



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

**LUCAS COSTA GUIMARÃES**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NA CARDIOTOXICIDADE DE RATOS  
TRATADOS COM DOXORRUBICINA.**

**UBERLÂNDIA – MG**  
**2022**

**LUCAS COSTA GUIMARÃES**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NA CARDIOTOXICIDADE DE RATOS  
TRATADOS COM DOXORRUBICINA.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito obrigatório para obter o título de doutor.

**Linha de pesquisa:** Fisiologia, Diagnóstico, e Tratamento de Doenças

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

**Coorientador:** Prof. Dr. Thiago Montes Fidale

**UBERLÂNDIA – MG**

**2022**

## FICHA CATÁLOGO

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

---

G963e  
2022      Guimarães, Lucas Costa, 1985-  
            Efeitos da suplementação de leucina na cardiotoxicidade de ratos  
            tratados com doxorubicina [recurso eletrônico] / Lucas Costa  
            Guimarães. - 2022.

            Orientador: Elmiro Santos Resende.  
            Coorientador: Thiago Montes Fidale  
            Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
            de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
            Modo de acesso: Internet.  
            Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.5320>  
            Inclui bibliografia.  
            Inclui ilustrações.

            1. Ciências médicas. I. Resende, Elmiro Santos, 1953-, (Orient.). II.  
            Fidale, Thiago Montes, 1979- (Coorient.). III. Universidade Federal de  
            Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV.  
            Título.

---

CDU: 61

Glória Aparecida  
Bibliotecária - CRB-6/2047



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 11 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 3225-8628 - www.ppcsafamed.ufu.br - ppcsaf@famed.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |  |                 |        |                       |        |
|------------------------------------|--|-----------------|--------|-----------------------|--------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Ciências da Saúde  |                 |        |                       |        |
| Defesa de:                         | Tese de Doutorado Nº 013/PPCSA   |                 |        |                       |        |
| Data:                              | 28.07.2022   | Hora de início: | 16:00h | Hora de encerramento: | 19:30h |
| Matrícula do Discente:             | 11913CSD009  |                 |        |                       |        |
| Nome do Discente:                  | Lucas Costa Guimarães  |                 |        |                       |        |
| Título do Trabalho:                | EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NA CARDIOTOXICIDADE DE RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA |                 |        |                       |        |
| Área de concentração:              | Ciências da Saúde  |                 |        |                       |        |
| Linha de pesquisa:                 | 2 - DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DAS DOENÇAS E AGRAVOS À SAÚDE                    |                 |        |                       |        |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA E DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS DEGENERATIVAS DO APARELHO CARDIOVASCULAR   |                 |        |                       |        |

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Profas. Dras. Ivani Pose Martins (UNIFOR-MG), Renata Costa Fortes (ESCS), Ana Lúcia Ribeiro Salomon (ESCS), Alexandre Gonçalves (IMEPAC) e Elmiro Santos Resende (UFU), orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Prof. Dr. Elmiro Santos Resende, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao 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 Doutor.

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 **Alexandre Gonçalves, Usuário Externo**, em 28/07/2022,



às 17:44, 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 **Ivani Pose Martins, Usuário Externo**, em 28/07/2022, às 18:03, 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 **Renata Costa Fortes, Usuário Externo**, em 28/07/2022, às 18:05, 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, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/07/2022, às 18:06, 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 **Ana Lúcia Ribeiro Salomon, Usuário Externo**, em 28/07/2022, às 18:11, 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 **3790251** e o código CRC **46174D8D**.

## DEDICATÓRIA

Eu dedico esta tese de doutorado as minhas avós, Maria dos Anjos e Francisca Guimarães (in memorian), e ao meu avô, Miguel Guimarães, por terem me ensinado, desde cedo, o valor da educação.

Aos meus pais, Ruth Costa e José Renato Guimarães, pelo exemplo de trabalho e de honestidade, que se tornou meu propulsor nas lutas diárias.

Ao meu irmão, Joab Costa, por ser grande incentivador da minha carreira acadêmica.

E, por fim, dedico a minha amada esposa, Mayza, por trilhar cada passo dessa estrada ao meu lado, sendo sempre a minha paz em meio às turbulências da vida.

## AGRADECIMENTOS

*“Alicerçado e edificado nele, transbordando em gratidão.  
Colossenses 2:07”*

Inúmeras foram as lutas, as críticas e as dúvidas, porém, jamais houve o desejo de desistir. A ausência desse desejo somado ao fim de um ciclo tão extenuante é o motivo dos meus agradecimentos.

Agradeço a Deus, todo poderoso, que me guiou e me escolheu dentre tantos para uma titulação que jamais poderia imaginar.

Agradeço à minha família (avós, tios, tias, primos e primas) que mesmo distante se fez presente em oração e em conversas motivadoras durante todo o tempo.

Agradeço aos meus pais, Ruth Alves Costa e José Renato Guimarães, que deram a mim e ao meu irmão uma educação baseada no exemplo da honestidade, no trabalho duro e no desejo de ter uma vida melhor.

Aos meus professores, do ensino fundamental até o doutorado, que foram responsáveis por moldar uma mente hiperativa e confusa que hoje tem a honra de terminar esse ciclo de doutoramento trazendo consigo os ensinamentos de cada um deles.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr Elmiro Santos Resende, pelas orientações, correções, ensinamentos e pelas conversas engrandecedoras, durante toda jornada, não sendo somente um orientador de tese, e sim, um orientador para a vida.

Agradeço ao meu coorientador, professor Dr Thiago Fidale, por me convidar a fazer parte do grupo CARDIOEX e por não se contentar em ser mais um coorientador, se tornando assim um grande amigo.

Agradeço a todos os integrantes do grupo CARDIOEX que me auxiliaram de forma esplêndida em cada passo dessa jornada.

Agradeço ao professor Dr Marcos Neto pelas contribuições que possibilitaram a realização

deste trabalho.

Agradeço ao Dr Paulo Ricardo Lopes e à Doutoranda Talita Pereira que investiram nessa pesquisa como se fossem deles, contribuindo de forma singular para o sucesso desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos/padrinhos/afilhados Alexandre e Juliana e também à Giulia por me abrigarem durante grande parte dessa jornada, me propiciando mais que um teto e uma cama calorosa, mas sim um lar.

Agradeço ao Exército Brasileiro, meus comandantes, superiores, pares e subordinados, que durante esse percurso me auxiliaram, aliviando meu fardo para que pudesse me dedicar mais aos meus estudos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia pela possibilidade de cursar o tão sonhado Doutorado, e em especial à secretaria do PPCSA que mesmo com a pandemia esteve sempre disponível para sanar todas as minhas dúvidas e me orientar em cada momento nos ritos necessários ao projeto.

Agradeço ao meu irmão, Joab Costa Guimarães, que foi o grande idealizador desse sonho, me fornecendo condições de cursar a graduação e o mestrado e me incentivando incondicionalmente na busca pelo doutoramento.

Agradeço à minha esposa, Mayza, por me tolerar, ser minha amiga, companheira e incentivadora, sonhar os meus sonhos, trilhar comigo cada passo dessa extenuante jornada e iluminar com seu sorriso até os dias mais sombrios.

Por fim, agradeço a todos que em algum momento fizeram parte dessa conquista e que por algum descuido esqueci de citar.



## EPÍGRAFE

Os que se encantam com a prática sem a ciência são  
como os timoneiros que entram no navio sem timão nem  
bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

**Introdução:** A doxorubicina é um importante quimioterápico utilizado em oncologia, porém, seu efeito cardiotoxico limita seu uso terapêutico e gera preocupação em relação ao prognóstico dos pacientes. A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada utilizado na suplementação dietética e vêm sendo estudada como uma estratégia para atenuar os efeitos tóxicos da doxorubicina em animais, os quais têm sido atribuídos, pelo menos em parte, ao aumento do estresse oxidativo. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi analisar a ação da leucina na cardiotoxicidade provocada pela doxorubicina em ratos. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos da linhagem Wistar com média de idade de três meses e de peso corporal médio de 274g, os quais foram separados em quatro grupos identificados como Controle (C), Doxorubicina (D), Leucina (L), Leucina + Doxorubicina (LD). Os animais dos grupos D e LD receberam injeções intraperitoneais de cloridato de doxorubicina três vezes por semana, na dose de 1,25 mg/kg cada, ao longo de duas semanas, até atingir a dose cumulativa total de 7,5 mg/kg; os demais grupos receberam injeções intraperitoneais de solução salina, em volume semelhante. Os grupos L e LD receberam dieta com suplementação de 5% de leucina. Foram obtidas medidas de dados corporais dos animais e realizadas análises histopatológicas; foram feitas dosagens de SOD, catalase e AKT - mTOR. A análise da variabilidade da frequência cardíaca foi feita nos grupos C e D. **Resultados:** Os corações dos animais do grupo D apresentaram maior expressão de fibras de colágeno tipo I e total quando comparados aos grupos C, L e LD. Houve menor expressão da catalase cardíaca nos grupos L e LD quando comparados ao controle. **Conclusão:** A doxorubicina aumenta a produção cardíaca de colágeno do tipo I e total; a suplementação com leucina reduz os níveis de colágeno e de catalase no coração o que pode estar ligado à atenuação da cardiotoxicidade via redução do estresse oxidativo. A doxorubicina reduz a variabilidade da frequência cardíaca, com maior ação na via simpática.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo, variabilidade da frequência cardíaca, doxorubicina, cardiotoxicidade, leucina, colágeno, catalase

## ABSTRACT

**Introduction:** Doxorubicin is an important chemotherapeutic agent used in oncology, however, its cardiotoxic effect limits its therapeutic use and generates problems regarding the prognosis of patients. Leucine is a branched-chain amino acid used in dietary supplementation and has been less as a strategy for the adverse effects of oxidative stress, at least they have been attributed to increased stress in animals, oxidized in part have been attributed to increased stress. in animals. **Objectives:** The objective of the study was to analyze the action of leucine on cardiotoxicity by doxorubicin in rats. **Material and Methods:** Wistar strain media with a mean age of three months and body weight of 274g were used, which were separated into four groups designated as Control (C), Doxorubicin (D), Leucine (L), Leucine + Doxorubicin (LD). The animals in groups D and LD received intraperitoneal injections of doxorubicin hydrochloride times a week, at a dose of 1.25 mg/kg each, over two weeks, until reaching a total cumulative dose of 7.5 mg/kg; the other groups received intraperitoneal injections of saline solution, in a similar volume. The L and LD groups received a diet with 5% leucine supplementation. Measures were taken to prevent data from the animals and their topological views were performed; dosages of SOD, catalase and AKT - mTOR were performed. The analysis of heart rate variability was performed in groups C and D. **Results:** The hearts of the animals in group D showed higher expression of type I and total collagen fibers when compared to groups C, L and LD. There was lower expression of cardiac catalase in groups L and LD when compared to control. **Conclusion:** Doxorubicin increases cardiac production of type I and total collagen; Leucine supplementation reduces collagen and catalase levels in the heart, which may be linked to attenuation of cardiotoxicity via reduced oxidative stress. Doxorubicin reduces heart rate variability, with greater action on the sympathetic pathway.

**Keywords:** oxidative stress, heart rate variability doxorubicin, cardiotoxicity, leucine, collagen fibers, catalase

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Figura 1:** Estrutura química da doxorubicina

**Figura 2:** Estrutura química da leucina

**Figura 3:** Eletrocardiograma representando as variações dos intervalos R-R

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**ARTIGO:** Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca em Ratos Tratados com Doxorubicina.

**Figura 1A:** Comparação dos valores das médias da Pressão Arterial Média

**Figura 1B:** Comparação dos valores das médias da Frequência Cardíaca

**Figura 1C:** Comparação dos valores das médias da Pressão Arterial Sistólica

**Figura 1D:** Comparação dos valores das médias do componente LF

**Figura 1E:** Comparação dos valores das médias dos valores do componente LF/HF

**Figura 1F:** Comparação dos valores das médias dos componentes HF

**Figura 2A:** Comparação dos valores das médias do Intervalo R-R

**Figura 2B:** Comparação dos valores das médias do componente 0V

**Figura 2C:** Comparação dos valores das médias do Índice Simpato-Vagal

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**ARTIGO:** Suplementação de Leucina na Cardiotoxicidade Provocada pela Doxorubicina: Efeitos sobre a Expressão da Catalase no Coração de Ratos.

Figura 1. Fotomicrografias de seções coradas com Picrosirius Red demonstrando o potencial antifibrogênico em tecido cardíaco induzido pela administração de doxorubicina. Figuras (A, C, E, G) Fotomicrografias de seções coradas com Picrosirius Red sem filtro de polarização. Figuras (B, D, F, H), fotomicrografias de seções coradas com Picrosirius Red com filtro de polarização (ampliação final 200x). Sob luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I são marcadas em vermelho; o colágeno do tipo III está marcado em verde e a sobreposição dessas duas fibras de colágeno está marcada em amarelo ou laranja.

**Figura 2A:** Comparação dos valores das médias do Colágeno Tipo I.

**Figura 2B:** Comparação dos valores das médias do Colágeno Total.

**Figura 2C:** Comparação dos valores das médias da expressão de Catalase.

**Figura 2D:** Comparação dos valores das médias do peso relativo do coração.

## LISTA DE TABELAS

**ARTIGO:** Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca em Ratos Tratados com Doxorubicina.

**Tabela 1:** Composição dos grupos experimentais e suas características em relação ao tratamento com doxorubicina.

## LISTA DE TABELAS

**ARTIGO:** Suplementação de Leucina na Cardiotoxicidade Provocada pela Doxorubicina: Efeitos sobre a Expressão da Catalase no Coração de Ratos.

**Tabela 1:** Anticorpos específicos utilizados na análise de Western Blotting.

**Tabela 2:** Comparação dos valores das médias e desvio padrão das variáveis histológicas do Colágeno (mm<sup>2</sup>) por grupo.

