suplementada com mais 5% de leucina.

Grupo Doxorrubicina + Leucina (DL) composto por dez ratos que receberam doxorrubicina e com acesso livre a ração (AIN-93G) suplementada com mais 5% de leucina. Todos os ratos tiveram acesso livre à água.

**Figura 1 - Rack ventilado e caixas de monitoração**



Fonte: Própria, 2019.

As caixas de monitoração e garrafas de água foram trocadas por material esterilizado duas vezes por semana, conforme protocolo do REBIR. A ração foi trocada na mesma frequência para todos os grupos e as sobras foram descartadas. Todas as trocas foram feitas em um gabinete de biossegurança com fluxo de ar BS60 BioSafety Cabinet (Tecniplast®) (Figura 2).

**Figura 2- Caixa de monitoração dentro do gabinete de biossegurança**



Fonte: Própria, 2019.

## **4.2 Composição e Elaboração das Dietas**

Estabeleceu-se como dieta padrão o modelo proposto pelo *American Institute of Nutrition* (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993; FIDALE et al., 2018) que estabelece como base alimentar a formulação AIN-93G, adequada ao crescimento, gestação e lactação de roedores. A lista de ingredientes está apresentada na Tabela 2 e foi toda adquirida da empresa RHOSTER®, indústria e comércio de ração para animais de laboratório. 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; Nielsen; Fahey, 1993.

A dieta padrão (DP) tinha em sua composição a concentração mínima de leucina de 1,54g/100g (1,5%) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Ao grupo tratado com dieta rica em leucina (DRL) foi fornecida dieta padrão adicionada com mais 5,0g/100g (5%) de leucina do total de nutrientes da dieta (WITHAM; YESTER; MCGAFFIN, 2013).

As dietas oferecidas aos diversos grupos foram semelhantes em relação às calorias (395,0 kcal/100g de dieta). O conteúdo de macronutrientes apresentou variação no percentual de distribuição dos componentes devido ao acréscimo de leucina da DRL, os quais corresponderam na DP a ~ 20% de proteínas, ~ 64% de carboidratos e ~ 16% de lipídeos, como visto na Tabela 3.

**Tabela 3 - Distribuição percentual de macronutrientes 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

Fonte: Própria, 2019.

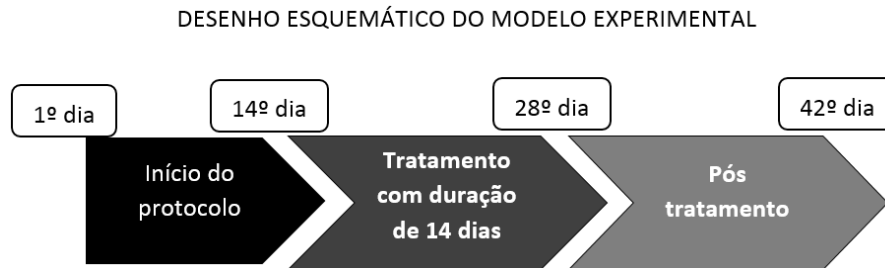
As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Medicina Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando-se utensílios exclusivos e seguindo com os cuidados no controle de riscos de contaminação química e biológica. Os ingredientes foram misturados dos menores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

A fim de garantir melhor homogeneização, todos os ingredientes foram peneirados e misturados. Acrescentou-se água filtrada até o ponto de se obter massa homogênea e firme. Foi utilizado um funil plástico para moldar a massa em forma de *pellets* que foram para estufa de ar circulante a 60°C, por 12h e, após estar seca e resfriada, foi acondicionada em sacos plásticos escuros e armazenada em câmara fria.

As dietas foram oferecidas aos quatro grupos experimentais. Os Grupos Controle e Doxorubicina receberam DP, enquanto os grupos Leucina e Leucina + Doxorubicina receberam DRL.

A ração e a água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais dos quatro grupos experimentais receberam suas respectivas dietas durante 14 dias de adaptação antes de ser iniciado o tratamento com doxorubicina e durante os próximos 28 dias após o início do tratamento, totalizando-se 42 dias de experimento.

**Figura 3 - Desenho Esquemático do Protocolo Experimental**



1º DIA= Início do período de adaptação dos animais ao ambiente do laboratório e à ração: duração de 14 dias.

14º DIA= Pesagem dos animais e início do tratamento com doxorrubicina: duração de 14 dias.

28º DIA= Pós-tratamento com doxorrubicina e manutenção da dieta rica em leucina: duração de 14 dias.

42º DIA= Realização do ecocardiograma, pesagem e eutanásia.

Durante o período experimental, as caixas usadas foram trocadas por caixas limpas e esterilizadas duas vezes por semana, da mesma forma que as garrafas de água e ração. O consumo de ração foi verificado semanalmente, em balança de precisão Marte® AS 500. Todos os resíduos sólidos foram colocados em um saco branco, congelados e posteriormente incinerados.

**Figura 4 - Balança de precisão Marte® AS 500 utilizada para as pesagens**



Fonte: Própria, 2019.

### 4.3 Tratamento com Doxorrubicina

Todos os animais dos grupos Doxorrubicina e Leucina + Doxorrubicina, receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorrubicina (Fauldoxo, Libbs Farmacêutica®), três vezes por semana, ao longo de duas semanas, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg. Tanto a dose quanto o tempo de exposição dos animais foram instituídas visando a reprodução de um modelo de cardiotoxicidade de evolução crônica, conforme já observado em experimentos prévios (CAMPOS et al., 2011; FIDALE et al., 2018). O grupo Controle e o grupo Leucina receberam volume semelhante de solução salina via intraperitoneal, no mesmo regime empregado para os animais tratados com doxorrubicina. Todas as injeções foram preparadas em condições estéreis imediatamente antes das aplicações.

### 4.4 Estudo Ecocardiográfico

Para a realização do exame ecocardiográfico, 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.

Para obtenção dos registros ecocardiográficos foi realizada tricotomia da face anterior do tórax, sendo os animais colocados em decúbito lateral esquerdo a 45°. Para obtenção das imagens utilizou-se o equipamento 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, foram calculados os volumes diastólico (LVVD) e sistólico (LVVS) do ventrículo esquerdo, pelo método de Teicholz (1976), para posterior cálculo da fração de ejeção (LVEF %) pela fórmula  $\%LVEF = [(LVVD - LVVS) / LVVD] \times 100$ , conforme Figuras 9 e 10.



