UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular
desencadeada pela insuficiência cardíaca: influência do treinamento
físico aeróbico

ALINE VILLA NOVA BACURAU

SÃO PAULO

2013

ALINE VILLA NOVA BACURAU

**Contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular
desencadeada pela insuficiência cardíaca: influência do treinamento físico
aeróbico**

**Tese apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Ciências.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Patricia Chakur Brum

SÃO PAULO

2013

Nome: BACURAU, Aline Villa Nova

Título: Contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular desencadeada pela insuficiência cardíaca: influência do treinamento físico aeróbico

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Julgamento: _____	Assinatura: _____

*Dedico essa Tese a duas pessoas. Uma me deu a vida, e a outra me faz
sentir viva e com vontade de viver.*

À minha mãe, pelo seu amor incondicional.

À meu filho, por me ensinar a amar incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Chakur Brum, pelo seu exemplo de profissionalismo, liderança e caráter. Serei eternamente grata por tudo que aprendi nesses 11 anos ao seu lado. Obrigada pela confiança e incentivo, que contribuíram para o meu amadurecimento científico e pessoal. Espero um dia retribuir por todas as “horas extras” de trabalho.

Ao meu pai, meu eterno herói, meu exemplo de vida. Agradeço por toda dedicação, incentivo e amor;

Ao meu marido Frank, meu maior incentivador. Você é um dos pilares que sustentam a minha vida. Sua paixão pelo conhecimento reflete em parte do que sou hoje. Se hoje escrevo essa Tese, devo isso a você!

À minha querida Tica e ao Monsenhor Sergio, por toda ajuda e suporte emocional, além dos dias agradáveis e das refeições maravilhosas.

Aos professores Edilamar e Paulo Ramires, por toda ajuda e apoio quando necessários, além da contribuição para meu crescimento científico.

Ao querido amigo e colaborador Paulo, por toda ajuda e contribuição em território “nacional” e “internacional”.

Aos amigos e catalisadores do término dessa Tese, Telminha e Marcos, por todo apoio emocional e técnico.

Aos queridos técnicos, Alex, Glória, Katt, Luciano, Marcele e Ney, pela colaboração e ajuda essenciais no dia-a-dia.

Aos amigos do laboratório, Alê, Andréa, Bianco, Bozi, Carmão, Chris, Dani, Paulo, Fabi, Fafa, Fernanda, Telma, Tiago, Juliane, Julio, Kátia, Bechara, Max, Nathalie, Stefano, Ursula, Vanessa e Vander por todo auxílio e pelos momentos alegres que passamos juntos.

Aos amigos do meu segundo laboratório, Lauretta, Silvia, Manuela, Carmine, Maria Grazia, Ana Maria, Martina, Gabriella, Emanuele, Michela, Enrica, Mirko,

Simona, Angela e o professor Antonio Musarò, por me fazer sentir bem recebida e assistida, além de compartilharem novas técnicas e entusiasmo na busca incessante pelo conhecimento. Minha experiência com vocês jamais será esquecida.

À querida Solange, por manter minha mente sã durante o desenvolvimento dessa Tese.

Aos queridos amigos, Andrea, Elenice, Luciane e Uchida, por fazerem meus dias mais felizes.

À Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP, em especial aos secretários Ilza, Márcio, Mariana e Paulo, pela competência e prontidão no suporte necessário aos alunos de pós-graduação.

À FAPESP e a CAPES, pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

“Quelli che s'innamorano di pratica senza scienza son come il nocchiere, che entra in naviglio senza timone o bussola, che mai ha certezza su dove si vada.”

Leonardo da Vinci

“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

BACURAU, A.V.N. **Contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular desencadeada pela insuficiência cardíaca: influência do treinamento físico aeróbico.** 2013. 122 f. Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A insuficiência cardíaca (IC) é a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório. Considerando a prevalência crescente e a morbimortalidade associada representa um importante problema de saúde pública. Em quadros mais avançados, além do comprometimento funcional, portadores de IC apresentam perda de massa muscular excessiva que pode culminar em caquexia cardíaca; condição que contribui para o mau prognóstico e a mortalidade aumentadas. A massa muscular é regulada pelo balanço entre estímulos anabólicos e catabólicos. A quinase Akt vêm sendo considerada uma importante quinase na regulação do crescimento muscular por controlar o anabolismo proteico. Dessa forma, ativadores da Akt (IGF-I e insulina), bem como proteínas alvo da sinalização da Akt (mTOR e GSK3 β) são importantes mediadores na manutenção da massa muscular e podem ser regulados por estímulos metabólicos, nutricionais e mecânicos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular desencadeada pela IC tanto em humanos quanto em modelo experimental, bem como o efeito do treinamento físico aeróbico (TFA). Nossos resultados demonstraram que em biópsias do vasto lateral de pacientes portadores de IC classe II houve redução na expressão de mRNA de todas as isoformas de IGF-I e na expressão das proteínas IGFBP-3, Akt1, GSK3 β , pGSK3 β ^{Ser9}, mTOR e tendência a redução na pmTOR^{Ser2448} (p=0,08) e aumento na pAMPK^{Thr172}. Esses resultados foram acompanhados pela redução no VO₂ pico desses pacientes. O TFA de 12 semanas levou a um aumento não significativo na expressão de mRNA da isoforma IGF-I Ea (p=0,07) e IGF-I PAM (p=0,06). Também observou-se aumento na pAMPK^{Thr172} e tendência a aumento na Akt1 (p=0,07) e mTOR (p=0,06). Em modelo experimental de IC, no músculo sóleo observou-se redução na expressão das proteínas IGF-I, PI3K, pAkt^{Ser473}, pGSK3 β ^{Ser9} e aumento da

pAMPK^{Thr172}. O TFA de 8 semanas promoveu aumento na expressão do mRNA das isoformas de IGF-I Ea, Eb e IGF-I PAM, bem como na expressão das proteínas IGF-I, PI3K, pAkt^{Ser473}, pmTOR^{Ser2448} e redução na pAMPK^{Thr172}. O conjunto de alterações promovido pelo TFA foi associado à maior tolerância ao esforço físico e ganho no desempenho motor em Rota Rod, além de prevenir a atrofia muscular. Quando esses animais foram tratados com rapamicina, um inibidor farmacológico da mTOR, o efeito do TFA na prevenção da atrofia muscular foi abolido. Juntos, esses resultados apoiam a hipótese de que a via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR está envolvida no reestabelecimento muscular na IC induzida pelo TFA.

Palavras-chave: insuficiência cardíaca, músculo esquelético, IGF-I/Akt/mTOR, treinamento físico aeróbico.

ABSTRACT

BACURAU, A.V.N. **Contribution of IGF-I/Akt/mTOR signaling pathway to the muscular atrophy induced by heart failure: influence of aerobic exercise training.** 2013. 122 f. Tese (Doutorado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Heart failure (HF) is a common ultimate consequence for the most cardiomyopathies and other diseases from circulatory system. Due its growing prevalence and morbimortality is an important public-health problem. In more advanced cases, besides functional impairment, HF patients present an excessive skeletal muscle loss which can lead to cardiac cachexia; a condition associated to a poor prognostic and increased mortality.

Skeletal muscle mass is regulated by the balance between anabolic and catabolic stimuli. Akt kinase, although involved with the protein synthesis pathway, is able to regulates the skeletal muscle growth via anabolism and catabolism control. .. An importante role in the skeletal muscle growing has been attributed to the Akt kinase due its ability to control protein synthesis. Thus, activators (IGF-I and insulin) as well as target proteins in the Akt signaling pathway (mTOR and GSK3 β) are important mediators in the skeletal muscle mass homeostasis being regulated by anabolic, nutritional and mechanic stimuli. Therefore, the aim of the presente study was to evaluate the contribution of IGF-I/Akt/mTOR contribution to the muscle atrophy induced by HF in humans and mice. Additionally, the effect of aerobic exercise training were evaluated. Our data demonstrated that in biopsies obtained in the vastus lateral from class II IC patients occurred a reduction in the expression of all the forms of IGF investigated and in the expression of proteins such as IGFBP-3, Akt1, GSK3 β , pGSK3 β ^{Ser9}, mTOR, and tendency to reduce pmTOR^{Ser2448} (p=0.08) and to increase pAMPK^{Thr172}. These results were accompanied by the reduction of peak VO₂ in these patients. Twelve weeks of aerobic exercise training promoted a non-significant increase in the expression of the IGF-I Ea (p=0.07) and IGF-I PAM (p=0.06) mRNA expression. Moreover, it was observed an increase to pAMPK^{Thr172}, and tendency of increase for Akt1 (p=0.07) and mTOR (p=0.06) mRNA expression. In a experimental model of IC, it was observed a reduction in the expression of IGF-

I, PI3K, pAkt^{Ser473}, pGSK3 β ^{Ser9} and increase of pAMPK^{Thr172}. Eight weeks of aerobic exercise training increased the mRNA of IGF-I Ea, Eb and IGF-I PAM isoforms, as well as in the expression of IGF-I, PI3K, pAkt^{Ser473}, pmTOR^{Ser2448} and pAMPK^{Thr172} reduction. The changes induced by aerobic exercise training were associated with a higher tolerance to exercise and motor performance in rota rod besides prevent muscular atrophy. When treated with a inhibitor of mTOR, rapamycin, the adaptations induced by aerobic exercise training were blunted, supporting the hypothesis that the IGF-I/Akt/mTOR signaling pathway is involved in the recovering of muscle mass induced by physical training.

Key-words: heart failure, skeletal muscle, IGF-I/Akt/mTOR, aerobic exercise training.

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Porcentagem de fibras tipo I e tipo IIA (A), razão número de capilares/número de fibras musculares (B) e área de secção transversa das fibras tipo I e tipo IIA (C) no músculo sóleo de animais com 7 meses de idade controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentário (ARKO) e treinado (ARKOT).....	26
FIGURA 2	Diferentes isoformas do gene do IGF-I em roedores e humanos.....	28
FIGURA 3	Estrutura dos receptores de insulina e IGF-I.....	30
FIGURA 4	Esquema da via de sinalização Akt/mTOR envolvida na regulação da massa muscular (A). Mediadores da regulação da mTOR1(B).....	34
FIGURA 5	Sinalização da mTOR na síntese proteica (A). Contribuição da via proteolítica ubiquitina proteassoma na regulação da síntese proteica (B).....	37
FIGURA 6	Expressão gênica (A-D) e proteica (E-G) dos componentes do sistema de regulação do IGF-I no músculo vasto lateral.....	61
FIGURA 7	Expressão de proteínas integrantes da via de sinalização Akt/mTOR no músculo vasto lateral.....	63
FIGURA 8	VO ₂ pico de indivíduos controle e portadores de IC.....	64

FIGURA 9	Expressão gênica (A-E) e proteica (F-H) dos componentes do sistema de regulação do IGF-I do músculo sóleo de animais.....	67
FIGURA 10	Expressão de proteínas integrantes da via de sinalização Akt/mTOR do músculo sóleo de animais....	69
FIGURA 11	Área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo IIA do músculo sóleo de animais	70
FIGURA 12	Distância percorrida em teste de esforço máximo (A) e avaliação do desempenho motor em Rota Rod (B).....	71
FIGURA 13	Desenho experimental da suplementação com leucina (A), glicemia (B), distância percorrida em teste de esforço máximo (C) e área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo IIA do músculo sóleo (D).....	75
FIGURA 14	Imunofluorescência para MHCI (vermelho) e laminina (verde) no músculo sóleo (A), área de secção transversa das fibras do tipo I e IIA do músculo sóleo (B) e <i>blot</i> representativo das proteínas P70 e pP70S6K ^{Thr389} (C).....	76
FIGURA 15	Desenho experimental do tratamento com rapamicina isolado ou associado ao treinamento físico aeróbico (A) e área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo IIA do músculo sóleo (B).....	77
FIGURA 16	Distância percorrida em teste de esforço máximo (A), avaliação do desempenho motor em Rota Rod (B), massa do baço (C) e razão peso úmido/ seco dos pulmões de animais.....	79

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Características físicas e clínicas dos indivíduos controle e portadores de insuficiência cardíaca.....	60
TABELA 2	Parâmetros hemodinâmico e ecocardiográfico de animais controle e com IC induzida por hiperatividade simpática.....	65
TABELA 3	Parâmetros metabólicos e morfológicos após tratamento com leucina.....	73
TABELA 4	Parâmetros morfológicos, metabólicos e hemodinâmico.....	80

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Resumo dos principais resultados.....	82

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon Ca ²⁺
CO	Camundongos do grupo controle
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC	Débito cardíaco
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
E1	Proteína ativadora
E2	Proteína carreadora
E3	Proteína ligase
FC	Frequência cardíaca
FEnc	Fração de encurtamento
FoxO	Fatores de transcrição <i>forkhead Box O</i>
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance

IC	Insuficiência cardíaca
IGF-I	Fator de crescimento similar à insulina
IL 1 β	Interleucina 1 β
IM	Infarto do miocárdio
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NAPDH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
PAS	Pressão arterial sistólica
PKA	Proteína quinase A
PPVED	Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPVES	Parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
SERCA	Proteína sarco-endo retículo Ca ²⁺ -ATPase
Sham	Cirurgia fictícia
SIVD	Espessura do septo interventricular na diástole
SIVS	Espessura do septo interventricular na sístole
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético
TNF α	Fator de necrose tumoral α
VE	Ventrículo esquerdo
VO ₂ pico	Consumo pico de oxigênio

β	Beta
β_2 KO	Animais com inativação gênica dos receptores β_2 adrenérgicos

Unidades

mmHg	Milímetros de mercúrio
Bpm	Batimento por minuto
L	Litro
μ L	Microlitro
m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
μ m	Micrometro (10^{-6})
min	Minuto
ms	Milissegundo
g	Gramma
mg	Miligramma
μ g	Microgramma
mM	Milimolar
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ANEXOS

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática.....	25
2.2	Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca.....	26
2.2.1	IGF-I: estrutura e função biológica.....	27
2.2.2	Akt: reguladora do crescimento e metabolismo muscular.....	30
2.2.3	mTOR: centro integrador do crescimento celular.....	32
2.2.4	GSK3: regulador da síntese proteica independente de mTOR.....	37
2.3	Atrofia muscular na insuficiência cardíaca: possível contribuição da via Akt/mTOR.....	38
2.4	Treinamento físico aeróbico e insuficiência cardíaca.....	39
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	Geral.....	42
3.2	Específicos.....	42
3.2.1	Estudar a via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR no músculo vasto	42

lateral de pacientes portadores de IC classe II, previamente e após período de 12 semanas treinamento físico aeróbico.....	
3.2.2 Estudar a participação da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia do músculo sóleo de camundongos com IC por hiperatividade simpática e o efeito do treinamento físico aeróbico sobre os componentes dessa via.....	42
3.2.3 Estudar o efeito da sobrecarga de leucina na ativação de mTOR independente do estímulo mecânico no músculo sóleo de camundongos com IC por hiperatividade simpática.....	43
3.2.4 Estudar o efeito do tratamento com inibidor farmacológico da mTOR (rapamicina), isolado e associado ao treinamento físico aeróbico.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Amostra.....	44
4.2 Avaliação da função cardíaca.....	46
4.3 Avaliação da capacidade física e função muscular.....	48
4.4 Treinamento físico aeróbico.....	49
4.5 Estratégias utilizadas para avaliar a contribuição da quinase mTOR na atrofia muscular induzida pela IC em modelo experimental.....	50
4.6 Avaliação da ingestão alimentar em gaiola metabólica.....	51
4.7 Avaliação da glicemia e do teste de tolerância à glicose e animais.....	51
4.8 Coleta dos tecidos.....	52
4.9 Biópsia do vasto lateral em humanos.....	52
4.10 Avaliação da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo de animais.....	53
4.11 Western blotting.....	55
4.12 Avaliação da expressão gênica das isoformas de IGF-I.....	56
4.13 Análise estatística.....	57
5. RESULTADOS.....	58

5.1	Efeito do treinamento físico aeróbico nos diferentes componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR em portadores de IC.....	59
5.1.1	Expressão gênica e proteica de componentes da regulação do IGF.....	59
5.1.2	Expressão das proteínas constituintes da via de sinalização Akt/mTOR.....	62
5.2	Efeito do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular induzida por IC e nos diferentes componentes da via de sinalização Akt/mTOR.....	65
5.2.1	Expressão gênica e proteica de componentes da regulação do IGF.....	66
5.2.2	Expressão das proteínas constituintes da via de sinalização Akt/mTOR.....	68
5.2.3	Parâmetros morfológicos e funcionais em modelo experimental....	70
5.3	Efeito da sobrecarga de leucina na atrofia muscular induzida pela IC....	72
5.4	Efeito do tratamento com rapamicina na IC: contribuição da quinase mTOR na regulação da massa muscular promovida pelo treinamento físico aeróbico.....	76
6	DISCUSSÃO.....	83
6.1	Efeito do treinamento físico aeróbico nos diferentes componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR em portadores de IC.....	83
6.2.	Efeito do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular induzida por IC e nos diferentes componentes da via de sinalização Akt/mTOR.....	87
6.3.	Efeito da sobrecarga de leucina na atrofia muscular induzida pela IC....	92
6.4.	Efeito do tratamento com rapamicina na IC: contribuição da quinase mTOR na regulação da massa muscular promovida pelo treinamento físico aeróbico.....	95
7	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório. Sua incidência é crescente, especialmente em países em desenvolvimento (LOPEZ-JARAMILLO, 2008), fato pode ser atribuído, em parte, ao aumento da longevidade, da urbanização e às mudanças no estilo de vida. Assim, considerando a prevalência crescente e a morbimortalidade associada à IC, esta representa um importante problema de saúde pública. Nos Estados Unidos ela acomete 1-2% da população adulta e 6-10% da população idosa (MCMURRAY e PFEFFER, 2005; DUNLAY et al., 2009) representando cerca de 5,7 milhões de norte-americanos (ROGER et al., 2012) sendo que a cada ano 550.000 novos casos são registrados (HO et al., 1993). No Brasil este quadro não é diferente, dados do sistema único de saúde (SUS) mostram que a IC é a causa mais frequente de internação por doença cardiovascular e que apresenta aumento progressivo nas taxas de mortalidade em pacientes mais idosos (BOCCHI et al., 2009).

Quanto à sua fisiopatologia, a IC é uma síndrome complexa que envolve múltiplos sistemas e mecanismos neuro-humorais compensatórios sendo acompanhada pela redução da expectativa de vida e caracterizada por sintomas como fadiga, dispneia bem como intolerância a esforços físicos (LUNDE et al., 2001; CRIMI et al., 2009). Neste contexto, há uma redução considerável da autonomia e qualidade de vida de pacientes com IC (WILSON et al., 1999).

Apesar de as alterações no tecido cardíaco serem causais e principais no desenvolvimento da IC, vários estudos têm demonstrado que a limitação da capacidade funcional perante a progressão da IC não está somente relacionada ao grau de disfunção ventricular (FRANCIOSA, PARK e LEVINE, 1981). Dessa forma, vem crescendo o número de trabalhos sobre o envolvimento da musculatura esquelética na intolerância ao esforço observada na IC. A hipótese que orienta essa nova abordagem propõe que pelo menos em parte, o comprometimento funcional pode ser atribuído a mudanças periféricas e ficou conhecida como *hipótese muscular* (LUNDE et al., 2001; PIEPOLI e COATS, 2013). Essa mudança conceitual permitiu constatar que a progressiva alteração do tecido muscular esquelético na IC

se reflete no agravamento do quadro clínico de portadores da síndrome, piorando o prognóstico, não apenas pela diminuição da qualidade de vida, mas também pela perda de autonomia do paciente. O desenvolvimento da miopatia esquelética na IC é observado nos músculos apendiculares (grandes músculos da locomoção e músculos dos braços), e nos músculos envolvidos na respiração (FULSTER et al., 2013). Dentre as alterações observadas nesses músculos ressaltam-se as alterações no metabolismo energético, como o acúmulo precoce de lactato durante a execução de exercício físico (LIBERA et al., 1999; LUNDE et al., 2001; PIEPOLI et al., 2001; HAMBRECHT et al., 2002; VESCOVO, 2002) resultante de uma sobreposição antecipada do metabolismo anaeróbio sobre o aeróbio; alterações fenotípicas como a redução no percentual de fibras do tipo I (oxidativa e resistente à fadiga) e aumento no percentual de fibras do tipo IIA (oxidativas e glicolíticas, menos resistentes à fadiga), também contribuem para reforçar a supracitada acidose decorrente da disfunção do metabolismo (HAMBRECHT et al., 1997).

Outro fator determinante da capacidade física e da qualidade de vida desses pacientes, com incidência média de 68%, é a atrofia muscular (MANCINI et al., 1992). Tal atrofia é caracterizada por diminuição no conteúdo proteico, redução no diâmetro das fibras e na força muscular (JACKMAN e KANDARIAN, 2004), que pode ulteriormente culminar em caquexia (do grego: *kakos*, má, ruim e *hexis*, condição do corpo). Uma condição resultante de várias doenças sistêmicas como o câncer, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o diabetes *mellitus*, a sepse, a insuficiência renal e a IC, sendo neste último caso denominada *caquexia cardíaca* (PITTMAN e COHEN, 1964; HAMBRECHT et al., 2002; MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006). Embora o termo tenha sido cunhado por PITTMAN e COHEN (1964), o primeiro relato documentado sobre a caquexia foi feito por Hipócrates há 2.300 anos (KATZ e KATZ, 1962; DOEHNER e ANKER, 2002).