**Tabela 3:** Comparação dos valores das médias e desvio padrão das variáveis ecocardiográficas.

**Tabela 4:** Comparação dos valores das médias e desvio padrão das variáveis provenientes das análises de Western Blotting.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

|         |   |
|---------|---|
| ROS     | Espécies reativas de oxigênio                           |
| RNS     | Espécies reativas de nitrogênio                         |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                               |
| BCAAs   | Aminoácidos de cadeia ramificada                        |
| mTOR    | Mammalian Target Of Rapamycin                           |
| p70S6k  | Proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA                |
| 4E-BP1  | Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E |
| eIF4G   | Fator de iniciação eucariótico 4G                       |
| HMB     | P-hidroxi P-metilbutirato                               |
| HMG CoA | P-hidroxi + metilglutaril CoA                           |
| OXPPOS  | Fosforilação oxidativa                                  |
| SOD     | Superóxido dismutase                                    |
| CAT     | Catalase  |
| GPx     | Glutathione peroxidase                                  |
| VFC     | Variabilidade da frequência cardíaca                    |
| AKT     | Proteína quinase B                                      |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ARTIGO:** Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca em Ratos Tratados com Doxorubicina.

|              |   |
|--------------|---|
| C            | Controle  |
| D            | Doxorrubicina   |
| L            | Leucina   |
| LD           | Leucina + Doxorrubicina                                 |
| SNA          | Sistema nervoso autônomo                                |
| VFC          | Variabilidade da frequência cardíaca                    |
| REBIR-UFU    | Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia |
| COBEA        | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal             |
| CEUA         | Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU       |
| RMSSD        | Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças       |
| PAP          | Pressão Arterial Pulsátil                               |
| PAS          | Pressão Arterial Sistólica                              |
| PAD          | Pressão Arterial Diastólica                             |
| PAM          | Pressão Arterial Média                                  |
| ECG          | Ecocardiograma  |
| $\Delta$ FC  | Variação da frequência cardíaca                         |
| $\Delta$ PAM | Variação de pressão arterial média                      |
| FCI          | Frequência cardíaca intrínseca                          |
| ISV          | Índice simpato-vagai                                    |
| FCI          | Frequência cardíaca intrínseca                          |
| LF           | Baixa Frequência  |
| LF/HF        | Razão de baixa e alta frequência                        |
| HF           | Alta Frequência   |

VLf      Frequência muito baixa

DOX      Doxorubicina

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ARTIGO:** A Leucina na Cardiotoxicidade Provocada pela Doxorrubicina: em Ratos Wistar: Efeitos sobre a Expressão da Catalase

|           |   |
|-----------|---|
| C         | Controle  |
| D         | Doxorrubicina   |
| L         | Leucina   |
| LD        | Leucina + Doxorrubicina                                 |
| BCAAs     | Aminoácidos de cadeia ramificada                        |
| ROS       | Espécies reativas de oxigênio                           |
| REBIR-UFU | Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia |
| COBEA     | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal             |
| CEUA      | Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU       |
| AIN – 93M | Instituto Americano de Nutrição                         |
| DP        | Dieta padrão  |
| DRL       | Dieta enriquecida com leucina                           |
| VDF       | Volumes diastólico final                                |
| VSF       | Volume sistólico final (VSF)                            |
| FE%       | Fração de ejeção do ventrículo esquerdo                 |
| mTOR      | Mammalian Target of Rapamycin                           |
| OXPHOS    | Fosforilação oxidativa                                  |
| SOD       | Superóxido dismutase                                    |
| CAT       | Catalase  |

AKT

Proteína quinase B

## SUMÁRIO

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO                           | 22 |
| Considerações                        | 23 |
| FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA                | 24 |
| Doxorrubicina e cardiotoxicidade     | 24 |
| Leucina                              | 25 |
| Estresse oxidativo                   | 27 |
| Variabilidade da frequência cardíaca | 27 |
| HIPÓTESE                             | 29 |
| OBJETIVOS                            | 29 |
| Objetivo Geral                       | 29 |
| Objetivos Específicos                | 29 |
| RESULTADOS                           | 30 |
| Artigo 1                             | 30 |
| Artigo 2                             | 43 |
| CONCLUSÃO GERAL                      | 62 |
| REFERÊNCIAS                          | 33 |
| ANEXOS                               | 66 |
| Anexo 1 Parecer CEUA                 | 66 |

## 1 INTRODUÇÃO

A doxorubicina é um antibiótico da família das antraciclinas descrita na década de 50. Foi isolada de culturas de *Streptomyces peucetius*, variante *caesius*, e vem se destacando como um dos mais importantes antitumorais utilizados na oncologia (ADÃO, 2013; RASCHI, 2010). Seu uso, como agente antineoplásico, iniciou-se nos anos 60 para tratamento de diversos tipos de câncer, especialmente tumores sólidos e as neoplasias hematológicas (TAN, 1967).

Apesar de ser utilizada na prática oncológica, desde a década de 60, seu emprego é limitado devido ao seu potencial cardiotoxico e possibilidade de desenvolvimento de resistência à droga (ADÃO, 2013; SAWYER, 2010).

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

Algumas das lesões características da toxicidade miocárdica por doxorubicina são a perda ou fragmentação de miofibrilas, edema muscular, hipertrofia muscular compensatória (YU et al, 2005), fibrose, vacuolização citoplasmática, alteração no tamanho nuclear e necrose celular (PONTES et al, 2010). Assim, quando se suspeita de cardiotoxicidade pela DOX, a biopsia miocárdica é o método diagnóstico definitivo (YU et al, 2005).

A regulação da hipertrofia celular, fibrose, apoptose e metabolismo do substrato no ambiente gerado pela insuficiência cardíaca são complexos, mas evidências sugerem que esses processos podem ser modulados por macronutrientes vitais na dieta, incluindo aminoácidos (LAYMAN, 2003; KIM, 2011). Neste sentido, a leucina, um aminoácido de cadeia alifática ramificada e pertencente ao grupo dos BCAAs (aminoácidos de cadeia ramificada), tem sido estudada em protocolos de suplementação dietética como estratégia para amenizar e/ou reverter o quadro de proteólise cardíaca encontrado em diversas situações clínicas (FIDALE, 2016; KOBAYASHI, 2006).

A suplementação nutricional com leucina, além de aparentemente beneficiar a estrutura do músculo esquelético, como relatado por Salomão e colaboradores (2010 e 2012), também se mostra eficiente no aumento da biogênese mitocondrial em musculatura esquelética e cardíaca, além de preservar o tamanho de fibras musculares, melhorar a

coordenação motora e a resistência física quando associada ao exercício físico (D'ANTONA et al, 2010). Além disso, segundo Tanada e colaboradores (2015), a suplementação nutricional com aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) preserva o peso corpóreo e a função cardiovascular em ratos com caquexia cardíaca, além de aumentar a taxa de sobrevivência destes animais. Cabe ressaltar que a administração oral de leucina produz ligeiro e transitório aumento na concentração de insulina sérica, fato este que contribui de modo permissivo para a estimulação da síntese proteica induzida por este aminoácido (ROGERO e TIRAPÉGUI, 2008).

Em pesquisas experimentais cardiovasculares, os modelos animais nos permitem estudar as cardiopatias e o efeito de intervenções com terapias medicamentosas e alternativas. Neste sentido se situa a cardiomiopatia induzida pela doxorubicina em ratos, situação que permite o estudo da insuficiência cardíaca em seus múltiplos aspectos fisiopatológicos. Apesar dos significativos avanços terapêuticos conseguidos nas últimas décadas, a morbidade por insuficiência cardíaca tem piorado a qualidade de vida e a sua mortalidade continua elevada (VENTRUCCI, 2001).

Neste aspecto, várias tentativas para o controle dos sintomas e da evolução ou reversão da insuficiência cardíaca vêm sendo realizadas proporcionando novos conceitos e estratégias terapêuticas. Evidências sugerem que os BCAAs, e, em especial, a leucina, podem ser benéficos no tratamento de doenças humanas (PITKANEN et al, 2003; ZANCHI, 2009; FIDALE et al, 2018), contudo desconhece-se o efeito dos mesmos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

O atual estudo justifica-se como uma contribuição para um melhor entendimento da fisiopatologia da cardiotoxicidade decorrente do tratamento com doxorubicina e sua resposta à utilização da leucina.

## 1.1 Considerações Iniciais

Esta tese encontra-se formatada de acordo com o modelo alternativo ora proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, o qual determina que os resultados do estudo sejam apresentados em formato de artigo científico. Dessa forma, esta tese encontra-se organizada na seguinte sequência: **Fundamentação Teórica**, a qual está apresentada como forma de revisão da literatura, seguida dos **Objetivos**, em que são

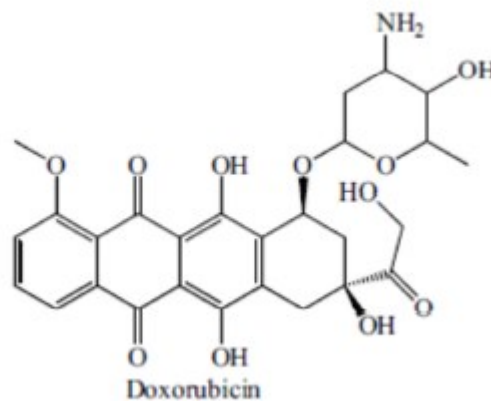


expostos os propósitos deste estudo. No item **Resultados**, tem-se o artigo principal desta tese e outro artigo, os quais foram elaborados conjuntamente com os colegas do grupo de pesquisa CARDIOEX. Na **Conclusão**, tem-se a síntese dos resultados principais deste estudo. Finalizamos com o **Pós-texto** em que foram incluídas as referências bibliográficas, os anexos e apêndices.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 DOXORRUBICINA E CARDIOTOXICIDADE

A doxorubicina é um antibiótico glicosídico da família das antraciclina, isolado a partir do fungo *Streptomyces peucetius var. Caesius*, que possui ação antineoplásica, (NAKAGE e SANTANA, 2008).



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

As propriedades citotóxicas da doxorubicina sobre as células malignas e seus efeitos tóxicos em diversos organismos podem estar relacionados à intercalação dos anéis planos entre os pares de bases nucleotídicas. A intercalação ao DNA inibe a replicação nucleotídica e pode, assim, desencadear quebra do DNA a partir da topoisomerase-II, gerando sérios danos na estrutura terciária do ácido nucleico. A capacidade da doxorubicina em se ligar à membrana celular pode afetar diversas funções. Ao que parece, a doxorubicina pode estar envolvida nas reações de oxidação/redução, com a produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos (YU et al, 2005).

Devido à sua ampla utilização no tratamento de diversos tipos de neoplasias, tornaram-se conhecidas as alterações patológicas e funcionais induzidas no coração pelos antibióticos antraciclínicos, assemelhando-se estas, em vários aspectos, às cardiomiopatias

dilatadas, incluindo-se a degeneração miocárdica com inflamação, fibrose, dilatação e insuficiência cardíaca (SILVA et al, 2005).

Segundo RASCHI (2010), todos os fatores de risco cardiovascular estão intimamente relacionados à cardiotoxicidade crônica e não àquela que surge de forma aguda, que ocorre durante ou imediatamente após a administração da droga, principalmente quando esta é administrada em velocidade rápida, e envolve vasodilatação, hipotensão e arritmias cardíacas.

A progressão e o grau de cardiotoxicidade inerente ao uso destes fármacos são variáveis entre indivíduos e relacionam-se a diversos fatores de risco como idade, gênero, modo de administração do medicamento, dose cumulativa, doenças cardiovasculares prévias, bem como com a própria predisposição genética (RASCHI, 2010), sendo, a dose cumulativa total, o principal fator de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva (RYBERG, 1998).

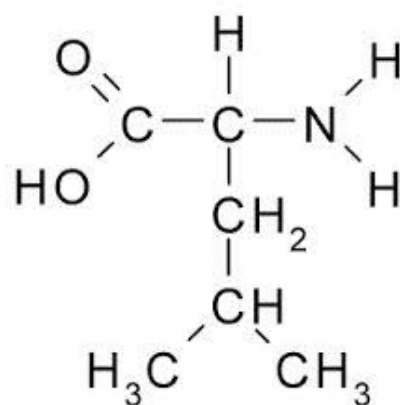
Os mecanismos que geram a cardiotoxicidade pelo uso da doxorubicina não são totalmente conhecidos, porém, acredita-se que a geração em excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), a ligação e dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA), a inibição da topoisomerase-II e o desequilíbrio da estrutura e disfunção mitocondrial sejam os principais mecanismos envolvidos na geração da cardiotoxicidade (ZHANG et al, 2012; ICHIKAWA et al, 2014; GATTO & MOTA, 2021)

A cardiotoxicidade pode ser classificada em dois tipos, conforme o grau de dano celular gerado pela doxorubicina, sendo a cardiotoxicidade do tipo I irreversível, causando a morte celular por necrose ou apoptose e a cardiotoxicidade tipo II, reversível e caracterizada por disfunção celular (ESCHENHAGEN et al, 2011).

## **2.2 LEUCINA**

Os BCAAs (aminoácidos de cadeia ramificada) são utilizados no tratamento de diversas doenças humanas (AQUILANI, 2004; DE BANDT, 2006). No entanto, eventuais benefícios da terapêutica com os BCAAs no tratamento de insuficiência cardíaca não são totalmente conhecidos. Há evidências de que a leucina tem um efeito anabólico direto sobre o turnover de proteínas em corações isquêmicos de seres humanos (YOUNG, 1991;

KAWAGUCHI, 2008).



**Figura 2:** Estrutura química da leucina. (Lehninger, 2014)

A regulação metabólica no coração em condições de insuficiência cardíaca é complexa, podendo em parte, ser modulada através da suplementação de substratos disponíveis na forma de nutrientes inseridos na dieta, incluindo aí os aminoácidos (FILLMORE et al., 2018; KIM et al., 2011; LAYMAN, 2003). Estudos anteriores em animais mostram que a suplementação da dieta com aminoácidos de cadeia ramificada, pode reduzir os sinais de comprometimento do tecido cardíaco em condições de isquemia experimental (URETZKY et al., 1989; SCHWALB et al., 1987) diminuindo a captação miocárdica de lactato. Os aminoácidos também podem ser utilizados como substrato energético no tecido cardíaco e no músculo esquelético (DAVIS et al., 1993; MARAZZI et al., 2008).

Neste contexto, Mata e Navarro (2009), relatam que a leucina, promove a síntese e inibe a degradação proteica via mecanismos envolvendo uma proteína quinase, denominada alvo da rapamicina em mamíferos (Mammalian Target of Rapamycin - mTOR). A mTOR estimula a síntese proteica principalmente por meio de três proteínas regulatórias chave: a proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA (p70S6k), a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G). Tais descobertas mostram que a leucina desempenha papéis importantes além do seu papel metabólico como um aminoácido essencial.

Embora os efeitos metabólicos e regulatórios da leucina sejam conhecidos há mais de 30 anos, não há uma compreensão clara até o presente momento de como ela atua no metabolismo das proteínas. De acordo com Nissen (1997) o metabólito P-hidroxi P-metilbutirato (HMB) é responsável pelos efeitos metabólicos da leucina, propondo-se também que o HMB produzido no metabolismo da leucina seja convertido em P-hidroxi + metilglutaril CoA

(HMGCoA) em alguns tecidos, sendo este substrato utilizado na síntese de colesterol endógeno. Este, por sua vez, se faz necessário para a manutenção da função celular máxima.

Por fim, estudos indicam que a suplementação dietética com leucina em seres humanos, gera uma redução da proteólise em condições de imobilidade e de câncer (ELEY; RUSSELL; TISDALE, 2007; KOBAYASHI et al., 2006; SHAH et al., 2000), sendo uma terapia anticatabólica capaz de inibir a degradação proteica muscular (ZANCHI et al.2009).

### **2.3 ESTRESSE OXIDATIVO**

Define-se o estresse oxidativo como sendo decorrente de um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes e cuja magnitude pode ser estimada observando-se a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante ou o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KAUR e GEETHA, 2006).

A homeostase das ROS e RNS no organismo, é vital para o equilíbrio das funções metabólicas e, por consequência, está ligada à condição de saúde dos animais e do ser humano. As ROS são derivadas de moléculas quimicamente reativas que contem oxigênio, entre as quais se incluem uma variedade de moléculas, como radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e hidroxila (Aguirre et al., 2005). As principais fontes das ROS são as mitocôndrias e constituem subprodutos da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Murphy e Siegel, 2013).