**Figura 5 - Equipamento ESAOTE MyLab 30 VET gold, utilizado para a realização do ecocardiograma**



Fonte: Própria, 2019.

#### **4.5 Eutanásia dos Animais**

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com 0,1 ml/100g de Cetamina a 10%, associado à mesma dose de Xilazina a 2%, 0,1 ml/100g. A eutanásia ocorreu por exsanguinação e posteriormente retirou-se os corações que foram lavados em solução de cloreto de potássio (KCl) e posteriormente armazenados em formol a 10%.

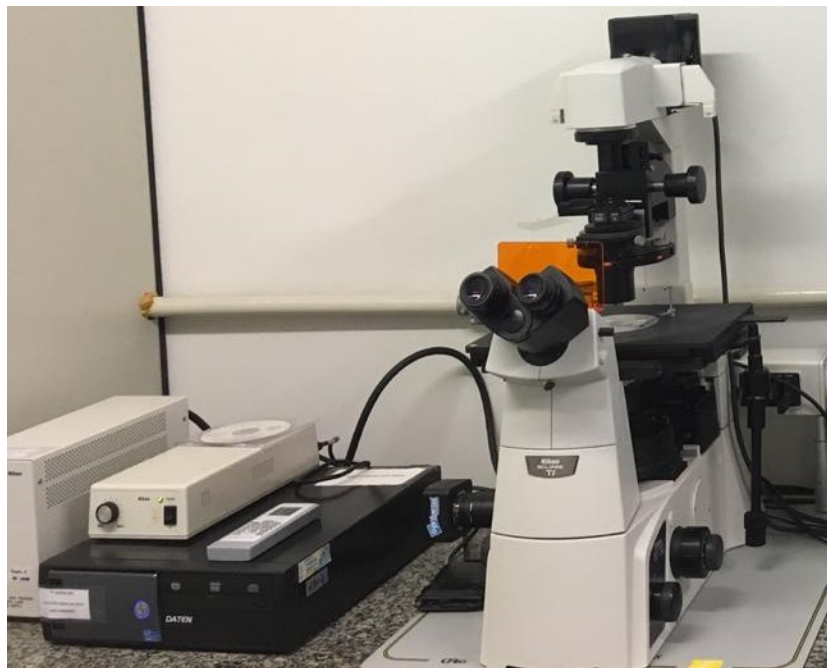
#### **4.6 Análise Histológica do Coração**

Para a realização do estudo histopatológico, foi feito um corte no plano coronal, dividindo-se as peças em duas porções que foram fixadas 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  $\mu$ ) e preparadas as lâminas.

Os cortes histológicos corados em *Picrosirius Red* foram analisados usando microscópio óptico (Figura 11) e registrados fotograficamente (objetiva de 40X, ocular de 10X). Cada

corde teve o registro fotográfico de 10 campos, até ser percorrida toda a área do tecido. Para quantificar o colágeno total os cortes foram corados com a técnica do *Picrosirius Red* (Figura 12) e registrados fotograficamente (objetiva de 10X, ocular de 10X) em microscópio *Nikon ECLIPSE Ti*® (Figura 11 e 12). A quantificação do colágeno foi feita usando a ferramenta ImageJ para produzir uma medição baseada em pixels. Toda a preparação do material histológico foi realizada no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM/UFU).

**Figura 6 - Microscópio óptico Nikon ECLIPSE Ti®, utilizado na captação das imagens histológicas**



Fonte: Própria, 2019

#### **4.7 Análise Estatística**

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para determinar-se a distribuição dos dados da amostra. Para dados com distribuição normal foi calculada a média e o desvio padrão. Para a comparação do colágeno total entre os grupos foi utilizado o modelo linear generalizado univariado para verificação da existência de diferença significativa entre os grupos; uma vez

detectada a significância empregou-se o pós-teste de Tukey para localizar entre quais grupos se localizavam as diferenças. O mesmo procedimento foi utilizado na comparação das medidas de volume das cavidades e da função cardíaca do ecocardiograma.

Para avaliar a associação entre a fração de ejeção e a concentração de colágeno total no ventrículo esquerdo foram utilizados modelos de regressão linear, considerando-se a fração de ejeção como a variável dependente e o colágeno total como a variável preditora.

Todas as análises foram realizadas no programa IBM SPSS versão 18.00, cuja propriedade da licença é da PGCS/FAMED/UFU.

O nível de significância adotado para o presente estudo é de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Observações Gerais

Os animais submetidos ao tratamento com doxorrubicina apresentaram sinais de hipocinesia associados à exsudação periocular e nasal e lesões nas patas. As lesões foram evidenciadas após a segunda semana de tratamento (Figura 14). Durante o nosso experimento não houve morte dos animais advinda da administração dos fármacos.

**Figura 7 - Ratos submetidos à ação da doxorrubicina com exsudação periocular e nasal e lesões nas patas**



Fonte: adaptada de Fidale, 2017.

### 5.2 Fibras de Colágeno no Coração

Conforme observado no Gráfico 1, a concentração de fibras de colágeno no grupo D foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos. Já a comparação entre os demais grupos C, L e DL não evidenciou diferença significativa para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

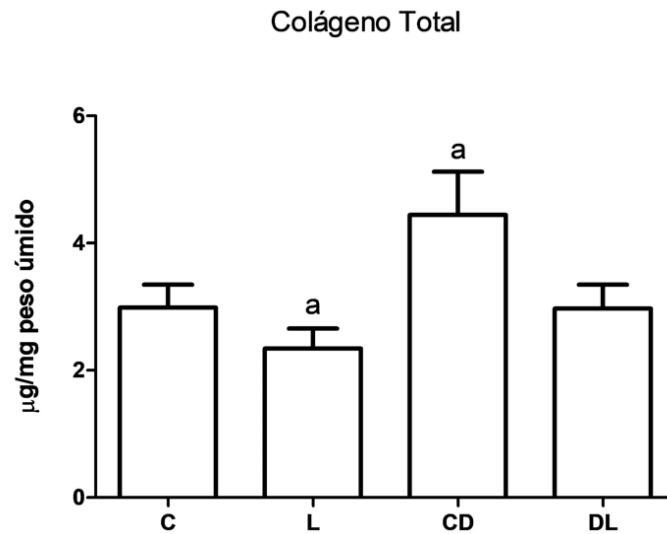


Gráfico 1 - A suplementação de leucina foi capaz de atenuar o aumento de fibras colágenas no coração de ratos Wistar: “a” representa a diferença significativa em relação aos demais grupos. C: controle, L: leucina, D: doxorubicina, DL: doxorubicina+leucina ( $p < 0,05$ ).