No quadro de caquexia normalmente observa-se perda excessiva de massa corporal associada à perda das massas óssea, gorda e muscular (ANKER e SHARMA, 2002). O diagnóstico da caquexia cardíaca foi recentemente definido como a perda > 5% de massa corporal de forma não intencional num período de 12 meses ou menos (EVANS et al., 2008). Na clínica, observa-se que cerca de 20% dos pacientes com IC desenvolvem caquexia (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006), e devido a essa condição apresentam mortalidade acentuada em

comparação a pacientes não caquéticos (50% vs. 17%, respectivamente) (ANKER e COATS, 1999). Dessa forma, vem sendo proposto que a caquexia seja um preditor independente de mortalidade em portadores de IC grave, e portanto, a sua avaliação deve ser incluída nos programas de transplantes, além de ser importante alvo para o tratamento da IC (ANKER et al., 1997).

A progressão e desenvolvimento da atrofia muscular envolvem uma rede complexa de fatores metabólicos, imunológicos e neuro-hormonais potencializados pela inatividade física e distúrbios nutricionais. Em geral, nessa condição, a síntese de proteínas é suprimida e suplantada pela elevação da degradação de proteínas, levando a um quadro atrófico que é agravado pela perda progressiva de mionúcleos por apoptose (LIBERA et al., 1999).

O fator de crescimento similar a insulina (IGF-I), originado de fontes autócrinas e/ou parácrinas, exerce uma importante ação anabólica (ROMMEL et al., 2001) e anticatabólica (STITT et al., 2004) na massa muscular. A ligação do IGF-I ao seu receptor desencadeia a ativação de várias quinases intracelulares, incluindo a quinase serina/treonina chamada Akt. Alvos da ativação da Akt tais como a *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) e *P70 ribosomal S6 kinase* (P70S6K), são proteínas-chave envolvidas na iniciação da tradução e síntese de proteínas (SCOTT e LAWRENCE, 1998), enquanto que sua ação inibitória sobre o fator de transcrição *forkhead box O* (FOXO) reduz a expressão de genes envolvidos na degradação proteica (atrogin-1 e MuRF1) (KANDARIAN e JACKMAN, 2006).

Em músculos atrofiados de animais com IC, foi observada redução tanto nas concentrações de IGF-I circulante quanto na expressão de IGF-I muscular, portanto, a manipulação das concentrações de IGF-I ou as vias ativadas por este peptídeo constituem uma potencial estratégia no combate a atrofia muscular em quadros de IC (HAMBRECHT et al., 1997; HAMBRECHT et al., 2002). De fato, animais transgênicos MLC/mIGF-I que superexpressam a isoforma local de IGF-I após 12 semanas de infarto do miocárdio apresentaram redução na expressão de atrogin-1 associada a prevenção da atrofia muscular (SCHULZE et al., 2005).

Uma estratégia conhecida por aumentar as concentrações locais de IGF-I é o exercício físico regular. Por meio do estímulo mecânico, o exercício físico, proporciona a ativação da cascata de sinalização da via IGF-I/Akt/mTOR iniciada

pelo IGF-I, sendo este estímulo, um potente agente trófico para o músculo esquelético. Na IC, o treinamento físico é considerado um importante adjuvante no tratamento dessa síndrome, proporcionando adaptações que se estendem além do tecido cardíaco. Em nosso laboratório demonstramos o importante efeito preventivo do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular esquelética desencadeada pela IC induzida por hiperatividade simpática (KO) (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012).

Mediante a esses achados e a escassez de informações na literatura sobre os mecanismos moleculares envolvidos na atrofia muscular associada à IC, a continuação desses estudos se fez necessária e relevante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática

Com o advento de técnicas de DNA recombinante, modelos animais geneticamente modificados foram produzidos com o intuito de mimetizar diversas condições patológicas e contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos em sua origem e progressão.

O modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática consiste na inativação dos genes para os receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos em camundongos. Estes animais apresentam concentrações elevadas de noradrenalina plasmática (HEIN, ALTMAN e KOBILKA, 1999), o que sugere hiperatividade do sistema nervoso simpático. Além disso, apresentam 50% de mortalidade aos sete meses de idade acompanhado por sinais clínicos de IC como edema pulmonar (FERREIRA et al., 2006). As consequências deletérias da hiperatividade simpática resultam em diminuição na contratilidade cardíaca, perda de cardiomiócitos e intolerância ao exercício físico com diminuição significativa na capacidade máxima de realização de esforço (BRUM et al., 2002).

Os receptores α_2 -adrenérgicos regulam a atividade simpática por meio de diferentes mecanismos. No bulbo rostroventrolateral, os receptores α_{2A} -adrenérgicos são pós-sinápticos e regulam o tônus simpático. Quando ativados, eles desencadeiam bradicardia e hipotensão (ALTMAN et al., 1999). Em neurônios simpáticos periféricos ambos os receptores α_{2A} - e α_{2C} -adrenérgicos estão localizados no terminal pré-sináptico e regulam a liberação do neurotransmissor, no caso a noradrenalina (HEIN et al., 1999). Quando ativados, por ação da noradrenalina, eles inibem a liberação da mesma pelo terminal nervoso simpático e por isso são comumente denominados “autorreceptores”. Por fim, vale notar que os camundongos com inativação dos genes para os receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos (KO) constituem-se no primeiro modelo experimental a ser descrito na literatura que desenvolve cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que camundongos KO apresentam aumento no percentual de fibras glicolíticas, atrofia muscular e rarefação vascular (FIGURA 1) associados à antecipação da fadiga periférica e, por conseguinte, à intolerância ao esforço. Interessante, após oito semanas de treinamento físico aeróbico em idade prévia ao quadro de cardiomiopatia grave (5 meses), observou-se prevenção da miopatia esquelética associada a melhora funcional da musculatura esquelética (BUENO JUNIOR et al., 2006; BACURAU et al., 2009).

FIGURA 1: Porcentagem de fibras tipo I e tipo IIA (A), razão número de capilares/número de fibras musculares (B) e área de secção transversa das fibras tipo I e tipo IIA (C) no músculo sóleo de animais com 7 meses de idade controle (WT), α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentário (ARKO) e treinado (ARKOT). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média. [‡] diferença significativa vs. WT sedentário ($p \leq 0,05$); [§] diferença significativa vs. ARKO ($p \leq 0,05$) (BACURAU et al., 2009).

2.2. Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca

A musculatura esquelética representa cerca de 40-50% da massa corporal e contém o maior conteúdo de proteínas do organismo. Para a manutenção da massa muscular, mecanismos envolvidos no balanço entre a síntese e a degradação proteica são de grande importância (HESZELE e PRICE, 2004). De fato, indivíduos adultos apresentam um *turnover* proteico de 3,5-4,5 g de proteína.kg⁻¹.dia⁻¹, levando em média a síntese e a degradação de 1-1,5 Kg de proteína por dia (MITCH e

GOLDBERG, 1996). Portanto, qualquer desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação proteicas pode culminar em alterações tróficas na musculatura esquelética.

Novos estudos têm expandido o conhecimento sobre os mecanismos intracelulares envolvidos no balanço entre síntese e degradação proteicas (SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004), demonstrando a importância da proteína Akt1 como moduladora da expressão de genes envolvidos na progressão da atrofia muscular. Esses novos conhecimentos não apenas auxiliam no entendimento dos fatores envolvidos na progressão da atrofia muscular, como também demonstram uma importante integração entre vias celulares, onde, uma molécula chave do crescimento celular (Akt) quando ativada, regula negativamente a degradação de proteínas. Tal interação sugere um mecanismo dinâmico na regulação da massa muscular por um processo coordenado entre moduladores intracelulares de síntese e degradação proteica.

A seguir, discorreremos sobre os componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR envolvidos na regulação da massa muscular, bem como diferentes moduladores dessa via.

2.2.1 IGF-I: estrutura e função biológica

Em 1976, Rinderknecht e Humbel isolaram do soro humano, dois compostos com estruturas semelhantes à insulina nomeados "fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2" (IGF-I e IGF-II). Hoje sabe-se que o IGF-I é um importante fator na homeostase muscular por meio dos processos de proliferação, diferenciação, crescimento e sobrevivência celular (WINN et al., 2002).

Além da molécula circulante produzida pelo fígado em resposta ao hormônio do crescimento (GH), existem outras isoformas de IGF-I produzidas em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético que exercem ações autócrinas/parácrinas (BARTON, 2006). Essas isoformas são geradas por modificações pós-transcricionais e diferenciam-se entre si pela presença de diferentes peptídeos sinais na região N-terminal e diferentes peptídeos E na região C-terminal (BARTON, 2006). Em humanos e roedores o gene é composto por seis éxons e cinco íntrons (FIGURA 2).

Na região N-terminal são transcritas as isoformas classe 1 e classe 2 nos respectivos éxons 1 e 2, pela geração de diferentes peptídeos sinais por *splicing* alternativo nos distintos sítios de clivagem do pró-peptídeo. Em geral, a classe 1 é expressa na maioria dos tecidos exercendo ações autócrinas/parácrinas, enquanto a classe 2 é produzida principalmente pelo fígado sob o estímulo do GH, com ações endócrinas (LEROITH e ROBERTS, 1991). Na região C-terminal também são transcritas duas diferentes isoformas por *splicing* alternativo, Ea e Eb/Ec. A isoforma Ea é resultante da exclusão do éxon 5, formando a conformação 4-6 observada tanto em seres humanos quanto em roedores. Por sua vez, ambas isoformas Eb em roedores ou Ec em humanos resultam da inclusão do éxon 5, seguido por uma mudança da ORF (*open reading frame*) e consequentemente um códon de parada prematuro (FIGURA 2) (BARTON, 2006). A isoforma Ea é a mais abundante no músculo esquelético e constitui a principal fonte para a formação do IGF maduro, enquanto a isoforma Eb/Ec, predominante no fígado (circulante), é transcrita no músculo esquelético principalmente após estímulos mecânicos e/ou danos, o que atribuiu a essa isoforma a terminologia de *mechano growth factor* (MGF) (WALLIS, 2009). Todas as isoformas de IGF-I são processadas em uma proteína madura que consiste num pequeno peptídeo de 70 aminoácidos com estrutura semelhante à da insulina. Essa semelhança permite a ligação do IGF-I, embora com baixa afinidade, ao receptor de insulina (RAKATZI et al., 2006).

FIGURA 2: Diferentes isoformas do gene do IGF-I em roedores e humanos. Adaptado de BARTON (2006).

Cerca de 99% do IGF-I circulante é sequestrado por *IGF-binding proteins* (IGFBP) que possuem afinidade semelhante ou superior à do receptor de IGF-I. Dos 6 subtipos existentes de IGFBPs (1 a 6), o subtipo IGFBP-3 é o mais expresso em seres humanos, além de ligar-se em 80% do IGF-I circulante. Essa ligação desempenha funções importantes, tais como: a regulação da meia-vida do IGF circulante (RUSSELL-JONES et al., 1995; GATTI et al., 2012) e a distribuição do IGF-I nos tecidos, agindo como uma proteína transportadora que facilita ou bloqueia a ligação do IGF ao seu receptor ou ao receptor de insulina. Esta última função se faz importante, pois dada a semelhança estrutural entre a insulina e IGF, um possível efeito seria um estado hipoglicêmico (RAJARAM, BAYLINK e MOHAN, 1997).

Diferentes métodos usados em animais, incluindo a infusão de proteínas recombinantes e a superexpressão do gene que codifica o IGF-I, vêm demonstrado a importância desse fator no processo de hipertrofia muscular esquelética (ADAMS e MCCUE, 1998; BARTON-DAVIS et al., 1998; MUSARO et al., 2001). A participação do IGF-I no crescimento celular se faz por dois mecanismos: 1) pela ativação/diferenciação das células satélites que se fundem nas fibras musculares auxiliando na regeneração e no crescimento muscular (FLORINI et al., 1993), e 2) pelo aumento da síntese proteica advinda da ativação das vias de sinalização Akt/mTOR e MAPK (*mitogen activated protein kinase*), sendo esta última envolvida principalmente na proliferação celular (MATHENY, NINDL e ADAMO, 2010).

Embora não seja o único (discutido nos próximos tópicos), o IGF-I é o principal ativador da via de sinalização Akt/mTOR, sendo essa via também reconhecida como a via IGF-I/Akt/mTOR. O início dessa sinalização é deflagrado pela ligação do IGF-I ao receptor de tirosina quinase tipo I (IGF-IR), que semelhante ao receptor de insulina, é composto por duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembrânicas, ligadas por pontes de dissulfeto. O IGF-I se liga a subunidades α por meio de um domínio rico em resíduos de cisteína, enquanto a subunidade β traduz o sinal por meio de um domínio de tirosina quinase (FIGURA 3) (KATO et al., 1994).

Depois de ligado ao receptor, o IGF-I promove a transfosforilação do mesmo, resultando na fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1). Este ativa a translocação da PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) para a membrana, que

promove a fosforilação do PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) em PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), causando a fosforilação e o recrutamento da PDK1/2 (quinase dependente de fosfoinosítídeos) para o domínio PH (*pleckstrin homology*) do PIP3, mesmo sítio que será recrutada a Akt e subsequentemente fosforilada pela PDK1/2 (FIGURA 4A).

FIGURA 3: Estrutura dos receptores de insulina e IGF-I.

2.2.2 Akt: reguladora do crescimento e metabolismo muscular

A Akt/proteína quinase B (PKB) exerce uma regulação crítica na homeostase celular, atuando no controle do metabolismo, da sobrevivência, da proliferação e do crescimento celular (NADER, 2005). A Akt é uma família de proteínas serina/treonina quinases composta por três membros: Akt1 (também chamada de PKB α), Akt2 (PKB β), e Akt3 (PKB γ). Estas isoformas são codificadas por três genes distintos, homólogos, e possuem significativa homologia na sequência de aminoácidos (>80%). A Akt1 é amplamente expressa nos tecidos (CHEN et al., 2001), enquanto que Akt2 é expressa em tecidos cuja insulina modula o metabolismo de glicose, tais como músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (ALTOMARE et al., 1998). Já a Akt3 é expressa no pulmão, rim e predominantemente no cérebro (BRODBECK, CRON e HEMMINGS, 1999; EASTON et al., 2005). Portanto, Akt1 e Akt2 são as principais isoformas expressas no músculo esquelético, e desempenham importante papel na regulação da estrutura e

função muscular.

Diferentes abordagens genéticas começaram a elucidar as funções específicas das isoformas de Akt. Camundongos Akt1^{-/-} são viáveis, mas exibem deficiência no crescimento somático, sugerindo o papel desta isoforma no controle do crescimento celular (CHO et al., 2001). Já, a superexpressão da forma ativa da Akt1 resultou num fenótipo hipertrófico, bem como no crescimento dos órgãos (SHIOI et al., 2002). Por sua vez, a expressão específica no músculo esquelético da forma constitutivamente ativa da Akt1, resultou num fenótipo hipertrófico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de prevenir a atrofia de músculos denervados (BODINE et al., 2001). Mais recentemente, foi demonstrada na mesma abordagem experimental, a hipertrofia específica de fibras do tipo IIB, associada ao aumento da força muscular (IZUMIYA et al., 2008). Camundongos Akt2^{-/-} também são viáveis, mas desenvolvem um fenótipo semelhante ao observado no diabetes tipo II, o que sugere a participação desta isoforma na regulação do metabolismo de glicose (CHO et al., 2001). Experimentos em músculo *ex vivo*, mostraram que a ausência da Akt2 reduz a captação de glicose insulino-estimulada em relação a animais controle (SAKAMOTO et al., 2006), enquanto, estudo com cultura de células mostrou que o silenciamento da Akt2 por siRNA (interferência por RNA) inibia a captação de glicose insulino-estimulada e a síntese de glicogênio (BOUZAKRI et al., 2006). A inativação gênica conjunta dos genes da Akt1 e Akt2 resultou em grave deficiência do crescimento com mortalidade pós natal. Estes animais apresentavam atrofia muscular grave (~50%), principalmente devido à redução na dimensão das fibras musculares (PENG et al., 2003). Estes resultados sugerem que a Akt1 e a Akt2 não assumem papéis redundantes, portanto, promovem funções celulares específicas.

Em análise de *microarray* observou-se que a ativação da Akt induzia múltiplas mudanças na expressão de genes no músculo esquelético. (IZUMIYA et al., 2008; BLAAUW et al., 2009; BLAAUW et al., 2010). Um importante mediador dessa quinase é o fator de transcrição FOXO. Quando ativo, ou seja desfosforilado, FOXO está localizado no compartimento nuclear ligado ao DNA. A sua fosforilação pela Akt1 (FIGURA 4A) em pelo menos dois resíduos conservados (FOXO1^{Thr24} e ^{Ser256}; FOXO3a^{Thr32} e ^{Ser193}) resulta em sua liberação do DNA e ligação à proteína 14-3-3, uma chaperona que sequestra e ancora FOXO no citoplasma (BIRKENKAMP e COFFER, 2003). Vale ressaltar que parte desse processo envolve a translocação da

Akt para o núcleo. Por outro lado, a inativação da Akt induz a desfosforilação de FOXO, e ambos FOXO e 14-3-3 são translocados para o núcleo, onde FOXO pode exercer a sua atividade transcricional. FOXO é responsável pela transativação de genes constituintes do sistema proteolítico dirigido pelo proteassoma, especialmente das E3 ligases atrogin-1(*atrophy gene-1*) e MuRF1 (*muscle ring finger 1*). Existe uma relação direta entre a ativação do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma mediada por FOXO, onde, o aumento da expressão de E3 ligases em diferentes modelos de atrofia muscular são induzidas pela ativação desse fator de transcrição (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001; SANDRI et al., 2004). O sistema proteolítico ubiquitina proteassoma é indicado como o principal envolvido na atrofia muscular durante estados catabólicos (LECKER et al., 1999). A ubiquitinação de substratos proteicos é principalmente regulada pelas E3 ligases que catalisam a transferência de ubiquitinas ativadas e conjugadas em um complexo de poliubiquitinas para a proteína alvo, que é então reconhecida pelo proteassoma 26S e degradada em pequenos peptídeos (8-12 aminoácidos) (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002). Essas E3 ligases aumentam consideravelmente sua expressão na atrofia muscular associada ao jejum, sepse, diabetes e IC (GOMES et al., 2001; SCHULZE et al., 2005; KANDARIAN e JACKMAN, 2006; BAVIERA et al., 2008) (CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012). Portanto, a integração entre os sistemas anabólicos (IGF-I/Akt/mTOR) e catabólicos (sistema proteolítico ubiquitina proteassoma) por meio do fator de transcrição FOXO, representa um grande avanço na compreensão da regulação da massa muscular, sendo esse um importante achado nos últimos dez anos (SCHIAFFINO et al., 2013).

2.2.3 mTOR: centro integrador do crescimento celular

A mTOR é um importante regulador de processos biológicos, tais como, o crescimento e a sobrevivência celular, que são mediados por sinais intracelulares e extracelulares, incluindo os fatores de crescimento, nutrientes, níveis de energia e estresse celular. Atualmente essa quinase vem sendo foco de muitos estudos pelo seu papel fundamental no controle do crescimento celular, e consequentemente, na gênese de tumor.

A história da mTOR teve início em 1965 com a descoberta, de uma bactéria (*Streptomyces Hygroscopicus*) no solo da ilha de Páscoa que apresentava uma potente ação antifúngica e um importante efeito imunossupressor, que culminou posteriormente em seu uso clínico (VEZINA, KUDELSKI e SEHGAL, 1975). Demonstrou-se que tais propriedades estavam associadas ao composto que veio a ser denominado de rapamicina ou sirolimus (SEHGAL, 2003). Além de suas propriedades antifúngicas e imunossupressoras, verificou-se que a rapamicina era capaz de inibir o crescimento de uma variedade de organismos eucarióticos (FINGAR e BLENIS, 2004; FINGAR et al., 2004). Posteriormente, esse efeito na regulação do crescimento foi atribuído a capacidade da rapamicina de inibir a sinalização de duas serina/treonina quinases em levedura, designando-as como **target of rapamycin** (TOR) 1 e 2 (HEITMAN et al., 1991). Um gene ortólogo ao de leveduras foi descoberto em mamíferos (BROWN et al., 1994; SABATINI et al., 1994) e mais tarde passou a ser denominado de **mammalian target of rapamycin** (mTOR) (SABERS et al., 1995). Vinte anos após a descoberta de mTOR, estudos demonstraram a complexidade dos mecanismos regulados por esse conjunto de proteínas ancoradas a uma quinase em associação a rapamicina e por isso sua nomenclatura foi alterada para **mechanistic target of rapamycin** (LAPLANTE e SABATINI, 2012). Portanto, parte do conhecimento sobre a função biológica da quinase mTOR foi obtido pelo uso da rapamicina, uma vez que a mTOR tem sua atividade inibida pela mesma. Foi demonstrado que a mTOR possui dois complexos multiproteicos distintos, mTORC1 e mTORC2 (KIM et al., 2002; JACINTO et al., 2004), no qual, mTORC1 é mais responsivo pela ação inibitória da rapamicina, e assim sendo, os efeitos reguladores da droga no crescimento muscular são exercidos principalmente por meio deste complexo (LIU et al., 2009; ZONCU, EFEYAN e SABATINI, 2011).

FIGURA 4: Esquema da via de sinalização Akt/mTOR envolvida na regulação da massa muscular (A). Mediadores da regulação da mTOR1(B).