Neste contexto, o radical livre semiquinona produzido a partir da doxorubicina, assume um papel relevante na estimulação do estresse oxidativo; por ser um metabólito tóxico, a semiquinona pode reagir com o oxigênio elevando a produção de ROS, gerando interferência na função mitocondrial, na expressão de proteínas e na oxidação lipídica (EDER et al., 2006).

Com o objetivo de diminuir ou evitar a ação prejudicial das ROS, o organismo dispõe de mecanismos de defesa enzimáticos e não-enzimáticos sendo estes denominados antioxidantes (SEDDON, 2007). O termo antioxidante refere-se a qualquer substância que, mesmo em pequenas concentrações quando comparadas às do substrato oxidável, inibe ou gera uma redução significativa da oxidação produzida por tal substrato (RIBEIRO et al., 2005). Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Os enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Por outro lado, as vias não enzimáticas são formadas por micronutrientes, mais precisamente as

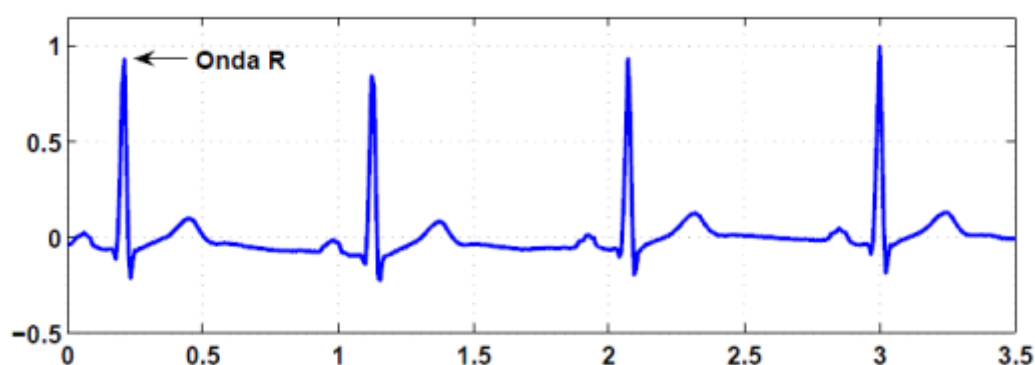
vitaminas A, C e E, e pela glutathiona que é uma molécula constituída pelos aminoácidos cisteína e glicina e ácido glutâmico (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

## 2.4 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

A função cardíaca é mantida numa sequência de eventos denominada de ciclo cardíaco que se inicia em um batimento e continua até o início do próximo. O ciclo cardíaco completo consiste de relaxamento (diástole) e de contração (sístole) que se repetem ao longo do tempo. Porém, os ciclos não são regulares e o coração não funciona como um metrônomo (GUYTON E HALL, 2011).

Esta variabilidade dos ciclos cardíacos depende de vários fatores interligados que podem sofrer interferências derivadas de ajustes necessários frente às situações vivenciadas em condições normais ou frente às alterações patológicas que podem acometer o coração. Dessa forma, pode-se avaliar a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e, a partir de sua análise, inferir as oscilações do sistema nervoso autônomo em indivíduos saudáveis ou acometidos por patologias cardiovasculares ou não cardiovasculares (MALIK et al., 1996).

A VFC é uma medida de avaliação simples e não invasiva que é definida pela duração dos ciclos cardíacos mensurada pelo tempo transcorrido entre duas ondas R consecutivas da eletrocardiograma, o que é denominado intervalo R-R (FIGURA 2) que não é constante (VANDERLEI et al., 2009).



**Figura 2** – Eletrocardiograma apresentando as variações dos intervalos R-R (Rajendra et al., 2006).

O aumento do tônus simpático acarreta na diminuição da variabilidade dos intervalos R-R, enquanto o aumento do tônus parassimpático gera o aumento no grau de variação dos

intervalos R-R (GRUPI; MORAES, 2001; VANDERLEI et al., 2009). Neste contexto, sabe-se que a diminuição na VFC em seres humanos, gerado pelo aumento do tônus simpático, predispõe ao desenvolvimento de arritmias ventriculares potencialmente fatais sendo, esse parâmetro, um fator preditivo de morte súbita em pacientes acometidos por insuficiência cardíaca congestiva e arritmias ventriculares (SPIER; MEURS; WRIGHT, 2002; SPIER; MEURS, 2004a; VANDERLEI et al., 2009).

No presente estudo as alterações da VFC foram analisadas na tentativa de se identificar, indiretamente, processos lesivos miocárdicos induzidos pela doxorrubicina, o que reafirmaria a presença da cardiotoxicidade no modelo experimental empregado.

### **3 HIPÓTESE**

Diante das argumentações apresentadas, nesta tese testamos a hipótese que a cardiotoxicidade produzida em ratos Wistar pela administração de doxorrubicina pode ser atenuada pela adição de uma dieta enriquecida com o aminoácido leucina.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

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

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Analisar os efeitos da doxorrubicina na variabilidade da frequência cardíaca;
- Verificar a função do ventrículo esquerdo após tratamento com doxorubicina e leucina;
- Verificar o teor de colágeno cardíaco após tratamento com doxorrubicina e leucina;
- Verificar o teor de fibras de colágeno tipo I e tipo III cardíaco após tratamento com doxorubicina e leucina;
- Avaliar os efeitos da leucina na via de sinalização da AKT - mTOR após tratamento com doxorrubicina;
- Avaliar os efeitos da suplementação de leucina no estresse oxidativo cardíaco por meio da expressão de SOD e catalase após tratamento com doxorrubicina.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ARTIGO 1

#### **Doxorrubicina reduz a variabilidade da frequência cardíaca em ratos.**

Lucas C. Guimarães<sup>1</sup>, Thiago M. Fidale<sup>2</sup>, Talita C. R. Pereira<sup>3</sup>, Simone R. Deconte<sup>4</sup>, Paulo R. Lopes<sup>5</sup>, Marcos D. Ferreira-Junior<sup>6</sup>, Marcos L. Ferreira-Neto<sup>7</sup>, Willams S. Brito<sup>8</sup>, Rodrigo M. Gomes<sup>6</sup>, Fernanda R. de Souza<sup>9</sup>, Keilah V. N. Cavalcante<sup>6</sup>, Gustavo C. Herrera<sup>10</sup>, Brener M. Armond<sup>11</sup> e Elmiro S. Resende<sup>12</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Medicina Experimental, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Doutorando no departamento de Ciências da Saúde - PGCS, Faculdade de Medicina, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Catalão- UFCAT, Catalão Goiás, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Medicina Experimental, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Doutoranda no departamento de Ciências da Saúde - PGCS, Faculdade de Medicina, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Técnica de Laboratório/Biologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Uberlândia-UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade de Odontologia - FOAr, Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, ICB, Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia, GO, Brasil

<sup>7</sup> UFU-ICBIM departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>8</sup> Estatístico Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina, PI, Brasil

<sup>9</sup> Laboratório de Medicina Experimental, Departamento de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>10</sup> Técnico de laboratório do Hospital Veterinário Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

<sup>11</sup> Professor do curso de Odontologia na Universidade Salgado de Oliveira – UNIVERSO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>12</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - PGCS, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil

#### **\* Correspondência:**

Autor correspondente  
esr\_udi@hotmail.com

**Palavras-chave:** variabilidade da frequência cardíaca doxorrubicina, cardiotoxicidade.

## Resumo

A doxorubicina é um dos quimioterápicos mais utilizados na prática clínica trazendo resultados favoráveis ao tratamento de diversos tipos de tumores malignos, porém sua utilização torna-se limitada devido ao efeito cardiotoxico que está diretamente associado à sua concentração sérica. A cardiotoxicidade acarreta degeneração miocárdica que pode ser progressiva em humanos e em animais. A análise da variabilidade da frequência cardíaca tem diversas aplicações clínicas permitindo avaliar a integridade do sistema cardiovascular e servindo como uma janela para a caracterização das influências do sistema nervoso autônomo no sistema cardiovascular. A análise da variabilidade da frequência cardíaca reflete o comportamento do coração frente a situações fisiológicas e ambientais. O objetivo do presente estudo foi verificar as ações cardíacas geradas pela administração da doxorubicina em ratos, utilizando-se a análise da VFC. No presente estudo foram utilizados 20 ratos da linhagem Wistar, com média de idade de três meses e de peso corporal médio de 274 g, divididos em dois grupos, Controle (C) e Doxorubicina (D). Os animais do grupo D receberam injeções intraperitoneais de doxorubicina, três vezes por semana, ao longo de duas semanas, totalizando seis injeções de 1,25 mg/kg diluídos em solução salina, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (8). Os animais do grupo C receberam volume semelhante de solução salina, no mesmo regime empregado para os animais tratados com doxorubicina. A doxorubicina exerce ação no controle autonômico cardíaco, caracterizada por aumento da atividade simpática com elevação da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica.

## 1 Introdução

A doxorubicina é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de várias neoplasias malignas, principalmente de tumores sólidos, leucemias e linfomas, tanto em adultos, quanto em crianças (1).

Clinicamente, a utilização da doxorubicina está associada ao seu efeito cardiotoxico que é, em geral, proporcional à sua concentração sérica. Em seres humanos a cardiotoxicidade é caracterizada por degeneração miocárdica progressiva quando a dose excede 250 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal. Em doses superiores a 400 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal, já são observados danos permanentes ao miocárdio, caracterizados por apoptose dos miócitos e resultando em fibrose e perda de função cardíaca (2).

A modulação funcional do sistema cardiovascular é desempenhada pelo sistema nervoso autônomo (SNA) que fornece nervos aferentes e eferentes ao coração na forma de terminações simpáticas que se estendem por toda a região do miocárdio e parassimpáticas especialmente direcionadas ao nodo sinusal (3). Os batimentos cardíacos não possuem uma regularidade absoluta e, neste sentido, alterações na frequência cardíaca (FC), definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC), são normais e esperadas, indicando a capacidade do coração em responder aos diversos estímulos fisiológicos e ambientais, como a respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas,



sono e ortostatismo, bem como em compensar desordens induzidas pelas mais diversas doenças (4), (5).

A análise da VFC tem diversas aplicações clínicas que permitem avaliar a integridade do sistema cardiovascular e serve como uma janela para a caracterização da atividade do sistema nervoso autônomo (6). Assim, um coração sem anomalias, com um SNA normal, apresenta variações fisiológicas dos ciclos cardíacos, refletindo o equilíbrio simpátovagal, o que resulta em uma VFC normal. Porém, em se tratando de um coração acometido de alguma cardiopatia, ocorrerão mudanças no controle da regulação neural com desequilíbrio simpátovagal, com conseqüente alteração da VFC (7).

O estudo teve como objetivo verificar as ações cardíacas geradas pela administração da doxorubicina em ratos, utilizando-se a análise da VFC.

## **2 Material e Métodos**

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar, com idade média de três meses e peso corporal médio de 274 gramas, fornecidos pela Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os animais foram alojados em ambiente com temperatura e umidade controladas e expostos a ciclos alternados de claro e escuro com duração de 12 horas cada. Os animais tiveram livre acesso à dieta padrão e à água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados no REBIR-UFU, de acordo com o protocolo de ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU (CEUA), tendo recebido parecer favorável, conforme o registro 045/19 do CEUA.

### **2.1 Protocolo Experimental**

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos: Controle (C) e Doxorubicina (D), com 10 animais em cada grupo, conforme Tabela 1.

O protocolo experimental ocorreu em quatro fases, sendo um período inicial de adaptação dos animais ao ambiente do laboratório e à ração, com duração de 14 dias. O tratamento com doxorubicina foi realizado durante 14 dias, seguido de um período de repouso, com posterior canulação da artéria femoral e da veia femoral e seguido da aquisição dos registros de pressão arterial pulsátil (PAP) e análises das variáveis cardiovasculares. Ao final do experimento ocorreu a eutanásia. O exame e pesagem dos animais foram realizados ao longo de todo o protocolo experimental sendo observadas algumas lesões de pele no local de aplicação da doxorubicina.

## **2.2 Tratamento com Doxorrubicina**

Os animais do grupo D receberam injeções intraperitoneais de doxorrubicina, três vezes por semana, ao longo de duas semanas, totalizando seis injeções de 1,25 mg/kg, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (8). Os animais do grupo C receberam volume semelhante de solução salina, no mesmo regime empregado para os animais tratados com doxorrubicina. Todas as injeções foram preparadas em condições estéreis imediatamente antes das aplicações.

## **2.3 Obtenção das Variáveis Cardiovasculares**

### **2.3.1 Procedimento Cirúrgico**

Os animais dos grupos C e D foram anestesiados com tiopental sódico (25mg/kg, i.v.) após indução com halotano (5%) e mantidos em ventilação com oxigênio a 100%. A artéria femoral e a veia femoral foram canulados para registro da PAP, e infusão de drogas, respectivamente. Para a confecção das cânulas arteriais e venosas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (diâmetro interno de 0,05mm) soldados ao tubo de polietileno PE-10 (diâmetro interno de 0,01mm). Antes do implante, o interior das cânulas foi lavado e preenchido com heparina sódica 50UI/ml e solução fisiológica. As cânulas foram introduzidas através de uma pequena incisão inguinal (esquerda ou direita) na localização ao feixe vaso-nervoso. As extremidades de menor calibre das cânulas (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria e veia femorais. As cânulas foram exteriorizadas e ancoradas no dorso do animal, ao final destes procedimentos os animais foram deixados em decúbito dorsal sobre uma mesa térmica e a temperatura retal mantida entre 36 e 37 °C até recobrem a consciência. Em seguida foram acondicionados em caixas individualizadas.

### **2.3.2 Registro da Pressão Arterial e da Frequência Cardíaca**

Após 24 horas do procedimento cirúrgico, os animais não anestesiados foram conectados a um sistema de aquisição de dados em que o cateter arterial foi acoplado a um transdutor de PA “Disposable BP Transducer (no stopcock) MLT0699” (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA), ligado a um amplificador de sinal “Bridge Amp FE221” (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA); ambos foram conectados a um conversor analógico/digital “PowerLab 8/35” (ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA) com comunicação a um computador contendo o software de interface “LabChart v.7.3.8” (ADInstruments, Colorado

Springs, CO, EUA). Foi realizado um registro basal da PAP em que a Pressão arterial Sistólica (PAS) foi calculada como a média dos picos máximos de PAP, a Pressão Arterial Diastólica (PAD) foi calculada como a média dos picos mínimos de PAP, a Pressão Arterial Média (PAM) foi calculada a partir da PAP como  $1/3$  da PAS somados a  $2/3$  da PAD) a FC foi derivada dos ciclos cardíacos obtidos a partir dos intervalos entre um pico e o outro da PAS (em que a frequência cardíaca (FC) foi calculada da média dos intervalos entre um pico e outro da PAS em milissegundos multiplicados por um minuto em milissegundos ou 60000 ms). Ambos os registros foram realizados simultaneamente e tiveram duração de 10 minutos. Ao final do registro basal, os animais foram submetidos a testes farmacológicos.