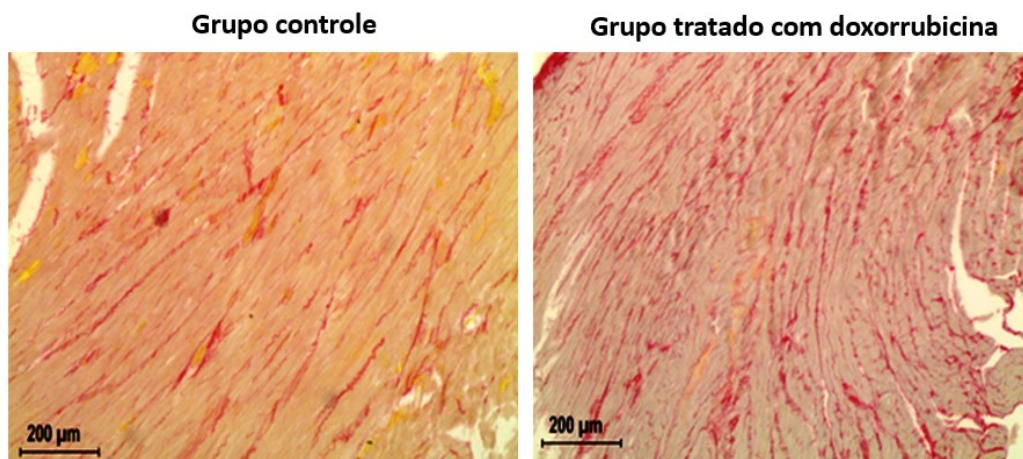


Figura 8 - Fibras de colágeno coradas com Picrosirius Red. Foram observadas maiores concentrações de colágeno no grupo submetido ao tratamento com doxorubicina, sem suplementação de leucina. Fonte: adaptada de Fidale, 2017.

Em relação à fração de ejeção, o grupo D apresentou valores significativamente menores que os demais grupos, conforme demonstrado na Tabela 4. Já a comparação entre os demais grupos, controle, leucina e leucina +doxo não evidenciou diferenças significativas.

	Grupo				P valor
	Controle	Leucina	Doxo	Leucina+Doxo	
	Média Desvio padrão	Média Desvio padrão	Média Desvio padrão	Média Desvio padrão	
Fração de ejeção	78,00 <sup>a</sup> ±7,76	78,90 <sup>b</sup> ±9,25	65,37 <sup>ab</sup> ±2,87	72,75 ±2,87	0,01
Colágeno Total	2,37 ±1,50	1,94 <sup>a</sup> ±1,34	4,00 <sup>a</sup> ±2,68	2,50 ±1,61	0,01

Tabela 4 - Comparação das frações de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e do colágeno total (CT) por meio do modelo linear generalizado e pós teste de Tukey. A suplementação com leucina preservou a FEVE dos ratos Wistar submetidos ao tratamento com doxorubicina. \* diferença significativa em relação aos demais grupos. (p=0,01)

Nas comparações feitas entre os grupos foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, com aumento registrado apenas no grupo D (Gráficos 2 e 3).

### Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole

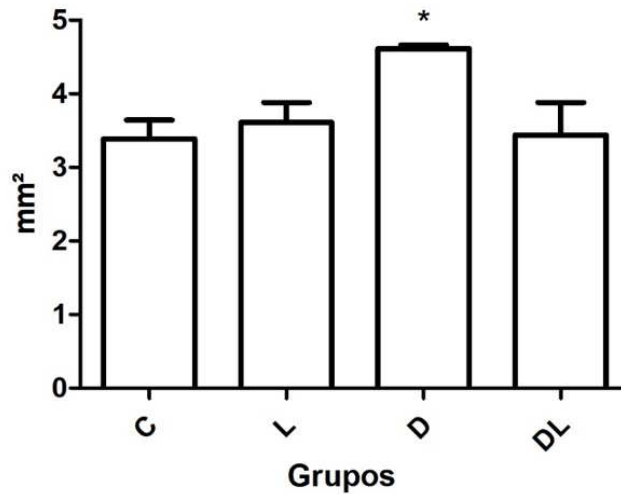


Gráfico 2 - A suplementação com leucina (grupo DL) preservou o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo dos ratos Wistar submetidos ao tratamento com doxorubicina. C:controle, L: leucina, D: doxorubicina, DL: doxorubicina+leucina. \* diferença significativa em relação aos demais grupos. Comparação por meio do modelo linear generalizado e pós teste de Tukey. ( $p < 0,05$ )

### Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole

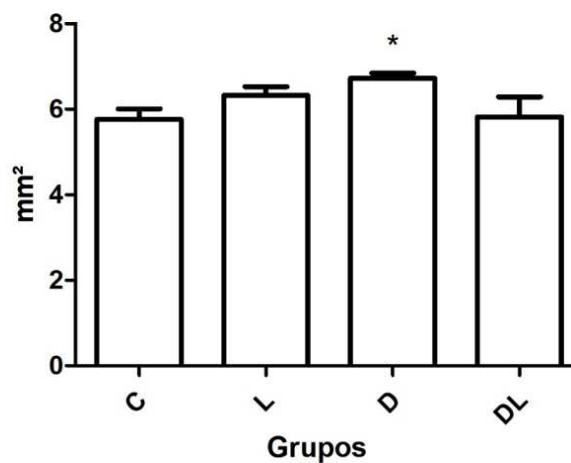


Gráfico 3 - A suplementação com leucina (grupo DL) preservou o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo dos ratos Wistar submetidos ao tratamento com doxorubicina. C:controle, L: leucina, D: doxorubicina, DL: doxorubicina+leucina. \* diferença significativa em relação aos demais grupos. Comparação por meio do modelo linear generalizado e pós teste de Tukey. ( $p < 0,05$ )

## 6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo buscamos verificar os efeitos da associação do uso da doxorubicina com a suplementação dietética de leucina na estrutura de colágeno cardíaco e sua relação com a função ventricular esquerda em ratos Wistar. Com o emprego da metodologia descrita foi possível perceber que a suplementação com leucina atenuou a formação de colágeno no coração e a função cardíaca foi preservada.