A mTOR se liga a duas diferentes subunidades regulatórias que formam complexos com distintas funções na sinalização intracelular. O complexo TORC1 (FIGURA 4B), mais sensível à rapamicina, é formado pela mTOR, Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), pela subunidade catalítica mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*) e PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40 kDa*), sendo este complexo envolvido no processo de tradução, biogênese ribossomal, autofagia, metabolismo da glicose e na resposta celular à hipóxia. Menos conhecido, o complexo TORC2 é formado pela mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mLST8 e mSin 1 (*mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*), e regula parcialmente a ativação da quinase Akt por meio da fosforilação do resíduo serina 473. Embora este complexo seja mais insensível a rapamicina, sua participação no processo de síntese proteica é limitada quando comparada a TORC1 (YANG e GUAN, 2007). O mecanismo pelo qual a rapamicina inibe a atividade da mTORC1 ainda não está completamente compreendido. Uma explicação seria a associação da rapamicina à proteína FKBP12 (*FK506-binding protein 12 kDa*), e a interação desse complexo no domínio FRB da mTORC1, o qual

regula a atividade catalítica desta quinase (JACINTO et al., 2004). Uma outra explicação seria a dissociação do complexo mTORC1-Raptor (KIM et al., 2002). Como o tratamento agudo com rapamicina não inibe a sinalização de mTORC2, este complexo foi originalmente conhecido como insensível a rapamicina (JACINTO et al., 2004). No entanto, foi demonstrado que o tratamento crônico com rapamicina reduz a sinalização da mTORC2 em alguns, mas não em todos os tipos celulares (PHUNG et al., 2006; SARBASSOV et al., 2006).

Parte dos mecanismos envolvidos na ativação da sinalização da mTOR incluem estímulos extracelulares como a insulina e o IGF-I, que por meio da Akt, promovem a ativação direta ou indireta da mTOR. A Akt pode ativar diretamente mTOR pela fosforilação no resíduo Ser2448 (NAVE et al., 1999), no entanto dois mecanismos adicionais no controle da mTOR via Akt, tem sido atribuídos: 1) fosforilação e dissociação de Raptor da subunidade inibitória da mTOR, PRAS40 (SANCAK et al., 2007; THEDIECK et al., 2007); 2) fosforilação de múltiplos sítios da proteína TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), um inibidor endógeno da mTOR. A TSC2 é uma proteína GTPase ativadora (GAP) da proteína G Rheb (*Ras homologue enriched in brain*), que quando ligada a GTP, promove a ativação da mTOR. O domínio GAP da TSC2 aumenta a hidrólise da forma de Rheb-GTP para Rheb-GDP, impedindo a propagação do sinal para mTOR, inibindo-a. No entanto, para função inibitória completa da TSC2 é necessária a associação à proteína TSC1, que age como estabilizadora do complexo TSC1/2 (GARAMI et al., 2003; INOKI et al., 2003; INOKI, ZHU e GUAN, 2003; TEE, ANJUM e BLENIS, 2003; TEE et al., 2003).

Além do controle de hormônios e fatores de crescimento, a sinalização da mTOR também é regulada por aminoácidos e pelo status de energia celular. Dentre os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs – leucina, valina e isoleucina), a leucina destaca-se por sua habilidade de regular processos anabólicos envolvendo a síntese de proteínas (ANTHONY et al., 2000; AVRUCH et al., 2009). Parte da regulação da sinalização da mTOR por aminoácidos, parece acontecer por mecanismos independentes da TSC2, apesar de estudos relatarem alterações na regulação da Rheb-GTP (ROUX e BLENIS, 2004; SMITH et al., 2005). Dados recentes apontam a participação de uma proteína PI3K classe III, a Vps34 (*vacuolar protein sorting mutant 34*), no controle da mTOR por aminoácidos (BYFIELD, MURRAY e BACKER, 2005). No entanto, estudos que associaram a privação de

aminoácidos com a sinalização da mTOR, apresentaram variações entre os tipos celulares, que pode ser resultante da diferença na disponibilidade de aminoácidos a partir de fontes intracelulares, tais como a degradação de proteínas por autofagia ou pelo proteassoma. Portanto, estudos adicionais são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a regulação da via de sinalização mTOR por aminoácidos.

A depleção do ATP celular também pode modular a sinalização da mTOR, mediada pela ativação da TSC2 por meio da quinase AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*), um importante sensor no status de energia celular (FIGURA 4B) (INOKI, ZHU e GUAN, 2003). AMPK é um complexo $\alpha\beta\gamma$ heterotrímico, formado por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ). A sua ativação durante um estado de estresse energético, como a hipóxia, a hipoglicemia ou o exercício físico, inibe vias anabólicas em paralelo a estimulação de vias catabólicas, restituindo o balanço energético (MU et al., 2001; HARDIE, 2004; LONG e ZIERATH, 2006). Portanto, a inibição da mTOR causada pela redução na disponibilidade de aminoácidos ou de energia é compreensível, visto que uma das principais funções da mTOR é promover a tradução do mRNA, sendo esse um processo que requer aminoácidos, além do grande dispêndio de energia celular, como observado principalmente na fase de alongação do mRNA.

A mTOR estimula a síntese proteica por meio de três principais proteínas reguladoras: P70^{S6K} (*P70 ribosomal S6 kinase*), 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E [eIF4E] binding protein 1*) e eIF4G (*eukaryotic initiation factor 4G*) (BRUNN et al., 1997). A tradução do mRNA em proteína ocorre em três etapas distintas: a iniciação, a alongação e a terminação (PROUD, 2007). A proteína 4E-BP1 é inibidora do fator de iniciação da tradução proteica conhecido como eIF4E, sendo esta associação repressora da ligação do mRNA à unidade ribossomal 80S. Quando a 4E-BP1 é fosforilada pela mTOR, o eIF4E é liberado desse complexo, unindo-se ao eIF4G (também controlado por mTOR) e ao eIF4A, formando o complexo eIF4F (KIMBALL e JEFFERSON, 2005). A montagem desse complexo é necessária para a continuação da etapa de iniciação da tradução do mRNA em proteína (FIGURA 5A). Dentre os fatores de alongação, o eEF2 (*eukaryotic elongation factor 2*) é considerado um dos mais importantes em promover a translocação na fase de alongação. A ativação da P70^{S6K1} pela mTOR, fosforila e inativa a quinase eEF2K

(*eukaryotic elongation factor-2 kinase*), ativando o eEF2 e promovendo a elongação (WANG e PROUD, 2006). Além disso, a ativação da P70^{S6K1} induz a fosforilação da proteína ribossomal S6, estimulando a síntese proteica. No entanto, a ativação da P70^{S6K1} também envolve a inibição do IRS1, atuando como uma alça de *feedback* negativo (HARRINGTON et al., 2004).

A contribuição da via proteolítica ubiquitina proteassoma na regulação da síntese proteica foi recentemente demonstrada (LAGIRAND-CANTALOUBE et al., 2008; CSIBI et al., 2010). Observou-se que a atrogin-1, por meio da ubiquitinação e subsequente degradação do eIF3f (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f*), um membro do complexo eIF3, impede a ativação da P70^{S6K1} pela mTOR (FIGURA 5B). Esses novos achados demonstram que a interação entre as vias de síntese e degradação proteicas não ocorre por um mecanismo isolado, mas sim por modulação dinâmica e simultânea.

FIGURA 5: Sinalização da mTOR na síntese proteica (A). Contribuição da via proteolítica ubiquitina proteassoma na regulação da síntese proteica (B).

2.2.4 GSK3: regulador da síntese proteica independente de mTOR

O glicogênio sintetase quinase 3 (GSK3), é uma serina/treonina quinase cujo nome deriva de seu substrato, a glicogênio sintetase (GS), uma enzima chave envolvida na síntese de glicogênio que tem sua atividade inibida pela GSK3 (EMBI, RYLATT e COHEN, 1980; FRAME e COHEN, 2001). No entanto, o GSK3 está

envolvida em uma variedade de processos celulares que variam do metabolismo energético à regulação da transcrição (COHEN e FRAME, 2001).

A atividade da GSK3 é regulada pela fosforilação nos resíduos Ser21 e Ser9, nas isoformas GSK3 α e GSK3 β , respectivamente, levando a sua inibição (CROSS et al., 1995). Estudos tem demonstrado que no músculo esquelético, a GSK3 tem sua atividade regulada principalmente pela insulina (MARKUNS, WOJTASZEWSKI e GOODYEAR, 1999; WOJTASZEWSKI et al., 2000), onde o estímulo desse hormônio via PI3K, e a sucessiva ativação da Akt, leva à fosforilação da GSK3 nos sítios Ser9/21, desativando-a, e consequente levando a ativação da GS (CROSS et al., 1995) (FIGURA 4A).

Além da função da GSK3 em regular a síntese e os estoques de glicogênio, também é conhecida a ação dessa quinase na regulação de processos transcripcionais. Em condições basais a GSK3 suprime a atividade do eIF2B (*eukaryotic translation initiation factor 2B*), importante fator de iniciação da tradução, e portanto, na síntese de proteína (WANG et al., 2001). Quando fosforilada pela Akt, ou seja, em sua forma inativa, a GSK3 reduz a fosforilação do eIF2B na Ser535, promovendo o início da tradução (VYAS et al., 2002). Dessa forma, vêm sendo atribuída a GSK3, a importante função na regulação da massa muscular, mecanismo esse independente da sinalização da mTOR.

2.3. Atrofia muscular na insuficiência cardíaca: possível contribuição da via Akt/mTOR

Várias premissas sugerem alterações dos componentes envolvidos no processo de síntese proteica em pacientes portadores de IC. Essa afirmação é baseada em evidências na literatura, que demonstram alterações em estímulos responsáveis pela ativação da cascata de sinalização da via Akt/mTOR.

Alterações na disponibilidade de nutrientes, bem como o menor consumo energético em portadores de IC vem sendo relatados. Esse quadro de “má nutrição” é caracterizado pela anorexia ou redução do apetite, assim como pela deficiência na absorção intestinal de nutrientes, ocasionada pela menor perfusão intestinal, edema e pelo aumento no conteúdo de colágeno na parede intestinal (MUSTAFA e

LEVERVE, 2001). Por sua vez, o menor consumo energético acompanhado pelo elevado dispêndio energético (observado pelo aumento da atividade simpática na IC), podem contribuir para alterações na síntese de proteínas, uma vez que aminoácidos podem ativar diretamente a quinase mTOR (BURNETT et al., 1998; HARA et al., 1998). Dessa forma, foi objetivo desse projeto avaliar o consumo calórico e a ingestão de ração em gaiola metabólica, bem como, avaliar o efeito da sobrecarga de leucina no quadro de atrofia muscular observado em animais com IC por hiperatividade simpática.

Outra alteração observada durante o estabelecimento do quadro de atrofia muscular é a redução nas concentrações circulantes e locais de IGF-I (HAMBRECHT et al., 2002; SCHULZE et al., 2002). Um dos agentes envolvidos na regulação dos níveis de IGF-1 é a aplicação de tensão contrátil na fibra muscular (BOOTH, 2006). De fato, o desuso da musculatura esquelética propiciado pelo quadro de inatividade física observado em pacientes portadores de IC, pode influenciar nos níveis de IGF-I, e portanto, ser um importante fator desencadeador no desenvolvimento do quadro de atrofia muscular nesses indivíduos. Além disso, o estímulo mecânico *per se*, pode ser convertido em sinais químicos que geram numerosos eventos específicos que contribuem na determinação da forma e função muscular (TIDBALL, 2005). Recentemente foi demonstrado que pacientes com IC apresentam redução na fosforilação da Akt associada ao menor conteúdo de miosina. Esses dados sugerem uma possível contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR no desenvolvimento do quadro de atrofia muscular observada na IC. Portanto, o estímulo mecânico produzido pelo treinamento físico parecer ser uma interessante estratégia na ativação da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR.

2.4. Treinamento físico aeróbico e insuficiência cardíaca

Durante os últimos anos, tem-se acumulado dados convincentes sobre os benefícios do treinamento físico na IC, demonstrando que o mesmo é uma importante estratégia não farmacológica coadjuvante no tratamento da IC (BRUM et al., 2011), não somente por promover importantes adaptações no controle neuro-hormonal (NEGRAO et al., 1993; ROVEDA et al., 2003) e na função cardíaca (ERBS et al., 2003), mas também por propiciar diferentes adaptações bioquímicas,

estruturais e funcionais na musculatura esquelética (ADAMS, DORING e SCHULER, 2008), melhorando a tolerância aos esforços físicos, a qualidade de vida, diminuindo as hospitalizações e a mortalidade desses pacientes (HAMBRECHT et al., 1997; PIEPOLI et al., 2004; PIEPOLI et al., 2011).

O treinamento físico aeróbico é a única abordagem terapêutica significativa em minimizar a perda de massa muscular na IC suportada por inúmeras evidências clínicas (ANKER et al., 2013). Ele promove melhoras significativas na vasodilatação dependente do endotélio (ADAMOPOULOS et al., 1995; WANG et al., 2005) e aumento da densidade capilar em pacientes com IC, além de aumentar a densidade mitocondrial, a atividade de enzimas oxidativas, e promover adaptações importantes na regulação da massa muscular dos pacientes, consequentemente contribuindo para a melhora da tolerância ao esforço (HAMBRECHT et al., 1997; PIEPOLI et al., 2011).

Cabe ressaltar que o treinamento físico aeróbico também é capaz de reduzir o estresse oxidativo e a inflamação no músculo esquelético, o nível de oxidação de biomoléculas e prevenindo algumas alterações morfofuncionais tanto em pacientes com IC, quanto em modelos animais (SCHULZE et al., 2002; GIELEN et al., 2012), como também observado em estudos do nosso grupo (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012).

Além dos efeitos “anti-inflamatório” e “anti-oxidativo”, o treinamento físico também promove adaptações importantes na regulação da massa muscular, exercendo um efeito “anticatabólico”. O treinamento físico aeróbico *per se* não aumenta a área de secção transversa do músculo esquelético em indivíduos saudáveis, como observado pelo treinamento físico de força (FOLLAND e WILLIAMS, 2007). No entanto, animais com IC em estado hipotrófico, o treinamento físico aeróbico foi capaz de restaurar ou aumentar a massa muscular para níveis considerados eutróficos (BACURAU et al., 2009). Atualmente pouco se sabe sobre o impacto do treinamento físico aeróbico nas vias de degradação proteica, especialmente no que concerne o sistema ubiquitina proteassoma, que representa um importante regulador do catabolismo proteico. Recentemente em nosso laboratório foi demonstrado um importante efeito do treinamento físico aeróbico em regularizar alterações em diferentes constituintes desse sistema, bem como reduzir

a atividade do proteassoma tanto em modelo genético de IC por hiperatividade simpática, quanto em indivíduos portadores de IC (CUNHA et al., 2012).

No treinamento físico, o estímulo mecânico é conhecido deflagrar respostas anabólicas que em parte são mediadas pelo fator de crescimento IGF-I, um importante regulador da massa muscular. De fato, vários os estudos demonstraram o efeito do treinamento físico sobre o aumento na expressão local de IGF-I em portadores de IC (SCHULZE et al., 2002; HAMBRECHT et al., 2005). No entanto, pouco é conhecido sobre a transdução desse sinal na via de sinalização Akt/mTOR, que desempenha importante papel na regulação do controle do metabolismo, da sobrevivência, da proliferação e do crescimento celular. Dessa forma, esse projeto teve como intuito estudar o envolvimento da via de sinalização Akt/mTOR na regulação muscular observada após período de treinamento físico aeróbico.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar a contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na regulação da massa muscular na patologia da IC e o efeito do treinamento físico aeróbico sob os componentes dessa via.

3.2. Específicos

3.2.1 Estudar a via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR no músculo vasto lateral de pacientes portadores de IC classe II, previamente e após período de 12 semanas treinamento físico aeróbico. Para isso avaliamos em indivíduos controle sedentários, pacientes com IC sedentários e pacientes com IC treinados:

- as características físicas e clínicas;
- o consumo de oxigênio pico;
- a expressão de RNA mensageiro das isoformas de IGF-I (Ea, Eb e Ec), e IGF-I total (PAM);
- a expressão das proteínas integrantes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR (IGFBP-3, IGF-IR, PI3K, Akt1, pAkt^{Ser473}, mTOR, pmTOR^{Ser2448}, GSK3 β e pGSK3 β ^{Ser9}, pAMPK^{Thr172}).

3.2.2 Estudar a participação da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia do músculo sóleo de camundongos com IC por hiperatividade simpática e o efeito do treinamento físico aeróbico sobre os componentes dessa via. Para isso avaliamos em camundongos KO e controle (WT), sedentários e treinados:

- a tolerância à realização de exercício físico e a avaliação em Rota Rod;
- a massa e composição corporais;
- a ingestão alimentar em gaiola metabólica;
- a glicemia e tolerância à glicose;

- a área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares;
- a expressão de RNA mensageiro das isoformas de IGF-I (Ea, Eb, Classe I e Classe II) e IGF-I total (PAM);
- a expressão das proteínas integrantes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR (IGF-I, IGFBP-3, PI3K, Akt1, Akt2, pAkt^{Ser473}, mTOR, pmTOR^{Ser2448}, GSK3 β e pGSK3 β ^{Ser9}, AMPK, pAMPK^{Thr172}, P70S6K, pP70S6K^{Thr389}).

3.2.3 Estudar o efeito da sobrecarga de leucina na ativação de mTOR independente do estímulo mecânico no músculo sóleo de camundongos com IC por hiperatividade simpática. Para isso avaliamos em camundongos KO e WT suplementados com leucina:

- a tolerância à realização de exercício físico;
- a massa e composição corporais;
- a ingestão alimentar em gaiola metabólica;
- a glicemia e tolerância à glicose;
- a área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares.

3.2.4 Estudar o efeito do tratamento com inibidor farmacológico da mTOR (rapamicina), isolado e associado ao treinamento físico aeróbico (estímulo mecânico). Para isso avaliamos em camundongos KO e WT sedentários e treinados, tratados com rapamicina ou salina:

- a tolerância à realização de exercício físico e a avaliação em Rota Rod;
- a massa e composição corporais;
- a ingestão alimentar em gaiola metabólica;
- a glicemia e tolerância à glicose;
- a área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares;
- a expressão das proteínas P70S6K e pP70S6K^{Thr389}.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Modelo Animal

Utilizamos músculos esqueléticos de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO (KO) machos e camundongos controle (WT) da linhagem C57/BL6 na faixa etária compreendida entre cinco e sete meses. Vale destacar que aos cinco meses de idade, os camundongos KO já apresentam disfunção ventricular, intolerância ao esforço físico e edema pulmonar, sendo que essas alterações são ainda mais acentuadas aos sete meses de idade, o que confirma a IC nessa faixa etária.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício na Escola de Educação Física e Esportes da USP com temperatura controlada entre 22 e 25°C, em ciclo claro-escuro invertido em 12:12 horas, com início do período escuro às 7 horas da manhã e início do período claro às 19 horas, no total de 5 animais por caixa.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)¹. O projeto de pesquisa intitulado: Contribuição da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR na atrofia muscular desencadeada pela insuficiência cardíaca por excesso de catecolaminas: influência do treinamento físico aeróbico, foi aprovado pelo Comitê de Ética da EEFUEUSP (nº 058).

O genótipo dos animais foi confirmado por meio da extração de DNA genômico obtido por meio de biopsia da orelha esquerda dos animais. A genotipagem foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR - *polymerase chain reaction*) em termociclador (*MiniCycler MJ Research, EUA*) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção de genes α_{2A} - e α_{2C} -adrenérgicos intactos ou inativados.

¹ Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores α_{2A} -adrenérgicos:

WTA sense: 5' CTG CTC ATG CTG TTC ACA GTC ATT TG3'

WTA antisense: 5' CCA CAC GGT GAC AAT GAT GGC CTT3'

Neo/sense: 5' CGA GAT CCA CTA GTT CTA GCC TCG3'

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores α_{2C} -adrenérgicos:

WTC sense: 5' CAT CTT GTC CTC CTG CAT AGG CTC3'

WTC antisense: 5' TCT CAT CCG GCT CCA CTT CAG TG3'

Neo/sense: 5' GGG AGG ACA ATA GCA GGC ATG CTG3'

Após a realização das reações de PCR, foi feita uma corrida em gel de agarose com os produtos das reações com o objetivo de visualizar os tamanhos dos fragmentos amplificados e assim, confirmar o genótipo dos animais.

Humanos

Foram referenciados 720 pacientes de ambos os sexos com diagnóstico de IC há mais de um ano, fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor ou igual a 55%, classes funcionais I, II e III (NYHA), com idade superior a 30 e inferior a 60 anos e com terapia otimizada por no mínimo três meses. Os pacientes foram selecionados a partir do ambulatório de insuficiência cardíaca do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), e deveriam estar com a terapêutica medicamentosa otimizada sem modificação na medicação e conduta terapêutica nas últimas 6 semanas, como recomendada pela III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca (2009). Não foram incluídos pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, incapacidade motora em realizar o treinamento físico, arritmias ventriculares complexas, fibrilação atrial e alcoolismo. Durante o seguimento foram excluídos do estudo aqueles que se ausentarem por mais de cinco sessões de treinamento consecutivas, ou não cumprirem 70% do período total de estudo. Dos pacientes referenciados, 225 foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão. No entanto, 83 desses pacientes no primeiro contato recusaram participar do estudo. Dos 142 pacientes que previamente concordaram, 87 aceitaram participar e 55 não puderam por motivos particulares. Dos 87 pacientes, 6 pacientes foram a óbito e 03 submetidos a transplante cardíaco

antes da primeira fase do projeto. Dos 78 pacientes, 5 recusaram continuar por motivos particulares, 4 por contra indicação médica e 5 por intolerância ao esforço. Desses 64 pacientes, 1 foi a óbito antes de iniciar o programa de treinamento e 5 foram excluídos por ausência consecutivas de cinco sessões de treinamento. Dos referenciados, 30 pacientes completaram a primeira fase e foram randomizados e 28 por inviabilidade momentânea dos protocolos, não participaram do estudo. Dos 27 pacientes, 12 foram selecionados para compor o presente projeto. O grupo controle composto por 6 indivíduos foi proveniente de um projeto em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Ugrinowitsch.