### 2.3.3 Administração de fármacos

A administração farmacológica foi dividida em duas fases. A primeira fase foi o teste de sensibilidade do barorreflexo utilizando Fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgicos; 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA; i.v.) para promover aumento de PA e bradicardia reflexa, e Nitroprussiato de Sódio (doador de óxido nítrico; 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA; i.v.), para promover redução da PA e taquicardia reflexa. Os fármacos foram administrados com um intervalo de tempo de 5 minutos entre as administrações, para que houvesse tempo para observar a resposta farmacológica e também impedir interferência das respostas de um fármaco sobre as respostas do fármaco seguinte. Ao final dos registros, os dados foram analisados extraindo valores referentes aos  $\Delta\text{PAM}$  e  $\Delta\text{FC}$  (calculados pela diferença da média de 30" antes e o pico de resposta após administração farmacológica) e o Índice Barorreflexo (calculado pelo quociente de  $\Delta\text{FC}$  por  $\Delta\text{PAM}$ ), sendo o cálculo do índice de sensibilidade barorreflexa, o quociente entre a variação da frequência cardíaca ( $\Delta\text{FC}$ ) pela variação de pressão arterial ( $\Delta\text{PAM}$ ) induzida por resposta pressora (fenilefrina) ou resposta depressora (nitroprussiato de sódio) conforme proposto por Lopes e colaboradores (9).

A segunda fase de administração farmacológica, consiste em dois registros no animal não anestesiado (sendo 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico), em que a atividade simpátovagal foi avaliada pelo duplo bloqueio autonômico (DBA) utilizando Metil-atropina (antagonista colinérgico inespecífico de receptores muscarínicos e musculatura lisa; 4 mg/kg; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA; i.v.) para avaliar apenas a atividade simpática sobre o coração, e Metoprolol (antagonista  $\beta_1$ adrenérgico; 2 mg/kg-1; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA; i.v.) para avaliar apenas a atividade parassimpática sobre o coração. Os fármacos foram administrados com um intervalo de tempo de 15 min entre as

administrações. Tal intervalo ocorreu, para que houvesse tempo para observar a resposta farmacológica e, após a combinação dos dois fármacos, a frequência cardíaca intrínseca (FCI) foi adquirida. A administração intravenosa dos fármacos teve a sequência alterada entre os registros de 24 e 48h. De forma mais específica, foi calculado o índice simpatovagal (ISV), onde é realizada a razão entre a frequência basal de repouso e a frequência cardíaca intrínseca (resultados iguais a 1 indicam equilíbrio da modulação autonômica, resultados maiores que 1 indicam predominância da modulação simpática e resultados menores que 1 indicam predominância da modulação parassimpática para o coração). Para cálculo do índice simpatovagal (razão entre a frequência cardíaca basal de repouso e a frequência intrínseca - FCI) foi utilizada a equação proposta por Negrão e colaboradores (10).

## **2.4 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism versão 8.0. Para tal verificação foram utilizados a comparação de valores da bioestatística descritiva como: média, mediana e coeficiente de variação, bem como teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal foi utilizado o Teste t de Student para comparações entre os grupos C e D. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **3 Resultados**

Nas análises das variáveis cardiovasculares basais foram encontradas diferenças estatísticas significantes na pressão arterial média (8,22%), frequência cardíaca (9,40%) e na pressão arterial sistólica (9,90%) com valores superiores no grupo D (Figuras 1A, 1B e 1C).

Na análise espectral em relação ao Domínio da Frequência, foram encontradas diferenças estatísticas significantes nas variáveis: componente LF (Baixa Frequência) (44,65%), LF/HF (Razão de baixa e alta frequência) (66,32%) com valores superiores do grupo D e componente HF (Alta Frequência) (24,03%) com valores inferiores no grupo D. Não foram encontradas diferenças significantes na análise do componente VLF (Frequência muito baixa), conforme apresentado nas Figuras 1D, 1E e 1F.

Em relação ao Domínio do Tempo, observa-se diferença significativa no componente IRR (10,86%) com valores inferiores no grupo D (Figura 2A). Não foram encontradas diferenças significantes na análise dos componentes Variância e RMSSD. Em relação à Análise Simbólica, observa-se diferença significativa no componente 0V (26,30%) com valores

superiores no grupo D (Figura 2B). Não foram encontradas diferenças significativas na análise dos componentes 1V, 2LV e 2UV.

Em relação à análise do Índice de Sensibilidade Barorreflexa, não foram encontradas diferenças significantes.

Ao analisarmos os componentes da variável Duplo Bloqueio Autonômico, observou-se diferença significativa no componente Índice Simpatovagal (9,17%) com valores superiores no grupo D, conforme apresentado na Figura 2C. Não foram encontradas diferenças significantes na análise dos componentes Efeito Vagal, Efeito Simpático e Frequência Intrínseca de Marca- Passo.

#### **4 Discussão**

A modulação cardíaca simpática e parassimpática sofre influência de estímulos dos barorreceptores, quimiorreceptores, sistema respiratório, vasomotor, termorregulador e sistema renina-angiotensina-aldosterona. Logo, os batimentos e oscilações cardíacas não funcionam de maneira regular, mas sim, em função de uma interação complexa, que resulta numa significativa variabilidade da frequência cardíaca (11). Um coração acometido por alguma cardiopatia sofre mudanças no controle da regulação neural com desequilíbrio simpato-vagal, e, conseqüentemente, diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (7).

Os achados do presente estudo demonstram uma alteração na modulação autonômica da frequência cardíaca, com conseqüente elevação da pressão arterial sistólica, pressão arterial média e da frequência cardíaca nos animais tratados com doxorubicina, indicando uma possível interferência desta substância induzindo maior ação da via simpática e menor atividade parassimpática. Resultados semelhantes também foram relatados por Rocha e colaboradores (12) em mulheres com câncer de mama que receberam quimioterapia.

O componente LF reflete a atividade vagal e componente simpático. O componente HF corresponde à modulação respiratória e também serve de indicador de influência partilhada com predomínio vagal. O componente LF/HF reflete a razão entre baixa e alta frequência, com alterações relativas e absolutas entre componentes simpático e parassimpático caracterizadas pelo balanço simpático/vagal cardíaco sendo estes importantes indicadores na avaliação da variabilidade da frequência cardíaca. A utilização da doxorubicina parece induzir uma maior ação da via simpática e menor ação da via parassimpática, revelados por valores elevados do componente LF e componente LF/HF (13, 14).

A VFC, de maneira geral, descreve as oscilações dos intervalos que ocorrem entre os batimentos cardíacos consecutivos (intervalos R-R) que se relacionam com as influências

do sistema nervoso autônomo sobre o nodo sinusal (7, 3, 15, 16). Intervalos R-R normais refletem uma boa VFC e conseqüente aumento da atividade parassimpática (16). Por outro lado, a elevação da frequência cardíaca (FC) e do componente 0V, revela uma maior ação da via simpática e menor ação da via parassimpática (17, 18).

O índice simpato-vagal é representado por atuação dos neurotransmissores noradrenalina e acetilcolina sobre o ritmo cardíaco, o que provoca oscilações na frequência cardíaca (FC) (19), caracterizado por alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo (SNA), estando sua elevação relacionada com maior ação da via simpática (20).

Este efeito evidencia a presença da cardiotoxicidade produzida pelo doxorrubicina no nosso modelo experimental, além de indicar que a atividade simpática encontra-se exacerbada na sua fisiopatologia.

## **5 Limitações do estudo**

As limitações ao presente estudo são inerentes ao modelo experimental que traz consigo a dificuldade da generalização dos resultados para outros cenários. Por se tratar de um modelo invasivo, ele traz consigo alterações decorrentes do procedimento cirúrgico e que caracterizam um aumento do grau de estresse que poderia, por sua vez, alterar o resultado obtido pela análise da variabilidade da FC.

## **Conclusão**

A doxorrubicina exerce ação no controle autonômico cardíaco caracterizada por aumento da atividade simpática com elevação da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica.

## **7 Conflito de Interesse**

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## **8 Contribuições dos Autores**

LCG, TCRP, TMF e ESR: Planejamento dos experimentos, LCG, TCRP e TMF: Realização dos experimentos, LCG, TCRP, PRL, FRS e GCH: Coleta de dados, LCG, TCRP, TMF, RMG, MDFJ, KVNC, FBRM, BMA e WSB: Análise dos dados, RMG, ESR, SRD, GCH e MLFN: Fornecimento do espaço, reagentes, técnicos e suporte de laboratório, LCG: Escrita do

manuscrito, LCG, TCRP, SRD, WSB, PRL, TMF, BMA e ESR: Edição do manuscrito, ESR: Supervisão do estudo. Todos os autores contribuíram com o artigo.

## 9 Referências

Sá, M. P. B. O. et al. Cardiotoxicidade e quimioterapia. Revista Brasileira de Clínica Médica. (2009) 7:326-330.

Barret-Lee, P. J.; Dixon, J. M.; Farrell, C.; Jones, A.; Leonard, R.; Murray, N.; Palmieri, C.; Plummer, C. J.; Stanley, A.; Verrill, M. W. Expert opinion on the use of anthracyclines in patients with advanced breast cancer at cardiac risk. Annals of Oncology, Dordrecht. (2009) 20:816-827. doi: 10.1093/annonc/mdn728.

[h ttps://doi.org/10.1093/annonc/mdn728](https://doi.org/10.1093/annonc/mdn728)

Aubert AE, Seps B, Beckers F. Heart rate variability in athletes. Sports Med. (2003) 33:889-919. doi: 10.2165/00007256-200333120-00003 [h ttps://doi.org/10.2165/00007256-200333120-00003](https://doi.org/10.2165/00007256-200333120-00003)

Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. Med Bio Eng Comput. (2006) 44:1031-51. doi: 10.1007/s11517-006-0119-0

[h ttps://doi.org/10.1007/s11517-006-0119-0](https://doi.org/10.1007/s11517-006-0119-0)

Santos MDB, Moraes FR, Marães VRFS, Sakabe DI, Takahashi ACM, Oliveira L, et al. Estudo da arritmia sinusal respiratória e da variabilidade da frequência cardíaca de homens jovens e de meia-idade. Rev Soc Cardiol. (2003) 13:15-24.

Buccelletti, F. et al. Heart rate variability and myocardial infarction: systematic literature review and metaanalysis. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. (2009) 13:299-307.

Vanderlei, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica Rev Bras Cir Cardiovasc. (2009) 24:205-217. doi:10.1590/S0102-76382009000200018

[h ttps://doi.org/10.1590/S0102-76382009000200018](https://doi.org/10.1590/S0102-76382009000200018)

Lopes, P. R. et al. Association of exercise training and angiotensin converting enzyme 2 activator improves baroreflex sensitivity of spontaneously hypertensive rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. (2016) 49:9. doi: 10.1590/1414-431X20165349.

[h ttps://doi.org/10.1590/1414-431x20165349](https://doi.org/10.1590/1414-431x20165349)

Negrão, C. E., Urbana, M. and Rondon, P. B. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. Rev Bras Hipertens. (2001) 8:89-95.

Fidale TM, Gonçalves A, Haddad EG, et al. Action of leucine in heart hypertrophy induced by thyroid hormone in rats. Bioscience J. (2016) 32:4. doi: 10.14393/BJ-v32n4a2016-32378. [h ttps://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32378](https://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32378)

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. (2011).

Rocha, R. P. G. et al. Comparação da variabilidade da frequência cardíaca entre mulheres com câncer de mama e mulheres saudáveis: um estudo cego. *Fisioterapia Brasil*. (2018) 18:670. 10.33233/fb.v18i6.2045.

[h ttps://doi.org/10.33233/fb.v18i6.2045](https://doi.org/10.33233/fb.v18i6.2045)

Novais LD, Sakabe DI, Takahashi ACM, Gongora H, Taciro C, Martins LEB, et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. *Rev Bras Fisioter*. (2004) 8:207-13.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*. (1996) 93:1043-65.

Pumpela J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *Int J Cardiol*. (2002) 84:1. doi: 10.1016/s0167-5273(02)00057-8

[h ttps://doi.org/10.1016/S0167-5273\(02\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(02)00057-8)

Weerapong, Pornratshanee & Hume, Patria & Kolt, Gregory. The Mechanisms of Massage and Effects on Performance, Muscle Recovery and Injury Prevention.

*Sports medicine*. (2005) 35:235-56. doi: 10.2165/00007256-200535030-00004

[h ttps://doi.org/10.2165/00007256-200535030-00004](https://doi.org/10.2165/00007256-200535030-00004)

Malpas SC. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev*. (2010) 90:513-57. doi: 10.1152/physrev.00007.2009

[h ttps://doi.org/10.1152/physrev.00007.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2009)

Porto, Andrey A. et al. Symbolic analysis of heart rate variability and its interaction with p-value of normality tests applied on RR intervals. *MedicalExpress*. (2016) 3:2. doi:10.5935/MedicalExpress.2016.02.04.

[h ttps://doi.org/10.5935/MedicalExpress.2016.02.04](https://doi.org/10.5935/MedicalExpress.2016.02.04)

Cepeda FX, Toschi-Dias E, Maki-Nunes C, Rondon MU, Alves MJ, Braga AM, Martinez DG, Drager LF, Lorenzi-Filho G, Negrao CE, Trombetta IC. Obstructive Sleep Apnea Impairs Postexercise Sympathovagal Balance in Patients with Metabolic Syndrome. *Sleep*. (2015) 38(7):1059-66. doi: 10.5665/sleep.4812. PMID: 25669187.