A maior concentração de colágeno foi encontrada nos corações dos animais pertencentes ao grupo doxorubicina (Gráfico 1). Resultado similar também foi referido por Takemura e Fujiwara (2007) e Carvalho et al. (2014) que apontam este efeito como sendo uma das condições associadas ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca desencadeada pelas antraciclinas, fato que pode se dever a alterações da complacência da parede ventricular, ou seja, da sua capacidade de se distender na diástole. Esta propriedade do músculo cardíaco depende, em grande parte, da quantidade, da distribuição e da composição das fibras de colágeno encontradas no coração (FRIMM, 1998; HINZ, 2007; MILANEZ, 1995). São várias as funções estruturais da matriz de colágeno cardíaca e uma delas se refere à disposição das suas fibras as quais asseguram o alinhamento de feixes longitudinalmente ao longo dos cardiomiócitos (PELOUCH et al., 1994). Esta distribuição confere grande parte do grau de rigidez característica do tecido e assegura a conformação geométrica das estruturas cardíacas (LOPEZ et al., 2012).

O acúmulo de colágeno produz fibrose cardíaca que é mais pronunciada em doses cumulativas mais elevadas de doxorubicina e próximas de 15 mg/kg (CAMPOS et al., 2011; SUN; ZHOU; KANG 2001; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). Embora a fibrose contribua para a perda da função ventricular, outros mecanismos metabólicos também estão envolvidos e podem ser encontrados mesmo em doses menores (7,5mg/kg) (HERUM et al., 2017). Nosso estudo usou um modelo que, de fato, induziu o efeito cumulativo previsto na literatura como citado acima.

A elevada produção de colágeno cicatricial é decorrente da atividade de síntese exacerbada das células mesenquimais residentes no tecido conjuntivo e que são chamadas de miofibroblastos (GABBIANNI, 2003). Nesta resposta celular ocorre integração de fatores de crescimento, citocinas e hormônios liberados em resposta aos efeitos inflamatórios e que promovem a morte de cardiomiócitos e sua substituição por tecido fibroso (LEASK, 2015). O processo de fibrose intersticial é um componente do processo inflamatório cujos mediadores



induzem a conversão dos fibroblastos quiescentes para a forma diferenciada e ativa e é desencadeada pela ação de agentes patogênicos e tóxicos como a doxorrubicina (NAGARAJU et al., 2019). Estes aspectos precisam ser estudados em modelos especiais que permitam verificar todas as vias de síntese e de degradação de colágeno e tentar identificar oportunidades terapêuticas.

Um achado importante do presente estudo é observado quando se compara o colágeno no grupo DL com o grupo controle (Gráfico 1 e Tabela 4). Nota-se que não houve diferença significativa do colágeno total entre estes grupos, o que evidencia o efeito da leucina atenuando a formação de colágeno observada no grupo D. Como citado anteriormente, a leucina é um aminoácido de cadeia ramificada indutor de síntese proteica muscular mas que parece não estar envolvido na produção de fibrose podendo até modular esta resposta ao processo inflamatório decorrente da doxorrubicina. Esta resposta à leucina pode se dever à redução da produção de colágeno ou ao aumento do processo de sua degradação. Uma via a ser explorada é aquela envolvida com a estimulação de sistemas enzimáticos capazes de provocar a degradação do colágeno já existente, como ocorre quando as metaloproteinases são ativadas (COGNI et al., 2013). Futuros estudos devem ser dirigidos com intuito de se avaliar qual é o comportamento predominante do processo encontrado de aumento da deposição de colágeno em modelos de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina e como a leucina interage nesta resposta reduzindo a quantidade de colágeno. A inibição da fibrose poderia, inclusive, auxiliar no tratamento da cardiotoxicidade e da insuficiência cardíaca atuando por vias ainda inexploradas (FRANGOGGIANNIS, 2019; HERUM et al., 2017; MITREGA et al., 2011).

Sabe-se que na insuficiência cardíaca ocorre ativação transitória de miofibroblastos formando uma fibrose cicatricial que se destina a preservar a estrutura cardíaca e retardar a dilatação das câmaras (KONG et al., 2018). Contudo, os fibroblastos que permanecem ativos podem provocar deposição excessiva de colágeno o que é capaz de reduzir a complacência cardíaca (FRANGOGGIANNIS, 2019; KONG et al., 2018) e se tornar prejudicial ao mecanismo de compensação hemodinâmica. Embora isto seja um agravante potencial, os resultados encontrados de atenuação na produção da matriz colágena pela leucina, mostram que ocorre, paralelamente, uma manutenção da função sistólica no grupo leucina e doxorrubicina (NAGARAJU et al., 2019). Esses dados são ainda reforçados pelos achados de ecocardiografia, demonstrados nos gráficos 2 e 3, onde se vê que o grupo tratado com

doxorrubicina apresenta maiores diâmetros diastólicos e sistólicos, caracterizando a cardiomiopatia dilatada, o que não se repete nos demais grupos.