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração e pela Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Todos os voluntários, após esclarecimentos sobre o protocolo experimental, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 Avaliação da função cardíaca

Modelo Animal

A avaliação da função ventricular foi realizada por medida ecocardiográfica, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al., 1978). É importante salientar que a acurácia e a reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar as estruturas anatômicas cardíacas e as medidas dos diâmetros das cavidades em roedores têm sido confirmadas em uma série de estudos (LITWIN et al., 1994; CHAVES, WEINSTEIN e BAUER, 2001; JANSSEN, DALLMEIJER e VAN DER WOUDE, 2001).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um único observador, cego para o genótipo, nos animais KO e WT sedentários, com sete meses de idade. Em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente as médias aritméticas dessas medidas. O animal foi posicionado lateralmente, a fim de expor o hemitórax esquerdo que foi cuidadosamente feita a tricotomia. Sobre o precórdio do animal foi aplicado um gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (*General Imaging Gel*,

ATL. Reedsville, EUA). O exame ecocardiográfico foi realizado utilizando o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, EUA), equipado com transdutor de 15 MHz, em animal anestesiado com pentobarbital (30mg/Kg). Para a medida das estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo M com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo M posicionado ao nível da valva aórtica.

Durante o exame foram analisados o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) e o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE). Após a realização das medidas foi calculada a fração de encurtamento (FE) do ventrículo esquerdo ($\%FE = [(DDFVE-DSFVE)/DDFVE] \times 100$), utilizado como índice de função sistólica. O exame foi realizado no Instituto do Coração (InCor-FMUSP), por ecocardiografista experiente, cego para o genótipo dos animais.

Humanos

A função ventricular foi avaliada por ecodopplecardiografia (IE33 da Philips Medical System, equipados com transdutores transtorácico de banda larga com 2-5 MHz). Durante o exame foram analisados o DSFVE, DDFVE, volume sistólico final, volume diastólico final e motilidade regional de parede avaliada pelo ecocardiograma no basal. O diâmetro sistólico e o diâmetro diastólico foram medidos a partir do traçado do modo M obtido a partir da observação do eixo longo paraesternal. Os volumes do ventrículo esquerdo e fração de ejeção do ventrículo esquerdo foram analisados por meio do exame bidimensional, cortes duas e quatro câmaras pelo método de Simpson modificado.

4.3 Avaliação da capacidade física e função muscular

Modelo Animal

A tolerância ao esforço foi avaliada por meio de teste progressivo até a exaustão, onde os animais fizeram um teste de protocolo escalonado de exercício físico com velocidade inicial de 6 m/min (sem inclinação) e incrementos na velocidade da esteira de 3 m/min a cada 3 minutos até a exaustão do animal de acordo com protocolo desenvolvido por Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2007). Este teste foi realizado antes do início do protocolo de treinamento físico e das diferentes estratégias utilizadas (suplementação com leucina e tratamento com rapamicina), e após o término dos mesmos. No meio do protocolo de treinamento físico, ou seja, logo após a quarta semana de treino, os animais foram reavaliados para um possível ajuste na velocidade de treino. Os resultados foram apresentados pela distância máxima percorrida, em metros.

A função muscular em teste Rota Rod foi realizada no aparelho 755 da *IITC Life Science (Woodland Hills, CA, EUA)* programado para apresentar velocidade inicial de 1 rpm e velocidade final de 40 rpm, com duração máxima de até 300 segundos, sendo a aceleração constante durante todo o experimento. A avaliação consistiu em três tentativas por animal, com intervalos de 10 segundos entre elas, onde, o tempo (em segundos) alcançado até a queda foi anotado e o resultado do teste foi considerado como o maior tempo alcançado nas três tentativas (TURGEMAN et al., 2008). Essas avaliações foram realizadas em colaboração com a Prof^a Dra. Mayana Zatz, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Humanos

A avaliação funcional foi realizada pelo teste cardiopulmonar em esforço em esteira programável (*Marquette series 2000, Marquette Electronics, Milwaukee, WI, EUA*), segundo protocolo de *Naughton* modificado (PATTERSON et al., 1972). Após dois minutos em repouso, na posição ereta, os pacientes foram encorajados a realizar exercício progressivo até serem limitados por sintomas de dispneia ou fadiga. Durante o período inicial de repouso, de exercício e de recuperação, foram submetidos à monitorização contínua de ritmo cardíaco, ventilação pulmonar, concentração de oxigênio e de dióxido de carbono no ar inspirado e expirado, e à

medidas intermitentes de pressão arterial sistêmica. O ritmo cardíaco foi monitorizado continuamente por de 12 derivações (*Marquette series 2000, Marquette Electronics, Milwaukee, WI, EUA*). A ventilação e as concentrações de oxigênio e de dióxido de carbono serão medidas, respiração à respiração (*SensorMedics, modelo Vmax 229, Yorba linda, CA, EUA*). O consumo de oxigênio de pico (VO_2 pico) foi considerado como o valor mais alto atingido durante o exercício. A pressão arterial foi monitorizada pelo monitor multiparamétrico HP68S (*Hewlett-Packard, EUA*), empregando transdutor oscilométrico de pressão arterial HP M1008B (*Hewlett-Packard, EUA*).

Os critérios de interrupção do esforço foram as indicações absolutas citadas pelo ACC/AHA *Guidelines For Exercise Testing*, ou ao se atingir critério de exaustão (quociente respiratório $> 1,0$). O limiar anaeróbio foi determinado pelo menor valor de VE/VO_2 (equivalente ventilatório de oxigênio) a partir do qual ocorra elevação desta curva sem aumento correspondente do valor de VE/VCO_2 (equivalente ventilatório de dióxido de carbono). O ponto de compensação respiratória foi determinado por um conjunto de dados, onde houver maior concordância destes entre estes (*V-Slope*, ponto de intersecção das curvas de VE/VO_2 e VE/VCO_2 , maior FeCO_2 , menor VE/VCO_2 , mudança na ascensão da curva de VE, mudança na ascensão da curva de VE/VCO_2) (HARRINGTON, ANKER e COATS, 2001).

4.4 Treinamento físico aeróbico

Modelo Animal

O treinamento físico foi utilizado como uma estratégia terapêutica para a atrofia muscular observada nos camundongos KO. O treinamento físico foi realizado em intensidade moderada com predomínio de metabolismo aeróbio, conforme padronizado anteriormente em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2007). Mais especificamente, realizamos 8 semanas de treinamento físico em esteira rolante (dos 5 aos 7 meses de idade), com sessões de exercício com duração de 60 minutos, 5 vezes por semana a 60% da velocidade máxima atingida no teste de exercício físico progressivo até a exaustão, que corresponde a intensidade de máxima fase estável do lactado.

Para verificarmos a eficácia do treinamento físico avaliamos: 1) a frequência cardíaca em repouso, aferida semanalmente pelo método de pletismografia de cauda (*Kent Scientific, EUA*) e 2) a tolerância ao esforço por meio de teste progressivo até a exaustão (ver descrição abaixo no item 4.3) antes e após o período de treinamento físico.

Humanos

O treinamento físico teve duração de 12 semanas, incluindo três sessões semanais com duração de 60 minutos. Cada sessão foi constituída por: 5 minutos de aquecimento; 50 minutos de exercício aeróbico em esteira rolante e 5 minutos de alongamento. A intensidade foi determinada pela média entre o limiar anaeróbico (em torno de 70% da frequência cardíaca máxima) e o ponto de compensação respiratório (em torno de 90% da frequência cardíaca máxima), determinados pela avaliação basal da ergoespirometria.

Foram realizadas medidas de pressão arterial no repouso, durante e após a sessão de treinamento. A frequência cardíaca foi monitorizada continuamente. Os critérios de interrupção do exercício foram exaustão, tonturas, náuseas, arritmias, hipotensão arterial, bradicardia, síncope ou pré-síncope e aumento excessivo da pressão arterial sistólica (variação da PAS acima de 100 mmHg ou se ultrapassar 240 mmHg).

4.5 Estratégias utilizadas para avaliar a contribuição da quinase mTOR na atrofia muscular induzida pela IC em modelo experimental

O tratamento com rapamicina foi utilizado como estratégia para o entendimento da participação da via de sinalização Akt/mTOR na regulação da massa muscular de animais com IC, após oito semanas de treinamento físico aeróbico. Na quarta semana do protocolo experimental, parte dos animais WT e KO, sedentários e treinados, receberam por meio de gavagem uma concentração de 1 mg/kg de rapamicina (*Sirolimus*[®], *Wyeth Pharmaceuticals Inc., EUA*) administrada uma vez ao dia, por quatro semanas. Os demais animais receberam durante este mesmo período, solução salina.

A sobrecarga com leucina (estímulo por nutrientes) foi utilizada com o intuito de ativar a via da quinase mTOR e minimizar a perda de massa muscular nos camundongos KO. A L-leucina (Ajinomoto®) foi administrada na água de beber (LYNCH et al., 2002), na concentração de 1,5 g/100 ml de água (114,5 mM) por um período de 30 dias, correspondentes do sexto ao sétimo mês de idades dos animais WT e KO sedentários.

4.6 Avaliação da ingestão alimentar em gaiola metabólica

Para verificarmos se o quadro de IC desenvolvido pelos camundongos KO é acompanhado pela de redução na ingestão alimentar, parte dos animais sedentários, treinados, suplementados e tratados com rapamicina foi mantida em gaiolas metabólicas para camundongos (Beiramar®) onde foi controlada a ingestão de ração e água, bem como a excreção de urina e fezes destes animais. Antes do período de avaliação de 24h em gaiola metabólica, os animais realizaram um dia de adaptação. Para a quantificação do volume de urina, foi adicionada vaselina líquida nos respectivos recipientes, para evitar a evaporação da mesma.

4.7 Avaliação da glicemia e do teste de tolerância à glicose e animais

Alterações no metabolismo de glicose e insulina vêm sendo relatados em pacientes portadores de IC, dessa forma foi parte desse projeto avaliar as concentrações basais da glicemia, bem como o teste de tolerância à glicose. A determinação da glicose foi realizada em soro obtido no dia do sacrifício, e analisada por método colorimétrico (KIT GLICOSE PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica) (TRINDER, 1969). Diferente da glicemia, a tolerância à glicose foi realizada na última semana do protocolo experimental, três dias antes do sacrifício após 12 h de jejum. Uma primeira coleta de sangue foi realizada por meio de um único corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose (1g/Kg de peso) foi administrada via gavagem e as amostras de sangue foram coletadas após 15, 30, 60 e 120 minutos, prosseguido pela análise da glicemia por glicosímetro (Breeze® Bayer). Os resultados foram analisados pela determinação das áreas sob as curvas glicêmicas obtidas durante o teste pelo método trapezoidal.

4.8 Coleta dos tecidos

Após 24h do término do protocolo experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

foram coletados sangue, pulmões, fígado, baço, rins, o músculo sóleo e a loja posterior (gastrocnêmio, plantar e sóleo) para histologia. A massa total de cada víscera foi corrigida pelo peso corporal e comparada entre os grupos, além da massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, que auxiliaram na estimativa da gordura corporal.

O sangue foi centrifugado para separação do soro e mantido em freezer - 80°C para ulterior processamento e realização do experimento para a análise sérica de glicose.

Os músculos da loja posterior foram pré-congelados em isopentano por 10 segundos e rapidamente imersos em nitrogênio líquido, onde foram mantidos até a realização dos cortes histológicos, como descrito no item 4.10.

4.9 Biópsia do vasto lateral em humanos

A biópsia foi feita no músculo vasto-lateral, aproximadamente no ponto médio entre a borda superior da patela e o trocânter maior do fêmur. Após assepsia com clorexidina 0,5% (solução alcoólica) foi feita anestesia local com Lidocaína 1%. Em seguida, foi feita uma pequena incisão na pele e subcutâneo de mais ou menos meio centímetro de comprimento e 1 cm de profundidade. O sangramento local foi estancado por compressão. Através da incisão foi introduzida uma agulha de *Allendale - Bergstron* modificada até uma profundidade suficiente para ultrapassar a fáscia e penetrar no músculo. Por meio de uma pressão negativa, feita por uma seringa acoplada à agulha, foi retirado um pequeno fragmento do músculo vasto-lateral.

Após a retirada da agulha, foi feita compressão local por mais ou menos cinco minutos para estancar o sangramento. Em seguida, foi feito um “ponto falso” com

Steri-Strip – 3M no local da incisão. Por último, a coxa foi enfaixada com gaze estéril e atadura, sendo este curativo foi mantido por até 24hs.

O fragmento de músculo obtido no procedimento foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80o C.

4.10 Avaliação da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo de animais

Com o intuito de confirmar a atrofia muscular nos camundongos KO aos sete meses de idade e verificar a eficácia das estratégias terapêuticas adotadas nesse projeto avaliamos a área de secção transversa das fibras do tipo I, IIA e intermediárias (híbridas) do músculos sóleo de camundongos controle e KO aos sete meses de idade. Os músculos foram seccionados transversalmente em criostato (*Leica CM1850, Leica Microsystems, Alemanha*) na espessura de 10 µm. Duas técnicas diferentes de histologia foram realizadas:

A histologia para a miosina ATPase foi realizada em cortes transversais semi-seriados pré-incubados em solução alcalina (pH 10.3) ou ácida (pH 4.6). A reação da ATPase da miosina é usada para identificar os tipos de fibras musculares. Para esta análise, o ATP é o substrato e o Pi é o produto da reação. Em razão do Pi ser histoquimicamente invisível, a análise ocorre de modo que o Pi reaja quimicamente com o cálcio (Ca^{2+}) para formar um precipitado de fosfato de cálcio (CaPO_4). O passo subsequente no processo converte o CaPO_4 em sulfeto de cobalto (CoS_2), o qual assume coloração marrom escuro facilmente visível e menos solúvel. Porém, como o Pi é liberado pelo consumo de ATP a partir das moléculas de miosina, um produto marrom escuro é depositado em todo tecido musculare seccionado. Dessa forma a pré-incubação com diferentes pHs permite a diferenciação nos tipos de fibras por inibir ou estimular a miosina ATPase das mesmas. No pH 10.3, as fibras musculares glicolíticas (tipo IIB) hidrolisam ATP mais rapidamente que as fibras não glicolíticas, e portanto assumem coloração mais escura. O oposto é observado no pH4.6. A determinação da distribuição de fibras foi realizada segundo HAMALAINEN e PETTE (1993).

A imunofluorescência para MHCI foi realizada devido a sua grande especificidade na identificação desse tipo de fibra (Tipo I). Como observado previamente pela técnica de miosina ATPase, o músculo sóleo dos animais estudados apresenta menos que 1% de fibras do tipo IIX e nenhuma fibra do tipo IIB, dessa forma, a detecção de apenas um tipo de fibra (MHCI) se torna viável neste estudo. Além disso, a facilidade na avaliação por imunofluorescência permitiu inferir menos erros na classificação dos tipos de fibra. Nesta técnica, as secções são previamente fixadas com formalina (*Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil*) 10% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 (*Bio-rad, 01-0407, EUA*) e 1% albumina sérica bovina (BSA; *Amresco, E588, EUA*) diluídos em PBS (*Phosphate Buffer Saline; Tampão Fosfato Salino; Sigma-Aldrich, P4417, Brasil*) por 10 minutos. O bloqueio é feito em 10% goat serum (*Sigma-Aldrich, G9023, Brasil*) em PBS por 45 minutos. As lâminas são incubadas com solução contendo os anticorpos primários contra 1) MHCI (diluição 1:6000) para a diferenciação da fibra muscular do tipo I; e 2) Laminina (diluição 1:100) para a marcação das demais fibra musculares, negativas para tipo I, ou seja, fibras do tipo II; com 1,5% de *goat serum* em PBS por 1h e 30 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem com 0,2% de Triton X-100 em PBS (3 vezes de 10 minutos cada), os cortes são incubados por 40 minutos em sala escura com uma solução PBS contendo 1,5% de *goat sérum*, os respectivos anticorpos secundários fluorescentes para MHCI (diluição 1:500; *Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, Life Technologies, A11004, EUA*) e Laminina (diluição 1:500; *Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, Life Technologies, A11008, EUA*) e *Hoechst* (diluição 1:1000, para visualização dos núcleos). Após 30 minutos de lavagem em 0,2% de Triton X-100 em PBS as lâminas são cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCl 0.1M pH 9.3).

A captura das imagens obtidas pelas duas técnicas de coloração foi realizada com aumento de 200x e objetiva de 20x. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um microscópio fluorescente e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (*Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha*). A quantificação da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar foi realizada por meio do programa *Image-Pro Plus*. Os resultados foram expressos em μm^2 .

4.11 Western blotting

Os músculos foram homogeneizados por meio de homogeneizador *Polytron* (*PT-K Brinkmann Instruments, Westburg, EUA*) em volumes (9X seu peso) de tampão de lise hipotônico contendo tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100; *Sigma-Aldrich, EUA*). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por vinte minutos a 4°C, para a separação do sobrenadante. A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de *Bradford* (*Biorad, EUA*). Alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de serem utilizadas.

As amostras foram solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (*sodium- dodecyl- sulfate*) e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%. As membranas foram lavadas duas vezes com solução tampão (TBS). As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas proteicas obtidas pela eletroforese. A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

A membrana de nitrocelulose foi, então, incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de enxaguar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish peroxidase* (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário, onde, posteriormente, as bandas foram visualizadas e quantificadas (número de pixels) pelo sistema Image J, fornecido gratuitamente pela *NIH (EUA)* via internet. O *gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase* (GAPDH) foi utilizado como normalizador já que esta proteína não tem a sua expressão alterada pelo genótipo dos animais e treinamento físico.

Os anticorpos utilizados foram PI3K110 α , Akt1, Akt2, pAkt^{Ser473}, GSK3 β , pGSK3 β ^{Ser9}, P70S6k, pP70S6k^{Thr389}, mTOR, pmTOR^{Ser2448}, AMPK α , pAMPK α ^{Thr172},

GAPDH (*Cell Signaling Technology, EUA*); IGF-I (*Upstate Biotechnology, EUA*); IGFBP-3 (*Santa Cruz Biotechnology, EUA*) e IGF-IR (*Abcam[®], UK*) e anticorpos secundários (anti-rabbit IgG e anti-mouse IgG, *Cell Signaling Technology, EUA*).

4.12 Avaliação da expressão gênica das isoformas de IGF-I

Com o intuito de estudar a expressão das isoformas de IGF-I na progressão da atrofia muscular induzida pela IC, e o efeito do treinamento físico aeróbico, foi avaliada a expressão gênica das referidas isoformas no músculo esquelético em animais e humanos. Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, EUA*). As concentrações de RNA foram determinadas por medida de absorbância de 260 nm. A pureza do RNA foi determinada pelo cálculo da razão das absorbâncias de 260nm e 280nm e por gel de agarose marcado com brometo de etídio. O RNA isolado foi armazenado a -80°C até sua utilização para a reação em cadeia da polimerase (PCR para a confecção de cDNA). Para a transcrição reversa (cDNA) foram utilizados 1µg de RNA total usando *Ready-To-Go Kit (Amersham, EUA)*. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real utilizando sondas específicas e *Taqman Master Mix (Applied Biosystems, EUA)*. As sondas da *Taqman* utilizadas para a detecção dos transcritos foram: Mm00439559_m1, para IGF-I classe 2; 1233960_m1 para IGF-I classe 1; 00710307_m1 para IGF-I Ea e 001228180_m1 para IGF-I Eb. Para GAPDH, #4352339E (*Applied Biosystems, EUA*). A análise do PCR em tempo real foi realizada utilizando os seguintes parâmetros de ciclos: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s cada ciclo e 60°C por 1min. A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foi feita pelo Sistema de Detecção de Sequências *ABI Prism 5700 (Applied Biosystems)*. Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (ΔCt) foram calculados para cada amostra e para cada gene de interesse como o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene normalizador, no caso, o GAPDH. O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão do gene de interesse ($\Delta\Delta Ct$) foi realizado por subtração do ΔCt do grupos controle (animal ou humano) para o correspondente ΔCt dos outros grupos. Em seguida, foi calculada a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos nesse estudo foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média. Foi testada a normalidade do dados pelo teste de *Shapiro-Wilks*. Para as variáveis com distribuição normal, a comparação entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de um ou dois caminhos. A escolha da análise estatística foi específica para cada experimento. Maiores descrições se encontram nas legendas de cada figura. Essa análise foi executada no programa *Statistica* (StatSoft, Inc., Tulsa, EUA) e para todas as análises foi utilizado post-hoc de *Duncan* e nível de significância $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Para o melhor entendimento dos resultados obtidos neste estudo, essa seção será apresentada em quatro diferentes subtópicos. Inicialmente serão apresentados resultados de estudo realizado com pacientes portadores de IC classe II, cujas as alterações musculoesqueléticas são iniciais às observadas em classes mais avançadas. O título desse subtópico será:

- I.) Efeito do treinamento físico aeróbico nos diferentes componentes da via de sinalização IGF-1/Akt/mTOR em portadores de IC.

Na continuação apresentaremos resultados em modelo experimental de IC induzida por hiperatividade simpática, cujo subtópico será intitulado:

- II.) Efeito do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular induzida por IC e nos diferentes componentes da via de sinalização Akt/mTOR;

Para a melhor compreensão da participação dessa via na regulação da massa muscular em modelo experimental de IC, utilizamos duas diferentes estratégias envolvidas na ativação (sobrecarga com leucina) e inibição (tratamento com rapamicina) dessa via, sendo intituladas:

- III.) Efeito da sobrecarga de leucina na atrofia muscular induzida pela IC.
- IV.) Efeito do tratamento com rapamicina na IC: contribuição da quinase mTOR na regulação da massa muscular promovida pelo treinamento físico aeróbico.

5.1. Efeito do treinamento físico aeróbico nos diferentes componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR em portadores de IC.