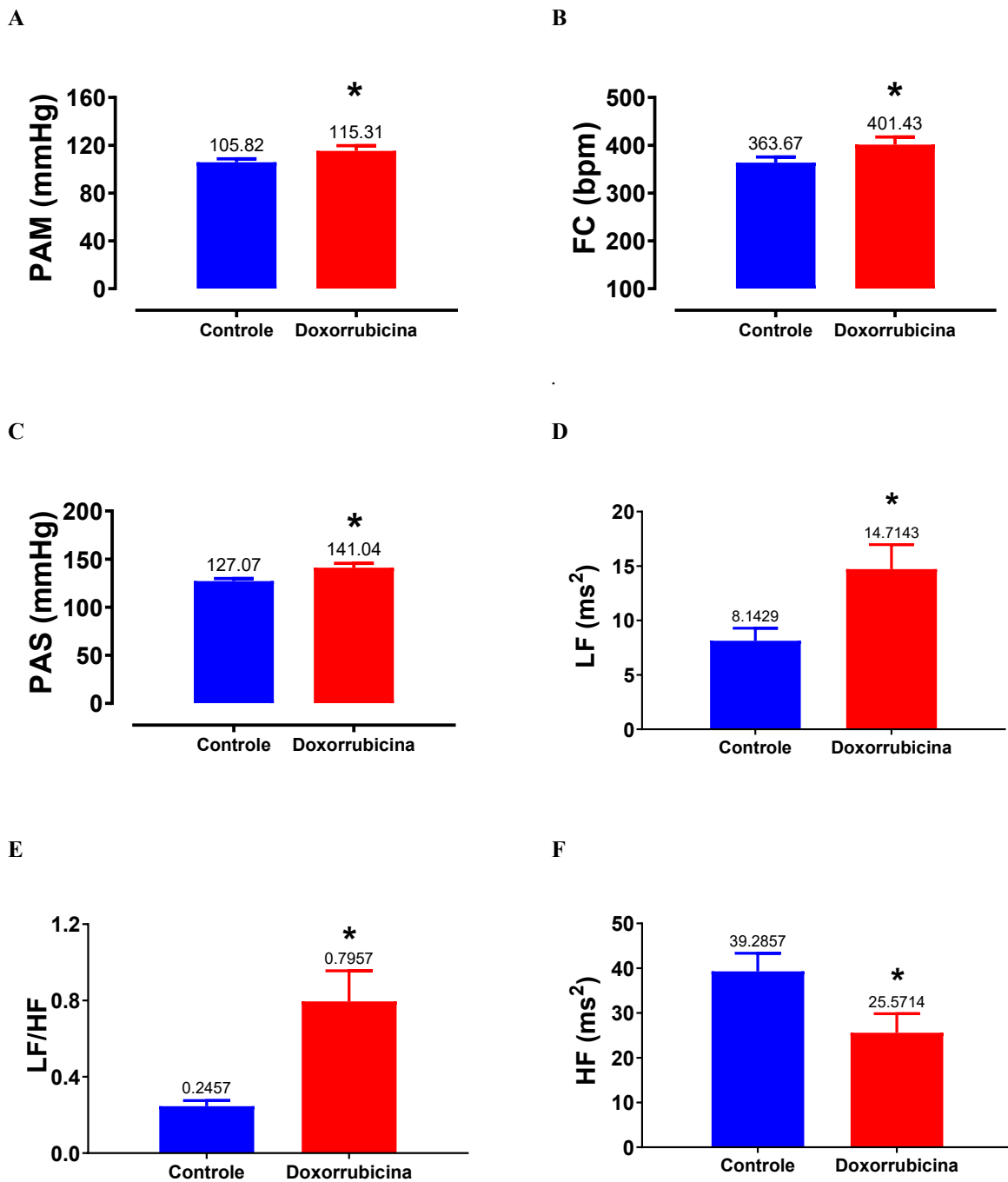
[h ttps://doi.org/10.5665/sleep.4812](https://doi.org/10.5665/sleep.4812)

Novais, L.D. & Sakabe, D.I. & Takahashi, Anielle & Gongora, H. & Taciro, C. & Martins, Luiz Eduardo Barreto. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. *Rev Bras Fisioter*. (2004) 8: 207-213.

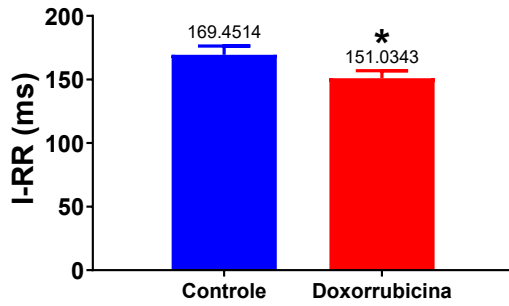
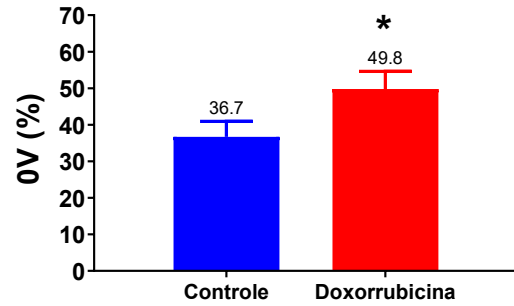
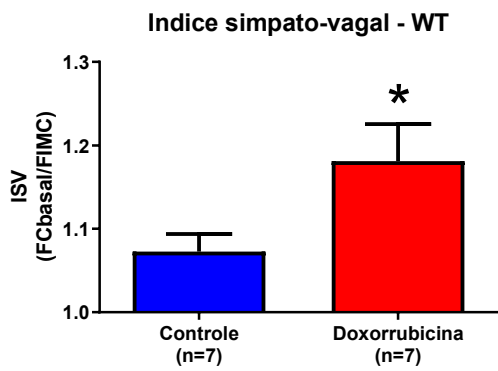


## ANEXOS

| <b>Tabela 1 Composição dos grupos experimentais e suas características em relação ao tratamento com doxorubicina e suplementação com leucina</b> |                |                     |  |  |
|--|----------------|---------------------|--|--|
| <b>Data</b>  | <b>GRUPO C</b> | <b>GRUPO D</b>      |  |  |
| <b>Número de Animais</b>   | <b>10</b>      | <b>10</b>           |  |  |
| <b>Tratamento com Doxorubicina</b>   | <b>X</b>       | <b>Doxorubicina</b> |  |  |
| <b>Avaliação da VFC</b>  | <b>VFC</b>     | <b>VFC</b>          |  |  |
| <b>C = Controle; D = Doxorubicina; L = Suplementação com Leucina; Grupo LD = Tratamento com Doxorubicina e Suplementação com Leucina.</b>        |                |                     |  |  |



**FIGURA 1:** Comparação dos valores das médias da pressão arterial médias dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (A); Comparação dos valores das médias da frequência cardíaca dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (B); Comparação dos valores das médias da pressão arterial sistólica dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (C); Comparação dos valores das médias do componente LF dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (D); Comparação dos valores das médias dos valores do componente LF/HF dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (E); Comparação dos valores das médias do componente HF dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (F). Para valores de  $p < 0,05$ .

**A****B****C**

**FIGURA 2:** Comparação dos valores das médias do Intervalo R-R dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (**A**); Comparação dos valores das médias do componente 0V dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (**B**); Comparação dos valores das médias do Índice Simpto-Vagal dos animais do grupo Controle e Doxorubicina (**C**); Para valores de  $p < 0,05$ .

## 5.2 ARTIGO 2

### **Suplementação de Leucina na Cardiotoxicidade Provocada pela Doxorrubicina: Efeitos sobre a Expressão da Catalase no Coração de Ratos.**

Lucas C. Guimarães<sup>1</sup>, Thiago M. Fidale<sup>2</sup>, Talita C. R. Pereira<sup>3</sup>, Simone R. Deconte<sup>4</sup>, Paulo R. Lopes<sup>5</sup>, Marcos D. Ferreira-Junior<sup>6</sup>, Marcos L. Ferreira-Neto<sup>7</sup>, Willams S. Brito<sup>8</sup>, Rodrigo M. Gomes<sup>6</sup>, Fernanda R. de Souza<sup>9</sup>, Keilah V. N. Cavalcante<sup>6</sup>, Gustavo C. Herrera<sup>10</sup>, Franciyelle B. R., de Moura<sup>11</sup> e Elmiro S. Resende<sup>12</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Medicina Experimental, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Doutorando no departamento de Ciências da Saúde - PGCS, Faculdade de Medicina, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Catalão- UFCAT, Catalão Goiás, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Medicina Experimental, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Doutoranda no departamento de Ciências da Saúde - PGCS, Faculdade de Medicina, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Técnica de Laboratório/Biologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Uberlândia-UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade de Odontologia - FOAr, Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>6</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, ICB, Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia, GO, Brasil

<sup>7</sup> UFU-ICBIM departamento de Fisiologia e biofísica, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>8</sup> Estatístico Universidade Federal do Piauí-UFPI, Teresina, PI, Brasil

<sup>9</sup> Laboratório de Medicina Experimental, Departamento de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>10</sup> Técnico de laboratório do Hospital Veterinário Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

<sup>11</sup> Departamento de Histologia, ICB, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>12</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - PGCS, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, Uberlândia, MG, Brasil

#### **\* Correspondência:**

Autor correspondente  
esr\_udi@hotmail.com

**Palavras-chave:** doxorrubicina, cardiotoxicidade, leucina, colágeno, catalase.

## Resumo

A doxorubicina é um dos mais importantes antitumorais utilizados na oncologia, porém seu efeito cardiotoxico limita seu uso terapêutico e gera preocupação em relação ao prognóstico dos pacientes. A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada utilizado na suplementação dietética, que vem sendo estudada como uma estratégia para atenuar os efeitos tóxicos da doxorubicina em animais, os quais têm sido atribuídos, pelo menos em parte, ao aumento do estresse oxidativo. Existem várias maneiras de estimar o estresse oxidativo nos diversos órgãos e uma delas é analisar a expressão de catalase. O objetivo deste estudo foi analisar a ação da leucina nos níveis de catalase no coração de ratos após administração de doxorubicina. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com média de idade de 3 meses e peso corporal médio de  $274 \pm 18,82$  gramas, divididos em 4 grupos, Controle (C), Doxorubicina (D), Leucina (L), Leucina + Doxorubicina (LD). Os animais dos grupos D e LD receberam injeções intraperitoneais de cloridato de doxorubicina, três vezes por semana, com 1,25 mg/kg cada, ao longo de duas semanas, até atingir a dose cumulativa total de 7,5 mg/kg. Os corações dos animais do grupo D apresentaram maior expressão de fibras de colágeno tipo I e total quando comparados aos grupos C, L e LD. A análise por Western Blotting mostrou menor expressão da catalase cardíaca nos grupos L e LD quando comparados ao controle. Em conclusão, a suplementação com leucina reduz os níveis de catalase no coração isoladamente e também após tratamento com doxorubicina.

## 1 Introdução

A doxorubicina é um antibiótico da família das antraciclina descoberto na década de 50 tendo sido isolado de culturas de *Streptomyces peucetius*, variante *caesius*, revelando-se um dos mais importantes agentes antitumorais utilizados clinicamente (1, 2) no tratamento de vários tipos de câncer, destacando-se as neoplasias hematológicas e tumores sólidos (3).

Apesar de ser usada desde a década de 60, sua utilidade clínica é limitada devido ao seu potencial cardiotoxico (4) responsável por uma considerável morbimortalidade (1, 2). Os fatores de risco cardiovascular estão mais intimamente relacionados à ocorrência de cardiotoxicidade crônica e menos com aquela que surge de forma aguda, durante ou imediatamente após a administração do medicamento, e que cursa com vasodilatação, hipotensão e arritmias (2). A dose cumulativa total do fármaco é o principal fator de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca crônica (7).

As lesões características na cardiotoxicidade provocada pela doxorrubicina são a perda ou fragmentação de miofibrilas, edema muscular, hipertrofia muscular compensatória (5), fibrose, vacuolização citoplasmática, necrose e alteração no tamanho nuclear (6).

A hipertrofia celular, fibrose, necroapoptose, netose e alterações no metabolismo do substrato energético na insuficiência cardíaca têm mecanismos complexos, mas evidências sugerem que esses processos podem ser modulados por macronutrientes vitais da dieta, incluindo aminoácidos (8, 9). Embora o conhecimento acumulado ainda seja esparso, os BCAAs (aminoácidos de cadeia ramificada) têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças humanas (10, 11, 12) e seus benefícios terapêuticos no tratamento de insuficiência cardíaca são pouco conhecidos, havendo algumas evidências de que a leucina tem um efeito anabólico direto sobre o *turnover* de proteínas em corações isquêmicos de seres humanos (13).

Outro dano provocado pelo tratamento com doxorrubicina é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de antioxidantes. As ROS são resultantes do metabolismo celular sendo altamente reativas, com capacidade de danificar estruturas celulares alterando suas funções (14). O desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio denomina-se estresse oxidativo (15).

A suplementação nutricional com leucina, além de beneficiar a estrutura do músculo esquelético (16, 17), também se relaciona ao aumento da biogênese mitocondrial na musculatura esquelética e cardíaca, além de preservar o tamanho de fibras musculares, melhorar a coordenação motora e a resistência física, aspectos importantes no tratamento da síndrome de insuficiência cardíaca. Estes efeitos tornam-se mais importantes quando a leucina é associada ao exercício físico (18). Além disso, a suplementação nutricional com os BCAAs preserva o peso corporal e a função cardiovascular em ratos com caquexia cardíaca, além aumentar a taxa de sobrevivência destes animais amenizando ou mesmo revertendo o quadro de proteólise encontrado em diversas situações clínicas (19, 20) a qual é atribuída, em parte, ao aumento do estresse oxidativo.

O objetivo deste estudo foi analisar a ação da leucina nos níveis de catalase no coração de ratos após administração de doxorrubicina.

## **2 Material e Métodos**

Foram utilizados 41 ratos machos da linhagem Wistar, com média de idade de três meses e peso corporal médio de 274 gramas, fornecidos pela Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os animais foram alojados em ambiente com

temperatura e umidade controladas e expostos a ciclos alternados de claro e escuro, com duração de 12 horas cada. Os animais tiveram livre acesso à dieta padrão (AIN – 93M) e à água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados no REBIR-UFU de acordo com o protocolo de ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU (CEUA), tendo recebido parecer favorável, conforme o registro 045/19 do CEUA.

## **2.1 Protocolo Experimental**

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Controle (C), Doxorubicina (D), Leucina (L), Leucina + Doxorubicina (LD).

O protocolo experimental foi composto por quatro etapas. Os animais foram inicialmente adaptados ao ambiente do laboratório e à ração por 14 dias. Após este período, os animais dos grupos D e LD foram tratados com doxorubicina realizado durante 14 dias; a dieta suplementada com leucina foi mantida nos grupos L e LD, durante todo o experimento. No final do experimento, os animais foram examinados ecocardiograficamente e, posteriormente, ocorreu a eutanásia. O exame e a pesagem dos animais foi realizada ao longo de todo o protocolo experimental.

## **2.2 Protocolo de suplementação com leucina**

A dieta foi adquirida e formulada para atender aos requisitos nutricionais de um rato adulto seguindo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN – 93M). As dietas com leucina foram modificadas no Laboratório de Medicina Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, realizando-se a adição de 5,0 g/100 g (5%) de leucina. Na manipulação da ração foram utilizados utensílios exclusivos e com todos os cuidados necessários para o controle de riscos de contaminação química e biológica. Os ingredientes foram misturados dos menores para os maiores volumes e todos os ingredientes foram passados em peneira até completa homogeneização. Após serem misturados, foi acrescentada água filtrada até o ponto de se obter massa homogênea e firme. A massa foi moldada em forma de *pellets* e dessecados em estufa de ar circulante a 60°C, por 12 horas.

Após resfriamento, a ração modificada foi acondicionada em sacos plásticos escuros em câmara fria até o consumo.

A ração foi distribuída entre os quatro grupos experimentais, sendo que os grupos C e D receberam dieta padrão (DP) e os grupos L e LD receberam dieta enriquecida com leucina (DRL).

### **2.3 Tratamento com Doxorrubicina**

Os animais dos grupos D e LD receberam injeções intraperitoneais de doxorrubicina, três vezes por semana, ao longo de duas semanas, totalizando seis injeções de 1,25 mg/kg cada, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (21). Os grupos C e L receberam solução salina estéril em volume injetado e modo de aplicação igual ao dos grupos D e DL.