Por outro lado, há uma complexa sequência de eventos envolvidos na metabolização da doxorrubicina e que são capazes de também conduzir ao processo de dilatação cardíaca. Há um conhecimento parcial destes processos e sabe-se que eles podem ser modulados por ação de macronutrientes e micronutrientes, incluindo aminoácidos e minerais (KIM et al., 2011; KHALILZADEH et al., 2018; LAYMAN, 2003). A sistematização desses conhecimentos pode apontar novas estratégias para controlar e até mesmo reverter o processo de remodelação sem precipitar piora na resposta compensatória cardiovascular. Alguns estudos já identificaram que, tanto em condições normais quanto patológicas, a suplementação dietética com leucina parece ser uma estratégia promissora para amenizar o *turnover* protéico (CHUA; SIEHL; MORGAN, 1979; SHAH et al., 2000; VENTRUCCI; MELLO; GOMES-MARCONDES, 2001). As diferentes alterações do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos advindos de mudanças induzidas pelos aminoácidos de cadeia ramificada são uma realidade que nos leva a pensar na importância de sua utilização como uma intervenção terapêutica coadjuvante para a insuficiência cardíaca (BISWAS; LUKE; THOMAS, 2019; LEHRKE, 2019).

Com relação ainda à complexidade das respostas à doxorrubicina e a cardiotoxicidade induzida, devem ser destacadas a participação de outras variáveis, como a proteína reguladora de ferro, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, níveis de adenosina trifosfato (ATP), prejuízo do efeito reparador de células progenitoras cardíacas, desregulação do metabolismo do cálcio, liberação de mediadores inflamatórios, liberação de óxido nítrico (NO) e disfunção endotelial, ativação do sistema de protease ubiquitina, autofagia e morte celular (FRANGOGGIANNIS, 2019; KONG et al., 2018; RENU et al., 2017). Todas elas podem estar envolvidas nas respostas do coração à agressão do quimioterápico.

Observações feitas em modelos isquêmicos indicam que ocorrem reações de degradação protéica no coração com perda de aminoácidos devido à ativação dos canais iônicos na membrana celular em condições de hipóxia, fato que induz a perda da força de contração cardíaca. Distúrbios nas membranas celulares por atividade de fosfolipases conduzindo a alterações nos canais sódio-dependentes, têm impacto no efluxo de aminoácidos e o aumento dos níveis destes aminoácidos no sangue que ocorre durante a reperfusão tem sido interpretado como resultado de lesões estruturais mediadas pela produção de radicais livres de oxigênio (MARAZZI et al., 2008). Os efeitos tóxicos de espécies reativas de

oxigênio tem sido implicados como sendo a base das lesões cardíacas produzidas pela doxorubicina e cujos efeitos finais resultam em fibrose. Este fato também conduz à necessidade de se avaliar qual é o efeito da leucina no estresse oxidativo no coração.

Algumas estratégias antifibróticas foram testadas anteriormente com relativo sucesso clínico. A fibrose cardíaca induzida por doxorubicina foi reduzida com o uso de flavaglinas, um produto natural extraído da *Aglaia*, planta do gênero das Miliáceas. Entretanto, e diferentemente do encontrado em nosso estudo, a cardiotoxicidade foi induzida neste experimento com dose única de injeção peritoneal de 15 mg/kg (BERNARD et al., 2011) e não pelo efeito cumulativo do medicamento. A ação de outros princípios ativos na redução da fibrose foi confirmada em animais tratados com doxorubicina (5mg/kg) quando administrou-se a tanshinona IIa extraída da sálvia vermelha (JIANG et al., 2013). Estas citações, embora ainda carentes de confirmação científica mais robusta, são colocadas aqui como indicadoras de possibilidades de redução da fibrose cardíaca e sugerem novas pesquisas voltadas a este tema.

Outra estratégia que tem sido usada para controle da fibrose é a prática de exercícios físicos (DE MORAES et al., 2015) os quais têm sido propostos em associação à leucina como estratégia anti-remodelação sob a premissa de que o exercício físico melhore a função ventricular e que a produção de matriz colágena permaneça reduzida. Apesar dos conhecidos benefícios do exercício físico para o coração, o aumento da tensão das fibras cardíacas durante a sua prática impõe aos miofibroblastos um cenário de alta tensão mecânica e as fibras de estresse são ativadas. Nesta situação, a expressão de  $\alpha$ -SMA (actina de músculo liso) torna-se marcadamente aumentada e a síntese de colágeno torna-se exacerbada (KONG et al., 2018) podendo causar mais fibrose. A ação da leucina nesta condição ainda não é bem compreendida porém nosso estudo demonstrou a capacidade deste aminoácido de atenuar a formação de colágeno em outro cenário que não o da prática de exercício físico.

Em nosso estudo foi possível ainda comprovar que houve um prejuízo da função ventricular esquerda no grupo tratado com doxorubicina que é expressado pela queda da fração de ejeção, concordando com os achados de Campos et al. (2011) e Fidale et al. (2018). Este fato não foi encontrado nos demais grupos experimentais (Tabela 4). Em nossos achados fica evidente que o grupo tratado com doxorubicina associada à suplementação dietética com leucina apresentou fração de ejeção próxima aos valores do grupo controle. A fração de ejeção é, em grande parte, o resultado da força e da velocidade de contração ventricular, assim como da complacência ventricular adequada. Como demonstrado nos Gráficos 2 e 3, parece

razoável afirmar que a leucina teve efeito favorável na manutenção da função cardíaca no modelo de doxorubicina ao preservar a fração de ejeção e os diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo, ao mesmo tempo em que atenuou a produção de colágeno.

Alguns fatos adicionais ainda podem ser enumerados. Em primeiro lugar, foi demonstrado, *in vitro*, que a exposição de células cardíacas isoladas de ratos à doxorubicina resulta numa diminuição rápida e seletiva da expressão de genes cardíacos específicos com redução seletiva dos níveis de mRNA para os genes sarcoméricos,  $\alpha$ -actina, troponina I e cadeia leve de miosina, caracterizando um modelo de alto catabolismo proteico (ITO et al., 1990). Em segundo lugar, a perda de capacidade contrátil dos cardiomiócitos sob ação da doxorubicina, *in vitro*, se relaciona com a redução na densidade dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático com efeitos consistentes no desequilíbrio do acoplamento contração-excitação resultando em redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Finalmente, estudos sugerem que a leucina atue como um sinal nutricional para estimular a síntese proteica no coração aumentando a disponibilidade do fator de iniciação eucariótica (eIF4B) e ativando a via p70S6K e mTOR cardíaca (CANEDO et al., 2010; ESCOBAR et al., 2006).