Os pacientes envolvidos neste estudos são oriundos de uma colaboração com o Prof. Dr. Guilherme Veiga Guimarães. Este estudo foi realizado na Unidade de Insuficiência Cardíaca e Transplante do InCor/HCFMUSP, na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor/HCFMUSP e no Laboratório de Atividade Física e Saúde (LATIS) do InCor/CEPEUSP. A concepção desse projeto envolveu outras abordagens de treinamento físico, mas foi parte deste projeto de doutorado apenas os indivíduos que realizaram o treinamento físico aeróbico.

As características físicas e clínicas iniciais dos grupos controle e IC estão apresentadas na TABELA 1. Os dois grupos são semelhantes em relação à idade e IMC .

5.1.1. Expressão gênica e proteica de componentes da regulação do IGF

Dentre os efeitos mediados pelo sistema IGF-I encontra-se o anabolismo e o aumento à sensibilidade da insulina e, assim, é de se esperar que tal sistema desempenhe um papel chave nas modificações orgânicas induzidas pelo exercício físico. Por isso, no presente estudo foram avaliados diferentes isoformas de IGF-I (IGF-IEa, IGF-IEb, IGF-IEc), IGF-I total (PAM), o receptor de IGF e a IGFBP-3, o subtipo mais expresso em seres humanos.

A expressão do RNA mensageiro de todas as isoformas de IGF-I e do IGF-I PAM (total) apresentou-se reduzida em portadores de IC em comparação a indivíduos saudáveis (FIGURA 6A-D). Indivíduos com IC treinados por sua vez apresentaram uma reversão parcial na expressão do RNA mensageiro de IGF-IEa e IGF-IPAM em comparação a seus congêneres não treinados (FIGURA 6A e D).

O receptor de IGF-I (IGF-IR) não apresentou diferença em sua expressão proteica (FIGURA 6E) entre os grupos avaliados. Já a IGFBP-3 apresentou sua expressão proteica reduzida em portadores de IC. (FIGURA 6F). O treinamento físico, apesar de uma tendência de aumento, não foi capaz de aumentar a

expressão desta proteína ligadora em comparação ao grupo IC, no entanto, o grupo IC treinado deixou de apresentar diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle.

TABELA 1: Características físicas e clínicas dos indivíduos controle e portadores de insuficiência cardíaca.

	Controle (n=6)	IC (n=12)	P
Idade (anos)	61 ± 2	49 ± 8	0,3
Peso (kg)	75,4 ± 4,5	81,1 ± 18,6	0,8
Altura (m)	1,57 ± 0,03	1,65 ± 0,07	0,4
IMC (kg/m²)	30.7 ± 1,8	29,8 ± 5,1	0,9
FEVE (%)	—	55,8 ± 4,7	—
<u>Gênero (%)</u>			
Masculino	66	50	—
Feminino	34	50	—
<u>Etiologia (%)</u>			
Isquêmica	—	40	—
Não Isquêmica	—	60	—
<u>Classe funcional</u>			
I / II / III	—	0 / 12 / 0	—
<u>Medicamentos (%)</u>			
Betabloqueador	0	100	—
IECA	0	100	—
Digoxina	0	50	—
Diuréticos	0	50	—

IMC, índice de massa corporal; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IECA, inibidor da enzima conversora de angiotensina. Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Os dados foram comparados entre os grupos pelo teste *t* de *Student* para dados não pareados.

FIGURA 6: Expressão gênica (A-D) e proteica (E-G) dos componentes do sistema de regulação do IGF-I do músculo vasto lateral de indivíduos controle (CO), com insuficiência cardíaca sedentários (IC) e treinados (IC-T). IGF-I peptídeo Ea (A), IGF-I peptídeo Eb (B), IGF-I peptídeo Ec (C), IGF-I PAM, (D), IGF-IR (E), IGFBP-3 (F) e os respectivos *blots* representativos (G). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

5.1.2. Expressão das proteínas constituintes da via de sinalização Akt/mTOR

Dentre as proteínas analisadas a expressão de PI3K não apresentou diferença entre os grupos (FIGURA 7A). A Akt1 total, por sua vez, apresentou-se reduzida em portadores de IC em comparação a indivíduos saudáveis sendo essa redução revertida em pacientes com IC treinados (FIGURA 7B). Apesar disso, não foram observadas diferenças entre os grupos na fosforilação da proteína Akt no resíduo de Ser473 (FIGURA 7C).

Tanto a expressão de GSK3 β total quanto de sua forma fosforilada na Ser9 apresentaram-se diminuídas em portadores de IC; sendo essa diferença abolida após o treinamento físico (IC-T) (FIGURA 7D e E).

De todas as proteínas analisadas, a AMPK fosforilada na Thr172 foi a única que se apresentou aumentada em portadores de IC em comparação a indivíduos controle. O treinamento promoveu um aumento ainda maior na expressão dessa proteína no grupo IC (FIGURA 7F).

Com relação à mTOR, tanto sua expressão total quanto a fosforilação no resíduo de Ser2448 apresentaram-se diminuídos em portadores de IC. O treinamento físico reverteu esse efeito da IC em relação a mTOR total mas não ao fosforilado (FIGURA 7G e H).

FIGURA 7: Expressão de proteínas integrantes da via de sinalização Akt/mTOR no músculo vasto lateral de indivíduos controle (CO), com insuficiência cardíaca sedentários (IC) e treinados (IC-T). PI3K (A), Akt1 (B), pAkt^{Ser473} (C), GSK3β (D), pGSK3β^{Ser9} (E), pAMPK^{Thr172} (F), mTOR (G), pmTOR^{Ser2448} (H) e os respectivos *blots* representativos (I). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

Associada as alterações moleculares observadas na via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR, os pacientes com IC apresentaram VO_2 pico inferior ao dos indivíduos controle. O treinamento físico aeróbico não foi capaz de promover melhora nessa variável (FIGURA 8).

FIGURA 8: VO_2 pico de indivíduos controle (CO), com insuficiência cardíaca sedentários (IC) e treinados (IC-T). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um caminho (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

5.2. Efeito do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular induzida por IC e nos diferentes componentes da via de sinalização Akt/mTOR

Como mencionado previamente, o modelo genético de IC induzida por hiperatividade simpática apresenta aos sete meses de idade, cardiomiopatia grave associada ao aumento de mortalidade e sinais clínicos de IC, evidenciado pelo acúmulo de água nos pulmões (BRUM et al., 2002; FERREIRA et al., 2008). Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que durante a progressão da doença, aos três, cinco e sete meses de idade, onde a cardiomiopatia é leve, moderada e grave, respectivamente, apenas aos sete meses foi constatado o quadro de miopatia esquelética nesses animais (BACURAU et al., 2009). Com base nesses resultados, o treinamento físico aeróbico com duração de 60 dias foi iniciado aos cinco meses de idade, com intuito de prevenir a atrofia muscular observada neste modelo.

A TABELA 2 apresenta resultados que corroboram a disfunção cardíaca nos animais KO aos sete meses de idade. Tanto a fração de encurtamento quanto a fração de ejeção apresentaram-se reduzidas no grupo KO quando comparadas ao grupo controle. Além da função sistólica, também foi analisado um parâmetro estrutural cardíaco, o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. Este apresentou-se aumentado no grupo KO, sugerindo dilatação do ventrículo esquerdo aos sete meses de idade associada à disfunção sistólica nesses animais. A taquicardia basal observada no grupo KO comprova a hiperativação do sistema nervoso simpático no modelo experimental estudado.

TABELA 2: Parâmetros hemodinâmico e ecocardiográfico de animais controle e com IC induzida por hiperatividade simpática.

	WT	n	KO	n	P
FC (bpm)	549 ± 15,6	24	677 ± 9,6	19	0,03
FE (%)	50,2 ± 1,3	10	36,5 ± 1,1	8	0,00
FS (%)	21.6 ± 0.7	10	14.7 ± 0.5	8	0.00
DDFVE (mm)	0,382 ± 0,007	10	0,406 ± 0,010	8	0,03

FC, frequência cardíaca; FE, fração de ejeção; FS, fração de encurtamento; DDFVE, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Os dados foram comparados entre os grupos pelo teste *t* de *Student* para dados não pareados.

5.2.1. Expressão gênica e proteica de componentes da regulação do IGF

Das isoformas de IGF-I investigadas (IGF-IEa, IGF-IEb e IGF-I Classe II) bem como o IGF-IPAM, o treinamento físico aeróbico no grupo WT apresentou uma tendência não significativa de induzir aumento na expressão desses genes em comparação a animais WT não treinados (FIGURA 9A, B, D, E, H).

Camundongos KO apresentaram menor expressão proteica de IGF-I quando comparados ao grupo controle (FIGURA 9F). Quando treinado, o grupo KO apresentou aumento na expressão de RNA mensageiro das isoformas IGF-IEa e IGF-IEb quando comparados ao grupo KO sedentário (FIGURA 9A e B). Esse aumento foi acompanhado tanto pela expressão gênica quanto pela expressão proteica do IGF-I total (FIGURA 9E e F).

FIGURA 9: Expressão gênica (A-E) e proteica (F-H) dos componentes do sistema de regulação do IGF-I do músculo sóleo de animais controle (WT), com insuficiência cardíaca (KO), sedentários e treinados. IGF-I peptídeo Ea (A), IGF-I peptídeo Eb (B), IGF-I Classe I (C), IGF-I Classe II (D) IGF-I PAM, (E), IGF-I (F), IGFBP-3 (G) e os respectivos *blots* representativos (H). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de post-hoc de Duncan.

5.2.2. Expressão das proteínas constituintes da via de sinalização Akt/mTOR

Das proteínas analisadas a única que apresentou diferença entre os grupos WT e WTT foi a PI3K sendo que o treinamento físico aumentou a expressão dessa proteína em relação a animais WT sedentários (FIGURA 10A).

Animais KO apresentaram menor expressão proteica em relação a camundongos WT para a forma fosforilada da Akt no resíduo Ser473 e para a forma fosforilada da GSK3 β no resíduo Ser9 (respectivamente, FIGURA 10D e F).

Além disso, o grupo KO sedentário apresentou menor expressão de PI3K e pAkt^{Ser473} em comparação a animais KOT indicando que o treinamento foi capaz de reverter a menor ativação dessa via na IC (FIGURA 10A e D). O treinamento em animais KO também parece ter se oposto ao efeito na ativação da AMPK em comparação ao grupo KO, pois a elevada expressão de AMPK fosforilada no resíduo Thr172 foi reduzida pelo treinamento físico aeróbico (FIGURA 10H). Interessante notar que o grupo KO treinado apresentou maior expressão da forma fosforilada de mTOR no resíduo Ser2448 em comparação ao grupo WT treinado (FIGURA 10L).

FIGURA 10: Expressão de proteínas integrantes da via de sinalização Akt/mTOR do músculo sóleo de animais controle (WT), com insuficiência cardíaca (KO), sedentários e treinados. PI3K (A), Akt1 (B), Akt2 (C), pAkt^{Ser473} (D), GSK3β (E), pGSK3β^{Ser9} (F), AMPK (G), pAMPK^{Thr172} (H), mTOR (J), pmTOR^{Ser2448} (L), P70 (M), pP70^{Thr389} (N) e os respectivos blots representativos (I). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$); § diferença

significante vs. KOT ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

5.2.3 Parâmetros morfológicos e funcionais em modelo experimental

Na FIGURA 11 podemos observar que os animais KO apresentaram diminuição na área de secção transversa das fibras do tipo I e IIA do músculo sóleo quando comparados ao grupo WT. É interessante notar, que após 2 meses de treinamento físico aeróbico, o grupo KO deixou de apresentar diferenças estatísticas quando comparado ao grupo WT sedentário, mostrando que mesmo o treinamento físico aeróbico foi eficaz em prevenir o desenvolvimento do quadro de atrofia muscular observado nesses animais.

FIGURA 11: Área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo IIA do músculo sóleo de animais controle (WT), com insuficiência cardíaca (KO), sedentários e treinados. * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$); § diferença significativa vs. KOT ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

A atrofia muscular é um dos fatores que influenciam a intolerância ao esforço físico na IC. Como observado na FIGURA 12A, camundongos KO apresentam intolerância a realização de esforços quando comparados ao grupo WT após o

período experimental (2 meses). O treinamento físico aeróbico foi eficaz em promover a melhora na capacidade física tanto nos animais WT quanto nos animais KO, sendo que este último apresentou resultados semelhantes ao grupo WT sedentário. Com o intuito de avaliarmos especificamente a função muscular desses animais, foi realizado o teste em Rota Rod, que avalia o desempenho motor. Vale ressaltar que neste teste o melhor resultado é caracterizado pela maior permanência do animal. Na FIGURA 12B, pode-se observar um menor tempo de teste no grupo KO quando comparado ao grupo WT, corroborando os resultados de intolerância ao esforço observado nesse grupo. Essa diferença foi abolida pelo treinamento físico aeróbico, o que sugere que o treinamento físico melhora o desempenho motor de camundongos com IC.

FIGURA 12: Distância percorrida em teste de esforço máximo (A) e avaliação do desempenho motor em Rota Rod (B) realizado nos grupos controle (WT), com insuficiência cardíaca (KO), sedentários e treinados. * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$); § diferença significativa vs. KOT ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

5.3. Efeito da sobrecarga de leucina na atrofia muscular induzida pela IC

Além do estresse mecânico (isto é contração muscular), da insulina e do IGF-I, existem evidências demonstrando a participação dos nutrientes no aumento da síntese proteica (NAIR, SCHWARTZ e WELLE, 1992; ANTHONY et al., 2000; LIU et al., 2001; LYNCH et al., 2002). Portanto, foi parte deste projeto avaliar o efeito da sobrecarga de leucina no quadro de miopatia esquelética observado no modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. É importante mencionar que o objetivo da sobrecarga com leucina neste estudo foi de verificar a contribuição da quinase mTOR na atrofia muscular observada em animais KO, uma vez que é conhecida a ação da leucina sobre essa via de sinalização. Dessa forma, este estudo foi realizado apenas em animais controle e KO sedentários.

Inicialmente, a nossa grande preocupação era encontrar a forma mais adequada de realizar a suplementação com leucina em um período longo, sem haver nenhum prejuízo na função renal dos animais KO, visto que esses já apresentavam complicações advindas da IC. No entanto, na maioria dos estudos, a suplementação com leucina era realizada em períodos curtos de até 7 dias. Na ocasião, um estudo realizado por Lynch e colaboradores (2002) (LYNCH et al., 2002), avaliou a suplementação com leucina em ratos via água de beber num período de 12 dias, que resultou num aumento expressivo da síntese proteica no músculo gastrocnêmio desses animais. Baseado neste trabalho, foi realizado o estudo com suplementação de leucina, cuja dose era corresponde a 114,5 mM, mas diferente do estudo inicial realizado por Lynch, o período de intervenção foi de 1 mês, compreendendo do sexto para sétimo mês de idade dos animais, fase em que o grupo KO apresenta sinais de miopatia esquelética (BACURAU et al., 2009). O desenho experimental desse subtópico está ilustrado na FIGURA 13A.

Como observado na TABELA 3, o consumo de leucina na água de beber não foi diferente entre os grupos WT e KO ao término do protocolo. Entretanto, como cada animal foi avaliado semanalmente em gaiola metabólica, foi observado oscilações no consumo de leucina entre as semanas, sendo este um fator limitante da suplementação via água de beber.

Sabendo que o menor consumo calórico pode deflagrar alterações no anabolismo proteico, realizamos a avaliação do consumo calórico em gaiola

metabólica nos grupos estudados. Como observado na TABELA 3, o consumo calórico não foi diferente entre os grupos estudados, mostrando que a suplementação com leucina não afetou o balanço energético dos animais suplementados, o que poderia ser um viés quanto ao estudo da regulação da massa muscular. Esse resultado é importante, pois demonstra que o pareamento dos animais por consumo alimentar (*pair fed*) não era necessário. A massa corporal não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos estudados, no entanto, o tecido adiposo epididimal dos grupos suplementados, apresentou valores superiores quando comparado aos grupos não suplementados. Embora o mesmo padrão de alteração em resposta a suplementação com leucina tenha sido observado no tecido adiposo retroperitoneal, as diferenças não foram significantes.

TABELA 3: Parâmetros metabólicos e morfológicos após tratamento com leucina.

	WT	WTL	KO	KOL
Parâmetros Metabólicos				
Massa corporal, g	26 ± 1,7	24,2 ± 0,7	23,5 ± 2	25,3 ± 1,8
Ingestão de água, ml/48h	6,7 ± 1,2	13,7 ± 1,3	21 ± 4*	16,2 ± 1,7
Excreção de urina, ml/48h	3,3 ± 0,7	4,6 ± 0,9	4,5 ± 0,7	5,1 ± 0,3
Ingestão de ração, g/48h	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,2
Excreção de fezes, g/48h	2,2 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,8 ± 0,5	2,4 ± 0,2
Consumo calórico, cal/g/dia	0,23 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02
Consumo de leucina, mg/100g	—	0,5 ± 0,1	—	0,4 ± 0,04
Parâmetros Morfológicos				
T.A. epididimal, mg/100g	0,82 ± 0,14	1,52 ± 0,17*	0,42 ± 0,09	1,02 ± 0,18 #
T.A. retroperitoneal, mg/100g	0,21 ± 0,06	0,41 ± 0,09	0,05 ± 0,01	0,25 ± 0,05
Coração, mg/100g	0,46 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,46 ± 0,01
Rim, mg/100g	0,56 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,72 ± 0,01*	0,65 ± 0,03
Músculo sóleo, mg/100g	0,34 ± 0,002	0,32 ± 0,002	0,39 ± 0,004	0,32 ± 0,002
Músculo plantar, mg/100g	0,06 ± 0,004	0,06 ± 0,004	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,004

WT, controle (n=4); KO, animal com insuficiência cardíaca (n=3), WTL, controle suplementado com leucina (n=5); KOL, animal com insuficiência cardíaca suplementado com leucina (n=6). * diferença significativa vs. WT (p< 0,05); # diferença significativa vs. KO (p< 0,05). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de post-hoc de Duncan.

A avaliação da glicemia basal constatou que o grupo KO apresentava valores inferiores quando comparado ao grupo controle (FIGURA 13). Em concordância, esses animais possuem maior tolerância à glicose (TABELA 4). A glicemia observada no grupo KO, pode estar relacionada com a inativação gênica do receptor α_{2A} adrenérgico, visto que, animais com a inativação desse receptor apresentam hiperinsulinemia e diminuição da glicose sanguínea. O grupo WT suplementado com leucina também apresentou valores inferiores aos do grupo WT não suplementado. Embora os animais KO suplementados apresentem redução da glicemia em relação aos KO não suplementados, essa diferença não foi significativa (FIGURA 13B). A menor glicemia observada em resposta à suplementação com leucina no grupo WT pode ser devido a uma maior liberação de insulina, uma vez que estudo com infusão venosa de leucina, acarretou em aumento na liberação de insulina, concomitante a inibição na liberação do glucagon (ROCHA, FALOONA e UNGER, 1972; NEWSHOLME et al., 2005). Na ausência de exames mais específicos (ex. absorção intestinal, aminograma) que comprovassem a eficácia do tratamento, esse resultado está em concordância com o fato de que a suplementação com leucina, ao menos em parte, foi eficaz.

Embora a suplementação com leucina tenha reduzido a glicemia, não foram observadas alterações benéficas nem na área de secção transversa dos diferentes tipos de fibra do músculo sóleo (FIGURA 13D), nem na tolerância ao esforço nos grupos tratados com esse aminoácido (FIGURA 13C). Dessa forma, a suplementação com leucina não foi uma estratégia atrativa para responder a nossa pergunta inicial: Qual é a participação da via de sinalização Akt/mTOR na regulação na atrofia muscular em modelo de IC? Portanto, buscamos uma nova estratégia para melhor responder essa pergunta.

A seguir serão apresentados os resultados da inibição com rapamicina isolada ou associada ao treinamento físico aeróbico em modelo experimental de IC.

FIGURA 13: Desenho experimental da suplementação com leucina (A), glicemia (B), distância percorrida em teste de esforço máximo (C) e área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo IIA do músculo sóleo (D) de animais controle (WT), com insuficiência cardíaca (KO), e nos grupos WT e KO suplementados com leucina. * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

5.4. Efeito do tratamento com rapamicina na IC: contribuição da quinase mTOR na regulação da massa muscular promovida pelo treinamento físico aeróbico.

A FIGURA 14 comprova a eficácia do tratamento com rapamicina em bloquear a quinase mTOR, uma vez que este promoveu redução na área de secção transversa das fibras do tipo I e IIA do músculo sóleo de animais controle (FIGURA 14A e B) acompanhada pela redução na expressão da forma fosforilada de P70S6K na Thr389 nos músculos sóleo e plantar (FIGURA 14C).

FIGURA 14: Imunofluorescência para MHCI (vermelho) e laminina (verde) no músculo sóleo (A), área de secção transversa das fibras do tipo I e IIA do músculo sóleo (B) e *blot* representativo das proteínas P70 e pP70S6K^{Thr389} (C) de animais controle tratados com salina (WT) ou rapamicina (WTrap). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

Para avaliar a participação da via Akt/mTOR na resposta trófica do treinamento físico aeróbico na prevenção da atrofia muscular em modelo experimental de IC, animais WT e KO, sedentários e treinados receberam por trinta

dias via gavagem, rapamicina ou salina (FIGURA 15A). O tratamento com rapamicina inibiu o efeito preventivo do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular de animais com IC (FIGURA 15B). Esse resultado sugere o envolvimento da via quinase mTOR nesta prevenção.