### **2.4 Análise ecocardiográfica**

Aspectos morfológicos e funcionais do coração foram analisados por meio de ecocardiografia transtorácica realizada no 35º dia após o início do experimento. Para realização do ecocardiograma todos os animais foram anestesiados utilizando-se 0,1 ml/100 g de cetamina a 10% (Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba- SP, Brasil), associada à xilazina a 2% (Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia-SP, Brasil). O ecocardiograma foi realizado utilizando-se equipamento ESAOTE, modelo *MyLab VET 30 Gold* registrando imagens uni e bidimensionais, e um transdutor de 8,0 MHz de 3,0 cm de profundidade com um ângulo setorial de 75°. O diâmetro do ventrículo esquerdo foi obtido no modo M, em corte direito transversal parasternal obtido no plano das cordas tendíneas. As mensurações da espessura das paredes e dos diâmetros das cavidades foram feitas durante a diástole (DIVEd) e sístole (DIVEs) e utilizadas para o cálculo da fração de encurtamento (Delta D %) pela fórmula  $DELTA D\% = [(DIVEd - DIVEs) / DIVEd] \times 100$ . Nestes mesmos cortes foram medidos os volumes diastólico final (VDF) e sistólico final (VSF), pelo método de Teichholz (22) para posterior cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE%) pela fórmula  $FE\% = [(VDF - VSF) / VDF] \times 100$ .

### **2.5 Análise Histopatológica**

Os corações retirados foram lavados em solução salina gelada a 0,9%, secos em papel de filtro, pesados em balança de precisão e colocados em solução de formol (10%), por 48h. Posteriormente, foram cortados transversalmente e seguiram-se os estágios de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. O segmento médio-proximal foi seccionado em cortes de 5 µm e corados para colágeno com Picosirius Red, conforme



apresentado na Figura 1. Os cortes histológicos corados foram analisados ao microscópio óptico Nikon TS 100 e as imagens digitalizadas em sistema de microcâmara Optcam, utilizando-se objetiva de 10x e com aumento final de 100x. Em cada corte da parede livre do ventrículo esquerdo foi feito o registro fotográfico de 10 campos. A luz polarizada no microscópio óptico foi utilizada para a identificação dos subtipos I e III de colágeno. A quantificação em percentagem de colágeno total foi feita com o auxílio da ferramenta threshold do software ImageJ 1.6.0\_24. Essa ferramenta permite delimitar a percentagem de área de colágeno depositada na matriz extracelular em relação à área total do campo avaliado.

## **2.6 Quantificação de Proteínas**

As amostras de coração foram processadas para quantificação de Akt- mTOR por Western Blotting. Também foram quantificadas as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase.

Para estas análises, amostras de coração foram imersas em tampão de lise a 4°C (NaCl 150 mM, KCl 2,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, IGEPAL CA-630 8,8 mM, Desoxicolato de sódio 12 mM, SDS 3,46 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, 1 mM PMSF, 2,34 µM Leupeptina, 0,154 µM Aprotinina, 1,45 µM Pepstatina, pH 8) e moído em um homogeneizador de vidro. Os homogeneizados foram centrifugados a 12000g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína quantificada pelo método de Bradford. Alíquotas contendo 20 µg de proteína, foram desnaturadas (95°C por 3 minutos) em tampão Laemmli (50 mM, pH 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% Glicerol, 0,001% azul de bromofenol) e submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE, Little Chalfont, Berckinghamshire, UK). As membranas foram bloqueadas em solução de leite bovino desnatado a 5% e incubadas a 4°C durante a noite com os anticorpos primários descritos na Tabela 1. Em seguida, foram incubados por 90 minutos em temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com HRP (Peroxidase de rábano) para detecção dos complexos por quimioluminescência (NOVEX ECL, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A quimioluminescência foi detectada por um sistema de aquisição de imagens (ImageQuant LA 4000 series, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA), e a intensidade das bandas foi quantificada por densidade óptica relativa usando o software FIJI. Todas as proteínas foram normalizadas com referência a GAPDH ou Beta-Actina. Os resultados de cada região analisada foram comparados com a média dos resultados do grupo controle e expressos em % do controle.

Os resultados Média  $\pm$  Erro Padrão da Média ( $M \pm SEM$ ) foram comparados entre os grupos utilizando ANOVA one-way com nível de significância estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 2.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism versão 8.0. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (DP). Em seguida, para verificar a normalidade dos dados, foi realizado o teste de Shapiro Wilk.

A análise dos dados paramétricos foi realizada pelo teste ANOVA one-way com teste post-hoc de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 3 Resultados

No exame dos animais foram observadas lesões de pele no local de aplicação da doxorrubicina. Ao longo do experimento houve perda de quatro animais do grupo C, quatro do grupo D e um do grupo LD. Os animais morreram no momento da aplicação da anestesia para realização do ecocardiograma e não foram incluídos na amostra final.

Nas análises histológicas, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quanto ao teor de colágeno total que foi maior no grupo que recebeu apenas doxorrubicina; houve redução do colágeno do tipo I no grupo LD em relação aos grupos C e D; não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao teor de colágeno do tipo III. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e Figuras 2A e 2B.

Na análise ecocardiográfica, foi encontrada diferença significativa na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole (PPVEd) entre os grupos LD e L, sendo o valor encontrado no grupo LD 21,9% maior do que o encontrado no grupo L. Para as demais variáveis analisadas, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes, conforme apresentado na Tabela 3.

Nas análises de Western Blotting não foram encontradas diferenças significantes na comparação entre os grupos em relação à quantificação das proteínas Akt total, Akt fosforilada, mTOR total e mTOR fosforilada; também não houve diferença quanto à quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD) conforme apresentado na Tabela 4. Ao analisar a enzima catalase, foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os Grupos LD, L e C, sendo os valores encontrados nos grupos L e LD menores, na ordem de 56,1% e

54,7%, respectivamente, quando comparados ao grupo C, conforme apresentado na Figura 2C e tabela 4.

Ao analisarmos as variáveis de peso, não foram encontradas diferenças significantes no peso do coração, peso corporal inicial e final dos ratos. O peso relativo (peso do coração/peso corporal) dos grupos LD, L, D e C, foi maior no grupo LD, na ordem de 22,23%, quando comparado aos grupos L e C, e em 11,11% quando comparado ao grupo D, conforme apresentado na Figura 2D.

#### **4 Discussão**

A doxorubicina é amplamente utilizada em protocolos quimioterápicos e reduz a mortalidade (em cerca de 33%) em mulheres com câncer de mama (5). Porém seus efeitos colaterais são relativamente frequentes, com incidência de cardiotoxicidade variando de 3% a 26% (23).

A hipótese principal para explicar a fisiopatologia da cardiotoxicidade causada pela doxorubicina é aquela que a relaciona ao aumento do estresse oxidativo (23,24). Vários modelos de prevenção ou de atenuação da cardiotoxicidade têm sido propostos nesta área e tem sido objeto de investigações do nosso próprio grupo (21).

No presente estudo, os indicadores de cardiotoxicidade foram caracterizados pela elevação da expressão de fibras de colágeno no coração e por alterações da concentração de catalase no tecido cardíaco. Não foram encontradas alterações ecocardiográficas significativas, à exceção de um maior espessamento da parede posterior do ventrículo esquerdo observado no grupo LD. A ausência de outros achados ecocardiográficos significativos pode estar relacionada a aspectos do próprio protocolo que investigou a função cardíaca após 14 dias do encerramento do tratamento com a doxorubicina. Mesmo sendo este intervalo experimental ter sido descrito como suficiente para a instalação da cardiotoxicidade de característica crônica (25), outros estudos devem verificar se mais alterações cardíacas podem ocorrer de forma mais tardia ainda, como parece ocorrer em humanos. Por outro lado, é importante destacar que, durante o tratamento antitumoral, os pacientes oncológicos muitas vezes são tratados com diversos medicamentos em protocolos complementares contendo

antitumorais citotóxicos, bem como radiação, acarretando um maior impacto cardíaco (26, 27).

A utilização de doses mais elevadas do quimioterápico em diferentes desenhos experimentais certamente produz resultados mais intensos em termos de cardiotoxicidade porém ocorre uma mortalidade muito maior dos animais, o que tem implicações éticas importantes.

Estudos que encontraram maior acúmulo de colágeno no coração após o tratamento com doxorrubicina, buscam relacionar este fato ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (28, 29). O acúmulo de colágeno gera fibrose cardíaca que por sua vez é mais comum em doses cumulativas mais elevadas de doxorrubicina (30, 31, 32). Existem diversos tipos de colágeno e os do tipo I e III podem ser identificados e quantificados em microscópios ópticos de luz polarizada (33, 34). Em condições normais, o colágeno do tipo I, constitui cerca de 80% do colágeno cardíaco, sendo o mais rígido de todos e o principal responsável pela resistência da câmara cardíaca. O colágeno do tipo III forma agregados mais finos e constitui cerca de 12% do colágeno cardíaco; este colágeno forma pontes entre os feixes de colágeno do tipo I que se alinham longitudinalmente ao longo dos cardiomiócitos (35, 36).

Os resultados do presente estudo demonstram maior acúmulo de fibras de colágeno tipo I e total nos animais tratados com doxorrubicina, quando comparados aos demais grupos, evidenciando a capacidade deste quimioterápico em causar cardiotoxicidade, conforme já descrito por Oliveira e colaboradores (37). No entanto, é importante destacar o papel exercido pela leucina nos animais suplementados. O grupo LD apresentou menor teor de colágeno do tipo I em relação aos grupos C e D; também no grupo LD, resultados inferiores ao grupo D foram encontrados no teor de colágeno total. Resultados semelhantes foram descritos por Fidale (38) utilizando modelo experimental semelhante ao nosso.

Apesar de ser descrita na literatura como modulador da síntese proteica no coração (39, 40), os resultados do presente estudo sugerem que a leucina parece não estar relacionada ao aumento da produção de fibrose. É possível que uma maior atividade de síntese proteica com o emprego de leucina possa até ocorrer de modo a preservar o microambiente celular no quadro tóxico sistêmico gerado pela ação da doxorrubicina mas isto parece não estar refletido na síntese de colágeno. Este aspecto deve merecer estudos futuros.

Os antioxidantes produzidos pelo organismo atuam no sentido de restabelecer a homeostase minimizando os danos decorrentes do estresse oxidativo. Dentre os antioxidantes atuantes na atenuação do estresse oxidativo já conhecidos, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (Gpx) (41).

A utilização da doxorubicina, conforme já descrito na literatura, provoca um desequilíbrio na homeostase elevando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (14) e é nesse ambiente que a catalase atua como protetora ao reduzir, principalmente, os teores de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gerando água e oxigênio. Esta ação tem o propósito de restabelecer o equilíbrio e minimizar os danos decorrentes do estresse oxidativo (41).

Um achado de relevância do presente estudo foi a ação que a leucina promoveu frente à expressão da catalase nos grupos L e LD quando comparados ao grupo C: a suplementação de leucina parece atenuar os efeitos do estresse oxidativo, induzindo o organismo a necessitar de uma menor atividade da catalase. Resultados semelhantes foram descritos por Duarte (42) ao analisar tecido hepático de ratos suplementados com leucina frente à utilização da doxorubicina, o que demonstra mais uma vez o efeito antioxidante obtido com a suplementação de leucina.

O nosso estudo sugere que a leucina exerce efeito modulador sobre o metabolismo energético celular, promovendo o chamado “efeito Warburg”, que ocorre a partir da modificação da via de OXPHOS para glicólise sendo, esta mudança, crucial para a diminuição dos níveis celulares de ROS (43). O “efeito Warburg” gera maior facilidade na absorção e incorporação de nutrientes que são necessários para a proliferação celular (44, 45). A redução de ROS ocorre devido à mudança do metabolismo energético onde a via de respiração aeróbica é substituída pela respiração anaeróbica ocorrendo distante da ação mitocondrial. Sugere-se que a suplementação de leucina possa, portanto, ser um meio eficaz para atenuar os danos gerados pelo estresse oxidativo.

Nenhuma alteração pode ser detectada em relação à AKT – mTOR, tanto com a doxorubicina quanto com a leucina e sua associação. Como a inibição da mTOR tem sido investigada em relação a aspectos de senescência e sobrevivência celulares (38), outros estudos devem investigar em mais detalhes o que de fato acontece neste cenário quando a suplementação com leucina é empregada após exposição à doxorubicina.

Em relação ao peso relativo do coração, como não houve aumento da estrutura de colágeno, a identificação do peso maior do coração em relação ao peso corporal encontrado nos grupos LD e D pode ter ocorrido devido a processos inflamatórios e edema ou se dever ao aumento da produção de outros componentes proteicos talvez intracelulares. Contudo, tais investigações não foram motivo de análise no presente estudo, mas devem ser motivo de investigação em modelos especialmente desenhados para esta finalidade.

## **5 Limitações e importância do estudo**

Os resultados descritos reforçam que a suplementação de leucina é uma estratégia promissora e aparentemente segura que pode ser utilizada na tentativa de se evitar ou atenuar os danos cardíacos produzidos pela doxorubicina.

Algumas limitações ao presente estudo são inerentes ao modelo experimental que traz consigo a dificuldade da generalização de resultados para outros cenários. Apesar disso, a prova de que existe, além da plausibilidade biológica de efeitos benéficos, algumas constatações que precisam ser melhor esclarecidas, acrescentam conhecimento sobre um tópico promissor, mas ainda um tanto desprovido de evidências científicas.

Outras limitações encontram-se na necessidade de se avaliar os aspectos metabólicos e inflamatórios envolvidos na cardiotoxicidade, particularmente no que se refere à biogênese mitocondrial e aos mecanismos de morte celular como a necroapoptose e a netose. Apesar de não termos encontrado alterações na via AKT – mTOR relacionadas à atuação da doxorubicina e da leucina, ainda assim, estudos sobre como se comporta a utilização celular de substratos energéticos neste cenário alterado ainda precisam ser feitos. A ausência de aumento da produção de fibrose cardíaca associada à possível redução do estresse oxidativo como sugerido pelo comportamento da catalase cardíaca são importantes e merecem atenção especial em futuros estudos.

## **6 Conclusão**

A suplementação dietética com leucina reduz os níveis de catalase no coração isoladamente e também após tratamento com doxorubicina.

## **7 Conflito de Interesse**

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## **8 Contribuições dos Autores**

LCG, TCRP, TMF e ESR: Planejamento dos experimentos, LCG, TCRP e TMF: Realização dos experimentos, LCG, TCRP, PRL, FRS e GCH: Coleta de dados, LCG, TCRP, TMF, RMG, MDFJ, KVNC, FBRM e WSB: Análise dos dados, RMG, ESR, SRD, GCH e MLFN: Fornecimento do espaço, reagentes, técnicos e suporte de laboratório, LCG: Escrita do manuscrito, LCG, TCRP, SRD, WSB, PRL, TMF e ESR: Edição do manuscrito, ESR: Supervisão do estudo. Todos os autores contribuíram com o artigo.