Todos estes fatos apontam no sentido de que a via indutora de síntese proteica pela leucina pode ter atenuado a ação danosa observada no grupo doxorubicina ao mesmo tempo em que reduziu a concentração de colágeno. Estes resultados sugerem uma ação múltipla da leucina como agente inibidor dos eventos catabólicos sobre as proteínas contráteis do coração e redutor da acumulação de colágeno, ambos induzidos pela doxorubicina (WILKINSON et al., 2018).

## 6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estudo demonstrou que a fibrose decorrente do acúmulo de colágeno total produzida pela doxorrubicina pode ser atenuado pela administração de leucina, embora não tenham sido investigadas as vias pelas quais este efeito ocorreu. Algumas destas vias que devem ser analisadas são as do estresse oxidativo no coração, da TGF-beta, a ativação/desativação de miofibroblastos e a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

O estudo se restringiu à análise do comportamento do colágeno total; os subtipos de colágeno também devem ser quantificados devido às suas diferentes propriedades que podem influenciar na remodelação geométrica ventricular.

A identificação de eventuais alterações sobre as cavidades e paredes cardíacas direitas devem ser analisadas em estudos futuros.

Os animais utilizados não apresentavam câncer, fato que pode limitar o resultado obtido pois vieses metabólicos e imunológicos poderiam estar presentes na vigência de neoplasias. O estudo também não testou a hipótese da leucina alterar a ação antitumoral da doxorrubicina, fato que poderia limitar o seu uso clínico.

Novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de se obter respostas a estas intrigantes questões.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia adotada e os resultados encontrados podemos concluir que:

1 . A suplementação dietética com 5% de leucina atenuou o acúmulo do colágeno total no coração de ratos Wistar produzido pela doxorubicina;

2 . A leucina preservou a função ventricular esquerda quando foi administrada em associação com a doxorubicina.

## REFERÊNCIAS

ADÃO, R. 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.

<https://doi.org/10.1016/j.repc.2012.11.002>

AKOLKAR, G. et al. The role of renin-angiotensin system antagonists in the prevention of doxorubicin and trastuzumab-induced cardiotoxicity. **Cardiovasc Ultrasound.**, v.13, n. 18, abr. 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12947-015-0011-x>

ALBINI, A. 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.

<https://doi.org/10.1093/jnci/djp440>

ALEXIEVA, B. et al. Insights into mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity. **J Phys Pharm Adv.**, v. 4, n. 3, p. 342-348, 2014.

<https://doi.org/10.1124/mol.119.115725>

ANTHONY, J. C. 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, mar. 2001.

<https://doi.org/10.1093/jn/131.3.856S>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.11.005>

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

<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.308S>

BARROS, M. V. L. et al. Left ventricular regional wall motion abnormality is a strong predictor of cardiotoxicity in breast cancer patients undergoing chemotherapy.

**Arquivos brasileiros de cardiologia**, São Paulo, v. 112, n. 1, p.50-56, dez. 2018.

<http://www.dx.doi.org/10.5935/abc.20180220>

BERNARD, Y. et al. Flavaglines alleviate doxorubicin cardiotoxicity: implication of Hsp27. **PlosOne**, v. 6, n. 10, p. e25302, out. 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025302>

BISWAS, D.; LUKE, D.; THOMAS, P. Role of branched-chain amino acid-catabolizing enzymes in intertissue signaling, metabolic remodeling, and energy homeostasis. **The FASEB Journal**, v.33, n.8, p.8711-8731, mai, 2019.

<https://doi.org/10.1096/fj.201802842RR>

BONITA, R.; PRADHAN, R. Cardiovascular toxicities of cancer chemotherapy. *Seminars in Oncology*, **ScienseDirect**, v. 40, n.1, p.156-167, abr.2013.  
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2013.01.004>

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.

CAMPOS, E. C. 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.021>

CANEDO, C. S. 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.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00421.2009>

CARON, E. et al. A comprehensive map of the mTOR signaling network. **Mol Syst Biol.**, v.6, n.453. dez. 2010.  
<https://doi.org/10.1038/msb.2010.108>

CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin induced cardiotoxicity: From bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. **Med Res Rev.**, v. 34, p. 106-135, jan. 2014.  
<https://doi.org/10.1002/med.21280>

CHEUNG K. G. et al. Sirtuin-3 (SIRT3) protein attenuates doxorubicin-induced oxidative stress and improves mitochondrial respiration in H9c2 cardiomyocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 17, p. 10981- 10993, abr. 2015.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607960>

CHIRINOS, J. A. Magnetic Resonance Imaging of Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Ready for Prime Time? **Cardiovascular Imaging**, v.12, n.11, p.1-3, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2018.12.019>

CHUA, B.; SIEHL, D. L.; MORGAN, H. E. Effect of leucine and metabolites of branched chain amino acids on protein turn over in heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 17, p. 8358-8362, set. 1979.

COGNI, A. L. et al. Metalloproteinases-2 and-9 predict left ventricular remodeling after myocardial infarction. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v.100, n.4, p. 315-321, Abr. 2013. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20130049>



COSTALUNGA, A.; GAVAZZI, A. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction: The CAPRICORN randomized trial. *Italian heart journal. Supplement: official journal of the Italian Federation of Cardiology*, v. 2, n.11, p.1246-1247, nov. 2001.

CRUZ, B. et al. A leucine-rich diet modulates the mTOR cell signalling pathway in the gastrocnemius muscle under different Walker-256 tumour growth conditions. *BMC câncer*, v. 19, n. 1, p. 349, dec. 2019.  
<https://doi.org/10.1186/s12885-019-5448-0>

DAVIS, T. A. 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.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.2.R334>

DODD, D. A. 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, abr. 1993.  
<https://doi.org/10.1172/JCI116379>

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.