FIGURA 15: Desenho experimental do tratamento com rapamicina isolado ou associado ao treinamento físico aeróbico (A) e área de secção transversa das fibras do tipo I e do tipo IIA do músculo sóleo (B) de animais controle (WT) e com insuficiência cardíaca (KO), treinados (KOT) e treinados/tratados com rapamicina (KOTrap). * diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$); § diferença significativa vs. KOT ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

Embora o tratamento com rapamicina promoveu a redução na área de secção transversa das fibras do músculo sóleo de animais KO treinados, esse efeito não foi acompanhado por alteração na distância percorrida, uma vez que a maior tolerância ao esforço observada nesse grupo foi semelhante a do grupo KO treinado que recebeu o tratamento com rapamicina (FIGURA 16A). Já, o tratamento isolado com rapamicina, não promoveu nenhum efeito na distância percorrida no grupo KO.

Semelhante a tolerância ao esforço físico, a atrofia muscular induzida pelo tratamento com rapamicina não alterou o desempenho motor nos animais com IC treinados (FIGURA 16B). No entanto, animais com IC tratados com rapamicina não apresentaram redução no desempenho motor, como observado no grupo KO sedentário.

É interessante notar que o edema pulmonar de animais KO, que representa um sinal clínico de IC, apresentou-se reduzido após o tratamento com rapamicina, semelhante ao observado em animais KO treinados (FIGURA 16D). Os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda precisam ser explorados, mas podem estar relacionados à modulação de células imunológicas no pulmão dos animais.

Além da ação da rapamicina no edema pulmonar observado no grupo com IC, também é possível constatar alteração na massa do baço. Conforme demonstrado na (FIGURA 16C), a rapamicina foi capaz de reduzir a massa do baço de animais controle e KO. Esses resultados demonstram uma interessante ação sistêmica da rapamicina tanto em animais saudáveis quanto em animais com IC. Esses resultados serão melhor discutidos a seguir.

FIGURA 16: Distância percorrida em teste de esforço máximo (A), avaliação do desempenho motor em Rota Rod (B), massa do baço (C) e razão peso úmido/ seco dos pulmões de animais controle (WT) e com insuficiência cardíaca (KO), treinados (WTT, KOT) e tratados com rapamicina. * diferença significativa entre os grupos ou WT ($p \leq 0,05$); § diferença significativa vs. KOT ($p \leq 0,05$); § diferença significativa vs. KOT rapamicina ($p \leq 0,05$); ** diferença significativa vs. KO ($p \leq 0,05$). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

TABELA 4: Parâmetros Morfológicos, Metabólicos e Hemodinâmico.

	WT	WTT	KO	KOT	WTrap	WTTrip	KOrap	KOTrap
Parâmetros Metabólicos								
Consumo de água, ml/dia	4,8 ± 0,2 (13)	4,7 ± 0,3 (17)	5,1 ± 0,4 (16)	5,5 ± 0,6 (11)	4,8 ± 0,4 (17)	4,3 ± 0,4 (15)	4,1 ± 0,3 (10)	6,1 ± 0,3 \$ (18)
Excreção de urina, ml/dia	1,1 ± 0,1 (15)	1,5 ± 0,1 (17)	1,9 ± 0,3* (14)	1,6 ± 0,2 (10)	1,1 ± 0,1 (16)	1,5 ± 0,2 (17)	0,9 ± 0,1 † (9)	2,1 ± 0,2* \$ (17)
Consumo de ração, g/dia	2,4 ± 0,1 (13)	2,5 ± 0,2 (17)	2,6 ± 0,1 (16)	2,7 ± 0,1 (13)	2,4 ± 0,1 (15)	2,2 ± 0,2 (14)	2,0 ± 0,2 (11)	1,8 ± 0,2 † (18)
Excreção de fezes, g/dia	1,5 ± 0,2 (15)	1,5 ± 0,1 (18)	1,5 ± 0,1 (15)	1,8 ± 0,1 (13)	1,3 ± 0,3 (15)	1,1 ± 0,1 (17)	0,9 ± 0,1 † (12)	1,1 ± 0,1 † (19)
Consumo calórico, cal/g/dia	0,30 ± 0,02 (13)	0,31 ± 0,02 (17)	0,32 ± 0,01 (14)	0,32 ± 0,02 (13)	0,34 ± 0,02 (15)	0,29 ± 0,03 (14)	0,23 ± 0,03 \$ (12)	0,21 ± 0,03 † (18)
Glicemia, mg/dL	153,9 ± 4,6 (9)	148,1 ± 5,5 † (7)	123,3 ± 19,8* (11)	110,4 ± 10,7* (8)	132,7 ± 7,5 † (6)	139,5 ± 5,4 †** (14)	130,7 ± 3,9 (5)	138,3 ± 6,6 † (10)
Área sob a curva	17,4 ± 0,9 (12)	13,7 ± 0,7* † (14)	11,1 ± 0,4* (17)	9,7 ± 0,4* (13)	14,2 ± 1,5 † (5)	14,6 ± 0,9 † (7)	12,9 ± 0,5* (6)	10,1 ± 0,3* \$ (8)
Parâmetros Morfológicos								
Massa corporal, g	24,8 ± 0,8 (14)	26,0 ± 0,6 (9)	27,3 ± 0,3 (10)	27,7 ± 0,4 (10)	22,8 ± 0,7 (17)	24,7 ± 0,6 (16)	26,6 ± 0,3 (10)	27,8 ± 0,5* # (17)
T. A. Epididimal, mg/100g	1,07 ± 0,08 (13)	0,7 ± 0,09 (9)	1,5 ± 0,08* (10)	1,2 ± 0,09** (11)	1,0 ± 0,08 (9)	1,1 ± 0,1** (15)	1,3 ± 0,08 (10)	1,1 ± 0,1 (18)
T. A. Retroper., mg/100g	0,3 ± 0,03 (14)	0,2 ± 0,03 (10)	0,4 ± 0,05 (11)	0,4 ± 0,03 (10)	0,2 ± 0,04 (16)	0,2 ± 0,03 (15)	0,3 ± 0,03 (13)	0,4 ± 0,04 (18)
Coração, mg/100g	0,42 ± 0,01 (13)	0,44 ± 0,01 (17)	0,44 ± 0,01 (12)	0,43 ± 0,006 (8)	0,44 ± 0,01 (17)	0,43 ± 0,01 (14)	0,44 ± 0,01 (13)	0,44 ± 0,01 (18)
Rim, mg/100g	1,07 ± 0,2 (13)	1,1 ± 0,03 (9)	1,28 ± 0,03* (12)	1,2 ± 0,02 (8)	1,09 ± 0,03 (16)	1,14 ± 0,04 (17)	1,29 ± 0,03 # (12)	1,34 ± 0,02 \$ # (18)

WT, controle sedentário; WTT, controle treinado; WTrap, controle tratado com rapamicina; WTTrip, controle tratado com rapamicina e treinado; KO, animal com insuficiência cardíaca (IC) sedentário; KOT, animal com IC treinado; KOrap, animal com IC tratado com rapamicina; KOTrap, animal com IC tratado com rapamicina e treinado; T. A., tecido adiposo; Retroper., retroperitoneal. * diferença significativa vs. WT; ** diferença significativa vs. WTT; # diferença significativa vs. WTTrip; \$ diferença significativa vs. KOrap; † diferença significativa vs. KOT; ‡ diferença significativa vs. KO. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguida de *post-hoc* de Duncan.

Animais tratados com rapamicina apresentaram alterações em vários parâmetros metabólicos (TABELA 4). Camundongos com IC apresentam aumento na excreção de urina quando comparados ao grupo controle sedentário, no entanto, ainda não estabelecemos os mecanismos envolvidos nesse fenômeno. No grupo KO o tratamento com rapamicina reduziu a excreção de urina, enquanto que associação treinamento físico/rapamicina aumentou a excreção de urina. Entretanto, vale notar que esse grupo apresentou uma maior massa renal em comparação aos dados dos demais grupos analisados, além do maior consumo de água.

Um dado interessante é que o tratamento com rapamicina foi associado ao menor consumo alimentar nos animais KO treinados, mas não nos grupos KO, WT tratados e WT tratados e treinados.

Nossos resultados demonstram que embora a glicemia não apresentou-se alterada no grupo controle após o treinamento físico aeróbico, esse grupo apresentou maior tolerância à glicose (TABELA 4). Já o tratamento com rapamicina nesse grupo impediu essa adaptação. Semelhante ao grupo WT treinado e tratado com rapamicina, o grupo KO treinado e tratado com rapamicina não apresentou alterações na glicemia. No entanto, a tolerância à glicose apresentou-se aumentada neste grupo em comparação aos animais WT e WT sedentários e tratados com rapamicina. A ausência de intolerância à glicose em animais KO cronicamente tratados com rapamicina pode ser explicada pela metabolismo diferenciado de carboidratos que tais animais possuem em função da ausência de receptores α_{2A} adrenérgicos conforme mencionado anteriormente.

QUADRO 1: Resumo dos principais resultados.

VARIÁVEIS		HUMANOS		ANIMAIS		
		IC Sedentário	IC Treinado	Controle Treinado	IC Sedentário	IC Treinado
Expressão de mRNA	IGF-IEa	↓	↓ ↑	↑	↔	↑ ↑
	IGF-IEb/c	↓	↓ ↔	↑	↔	↔ ↑
	IGF-IPAM	↓	↓ ↑	↑	↔	↔ ↑
Expressão proteica	IGFBP-3	↓	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔
	IGF-IR	↔	↔ ↔	—	—	—
	IGF-I	—	—	↔	↓	↔ ↑
	PI3K	↔	↔ ↔	↑	↓	↔ ↑
	Akt1	↓	↔ ↑	↔	↔	↔ ↔
	pAkt ^{Ser473}	↔	↔ ↔	↔	↓	↔ ↑
	mTOR	↓	↓ ↑	↔	↔	↔ ↔
	pmTOR ^{Ser2448}	↓	↔ ↔	↔	↔	↔ ↔ ↑
	pAMPK ^{Thr172}	↑	↑ ↔	↔	↔	↓ ↓ ↓
	pGSK3β ^{Ser9}	↓	↔ ↔	↔	↓	↔ ↔ ↓
Capacidade Física	VO ₂ pico	↓	↓ ↔	—	—	—
	Tolerância ao esforço	—	—	↑	↓	↔ ↑
	Função muscular	—	—	↔	↓	↔ ↑
AST	Fibras Tipo I	—	—	↔	↓	↔ ↑
	Fibras Tipo IIA	—	—	↔	↓	↔ ↑
Rapamicina	Fibras Tipo I	—	—	—	↓	↓ ↔
	Fibras Tipo IIA	—	—	—	↓	↓ ↔

↔	sem alteração	↑	aumento	↓	diminuição	vs. controle
↔	sem alteração	↑	tendência aumento	↓	tendência diminuição	vs. controle
		↑	aumento	↓	diminuição	vs. IC sedentário
		↑	tendência aumento	↓	tendência diminuição	vs. IC sedentário
		↑	aumento	↓	diminuição	vs. controle treinado (animal)

6. DISCUSSÃO

Um sinal clássico da IC é a intolerância ao esforço físico. A miopatia muscular esquelética permitiu o entendimento dessa menor capacidade física em portadores de IC, mesmo quando esses apresentavam melhora aguda da função cardíaca promovida pela terapia medicamentosa (FRAGA et al., 2007). O treinamento físico é considerado a abordagem terapêutica mais significativa em contrapor os efeitos da IC no tecido muscular esquelético, principalmente no que concerne a manutenção da massa muscular (ANKER et al., 2013). Embora a caquexia cardíaca seja referida como um preditor independente de mortalidade na IC, os mecanismos envolvidos nessa regulação são pouco conhecidos. Considerando que a estrutura e funcionalidade da musculatura esquelética depende do balanço entre síntese e degradação proteicas é possível que parte da regulação da massa muscular na IC ocorra também por alteração na via de síntese. Assim, considerando a importância da via IGF-I/Akt/mTOR, nossa hipótese de trabalho foi a de que o comprometimento de tal via no quadro da IC poderia ajudar a explicar as alterações musculares, sendo essas respostas contra reguladas pelo treinamento físico aeróbico.

Nesse sentido, o principal achado do presente estudo é que, pela primeira vez, foi demonstrada a participação da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR no efeito preventivo do treinamento físico aeróbico nas alterações musculares esqueléticas presentes na IC. Tal participação é corroborada tanto em humanos como no modelo experimental.

A seguir serão discutidos os resultados obtidos nos diferentes modelos estudados, humano e experimental.

6.1. Efeito do treinamento físico aeróbico nos diferentes componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR em portadores de IC.

Num estudo clássico realizado por Anker e colaboradores (1997) demonstrou-se que em período de 18 meses de acompanhamento pacientes portadores de IC classe III e IV, com VO_2 pico $\leq$ a $14 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, fração de ejeção $\leq$ 25% e estado

caquético, apresentavam mortalidade acentuada em comparação a pacientes com as mesmas características mas não caquéticos. Este estudo destacou a importância de se estudar a regulação da massa muscular na patologia da IC. De fato, alterações neste tecido podem levar a uma maior exacerbação dos sistemas neuro-humorais por meio de receptores musculares (mecano-metaboreflexo), contribuindo para a progressão do quadro de IC, o que caracteriza o círculo vicioso da IC (PIEPOLI e COATS, 2013). Dessa forma, a identificação de potenciais marcadores moleculares envolvidos num “estágio precoce” na modulação da massa muscular em pacientes com IC classe I e II, possui significativa relevância clínica.

No presente projeto, segundo a NYHA (*New York Heart Association*), todos os pacientes foram classificados como classe II. Esses resultados nos permitiram identificar potenciais eventos iniciais que ocorrem na IC durante o desenvolvimento da miopatia esquelética, além de eliminar a variabilidade de resultados encontrada em estudos que incluem todas as classes de IC em geral.

Outra característica importante dos pacientes incluídos neste estudo foi a fração de ejeção preservada (ICFEP) ($55,8 \pm 4,7 \%$), cujo sintoma primário é a fração de ejeção $\geq 50\%$ associada a intolerância ao esforço físico e diminuição da qualidade de vida em pacientes com IC compensada (BHELLA et al., 2011; HAYKOWSKY et al., 2011). Tradicionalmente a ICFEP tem sido vista como uma doença de menor gravidade, contudo, os pacientes do presente estudo apresentaram menor VO_2 pico quando comparados aos indivíduos controle ($15,4 \pm 4,9$ vs. $27,7 \pm 3,6 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente). Se considerarmos que 50% ou mais dos pacientes com IC são classificados com ICFEP (OWAN et al., 2006) e que dados epidemiológicos demonstram um incremento na mortalidade anual de 5% a 8% (comparado de 10% a 15% da IC com disfunção sistólica) vemos que a visão tradicional está equivocada e entende-se a relevância clínica em se estudar tal população. Estudo recente demonstrou, que mesmo pacientes com ICFEP apresentam redução da massa muscular associada a menor capacidade física (HAYKOWSKY et al., 2013).

Quanto aos efeitos do treinamento no sistema cardiovascular é preciso observar que não houve alteração no consumo máximo de oxigênio dos pacientes. Dessa forma, 12 semanas de treinamento aeróbico contínuo não foram capazes de

afetar tal parâmetro. Infelizmente, analisar somente o VO_2 pico permite poucas inferências sobre o efeito do treinamento na intolerância ao esforço desses indivíduos. Em teoria, por exemplo, é possível que o treinamento tenha melhorado a capacidade aeróbia desses indivíduos (e não a potência aeróbia ou VO_2) isso significaria que agora o indivíduo aproveitaria melhor o seu consumo máximo de oxigênio (seria capaz de se exercitar em porcentagens mais altas do consumo de oxigênio). Um maior tempo no teste de esforço bem como uma RER maior observados nesses pacientes estão de acordo com isso. Infelizmente a grande variabilidade dos dados entre o grupo (que foi pequeno) não permitiu que tais dados alcançassem relevância estatística.

Outro fato a ser notado é que em pacientes com fração de ejeção diminuída, ainda que aja um consenso de que VO_2 e débito diminuem, tal questão é pouco estudada em pacientes com ICFeP. Recentemente, ABUDIAB et al. (2013) demonstraram que nesses pacientes o maior limitante para a intolerância ao exercício é a incapacidade de aumentar o débito em equivalência à demanda metabólica do exercício. Isso reforça a ideia de que em nossos pacientes seria relevante verificar com abordagens adicionais se o treinamento realmente não foi eficaz ou melhorou a tolerância ao esforço muito embora isso não tenha sido demonstrado pelo aumento do VO_2 . Finalmente, o fato do treinamento contínuo ter revertido algumas alterações musculares induzidas pela IC também sugere um benefício dessa intervenção.

Sabe-se hoje que o tecido muscular esquelético é um importante órgão secretor e que as substâncias liberadas pelo mesmo podem ser benéficas ou prejudiciais dependendo da condição de saúde do indivíduo (PEDERSEN e FEBBRAIO, 2012). Um importante peptídeo produzido e secretado pelo músculo que tem sua regulação, ao menos em parte pela tensão contrátil, é o IGF-I. Esse fator de crescimento já foi amplamente estudado tanto em modelo experimental quanto em pacientes portadores de IC (HAMBRECHT et al., 2002; SCHULZE et al., 2003). Interessante notar que sua expressão muscular apresenta-se reduzida mesmo em fases iniciais da miopatia esquelética induzida pela IC. De fato os resultados do presente projeto corroboram os achados da literatura, demonstrando que pacientes com IC classe II apresentam redução na expressão gênica do IGF-I total. Essa redução foi acompanhada pela menor expressão gênica de todas as isoformas de

IGF-I (peptídeos Ea, Eb e Ec). Embora o papel de cada isoforma ainda não seja bem estabelecido, acredita-se que os peptídeos modulam a biodisponibilidade, a estabilidade e a ação do IGF-I, ou podem ter atividade independente do IGF-I processado. A coordenação entre a expressão de cada isoforma esta relacionada com a habilidade do tecido muscular em promover reparo e crescimento muscular (BARTON, 2006).

Embora não observada diferenças estatísticas, o treinamento físico aeróbico promoveu aumento da expressão gênica de IGF-I total ($p=0,06$) e da isoforma IGF-IEa (0,07). Curiosamente não foi observada alteração na isoforma IGF-IEc, conhecida pela sua regulação induzida por tensão contrátil, como o treinamento físico. No entanto, a expressão proteica de IGFBP-3, que estava reduzida na IC, apresentou um aumento parcial promovido pelo treinamento físico nesses pacientes. A IGFBP-3 é a proteína ligadora de IGF-I de maior abundância no plasma, e sua disponibilidade contribui para o aumento da meia vida de IGF-I, bem como em promover um maior reservatório desse peptídeo (GATTI et al., 2012). Existe na literatura apenas um estudo mostrando a redução da concentração circulante de IGFBP-3 associada a menor concentração de IGF-I plasmático, no entanto esses estudo foi realizado em crianças com IC de etiologia congênita (PENG et al., 2013). Recentemente foi demonstrado que uma outra proteína ligadora de IGF-I, o IGFBP-5, apresenta-se reduzida em músculo vasto lateral de pacientes com IC classe II. Essa redução foi acompanhada pela menor expressão de IGF-I, pelo aumento de fibras híbridas (IIa/IIx) e redução na função contrátil de fibras musculares isoladas (GODARD et al., 2012).

Parte da ativação da via de sinalização Akt/mTOR ocorre pelo estímulo do fator de crescimento IGF-I. Embora este teve sua expressão gênica diminuída, o mesmo não foi observado nas proteínas PI3K e pAkt^{Ser473}. Tal fato pode ser atribuído pelo tamanho da amostra e o menor poder estatístico, visto que ambas tiveram uma considerável redução (29,1% e 29,7%, respectivamente). No entanto, foi observada redução na expressão das proteínas Akt1 total, GSK3 β , pGSK3 β ^{Ser9}, mTOR e tendência a redução em pmTOR^{Ser2448}. Estudo realizado por Toth e colaboradores (2011) mostrou redução de pAkt^{Ser473}, no entanto nenhum outro componente da via foi alterado. Tal fato foi explicado pelo pareamento entre os sujeitos controle e portadores de IC, quanto a idade e o nível de atividade física.

O treinamento físico teve um efeito parcial na contra regulação dessas alterações proteicas. Essa intervenção promoveu aumento não significativo da mTOR total ($p=0,06$), sem alteração na pmTOR^{Ser2448}. Tal resposta pode ter sido mediada pelo aumento na forma fosforilada de AMPK na Thr172, conhecida em inibir a fosforilação da mTOR no resíduo Ser2448. Curiosamente, o treinamento em pacientes com IC promoveu aumento parcial na fosforilação da GSK3 β no resíduo Ser9, sendo essa uma regulação da síntese proteica independente de mTOR. Essa proteína em situações basais esta ativada, ou seja em sua forma desfosforilada, e suprime a atividade do eIF2B, um importante fator de iniciação da tradução, e portanto, na síntese de proteína (WANG et al., 2001).

Esses resultados sugerem pela primeira vez a participação de diferentes componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR associado a menor capacidade física em pacientes com IC classe II, sendo parte dessas alterações moleculares contra reguladas pelo treinamento físico aeróbico.

6.2. Efeito do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular induzida por IC e nos diferentes componentes da via de sinalização Akt/mTOR

O modelo genético de IC por hiperatividade simpática vêm sendo sistematicamente estudado em nosso laboratório (BRUM et al., 2002; BUENO JUNIOR et al., 2006; ROLIM et al., 2007; BARTHOLOMEU et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; VANZELLI et al., 2010; CUNHA et al., 2012; VANZELLI et al., 2013). Estudos prévios demonstraram que esses animais apresentam remodelamento cardíaco, acompanhado por disfunção cardíaca, edema pulmonar e mortalidade acentuada (BRUM et al., 2002; ROLIM et al., 2007; BARTHOLOMEU et al., 2008; FERREIRA et al., 2008). Não obstante as alterações cardiovasculares nesse modelo, no que diz respeito à musculatura esquelética, destacam-se alterações como atrofia muscular, mudança no tipo de fibra, no metabolismo energético e nas proteínas envolvidas na regulação do transiente de Ca^{2+} (BUENO JUNIOR et al., 2006; BACURAU et al., 2009). Juntos, esses resultados caracterizam esse como um bom modelo para estudar a IC e a miopatia esquelética induzida por essa patologia.