## 9 Referências

Adão R, Keulenaer G, Moreira AL, et al. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. *Rev Port Cardiol.* (2013) 32 (5): 395-409. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2012.11.002>

Raschi E, Vasina V, Ursino MG, et al. Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacol Ther.* (2010) 125: (2) 196-218. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.002>

Tan C, Tasaka H, Yu KP, et al, Daunomycin an antitumor antibiotic in treatment of neoplastic disease - clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer.* (1967) 20:333-53. [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)

Sawyer DB, Peng X, Chen B, et al. Mechanisms of Anthracycline Cardiac Injury: Can We Identify Strategies for Cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis.* (2010) 53:105-113. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2010.06.007>

Yu PC, Calderaro D, Ikeoka D T, Demarchi LMMF, Caramelli B, Toxicidade miocárdica por doxorubicina. *Revista da Associação Médica Brasileira.* (2005) 51: (3) 121-132. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302005000300010>

Pontes JCDV, Gomes Júnior JF, Silva GVR, Benfatti RA, Dias AEMASJ, Duarte JJ, Gardenal N, Maçanori Odashiro M, Santos CHM. Estudo anatomopatológico da miocardiopatia induzida pela doxorubicina em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira.* (2010) 25:137-143. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000200003>

Ryberg M, Nielsen D, Skovsgard T, et al. Epirubicin cardiotoxicity: An analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* (1998) 16:3502-8. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.11.3502>

Layman DK, The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr.* (2003) 133:261-267. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.261S>

Kim JY, Burghardt RC, Wu G, et al. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophectoderm cell signaling, proliferation, and migration. *Biol Reprod.* (2011) 84:62-69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085738>

Quilani R. Oral amino acid administration in patients with diabetes mellitus: supplementation or metabolic therapy? *Am J Cardiol.* (2004) 93:21-22. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.11.005>

Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, et al. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med.*(2008) 22:105-112. <https://doi.org/10.3892/ijmm.22.1.105>

De Bandt, JP, Cynober L. Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma, and sepsis. *J Nutr.* (2006) 136:308-313. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.308S>

Young LH, Mcnutly PH, Morgan C, et al. Myocardial protein turnover in patients with coronary

artery disease. Effect of branched chain amino acid infusion. *J Clin Invest.* (1991) 87:554-560. <https://doi.org/10.1172/JCI115030>

Cheteh EH et al. Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. *Cell Death Dis.* (2017) 6: 2848. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.225>

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. In: Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death, Oxford University Press. (2007):188-276. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.003.0005>

Salomão EM, Toneto AT, Silva GO, Gomes-Marcondes MCC. Physical exercise and a leucine-rich diet modulate the muscle protein 81 metabolism in Walker tumor-bearing rats. *Nutrition and Cancer.* (2010) 62:1095-1104. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.492082>

Salomão EM, Gomes-Marcondes MCC. Light aerobic physical exercise in combination with leucine and/or glutamine-rich diet can improve the body composition and muscle protein metabolism in young tumour-bearing rats. *J Physiol Biochem,* (2012) 68:493-501. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0164-0>

D'Antona G, Ragini M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, et al. Branched-Chain Amino Acid Supplementation Promotes Survival and Supports Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis in Middle-Aged Mice. *Cell Metab.* (2010) 12:362-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.016>

Tanada Y, Shioi T, Kato T, Kawamoto A, Okuda J, Kimimura T. Branched-chain amino acids ameliorate heart failure with cardiac cachexia in rats. *Life Sciences,* (2015) 137: 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.06.021>

Kobayashi H, Kato H, Hirabayashi Y, et al. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. *J Nutr.* (2006) 136:234-236. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.234S>

Fidale TM, Gonçalves A, Haddad EG, et al. Action of leucine in heart hypertrophy induced by thyroid hormone in rats. *Bioscience* (2016) 32:4. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32378>

Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: Echocardiographic-angiographic correlations in the presence or absence of asynergy. *The American Journal of Cardiology.* (1976) 37:7-11. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90491-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90491-4)

Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin- induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol.,* (2011) 670:541-553. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.021>

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.* (2012) 379:432-444. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61625-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61625-5)



Bonita R, Pradhan R. Cardiovascular toxicities of cancer chemotherapy. *Seminars in Oncology*, ScienceDirect. (2013) 40:156-167. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2013.01.004>

D. Farmakis, M. Mantzourani, G. Filippatos, Anthracycline-induced cardiomyopathy: secrets and lies, *Eur. J. Heart Fail.* (2018) 20:907-909, <https://doi.org/10.1002/ejhf.1172>

Kalyanaraman B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol.* (2020) 29:101394. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101394>

Doroshov JH, Effect of anthracyclines antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* (1983) 43:460-472.

Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* (2007) 49:330-352. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.10.002>

Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, Romano MMD, Ramos SG, Celes MRN, et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *European Journal of Pharmacology.* (2011) 670(2-3):541-53. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.021>

Carvalho FS, et al. Doxorubicin induced cardiotoxicity: From bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.*(2014) 34:106-135. <https://doi.org/10.1002/med.21280>

Sun X, Zhou Z, Kang YJ. Attenuation of doxorubicin chronic toxicity in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart. *Cancer research.* (2001) 61:3382-3387, abr. 2001.

Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* (2015) 106:62-9. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>

López B, Querejeta R, González A, Larman M, Díez J. Collagen Cross-Linking But Not Collagen Amount Associates With Elevated Filling Pressures in Hypertensive Patients With Stage C Heart Failure. *Hypertension.* (2012) 60(3):677-83. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.196113>

Junqueira LC, et al. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* (1979) 11:447-55. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>

Pelouch V, et al. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Molecular and cellular biochemistry.* (1993) 129:101-20. <https://doi.org/10.1007/BF00926359>

Oliveira LFL, O'Connell JL, CARVALHO EEV, et al. Comparação entre a Ventriculografia Radioisotópica e a Ecocardiografia na Quantificação da Função Sistólica Ventricular Esquerda em Ratos Expostos à Doxorubicina. *Arq Bras Cardiol.* (2017) 108:12-20.

<https://doi.org/10.5935/abc.20160194>

Fidale TM. Efeitos da suplementação de leucina no coração de ratos tratados com doxorubicina. Effects of leucine supplementation on the heart of doxorubicin- treated rats [Internet]. 30 de agosto de 2017 [citado 27 de março de 2022]; Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21019>.

Canedo CS, Demeulder B, Ginion A, et al. Activation of the cardiac mTOR/p70S6k pathway by leucine requires PDK1 and correlates with PRAS40 phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2010) 298:761-769. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00421.2009>

Escobar J, Frank JW, Suryawan A, et al. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2006) 290:612-621. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00402.2005>

Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires).* 1998;58(4):350-6. PMID: 9816695.

Duarte PRA. Efeitos da leucina no estresse oxidativo hepático e renal em Ratos tratados com doxorubicina 2017 Effects of leucine on hepatic and renal oxidative stress in rats treated with doxorubicin [Internet]. 30 de agosto de 2017 [citado 27 de março de 2022]; Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21019>.

Hu J, Nie Y, Chen S, Xie C, Fan Q, Wang Z, Long B, Yan G, Zhong Q, Yan X. Leucine reduces reactive oxygen species levels via an energy metabolism switch by activation of the mTOR-HIF-1 $\alpha$  pathway in porcine intestinal epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017 Aug;89:42-56. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.05.026>

Krisher, R.L., Prather, R.S. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol. Reprod.* (2012) 79:311-320. <https://doi.org/10.1002/mrd.22037>

Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*(2011) 27:441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>

## ANEXOS

**Tabela 1.** Anticorpos específicos utilizados na análise de Western Blotting.

| Antibody             | Catalog number | Source            | Dilution |
|----------------------|----------------|-------------------|----------|
| Anti-pAKT (Ser173)   | SC-7985-R      | Mouse Monoclonal  | 1:500    |
| Anti-AKT             | SC-8312        | Rabbit Polyclonal | 1:500    |
| Anti-pmTOR (Ser2448) | 44-1125G       | Rabbit Polyclonal | 1:500    |
| Anti-mTOR            | PA5-20123      | Rabbit Polyclonal | 1:500    |
| Anti-CAT             | LS-C21346      | Rabbit Polyclonal | 1:1000   |
| Anti-SOD             | SC-11407       | Rabbit Polyclonal | 1:1000   |
| Anti-®-Actin         | MA5-11869      | Mouse Monoclonal  | 1:1000   |
| Anti-GAPDH           | SC-25778       | Rabbit Monoclonal | 1:1000   |
| Anti-Rabbit IgG-HRP  | 5220-0336      | Goat              | 1:1000   |
| Anti-Mouse IgG-HRP   | SC-2005        | Goat              | 1:1000   |

**Tabela 2.** Comparação dos valores das médias e desvio padrão das variáveis histológicas do Colágeno (mm<sup>2</sup>) por grupo.

|                | Controle        | Doxorrubicina                 | Leucina                       | Leucina e Doxorrubicina       | p-valor* |
|----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------|
|                | Média ± DP      | Média ± DP                    | Média ± DP                    | Média ± DP                    |          |
| Colágeno I     | 113,11 ± 24,752 | 115,425 ± 15,862 <sup>c</sup> | 75,872 ± 18,14 <sup>ab</sup>  | 66,934 ± 8,378 <sup>ab</sup>  | ,000     |
| Colágeno III   | 65,476 ± 21,193 | 75,572 ± 16,905               | 60,943 ± 14,742               | 55,758 ± 5,97                 | ,076     |
| Colágeno Total | 238,579 ± 76,45 | 337,40 ± 75,723 <sup>ac</sup> | 125,018 ± 13,331 <sup>b</sup> | 105,720 ± 63,060 <sup>b</sup> | ,000     |

*Diferença significativa para valores de p < 0,05; a= diferença em comparação ao Controle; b= diferença em comparação ao Doxorrubicina; c= diferença em comparação ao Leucina; Teste ANOVA one-way.*

**Tabela 3.** Comparação dos valores das médias e desvio padrão das variáveis ecocardiográficas por grupo.

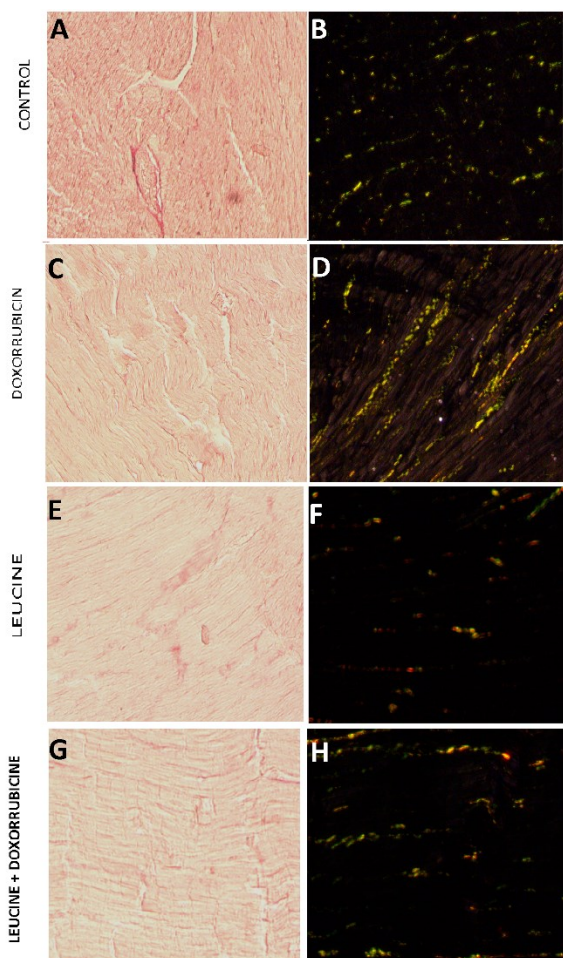
|            | Controle       | Doxorrubicina | Leucina        | Leucina e<br>Doxorrubicina | p-valor |
|------------|----------------|---------------|----------------|----------------------------|---------|
|            | Média ± DP     | Média ± DP    | Média ± DP     | Média ± DP                 |         |
| SMd - cm   | 0,141 ± 0,014  | 0,135 ± 0,011 | 0,138 ± 0,012  | 0,15 ± 0,028               | ,461    |
| SMs - cm   | 0,176 ± 0,025  | 0,164 ± 0,019 | 0,163 ± 0,031  | 0,175 ± 0,026              | ,645    |
| DMEd - cm  | 0,661 ± 0,052  | 0,675 ± 0,043 | 0,614 ± 0,128  | 0,674 ± 0,147              | ,633    |
| DMEs - cm  | 0,401 ± 0,073  | 0,448 ± 0,054 | 0,412 ± 0,119  | 0,448 ± 0,139              | ,768    |
| PPVEd - cm | 0,163 ± 0,019  | 0,152 ± 0,017 | 0,135 ± 0,024  | 0,173 ± 0,025 <sup>c</sup> | ,012    |
| PPVEs - cm | 0,218 ± 0,025  | 0,178 ± 0,025 | 0,185 ± 0,034  | 0,206 ± 0,048              | ,169    |
| VDF - ml   | 0,673 ± 0,145  | 0,705 ± 0,125 | 0,587 ± 0,339  | 0,776 ± 0,525              | ,724    |
| VSF - ml   | 0,176 ± 0,091  | 0,23 ± 0,086  | 0,21 ± 0,181   | 0,275 ± 0,273              | ,775    |
| FE - %     | 74,59 ± 9,483  | 67,611 ± 8,82 | 67,87 ± 8,99   | 68,921 ± 8,588             | ,471    |
| SV - ml    | 0,498 ± 0,099  | 0,477 ± 0,102 | 0,378 ± 0,172  | 0,5 ± 0,258                | ,474    |
| %Delta D   | 39,425 ± 8,914 | 33,52 ± 6,593 | 33,547 ± 6,203 | 34,464 ± 6,227             | ,371    |

Diferença significativa para valores de  $p < 0,05$ ; a= diferença em comparação ao Controle; b= diferença em comparação ao Doxorubicina; c= diferença em comparação ao Leucina; Teste ANOVA one-way. SIVs= Septo Interventricular em sístole; DIVEd= Diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole; DIVEs= Diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole; PPVEd= Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole; PPVEs= Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole; VDF= Volume diastólico final; VSF= Volume sistólico final; FE = fração de ejeção; SV = volume sistólico; Delta D = fração de encurtamento da parede livre do ventrículo.