DRAKE, K. J. et al. Amino acids as metabolic substrates during cardiac ischemia. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, v. 237, n.1, p. 1369-1378, 2012.  
<https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012025>

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP - EBCTCG. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*, v. 379, p. 432-444, fev. 2012.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61625-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61625-5)

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.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20070651>

ESCOBAR, J. 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.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00402.2005>

FÁVERO, B.C. **Efeitos da leucina sobre a via da mTOR e da miostatina em cultura celular de miotúbulos.** 55f. 2017. Dissertação (mestrado em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia) - Instituto de Biologia da Iniversidade de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B. Anthracycline-induced cardiotoxicity. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.**, v.6, n.4, p.278-281, out. 2008. <https://doi.org/10.2174/187152508785909474>

FIDALE, T. M. **Efeitos da suplementação de leucina no coração de ratos tratados com doxorubicina.** 2017. 74f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa de pós- Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2017.

FIDALE, T. M. et al. Increased dietary leucine reduces doxorubicin-associated cardiac dysfunction in rats. **Frontiers in physiology**, v. 17, n. 8, p. 1042, jan. 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01042>

\_\_\_\_\_. Action of leucine in heart hypertrophy induced by thyroid hormone in rats. **Bioscience J.**, v. 32, n. 4, p. 1080-1084, ago. 2016. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32378>

FILLMORE, N. et al. Cardiac branched-chain amino acid oxidation is reduced during insulin resistance in the heart. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.**, v. 315, n. 5, p. E1046-52, ago. 2018. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00097.2018>

FRANGOIANNIS, N. G. Can Myocardial Fibrosis Be Reversed?. **Journal of the american college of cardiology.**, v . 73, n. 18, p. 2283-2285, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.10.094>

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

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol.**, v. 200, n.1, p. 500-503, 2003. <https://doi.org/10.1002/path.1427>

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, 1988. <https://doi.org/10.1042/bj2540579>

GIANNI, L. et al. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. **J. Clin. Oncol.**, v.26, n.22, p.3777-3784, ago. 2008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9401>

GIANTRIS, A. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children and young adults. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v.27, n.1, p.53–68, jan. 1998. DOI: 10.1016/s1040-8428(97)10007-5

GILLERON, M. et al. Oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 388, n. 4, p. 727-731, out. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.085>

HAN, B. 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.

HERUM, K. et al. The soft-and hard-heartedness of cardiac fibroblasts: mechano transduction signaling pathways in fibrosis of the heart. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 5, p. 53, mai. 2017.

<https://doi.org/10.3390/jcm6050053>

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **J. Investig. Dermatol.**, v. 127, n.1, p. 526-537, mar. 2007.

<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>

HRDINA, R. et al. Anthracycline induced cardiotoxicity. **Acta Medica**, v. 43, n. 3; 75-82, 2000.

<https://doi.org/10.14712/18059694.2019.117>

ITO, H. 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.

<https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4275>

JEYASEELAN, R. 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.

<https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5828>

JIANG, B. et al. Tanshinone IIA sodium sulfonate protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin in vitro and in vivo. **Food Chem Toxicol.**, v.47, p. 1538-1544, jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.038>

KAWAGUCHI, T. 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. 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. <https://doi.org/10.1002/jcp.21197>

KHALILZADEH, M. et al. Protective effects of magnesium sulfate against doxorubicin induced cardiotoxicity in rats. **Life Sciences.** v. 207, p. 436 - 441jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.022>

KIM, J.Y. 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.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085738>

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.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.500S>

\_\_\_\_\_. 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.  
<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.227S>

KOBAYASHI, H. et al. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophiying rats. **J Nutr.**, v.136, n.1, p.234-236, jan. 2006.  
<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.234S>

KONG, P. et al. Opposing actions of fibroblast and cardiomyocyte Smad3 signaling in the infarcted myocardium. **Circulation.** v. 137, n. 7, p. 707-724, fev. 2018.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029622>

KONSTAM, M. A. et al. Effects of losartan and captopril on left ventricular volumes in elderly patients with heart failure: results of the ELITE ventricular function substudy. **American heart journal**, v. 139, n. 6, p. 1081-1087, jun. 2000.  
<https://doi.org/10.1067/mhj.2000.105302>

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.  
<https://doi.org/10.1093/jn/133.1.261S>

LEASK, A. Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. **Circulation research.**, v. 116, n. 7, p.1269-1276, mar. 2015.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305381>

LEFRAK, E. A. et al. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer.**, v. 32, n. 2, p. 302-314, ago. 1973.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197308\)32:2<302::AID-CNCR2820320205>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197308)32:2<302::AID-CNCR2820320205>3.0.CO;2-2)

LEHRKE, M. SGLT2 Inhibition: Changing What Fuels the Heart. **Journal of the american college of cardiology**, v.73, n.15, p.1945-1947, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.02.023>

LI, D. L.; HILL, J. A. Cardiomyocyte autophagy and cancer chemotherapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.**, v. 71, p. 54-61, jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.007>

LI, J. B.; JEFFERSON, L.S. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. **Biochem Biophys. Acta.**, v. 544, n. 2, p. 351-359, dez. 1978. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90103-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90103-4)

LIM, C. C. et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.9, p.8290-8299, fev. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308033200>

LIN, K. J.; LENGACHER, C. A. Anthracycline Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity in Breast Cancer Survivors: A Systematic Review. In: **Oncology Nursing Forum**, v. 46, n. 5. p. E145-E158, set. 2019. <https://doi.org/10.1188/19.ONF.E145-E158>

LOPEZ, B. et al. Collagen cross-linking but not collagen amount associates with elevated filling pressures in hypertensive patients with stage c heartfailure: Potential role of lysyl oxidase. **Hypertension**, v. 60, n. 3, p. 677-683, 2012. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.196113>

LIPSHULTZ, 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.2629-2636, abr. 2005. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.12.121>

MARAZZI, G. et al. The role of amino acids in the modulation of cardiac metabolism during ischemia and heart failure. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 25, p. 2592-604, set. 2008. <https://doi.org/10.2174/138161208786071227>

MARCHINI, J. S. 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. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v31i1p22-30>

MATA, G. R. da; NAVARRO, F. O efeito da suplementação de leucina na síntese protéica muscular. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v.3, n. 17, p.367 -378, 2009.