Corroborando os resultados prévios de nosso grupo, foi observado no modelo experimental de IC, a taquicardia basal acompanhada pela disfunção sistólica e dilatação ventricular esquerda, além de sinais clínicos de IC como o edema pulmonar, comprovando a presença da IC nos mesmos.

Outro sinal clássico da IC observado no presente projeto foi a menor tolerância aos esforços físicos. Especificamente vale lembrar que em seres humanos a intolerância é definida como a redução na habilidade de realizar exercício físico dinâmico devido a sintomas como dispneia ou fadiga periférica (RUBIM et al., 2006) sendo o teste de esforço comumente utilizado para diagnóstico ou prognóstico de doenças cardíacas, já que algumas anormalidades cardíacas são aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Na impossibilidade ter tais sintomas reportados pelos animais, nestes, a intolerância é verificada pelo menor tempo em testes físicos. Importante destacar que o teste de esforço máximo não avalia diretamente a função muscular, dessa forma utilizamos como instrumento a avaliação em teste Rota Rod. Este é um teste comportamental considerado padrão ouro para avaliar o efeito de doenças, da administração de drogas e de manipulações genéticas sobre a coordenação motora, a força muscular e a resistência à fadiga em roedores (RADLEY et al., 2007). Corroborando a menor tolerância ao esforço físico observada nos animais KO, estes apresentaram um menor tempo de teste em Rota Rod quando comparado ao grupo controle. Essa diferença foi abolida pelo treinamento físico aeróbico, o que sugere uma melhora do desempenho motor de camundongos com IC após treinamento físico.

Conforme já mencionado, um dos fatores que influenciam no quadro de intolerância ao esforço físico na IC é a atrofia muscular. Em concordância, podemos observar que os animais KO apresentaram diminuição na área de secção transversa das fibras do tipo I e IIA do músculo sóleo quando comparados ao grupo controle. É interessante notar que, após 2 meses de treinamento físico aeróbico, o grupo KO deixou de apresentar diferenças estatísticas quando comparado ao grupo WT sedentário, mostrando que mesmo o treinamento físico aeróbico foi eficaz em prevenir o desenvolvimento do quadro de atrofia muscular observado nesses animais. Esse resultado é muito significativo, visto que a atrofia muscular está associada ao mau prognóstico de indivíduos portadores de IC (MORLEY, THOMAS

e WILSON, 2006), e quando progride para caquexia, pode ser considerada como um do preditor independente de mortalidade (ANKER et al., 1997).

Diferente do conhecimento sobre mecanismos envolvidos no processo de degradação proteica na atrofia muscular mediada pela IC, pouco se conhece sobre a contribuição dos mecanismos que regulam “o outro” lado da balança, a síntese proteica. No presente estudo, os componentes que regulam a via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR, teve parte dessa modulação distinta entre os modelos estudados, humano e experimental. Diferente dos resultados obtidos em biópsia de vasto lateral de pacientes portadores de IC, a expressão das isoformas de IGF-I não foram alteradas em animais com IC. No entanto, quando avaliamos a forma processada do IGF-I no músculo sóleo desses animais, observamos significativa redução em comparação ao grupo controle.

Interessante notar que o treinamento físico aeróbico promoveu apenas no grupo KO, aumento significativo na expressão gênica das isoformas de IGF-IEa e Eb, e na expressão gênica e proteica do IGF-I. É importante destacar que no grupo KO treinado, a isoforma de IGF-IEa teve sua expressão aumentada em 92% em comparação ao grupo controle sedentário. Um estudo realizado em animais transgênicos que superexpressão apenas no músculo esquelético a isoforma IGF-IEa, constatou um efeito preventivo na atrofia muscular induzida pelo infarto agudo do miocárdio, associado ao aumento na expressão de componentes da via Akt/mTOR, bem como pela menor ativação do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma (SCHULZE et al., 2005).

Semelhante aos resultados da expressão proteica de IGF-I, a expressão da PI3K, proteína ativada indiretamente por esse peptídeo, também apresentou redução no grupo KO sedentário, sendo esta restabelecida pelo treinamento físico aeróbico.

Um dos alvos da proteína PI3K é a proteína Akt. Esta, quando ativada pela PI3K, promove uma série de respostas que inclui a fosforilação da mTOR e a translocação de FOXO para o citoplasma, processos importantes para a regulação da massa muscular. O grupo KO apresentou diminuição na fosforilação do resíduo Ser473 da Akt em comparação ao grupo controle.

Até o momento foram identificados quatro sítios de fosforilação da Akt1 (Ser473, Ser124, Thr308 e Thr450) (ALESSI et al., 1996). A fosforilação nos sítios Thr308 e Ser473 é induzida após tratamento de células com estímulos extracelulares, enquanto os sítios, Ser124 e Thr450 apresentam fosforilação basal. Estudos têm revelado que a fosforilação nos sítios Thr308 e Ser473 são necessárias para a atividade total da Akt (ALESSI et al., 1996; HANNIGAN et al., 1996; ANDJELKOVIC et al., 1997; ANDERSON et al., 1998). Embora tenha sido demonstrado que a fosforilação da PDK (via PI3K) ocorre no resíduo de Thr308 da Akt, estudos demonstraram que a PDK e sua associação a um fragmento de outra quinase (PRK-2), são capazes de fosforilar ambos os sítios.

Dessa forma, nossos resultados demonstraram pela primeira vez, a contribuição do treinamento físico aeróbico em aumentar a fosforilação da Akt em animais com IC. Esse resultado é importante, pois a Akt quando fosforilada promove a diminuição na degradação proteica por meio de FOXO. De fato, resultados do nosso grupo mostraram que tanto no modelo genético de IC por hiperatividade simpática (CUNHA et al., 2012) quanto em modelo de infarto agudo do miocárdio em ratos (dados não publicados), a via de degradação proteica dirigida pelo sistema ubiquitina proteassoma estava aumentada, sendo esta associada pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O treinamento físico aeróbico por sua vez reduziu a ativação desse sistema, acompanhado pela diminuição da produção de ROS. Resultados semelhantes foram demonstrados também em pacientes portadores de IC (GIELEN et al., 2012). Embora num primeiro momento, a ativação do sistema ubiquitina proteassoma esteja associada a uma manutenção negativa da massa muscular, a ativação desse sistema permite a degradação seletiva de proteínas oxidadas ou mal-enoveladas, evitando acúmulo destas no ambiente intracelular, sendo este processo de remoção conhecido como controle de qualidade de proteínas (CAMPOS et al., 2012). Dessa forma, é possível inferir que parte da regulação da proteólise muscular na IC possa ser modulado por dois mecanismos distintos: 1) pela sinalização IGF-I/Akt e 2) pelo acúmulo de proteínas oxidadas.

Um dos alvos da Akt, a mTOR, vêm sendo amplamente investigada em diferentes estudos envolvendo a regulação da massa muscular. Embora essa quinase não tenha apresentado alteração em sua fosforilação no animal com IC,

após treinamento físico, este apresentou aumento em comparação ao grupo controle treinado. Esses resultados podem ser explicados pela redução na forma fosforilada da AMPK no resíduo de Thr172 observada em camundongos com IC treinados. A ativação da AMPK vêm sendo relatada em situações de estresse energético, onde é observado o aumento na razão AMP/ATP. Esse resultado nos surpreendeu, uma vez que situações como hipóxia, jejum prolongado e exercício físico vêm sendo associados a ativação da AMPK. Esses resultados sugerem uma possível alteração no metabolismo energético de camundongos KO, que parece ser regulada pelo treinamento físico aeróbico.

Essa “falência energética” observada na IC, também pode ser reforçada por alterações na sinalização da GSK3 β em animais com IC. Essa proteína em situações basais esta ativada, e exerce importante regulação na atividade da enzima glicogênio sintetase, inativando-a e reduzindo a formação e os estoques de glicogênio. Como podemos notar animais KO sedentários e treinados apresentam menor fosforilação, ou seja, maior ativação da sinalização da GSK3 β . Diferente dos resultados observados nos pacientes, em animais com IC o exercício físico aeróbico não foi capaz de aumentar a fosforilação da GSK3 β , como observado na pAkt^{Ser473}, proteína envolvida na fosforilação/inativação da GSK3 β . No entanto, MARKUNS, WOJTASZEWSKI e GOODYEAR (1999), demonstraram redução na atividade a GSK3 β , sem modificação na fosforilação no resíduo Ser9 após treinamento físico aeróbico em ratos, demonstrando que parte da sinalização da GSK3 β é um mecanismo independente de fosforilação. Um possível mecanismo envolvido nessa regulação é a via de sinalização Wnt (COHEN e FRAME, 2001). Dessa forma, novos estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvido na regulação da sinalização da via Akt/GSK3 β na regulação da atrofia muscular induzida pela IC, bem como o efeito do treinamento físico sob essa via.

Até o momento foi possível constatar que diferentes componentes da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR parecem participar na modulação da massa muscular na patologia da IC. Para o melhor entendimento desses mecanismos, utilizamos no modelo experimental de IC duas diferentes estratégias: 1) a suplementação com leucina e 2) a inibição com rapamicina. Discutidas a seguir.

6.3. Efeito da sobrecarga de leucina na atrofia muscular induzida pela IC.

Aminoácidos podem ativar diretamente a quinase mTOR (HARA et al., 1998). Em células, a privação de aminoácidos bem como o tratamento com rapamicina são capazes de induzir a desfosforilação de proteínas alvo da mTOR, P70S6K e 4EBP1, resultando em prejuízos para a síntese de proteínas (KIM et al., 2002).

Como relatado em estudos realizados com portadores de IC, a redução de apetite bem como a inadequada absorção intestinal nesses indivíduos, resulta em uma indisponibilidade de nutrientes (CELIK et al., 2009). Apesar de não haver estudos com a suplementação isolada de leucina na IC, recentemente foi demonstrado que pacientes portadores de IC com caquexia cardíaca, após 12 semanas de dieta hipercalórica associada a aminoácidos, apresentaram melhora no desempenho em teste de tolerância aos esforços (ROZENTRYT et al., 2010).

Embora esses animais não apresentem alterações na ingestão calórica, ainda não é possível descartar que a absorção de nutrientes não esteja prejudicada, visto que já foi demonstrado que pacientes portadores de IC apresentam uma absorção de nutrientes inadequada devido a complicações como edemas intersticiais (CELIK et al., 2009). Apoiando a hipótese da má absorção intestinal, vale destacar que esses animais apresentam manutenção da massa corporal mesmo mediante a redução da massa muscular, o que pode ser “mascarado” pelo excesso do volume de líquido extracelular, fenômeno comumente observado na caquexia induzida por diferentes doenças (MOORE et al., 1963). De fato, foi demonstrado que camundongos KO quando avaliado por DEXA, apresentam aumento da massa livre de gordura mesmo havendo atrofia muscular. Esses resultados sugerem um quadro de edema intersticial em camundongos KO, que pode ser comprovado pelo edema pulmonar presente nesses animais (FERREIRA et al., 2008).

Mesmo sem alteração na massa corporal, o tecido adiposo epididimal dos grupos suplementados, apresentou valores superiores quando comparado aos grupos não suplementados. Embora o mesmo padrão de alteração em resposta a suplementação com leucina tenha sido observado no tecido adiposo retroperitoneal, as diferenças não foram significantes. Esse resultado é em parte controverso com os observados na literatura, visto que alguns estudos apontam a leucina como uma

importante intervenção no combate à obesidade, pois permite melhor controle da glicemia, diminuição da gordura corporal e do apetite (SKOV et al., 1999; PARKER et al., 2002; LAYMAN, 2003; LAYMAN et al., 2003; COTA et al., 2006). No entanto, essa função atribuída à leucina ainda não está bem estabelecida (LAYMAN, 2003; HALTON e HU, 2004; ZHANG et al., 2007; NAIRIZI et al., 2009). Uma possível explicação para o aumento no conteúdo do tecido adiposo nos animais suplementados pode ser pela conversão desse aminoácido em lipídeos por meio da síntese *de novo*.

A leucina é conhecida como um aminoácido secretagogo de insulina, além de inibir a liberação do glucagon (ROCHA, FALOONA e UNGER, 1972; NEWSHOLME et al., 2005). Dessa forma, na falta de avaliações mais contundentes como o aminograma, a avaliação da glicêmica pode ser uma ferramenta no auxílio da compreensão da eficácia da suplementação com leucina. De fato, o grupo WT suplementado com leucina apresentou valores inferiores aos do grupo WT não suplementado. Embora os animais KO suplementados apresentem redução da glicemia em relação aos KO não suplementados, essa diferença não foi significativa uma vez que estes já apresentavam valores inferiores da glicemia. Essa menor glicemia observada no grupo KO pode estar relacionada com a inativação gênica do receptor α_{2A} adrenérgico, visto que, animais com a inativação desse receptor, apresentam hiperinsulinemia e diminuição da glicose sanguínea (SAVONTAUS et al., 2008). De fato, estudos farmacológicos sugerem que a ativação dos receptores α_{2A} adrenérgicos podem inibir a secreção de insulina (ANGEL, NIDDAM e LANGER, 1990). Esses achados podem ser confirmados pelos estudos realizados em células isoladas do pâncreas de animais com inativação gênica do receptor α_{2A} adrenérgico, cujos autores demonstraram a importância desse receptor na regulação da insulina (PETERHOFF et al., 2003; HU et al., 2005).

Distúrbios no metabolismo de glicose e insulina vêm sendo relatados com incidência crescente em pacientes portadores de IC (DOEHNER, ANKER e COATS, 2000; SUSKIN et al., 2000; GUAZZI et al., 2002; TENENBAUM e FISMAN, 2004), de forma que cerca de 30% desses indivíduos apresentam diabetes (SUSKIN et al., 2000). A presença do diabetes em pacientes com IC está relacionada ao mau prognóstico e aumento da mortalidade nesses indivíduos quando comparados aos

pacientes portadores de IC, sem distúrbios na glicemia (SUSKIN et al., 2000). Dessa forma, esses resultados sugerem que a regulação diferenciada no metabolismo da glicose observada em animais com IC por hiperatividade simpática pode significar uma possível limitação neste modelo.

Quanto o efeito da sobrecarga de leucina na atrofia muscular observada no modelo de IC, não foram constatados efeitos benéficos nem sobre a área de secção transversa das fibras do tipo I e IIA do músculo sóleo e nem na capacidade física avaliada em teste de esforço máximo dos animais suplementados.

Inicialmente esses resultados nos surpreenderam devido à quantidade de estudos na literatura mostrando o potencial efeito da suplementação com leucina no aumento da síntese proteica. Entretanto, com exceção de um estudo realizado com dieta hipoproteica (SUGAWARA et al., 2008), nenhum outro estudo de fato demonstrou que a suplementação com leucina levou a um aumento na massa muscular. De fato, aminoácidos podem ativar diretamente a quinase mTOR (HARA et al., 1998), no entanto, o efeito da suplementação com leucina na hipertrofia muscular ainda é controverso (SHIMOMURA e HARRIS, 2006; VERHOEVEN et al., 2009). Uma possível explicação para esse fenômeno, seria a diminuição nas concentrações dos aminoácidos valina e isoleucina em resposta ao aumento da ingestão de leucina, sendo esse desbalanço resultante do aumento da oxidação dos aminoácidos referidos pelo complexo cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, mecanismo esse reportado na literatura como paradoxo da leucina (SHIMOMURA e HARRIS, 2006).

A fim de minimizar as possíveis interferências envolvidas na suplementação com leucina, a utilização da gavagem para oferta de leucina em uma mesma concentração diária entre os animais suplementados, poderia ser uma importante alternativa. No entanto, estudo recente do nosso laboratório demonstrou que a suplementação de leucina via gavagem, na mesma duração e faixa etária dos nossos experimentos, também não promoveu alterações morfofuncionais do músculo esquelético. Por sua vez, a associação da suplementação de leucina ao treinamento físico aeróbico promoveu efeitos adicionais no aumento da massa muscular e na tolerância ao esforço físico.

Os resultados da suplementação com leucina em animais com IC foram insatisfatórios. Dessa forma, buscamos uma nova estratégia para melhor responder essa nossa pergunta inicial. Baseado nisso, buscamos uma nova abordagem, a inibição com rapamicina isolada ou associada ao treinamento físico aeróbico em modelo experimental de IC.

6.4. Efeito do tratamento com rapamicina na IC: contribuição da quinase mTOR na regulação da massa muscular promovida pelo treinamento físico aeróbico.

Para a maior confirmação do envolvimento da quinase mTOR na resposta anti-atrótica do treinamento físico aeróbico observada em animais com IC, foi iniciado um novo estudo envolvendo o tratamento com rapamicina, uma vez que a mTOR tem sua atividade inibida por essa droga, e não são conhecidos outros alvos da rapamicina (DAVIES et al., 2000).

O tratamento sustentado com rapamicina por 30 dias, aboliu o efeito preventivo do treinamento físico aeróbico na atrofia muscular de animais com IC, o que sugere o envolvimento da quinase mTOR nesta prevenção. De fato, esses achados corroboram o aumento na expressão das proteínas IGF-I, PI3K e pAkt^{Seri473} no grupo KO treinado.

É importante mencionar que a associação do tratamento com rapamicina e do treinamento físico não interferiu na melhoria da tolerância ao esforço observada em camundongos com IC, no entanto a melhora do desempenho motor observado em teste Rota Rod em animais com IC treinados, foi abolida pelo tratamento com rapamicina.

Ainda que a mTOR apresente importantes funções na regulação do crescimento e proliferação celulares, seu papel no metabolismo intermediário permanece pouco compreendido (SIPULA, BROWN e PERDOMO, 2006). Em conjunto, os dados de avaliação funcional e avaliação morfológica sugerem que a rapamicina é capaz de impedir parte dos efeitos do treinamento físico na musculatura esquelética de animais com IC, especificamente os relacionados ao aumento da área de secção transversa de fibras do tipo I e IIA. No que se refere à

IC, o entendimento atual é que essa patologia induz uma depleção energética generalizada enquanto o exercício físico crônico é capaz de melhorar a função geral do organismo. Nesse sentido, o treinamento físico também parece ser capaz de contrabalancear a perda da microvasculatura, a redução de enzimas do metabolismo oxidativo e a atenuação na densidade da superfície e tamanho da mitocôndria (ELAHI et al., 2010). Particularmente no que concerne à utilização de substratos energéticos está bem estabelecido que o treinamento físico é capaz de aumentar a utilização de ácidos graxos pela musculatura esquelética enquanto reduz simultaneamente a utilização de glicose para uma dada intensidade de exercício. Essa adaptação está associada ao aumento da tolerância ao esforço. Por outro lado, é interessante notar que o uso prolongado de rapamicina exerce um efeito direto no metabolismo muscular promovendo aumento da β -oxidação as expensas da utilização de glicose (SIPULA, BROWN e PERDOMO, 2006). Ou seja, os efeitos prolongados da rapamicina na musculatura esquelética parecem ser similares aos provocados pelo treinamento físico aeróbico. Talvez isso explique o porquê de os animais não terem apresentado redução na avaliação funcional apesar do impedimento nas adaptações na secção transversa de fibras de animais treinados e tratados com rapamicina. Evidentemente, os efeitos do treinamento físico sobre a função do miocárdio e ventilatória não podem ser descartados na manutenção do desempenho funcional em animais tratados com rapamicina.

A rapamicina apresenta alguns efeitos colaterais clássicos: hematológicos (anemia, leucopenia, trombocitopenia), hipercolesterolemia, artralguas, edema de extremidades e comprometimento na capacidade de regenerar feridas. Além disso, mais recentemente, profissionais da área de transplante têm relatado alguns efeitos inesperados da droga, tal como a toxicidade pulmonar (BUHAESCU, IZZEDINE e COVIC, 2006). Contudo, é interessante observar que a monoterapia com rapamicina não é frequentemente utilizada na clínica de transplantes, ao invés em geral ela é usada como parte de um regime multidrogas (FERRER, ARAKI e FORD, 2011). Vale notar ainda, que não se pode descartar infecções e outras doenças pulmonares pré-existentes como fator causal da toxicidade pulmonar associada à rapamicina (BUHAESCU, IZZEDINE e COVIC, 2006).

Em relação aos nossos dados, é interessante notar que o edema pulmonar de animais KO, que representa um sinal clínico de IC, apresentou-se reduzido após o

tratamento com rapamicina, semelhante ao observado em animais KO treinados. Os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda precisam ser explorados, mas podem estar relacionados à modulação de células imunológicas no pulmão dos animais (LORNE et al., 2009). A inibição da mTORC1 por rapamicina também foi capaz de reduzir o edema em outros tecidos tal como o macular do diabetes (BLUMENKRANZ, 2010) além de promover dramática resolução do edema de extremidade num paciente com fibrose nefrogênica sistêmica (SWAMINATHAN et al., 2010).

Além da ação da rapamicina no edema pulmonar observado no grupo com IC, também é possível observar alteração na massa do baço. Conforme demonstrado, a rapamicina foi capaz de reduzir a massa do baço de animais controle e KO. Embora não tenhamos realizado análises adicionais neste órgão, resultados semelhante da rapamicina foi observado em ratos com esplenomegalia devido à hipertensão portal no qual esta droga foi capaz de reduzir em até 44% o tamanho do baço (MEJIAS et al., 2010). De acordo com os autores este efeito da rapamicina estaria relacionado à ação da droga sobre a proliferação de linfócitos, neovascularização e fibrose.