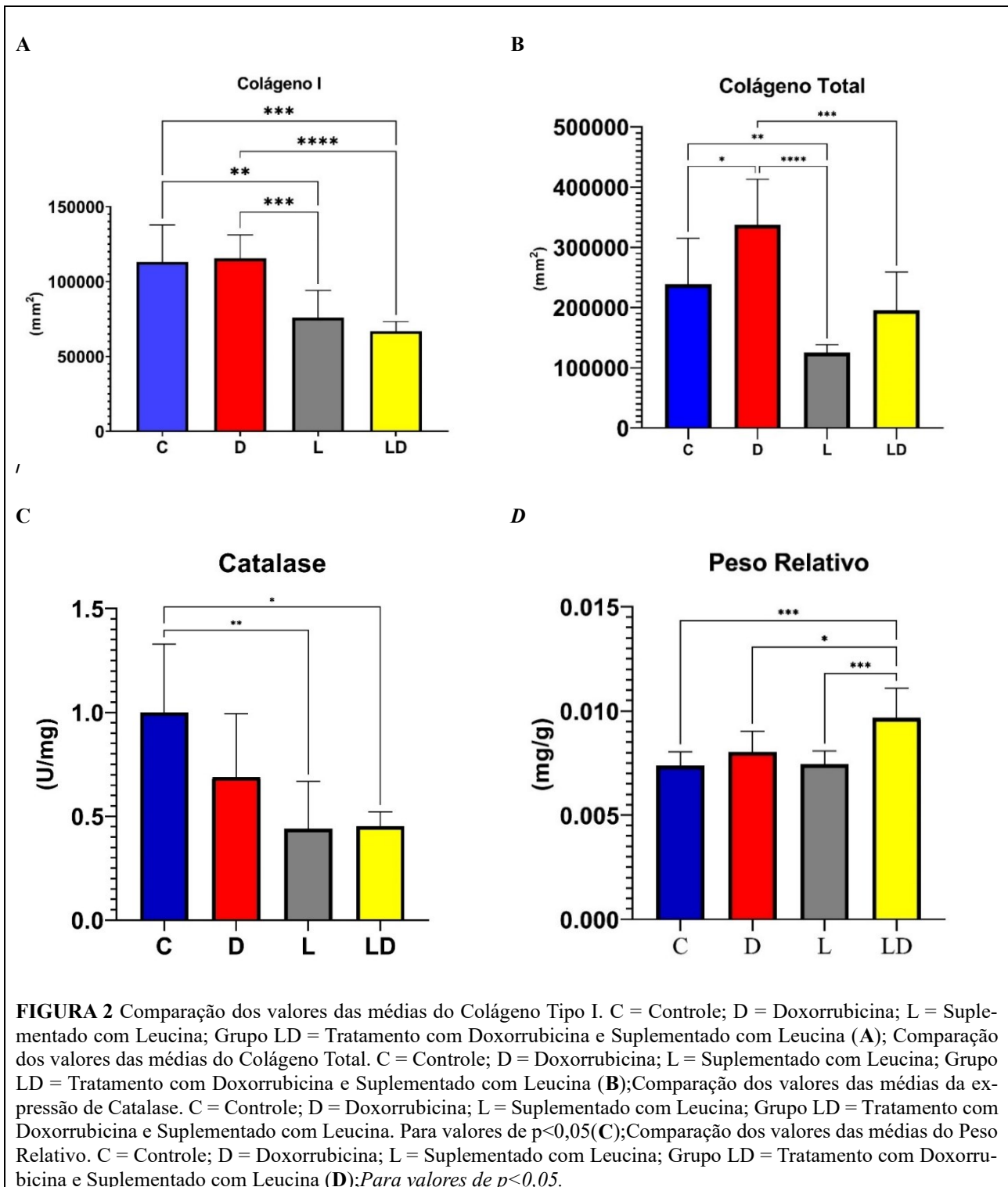
**Tabela 4.** Comparação dos valores das médias e desvio padrão das variáveis provenientes das análises de Western Blotting por grupo.

|       | Controle   | Doxorrubicina | Leucina                    | Leucina e<br>Doxorrubicina | p-valor |
|-------|------------|---------------|----------------------------|----------------------------|---------|
|       | Média ± DP | Média ± DP    | Média ± DP                 | Média ± DP                 |         |
| pMTOR | 1 ± 0,371  | 0,98 ± 0,297  | 0,937 ± 0,299              | 0,838 ± 0,176              | ,784    |
| pAKT  | 1 ± 0,292  | 0,917 ± 0,253 | 1,205 ± 0,243              | 0,96 ± 0,321               | ,319    |
| AKT   | 1 ± 0,251  | 0,883 ± 0,284 | 0,774 ± 0,188              | 0,832 ± 0,227              | ,432    |
| MTOR  | 1 ± 0,236  | 0,888 ± 0,279 | 0,904 ± 0,182              | 0,751 ± 0,232              | ,357    |
| CAT   | 1 ± 0,329  | 0,688 ± 0,306 | 0,439 ± 0,227 <sup>a</sup> | 0,453 ± 0,068 <sup>a</sup> | ,007    |
| SOD   | 1 ± 0,225  | 0,803 ± 0,387 | 0,939 ± 0,247              | 1,011 ± 0,487              | ,728    |

Diferença significativa para valores de  $p < 0,05$ ; a = diferença em comparação ao Controle; b = diferença em comparação ao Doxorubicina; c = diferença em comparação ao Leucina; Teste ANOVA one-way; pMTOR = mammalian target of rapamycin fosforilada; pAKT = Proteína Quinase B fosforilada; AKT = Proteína Quinase B total; MTOR = mammalian target of rapamycin total; CAT = Catalase; SOD = Superóxido Dismutase.



**Figura 1.** Fotomicrografias de seções coradas com Picrosirius Red demonstrando o potencial antifibrótico do exercício aeróbio em tecido cardíaco fibrovascular induzido pela administração de Doxorubicina. Figuras (A, C, E, G) Fotomicrografias de seções coradas com Picrosirius Red sem filtro de polarização. Figuras (B, D, F, H), fotomicrografias de seções coradas com Picrosirius Red com filtro de polarização (ampliação final 200x). Sob luz polarizada, as fibras de colágeno tipo I são marcadas em vermelho, tipo III está marcado em verde e a sobreposição dessas duas fibras de colágeno está marcada em amarelo ou laranja.



## 6 CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo foi testada a hipótese que a cardiotoxicidade produzida em ratos Wistar pela administração de doxorubicina pode ser atenuada pela adição de uma dieta enriquecida com o aminoácido leucina. Os resultados apresentados demonstram que a doxorubicina exerce alterações diretas na estrutura cardíaca produzindo maior depósito de colágeno, embora não tenha sido encontrada redução da função contrátil do coração nem da via da AKT/mTOR ou da sua forma fosforilada. Também houve acentuação do estresse oxidativo no coração, o que é evidenciado pelo aumento da expressão de catalase mesmo não tendo este sido acompanhado por alterações no teor de SOD. Indiretamente, a cardiotoxicidade altera o controle autonômico do coração produzindo uma maior atividade da via simpática e causando redução da VFC e, portanto, da capacidade do coração responder adequadamente aos diversos estímulos adaptativos fisiológicos e ambientais.

A adição de leucina a este cenário da cardiotoxicidade comprova a hipótese com base na ausência de aumento da produção de colágeno cardíaco associada à possível redução do estresse oxidativo como indicado pela redução da catalase cardíaca.

Estes resultados indicam que a suplementação da dieta com leucina é uma estratégia promissora e aparentemente segura que pode ser utilizada em futuras pesquisas na tentativa de se evitar ou atenuar os danos cardíacos produzidos pela doxorubicina.

## REFERÊNCIAS

ADÃO, R.; KEULENAER, G.; MOREIRA, A.L.; et al. Cardiotoxicidade associada à terapêutica oncológica: mecanismos fisiopatológicos e estratégias de prevenção. *Rev Port Cardiol.* (2013) 32:395-409. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2012.11.002>

AGUIRRE, J., RIOS-MOMBERG, M., HEWITT, D., HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* (2005) 13:111-118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>

D'ANTONA, G.; RAGINI, M.; CARDILE, A.; TEDESCO, L., DOSSENA, M.; et al. Branched-Chain Amino Acid Supplementation Promotes Survival and Supports Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis in Middle-Aged Mice. *Cell Metab.* (2010) 12:362-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.016>

EDER, ANGELA R.; ARRIAGA, EDGAR A. Capillary electrophoresis monitors enhancement in subcellular reactive oxygen species production upon treatment with doxorubicin. *Chemical Research in Toxicology.* (2006) 19:1151-1159. <https://doi.org/10.1021/tx060083i>

FERREIRAAL, MATSUBARA LS. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras.* (1997) 43(1):61-8. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>

GATTO M, MOTA GAF. Influence of Doxorubicin Treatment on Heme Metabolism in Cardiomyoblasts: An In Vitro Study. *Arq Bras Cardiol.* (2021) 116(2):323-324.

GRUPI, C. J.; MORAES, R. Variabilidade da frequência cardíaca: conceito e utilidade clínica. In: RAMIRES, J. A. F.; OLIVEIRA, S. A. *Eletrocardiograma: normal e patológico.* 7. ed. São Paulo: Editora Roca, (2001). p. 839-868.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica.* 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

KAUR IP, GEETHA T. Screening methods for antioxidants-a review. *Mini Rev Med Chem.* (2006) 6(3):305-12. <https://doi.org/10.2174/138955706776073448>

KIM, J.Y.; BURGHARDT, R.C.; WU, G.; et al. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophectoderm cell signaling, proliferation, and migration. *Biol Reprod.*(2011) 84:62-69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085738>

KOBAYASHI, H.; KATO, H.; HIRABAYASHI, Y.; et al. Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle- atrophying rats. *J Nutr.* (2006) 136:234-236. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.234S>

LAYMAN, D.K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr.*, (2003) 133:261-267. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.261S>

MALIK, J. M.; BIGGER, T.; CAMM, A. J.; KLEIGER, R. E.; MALLIANI, A.; MOSS, A.



J.; SCHWARTZ, P. J. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal*.(1996) 17:354-381. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a014868>

MURPHY, M.P., SIEGEL, R.M. Mitochondrial ROS fire up T cell activation. *Immunity*. (2013) 38:201-202. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.005>

PITKANEN, H. T.; OJA, S. S.; RUSKO, H.; NUMMELA, A.; KOMI, P. V.; SARANSARI, P.; TAKALA, T.; MERO, A. A. Leucine supplementation does not enhance acute strength or running performance but affects serum amino acid concentration. *Amino Acids*. (2003) 25: 85-95. <https://doi.org/10.1007/s00726-002-0343-3>

PONTES, J. C. D. V.; GOMES JÚNIOR, J. F.; SILVA, G. V. R.; BENFATTI, R. A.; DIAS A. E. M. A. S. J.; DUARTE, J. J.; GARDENAL, N.; MAÇANORI ODASHIRO, M.; SANTOS, C. H. M. Estudo anatomopatológico da miocardiopatia induzida pela doxorubicina em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira, São Paulo*. (2010) 25:137-143. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000200003>

RAJENDRA, U.; ACHARYA, K., JOSEPH, P. et al. Heart rate variability: a review. *Med. Bio. Eng. Comput.* (2006) 44:1031-1051. <https://doi.org/10.1007/s11517-006-0119-0>

RASCHI, E.; VASINA, V.; URSINO, M.G.; et al. Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacol Ther.* (2010) 125:196-218. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.002>

RIBEIRO SMR, QUEIROZ JH, PELÚZO MCG, COSTA NMB, MATTA SLP, QUEIROZ MELR. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. *Biosci J.* (2005) 21(3):133-49.

SALOMÃO, E. M.; TONETO, A. T.; SILVA, G. O.; GOMES-MARCONDES. M. C. C. Physical exercise and a leucine-rich diet modulate the muscle protein 81 metabolism in Walker tumor-bearing rats. *Nutrition and Cancer*. (2010) 62:1095-1104, 2010. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.492082>

SALOMÃO, E. M.; GOMES-MARCONDES, M. C. C. Light aerobic physical exercise in combination with leucine and/or glutamine-rich diet can improve the body composition and muscle protein metabolism in young tumour-bearing rats. *J Physiol Biochem.* (2012) 68:493-501. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0164-0>

SAWYER, D.B.; PENG, X.; CHEN, B.; et al. Mechanisms of Anthracycline Cardiac Injury: Can We Identify Strategies for Cardioprotection? *Prog Cardiovasc Dis.* (2010) 53:105-113. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2010.06.007>

SEDDON M, LOOI YH, SHAH AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* (2007) 93(8):903-7. <https://doi.org/10.1136/hrt.2005.068270>

SHAH, O. J.; ANTHONY, J. C.; KIMBAL, S. R. et al. Glucocorticoids oppose translational control by leucine in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2000) 279:1185-1190. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.5.E1185>

SPIER, A. W.; MEURS, K. M.; WRIGHT, N. A. Analysis of heart rate variability in Boxer dogs with arrhythmogenic cardiomyopathy. In: AMERICAN CONFERENCE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE. (2002) p. 343.

SPIER, A. W.; MEURS, K. M. Evaluation of spontaneous variability in the frequency of ventricular arrhythmias in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. (2004b) 224:538-541. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.538>

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

TANADA, Y.; SHIOI, T.; KATO, T.; KAWAMOTO, A.; OKUDA, J. KIMIMURA, T. Branched-chain amino acids ameliorate heart failure with cardiac cachexia in rats. *Life Sciences*. (2015) 137:20-27. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.06.021>

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis*. (2007) 49:330-352. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.10.002>

VANDERLEI, L. C. M.; PASTRE, C. M.; HOSHI, R. A.; CARVALHO, T. D.; GODOY, M. F. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. (2009) 24:205-217. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382009000200018>

YU, P. C.; CALDERARO, D.; IKEOKA, D. T.; DEMARCHI, L. M. M. F.; CARAMELLI, B. Toxicidade miocárdica por doxorubicina. *Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo*. (2005) 51:121-132. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302005000300010>

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

## ANEXOS

### Anexo 1- Parecer CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Efeito da suplementação de leucina na proteção e degradação de células cardíacas de ratos tratados com doxorubicina”**, protocolo nº **045/19**, sob a responsabilidade de **Elmiro Santos Resende** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **17 de Dezembro de 2021**.

(We certify that the project entitled “Efeito da suplementação de leucina na proteção e degradação de células cardíacas de ratos tratados com doxorubicina”, protocol 045/19, under the responsibility Elmiro Santos Resende - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 17th, 2021).

|   |  |
|---|--|
| Finalidade                              | ( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica             |
| Vigência do Projeto                     | Início: 01/07/2020 Término: 05/06/2022           |
| Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos | Ratos Wistar                                     |
| Número de animais                       | 80   |
| Peso / Idade                            | 250-300 g / 6-7 m                                |
| Sexo                                    | Machos   |
| Origem / Local                          | Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU |
| Local onde serão mantidos os animais    | Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU |

**Alteração realizada:** Inclusão da colaboradora Talita Cristina Rodrigues Pereira. Modificação no tópico: Programa de treinamento (corrida em esteira) - Os animais dos grupos T e TD serão submetidos ao exercício físico, cuja modalidade escolhida foi a corrida, por um período de 3 semanas, com uma frequência de três vezes por semana. O treinamento consistirá em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos, contendo 10 pistas individuais separadas individualmente (DE BARROS MANCHADO-GOBATTO et al., 2010). O programa de treinamento foi elaborado com a finalidade de submeter os animais a uma intensidade moderada, recomendada por Negrão et al. (1992). Os animais serão submetidos a duas semanas de adaptação à esteira rolante, antes do início do treinamento com uma

inclinação de  $10^{\circ}$ , enquanto as sessões de treinamento terão a intensidade de 18 m/min com uma inclinação de  $10^{\circ}$ , conforme figura 2 (DUFRESNE 2020). Além disso, durante as semanas de adaptação, colocaremos os animais na esteira desligada por 3 minutos, antes de iniciar o protocolo descrito acima. Adendo do tópico: Teste de Resistência Exhaustivo - Um teste de resistência exhaustivo será realizado antes do treinamento, após o treinamento (antes do tratamento com Doxorubicina) e ao final do experimento. Os animais terão que se deslocar voluntariamente pelo maior tempo a 18m/min com uma inclinação de  $10^{\circ}$ . O final do teste será determinado pela incapacidade do animal de executar o treino (DAVIES, et al., 1982).

Uberlândia, 22 de dezembro de 2021.

  
**Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Comissão de Ética na Utilização de Animais  
Coordenador da CEUA  
Portaria R. Nº 1114/2020