MATSUI, Y. et al. Effect of a leucine-enriched essential amino acids mixture on muscle recovery. **Journal of physical therapy science**. v. 31, n. 1, p. 95-101, 2019. <https://doi.org/10.1589/jpts.31.95>

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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.07.012>

MITREGA, K. et al. Beneficial effects of l-leucine and l-valine on arrhythmias, hemodynamics and myocardial morphology in rats. **Pharmacological research**, v. 64, n. 3, p. 218-225, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.04.011>

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, n. 9, p. 1779-1786, 2010. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0632>

MITRY, M. A.; EDWARDS J. G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. **IJC heart & vasculature**, v. 10, p. 17-24, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.11.004>

MIYAGUTI, N. A.; OLIVEIRA, S. C.; GOMES-MARCONDES, M. C. Maternal Leucine-Rich Diet Minimises Muscle Mass Loss in Tumour-bearing Adult Rat Offspring by Improving the Balance of Muscle Protein Synthesis and Degradation. **Biomolecules.** v. 9, n. 6, p. 229, jun. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9060229>

MORAES, W. M. de. et al. Impact of leucine supplementation on exercise training induced anti-cardiac remodeling effect in heart failure mice. **Nutrients.** v. 7, n. 5, p. 3751-3766, mai. 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7053751>

NAGARAJU, C. K. et al. Myofibroblast Phenotype and Reversibility of Fibrosis in Patients With End-Stage Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology.**, v. 73, n. 18, p. 2267-2282, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.02.049>

NOVO, G.; NUGARA, C.; LANCELLOTTI, P. Heart Failure and Left Ventricular Dysfunction. In: Cardiovascular Complications in Cancer Therapy. **Humana Press**, p. 57-69, out. 2019. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93402-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93402-0_7)

OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: Analysis of prevailing hypotheses. **FASEB J.**, v. 4, n. 3, p. 3076-3086, 1990. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.13.2210154>

PELOUCH, V. et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 129, n. 2, p. 101-20, dez. 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00926359>

POLEGATO, B. F. Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina. 73f. 2011. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011. Disponível em: [http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNSP\\_92e220e6579cc8293cd1885531c01052](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNSP_92e220e6579cc8293cd1885531c01052). Acesso em: 18 jun. 2019

RASCHI, E. et al. Anticancer drugs and cardiotoxicity: insights and perspectives in the era of targeted therapy. **Pharmacology & therapeutics.**, v. 125, n. 2, p. 196-218, fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.002>

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. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

REIS FILHO J. R. de A. R. et al. Reverse cardiac remodeling: a marker of better prognosis in heart failure. **Arquivos brasileiros de cardiologia**. São Paulo, v. 104, n.6, p. 502-506, 2015. <https://doi.org/10.5935/abc.20150025>

RENU, K. et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy-An update. **European journal of pharmacology**. v. 818, n.1, p. 241-53, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.043>

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v.44, n.4, p.563-575, out/dez, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000400004>

RYBERG, M. et al. Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology.**, v. 16, n. 11, p. 3502-3508, nov. 1998.. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.11.3502>

SABBAH, H. N. et al. Effects of long-term monotherapy with enalapril, metoprolol, and digoxin on the progression of left ventricular dysfunction and dilation in dogs with reduced ejection fraction. **Circulation**, v. 89, n. 6, p. 2852-2859, jun. 1994. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.6.2852>

SANGOMLA, S. et al. Nanoceria ameliorates doxorubicin induced cardiotoxicity: possible mitigation via reduction of oxidative stress and inflammation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 47, p. 53-62, maio. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.016>

SAWYER, D. 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. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2010.06.007>

SCHWALB, H. 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. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(87\)80571-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(87)80571-0)

SHAH, O. J. 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. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.5.E1185>

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. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.232S>

SONG, X. 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. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00338.2010>

SONGBO, M. et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology letters**, v.1, n.307, p.41-48, fev. 2019. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.02.013

STEINBERG, J. S. et al. Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. **Cancer.**, v.60, n.6 p.1213-1218, set. 1987. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19870915\)60:6<1213::AID-CNCR2820600609>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19870915)60:6<1213::AID-CNCR2820600609>3.0.CO;2-V)

STEWART, B. W. K. P.; WILD, C. P. **World cancer report 2014**. Public Health. Out. 2019.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.

SUN, X.; ZHOU, Z.; KANG, Y. J. Attenuation of doxorubicin chronic toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. **Cancer research**. v. 61, n. 8, p. 3382-3387, abr. 2001.

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



TAKAHASHI, S. 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.  
<https://doi.org/10.1254/jjp.76.405>

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. jun. 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.10.002>

TAN, T. M. D. 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. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1967\)20:3<333::AID-CNCR2820200302>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1967)20:3<333::AID-CNCR2820200302>3.0.CO;2-K)

TONETO, A. T. et al. Nutritional leucine supplementation attenuates cardiac failure in tumour-bearing cachectic animals. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 7, n. 5, p. 577-586, dez. 2016 <https://doi.org/10.1002/jcsm.12100>

URETZKY, G. 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. Disponível em: < <https://europepmc.org/abstract/med/2925356> >. Acesso em: 17 ago. 2019.

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.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000300006>

VIANA, L. R. et al. Leucine-rich diet changes tumor metabolism, reducing glucose consumption and metastasis in Walker 256 tumor-bearing rats. **The FASEB Journal**, v. 33, n. (1\_supplement), p. 652-21, abr. 2019.

VIALE, P. H.; YAMAMOTO, D. S. Cardiovascular toxicity associated with cancer treatment. **CJON.**, v.12, n.4, p.627-638, 2008.  
<https://doi.org/10.1188/08.CJON.627-638>

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.  
<https://doi.org/10.1249/00003677-199800260-00013>

WILKINSON, D. J. et al. Effects of leucine-enriched essential amino acid and whey protein bolus dosing upon skeletal muscle protein synthesis at rest and after exercise in older women. **Clinical nutrition.** v.37, n. 6, p. 2011-2021, dez. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.09.008>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.07.023>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.050>

YOUNG, L. H. 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. <https://doi.org/10.1172/JCI115030>

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

ZHANG, Y. et al. Overexpression of CYP2J2 provides protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 1, p. H37-46, jul. 2009.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00983.2008>

ZORNOFF, L. A. M. et al. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. **Ver. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 371-8, 2002.