Animais KO tratados com rapamicina apresentaram alterações em vários parâmetros metabólicos. Um dado interessante é que o tratamento com rapamicina foi associado ao menor consumo alimentar nos animais KO treinados, mas não nos KO, WT tratados e WT tratados e treinados. É sabido que no sistema nervoso central, nutrientes e hormônios sinalizam para o controle da ingestão de alimentos e o controle do peso corporal (CATANIA, BINDER e COTA, 2011). Apenas recentemente demonstrou-se que a mTORC1 é crucial na regulação dos conhecidos efeitos anoréxicos da leptina e insulina no sistema nervoso central (COTA et al., 2006). Contudo, de modo similar ao que se observa para o metabolismo de carboidratos na musculatura esquelética, a função da mTORC1 no sistema nervoso central (particularmente no hipotálamo) são bastante complexos uma vez que em distintas populações de neurônios a ativação dessa proteína em resposta a hormônio e nutrientes pode variar grandemente (COTA et al., 2006; CATANIA, BINDER e COTA, 2011). Dessa forma, pode-se entender porque mesmo participando dos efeitos anoréxicos como mencionados acima, a ativação crônica da mTORC1 pode aumentar a ingestão alimentar (HOWELL e MANNING, 2011). Nesse

cenário, os efeitos do tratamento crônico com rapamicina sobre a ingestão alimentar de camundongos KO deve ser melhor explorado em futuras investigações.

Dessa forma é importante salientar a complexidade da regulação da mTOR em diferentes sistemas biológicos, o que coloca esta quinase em evidência em vários estudos (ZONCU, EFEYAN e SABATINI, 2011). Contudo, é importante ressaltar que este efeito sistêmico de inibidores “rapalogs” também pode ser uma limitação.

Os resultados obtidos nesse estudo amplificaram o conhecimento dos possíveis mecanismos envolvidos na regulação da massa muscular na IC. Além disso, foi possível constatar que o treinamento físico aeróbico modula a via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR, sendo esse um dos possíveis mecanismos envolvidos na prevenção das alterações morfofuncionais observadas na IC. Os resultados referentes ao tratamento com rapamicina, reforçam a participação da via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR nesse efeito preventivo do treinamento físico aeróbico em animais hipotróficos. A diversidade entre a modulação de cada componente da via observada nos modelos de IC, animal e humano, sugere a importância de estudos translacionais para melhor elucidar os conhecimentos nessa área, cuja a aplicação clínica é de grande relevância.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a via de sinalização IGF-I/Akt/mTOR participa no desenvolvimento do quadro de atrofia muscular desencadeada pela IC, sendo parte do efeito preventivo provido pelo treinamento físico aeróbico na atrofia muscular, regulado por essa via.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUDIAB, M. M., REDFIELD, M. M., MELENOVSKY, V., OLSON, T. P., KASS, D. A., JOHNSON, B. D. e BORLAUG, B. A. **Cardiac output response to exercise in relation to metabolic demand in heart failure with preserved ejection fraction.** Eur J Heart Fail 15(7): 776-785. 2013
- ADAMOPOULOS, S., PONIKOWSKI, P., CERQUETANI, E., PIEPOLI, M., ROSANO, G., SLEIGHT, P. e COATS, A. J. **Circadian pattern of heart rate variability in chronic heart failure patients. Effects of physical training.** Eur Heart J 16(10): 1380-1386. 1995
- ADAMS, G. R. e MCCUE, S. A. **Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats.** J Appl Physiol 84(5): 1716-1722. 1998
- ADAMS, V., DORING, C. e SCHULER, G. **Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure.** Front Biosci 13: 302-311. 2008
- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. e HEMMINGS, B. A. **Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.** EMBO J 15(23): 6541-6551. 1996
- ALTMAN, J. D., TRENDELENBURG, A. U., MACMILLAN, L., BERNSTEIN, D., LIMBIRD, L., STARKE, K., KOBILKA, B. K. e HEIN, L. **Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A- adrenergic receptor knockout mice.** Molecular Pharmacology 56(1): 154-161. 1999
- ALTOMARE, D. A., LYONS, G. E., MITSUUCHI, Y., CHENG, J. Q. e TESTA, J. R. **Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin.** Oncogene 16(18): 2407-2411. 1998
- ANDERSON, K. E., COADWELL, J., STEPHENS, L. R. e HAWKINS, P. T. **Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B.** Curr Biol 8(12): 684-691. 1998
- ANDJELKOVIC, M., ALESSI, D. R., MEIER, R., FERNANDEZ, A., LAMB, N. J., FRECH, M., CRON, P., COHEN, P., LUCOCQ, J. M. e HEMMINGS, B. A. **Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.** J Biol Chem 272(50): 31515-31524. 1997
- ANGEL, I., NIDDAM, R. e LANGER, S. Z. **Involvement of alpha-2 adrenergic receptor subtypes in hyperglycemia.** J Pharmacol Exp Ther 254(3): 877-882. 1990

- ANKER, M. S., VON HAEHLING, S., SPRINGER, J., BANACH, M. e ANKER, S. D. **Highlights of mechanistic and therapeutic cachexia and sarcopenia research 2010 to 2012 and their relevance for cardiology.** Arch Med Sci 9(1): 166-171. 2013
- ANKER, S. D. e COATS, A. J. **Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation.** Chest 115(3): 836-847. 1999
- ANKER, S. D. e SHARMA, R. **The syndrome of cardiac cachexia.** Int J Cardiol 85(1): 51-66. 2002
- ANKER, S. D., SWAN, J. W., VOLTERRANI, M., CHUA, T. P., CLARK, A. L., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure.** European Heart Journal 18(2): 259-269. 1997
- ANTHONY, J. C., YOSHIZAWA, F., ANTHONY, T. G., VARY, T. C., JEFFERSON, L. S. e KIMBALL, S. R. **Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway.** J Nutr 130(10): 2413-2419. 2000
- AVRUCH, J., LONG, X., ORTIZ-VEGA, S., RAPLEY, J., PAPAGEORGIOU, A. e DAI, N. **Amino acid regulation of TOR complex 1.** Am J Physiol Endocrinol Metab 296(4): E592-602. 2009
- BACURAU, A. V., JARDIM, M. A., FERREIRA, J. C., BECHARA, L. R., BUENO, C. R., JR., ALBA-LOUREIRO, T. C., NEGRAO, C. E., CASARINI, D. E., CURI, R., RAMIRES, P. R., MORISCOT, A. S. e BRUM, P. C. **Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training.** J Appl Physiol 106(5): 1631-1640. 2009
- BARTHOLOMEU, J. B., VANZELLI, A. S., ROLIM, N. P., FERREIRA, J. C., BECHARA, L. R., TANAKA, L. Y., ROSA, K. T., ALVES, M. M., MEDEIROS, A., MATTOS, K. C., COELHO, M. A., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E., RAMIRES, P. R., GUATIMOSIM, S. e BRUM, P. C. **Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure.** J Mol Cell Cardiol 45(2): 240-249. 2008
- BARTON, E. R. **The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair.** Appl Physiol Nutr Metab 31(6): 791-797. 2006
- BARTON-DAVIS, E. R., SHOTURMA, D. I., MUSARO, A., ROSENTHAL, N. e SWEENEY, H. L. **Viral mediated expression of insulin-like growth factor I**

- blocks the aging-related loss of skeletal muscle function.** Proc Natl Acad Sci U S A 95(26): 15603-15607. 1998
- BAVIERA, A. M., ZANON, N. M., NAVEGANTES, L. C., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats.** Muscle Nerve 38(2): 1027-1035. 2008
- BHELLA, P. S., PRASAD, A., HEINICKE, K., HASTINGS, J. L., ARBAB-ZADEH, A., ADAMS-HUET, B., PACINI, E. L., SHIBATA, S., PALMER, M. D., NEWCOMER, B. R. e LEVINE, B. D. **Abnormal haemodynamic response to exercise in heart failure with preserved ejection fraction.** Eur J Heart Fail 13(12): 1296-1304. 2011
- BIRKENKAMP, K. U. e COFFER, P. J. **Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors.** Biochem Soc Trans 31(Pt 1): 292-297. 2003
- BLAAUW, B., AGATEA, L., TONIOLO, L., CANATO, M., QUARTA, M., DYAR, K. A., DANIELI-BETTO, D., BETTO, R., SCHIAFFINO, S. e REGGIANI, C. **Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy.** J Appl Physiol 108(1): 105-111. 2010
- BLAAUW, B., CANATO, M., AGATEA, L., TONIOLO, L., MAMMUCARI, C., MASIERO, E., ABRAHAM, R., SANDRI, M., SCHIAFFINO, S. e REGGIANI, C. **Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation.** Faseb J 23(11): 3896-3905. 2009
- BLUMENKRANZ, M. S. **Optimal current and future treatments for diabetic macular oedema.** Eye (Lond) 24(3): 428-434. 2010
- BOCCHI, E. A., BRAGA, F. G., FERREIRA, S. M., ROHDE, L. E., OLIVEIRA, W. A., ALMEIDA, D. R., MOREIRA MDA, C., BESTETTI, R. B., BORDIGNON, S., AZEVEDO, C., TINOCO, E. M., ROCHA, R. M., ISSA, V. S., FERRAZ, A., CRUZ, F., GUIMARAES, G. V., MONTERA VDOS, S., ALBUQUERQUE, D. C., BACAL, F., SOUZA, G. E., ROSSI NETO, J. M., CLAUSELL, N. O., MARTINS, S. M., SICILIANO, A., SOUZA NETO, J. D., MOREIRA, L. F., TEIXEIRA, R. A., MOURA, L. Z., BECK-DA-SILVA, L., RASSI, S., AZEKA, E., HOROWITZ, E., RAMIRES, F., SIMOES, M. V., CASTRO, R. B., SALEMI, V. M., VILLACORTA JUNIOR, H., VILA, J. H., SIMOES, R., ALBANESI, F., MONTERA, M. W. e SOCIEDASDE BRASILEIRA DE, C. **[III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure].** Arq Bras Cardiol 93(1 Suppl 1): 3-70. 2009
- BODINE, S. C., STITT, T. N., GONZALEZ, M., KLINE, W. O., STOVER, G. L., BAUERLEIN, R., ZLOTCHENKO, E., SCRIMGEOUR, A., LAWRENCE, J. C., GLASS, D. J. e YANCOPOULOS, G. D. **Akt/mTOR pathway is a crucial**

- regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.** *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-1019. 2001
- BOOTH, F. **The many flavors of IGF-I.** *J Appl Physiol* 100(6): 1755-1756. 2006
- BOUZAKRI, K., ZACHRISSON, A., AL-KHALILI, L., ZHANG, B. B., KOISTINEN, H. A., KROOK, A. e ZIERATH, J. R. **siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle.** *Cell Metab* 4(1): 89-96. 2006
- BRODBECK, D., CRON, P. e HEMMING, B. A. **A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain.** *J Biol Chem* 274(14): 9133-9136. 1999
- BROWN, E. J., ALBERS, M. W., SHIN, T. B., ICHIKAWA, K., KEITH, C. T., LANE, W. S. e SCHREIBER, S. L. **A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex.** *Nature* 369(6483): 756-758. 1994
- BRUM, P. C., BACURAU, A. V., MEDEIROS, A., FERREIRA, J. C., VANZELLI, A. S. e NEGRAO, C. E. **Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function.** *Braz J Med Biol Res* 44(9): 827-835. 2011
- BRUM, P. C., KOSEK, J., PATTERSON, A., BERNSTEIN, D. e KOBILKA, B. **Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice.** *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology* 283(5): H1838-1845. 2002
- BRUNN, G. J., FADDEN, P., HAYSTEAD, T. A. e LAWRENCE, J. C., JR. **The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antibodies to a region near its COOH terminus.** *J Biol Chem* 272(51): 32547-32550. 1997
- BUENO JUNIOR, C. R., BACURAU, A. V., JARDIM, M. e BRUM, P. C. **Exercise training restore Ca handling protein expression in a genetic model of cardiomyopathy induced by sympathetic hiperactivity [Abstract].** *Frontiers in Myogenesis* 1: 35. 2006
- BUHAESCU, I., IZZEDINE, H. e COVIC, A. **Sirolimus--challenging current perspectives.** *Ther Drug Monit* 28(5): 577-584. 2006
- BURNETT, P. E., BARROW, R. K., COHEN, N. A., SNYDER, S. H. e SABATINI, D. M. **RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1432-1437. 1998
- BYFIELD, M. P., MURRAY, J. T. e BACKER, J. M. **hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase.** *J Biol Chem* 280(38): 33076-33082. 2005

- CAMPOS, J. C., QUELICONI, B. B., DOURADO, P. M., CUNHA, T. F., ZAMBELLI, V. O., BECHARA, L. R., KOWALTOWSKI, A. J., BRUM, P. C., MOCHLY-ROSEN, D. e FERREIRA, J. C. **Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure.** PLoS One 7(12): e52764. 2012
- CATANIA, C., BINDER, E. e COTA, D. **mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease.** Int J Obes (Lond) 35(6): 751-761. 2011
- CELIK, T., IYISOY, A., YUKSEL, U. C. e JATA, B. **The small intestine: A critical linkage in pathophysiology of cardiac cachexia.** Int J Cardiol. 2009
- CHAVES, A. A., WEINSTEIN, D. M. e BAUER, J. A. **Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen.** Life Sci 69(2): 213-222. 2001
- CHEN, R., KIM, O., YANG, J., SATO, K., EISENMANN, K. M., MCCARTHY, J., CHEN, H. e QIU, Y. **Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation.** J Biol Chem 276(34): 31858-31862. 2001
- CHO, H., MU, J., KIM, J. K., THORVALDSEN, J. L., CHU, Q., CRENSHAW, E. B., 3RD, KAESTNER, K. H., BARTOLOMEI, M. S., SHULMAN, G. I. e BIRNBAUM, M. J. **Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta).** Science 292(5522): 1728-1731. 2001
- CHO, H., THORVALDSEN, J. L., CHU, Q., FENG, F. e BIRNBAUM, M. J. **Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice.** J Biol Chem 276(42): 38349-38352. 2001
- COHEN, P. e FRAME, S. **The renaissance of GSK3.** Nat Rev Mol Cell Biol 2(10): 769-776. 2001
- COTA, D., PROULX, K., SMITH, K. A., KOZMA, S. C., THOMAS, G., WOODS, S. C. e SEELEY, R. J. **Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake.** Science 312(5775): 927-930. 2006
- CRIMI, E., IGNARRO, L. J., CACCIATORE, F. e NAPOLI, C. **Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure.** Nat Rev Cardiol 6(4): 292-300. 2009
- CROSS, D. A., ALESSI, D. R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M. e HEMMINGS, B. A. **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.** Nature 378(6559): 785-789. 1995
- CSIBI, A., CORNILLE, K., LEIBOVITCH, M. P., POUPON, A., TINTIGNAC, L. A., SANCHEZ, A. M. e LEIBOVITCH, S. A. **The translation regulatory subunit**

- elF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse.** PLoS One 5(2): e8994. 2010
- CUNHA, T. F., BACURAU, A. V., MOREIRA, J. B., PAIXAO, N. A., CAMPOS, J. C., FERREIRA, J. C., LEAL, M. L., NEGRAO, C. E., MORISCOT, A. S., WISLOFF, U. e BRUM, P. C. **Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure.** PLoS One 7(8): e41701. 2012
- DAVIES, S. P., REDDY, H., CAIVANO, M. e COHEN, P. **Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.** Biochem J 351(Pt 1): 95-105. 2000
- DOEHNER, W. e ANKER, S. D. **Meeting report from the 74th annual scientific sessions of the American Heart Association (AHA).** Anaheim, CA, USA, November 11-14, 2001. Heart Fail Monit 2(3): 104-107. 2002
- DOEHNER, W., ANKER, S. D. e COATS, A. J. **Defects in insulin action in chronic heart failure.** Diabetes Obes Metab 2(4): 203-212. 2000
- DUNLAY, S. M., REDFIELD, M. M., WESTON, S. A., THERNEAU, T. M., HALL LONG, K., SHAH, N. D. e ROGER, V. L. **Hospitalizations after heart failure diagnosis a community perspective.** J Am Coll Cardiol 54(18): 1695-1702. 2009
- EASTON, R. M., CHO, H., ROOVERS, K., SHINEMAN, D. W., MIZRAHI, M., FORMAN, M. S., LEE, V. M., SZABOLCS, M., DE JONG, R., OLTERS DORF, T., LUDWIG, T., EFSTRATIADIS, A. e BIRNBAUM, M. J. **Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size.** Mol Cell Biol 25(5): 1869-1878. 2005
- ELAHI, M., MAHMOOD, M., SHAHBAZ, A., MALICK, N., SAJID, J., ASOPA, S. e MATATA, B. M. **Current concepts underlying benefits of exercise training in congestive heart failure patients.** Curr Cardiol Rev 6(2): 104-111. 2010
- EMBI, N., RYLATT, D. B. e COHEN, P. **Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase.** Eur J Biochem 107(2): 519-527. 1980
- ERBS, S., LINKE, A., GIELEN, S., FIEHN, E., WALTHER, C., YU, J., ADAMS, V., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Exercise training in patients with severe chronic heart failure: impact on left ventricular performance and cardiac size. A retrospective analysis of the Leipzig Heart Failure Training Trial.** Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 10(5): 336-344. 2003
- EVANS, W. J., MORLEY, J. E., ARGILES, J., BALES, C., BARACOS, V., GUTTRIDGE, D., JATOI, A., KALANTAR-ZADEH, K., LOCHS, H.,

- MANTOVANI, G., MARKS, D., MITCH, W. E., MUSCARITOLI, M., NAJAND, A., PONIKOWSKI, P., ROSSI FANELLI, F., SCHAMBELAN, M., SCHOLS, A., SCHUSTER, M., THOMAS, D., WOLFE, R. e ANKER, S. D. **Cachexia: a new definition**. Clin Nutr 27(6): 793-799. 2008
- FERREIRA, A. J., EVANGELISTA, F. S., BACURAU, A. V., TEIXEIRA, L. C., ROSA, K. T., IRIGOYEN, M. C., CASARINI, D., OLIVEIRA, E. M., KRIEGER, J. E. e BRUM, P. C. **Cardiac And Circulating Components Of The Sympathetic And Renin Angiotensin Systems During The Development Of Heart Failure In Mice [Abstract]**. The FASEB Journal 20: 312. 2006
- FERREIRA, J. C., BACURAU, A. V., EVANGELISTA, F. S., COELHO, M. A., OLIVEIRA, E. M., CASARINI, D. E., KRIEGER, J. E. e BRUM, P. C. **The role of local and systemic renin angiotensin system activation in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice**. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294(1): R26-32. 2008
- FERREIRA, J. C., ROLIM, N. P., BARTHOLOMEU, J. B., GOBATTO, C. A., KOKUBUN, E. e BRUM, P. C. **Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training**. Clin Exp Pharmacol Physiol 34(8): 760-765. 2007
- FERRER, I. R., ARAKI, K. e FORD, M. L. **Paradoxical aspects of rapamycin immunobiology in transplantation**. Am J Transplant 11(4): 654-659. 2011
- FINGAR, D. C. e BLENIS, J. **Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression**. Oncogene 23(18): 3151-3171. 2004
- FINGAR, D. C., RICHARDSON, C. J., TEE, A. R., CHEATHAM, L., TSOU, C. e BLENIS, J. **mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E**. Mol Cell Biol 24(1): 200-216. 2004
- FLORINI, J. R., EWTON, D. Z., MAGRI, K. A. e MANGIACAPRA, F. J. **IGFs and muscle differentiation**. Adv Exp Med Biol 343: 319-326. 1993
- FOLLAND, J. P. e WILLIAMS, A. G. **The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength**. Sports Med 37(2): 145-168. 2007
- FRAGA, R., FRANCO, F. G., ROVEDA, F., DE MATOS, L. N., BRAGA, A. M., RONDON, M. U., ROTTA, D. R., BRUM, P. C., BARRETTO, A. C., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Exercise training reduces sympathetic nerve activity in heart failure patients treated with carvedilol**. Eur J Heart Fail 9(6-7): 630-636. 2007

- FRAME, S. e COHEN, P. **GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery**. *Biochem J* 359(Pt 1): 1-16. 2001
- FRANCIOSA, J. A., PARK, M. e LEVINE, T. B. **Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure**. *The American Journal of Cardiology* 47(1): 33-39. 1981
- FULSTER, S., TACKE, M., SANDEK, A., EBNER, N., TSCHOPE, C., DOEHNER, W., ANKER, S. D. e VON HAEHLING, S. **Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF)**. *Eur Heart J* 34(7): 512-519. 2013
- GARAMI, A., ZWARTKRUIS, F. J., NOBUKUNI, T., JOAQUIN, M., ROCCIO, M., STOCKER, H., KOZMA, S. C., HAFEN, E., BOS, J. L. e THOMAS, G. **Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2**. *Mol Cell* 11(6): 1457-1466. 2003
- GATTI, R., DE PALO, E. F., ANTONELLI, G. e SPINELLA, P. **IGF-I/IGFBP system: metabolism outline and physical exercise**. *J Endocrinol Invest* 35(7): 699-707. 2012
- GIELEN, S., SANDRI, M., KOZAREZ, I., KRATZSCH, J., TEUPSER, D., THIERY, J., ERBS, S., MANGNER, N., LENK, K., HAMBRECHT, R., SCHULER, G. e ADAMS, V. **Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study**. *Circulation* 125(22): 2716-2727. 2012
- GLICKMAN, M. H. e CIECHANOVER, A. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction**. *Physiol Rev* 82(2): 373-428. 2002
- GODARD, M. P., WHITMAN, S. A., SONG, Y. H. e DELAFONTAINE, P. **Skeletal muscle molecular alterations precede whole-muscle dysfunction in NYHA Class II heart failure patients**. *Clin Interv Aging* 7: 489-497. 2012
- GOMES, M. D., LECKER, S. H., JAGOE, R. T., NAVON, A. e GOLDBERG, A. L. **Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440-14445. 2001
- GUAZZI, M., BRAMBILLA, R., PONTONE, G., AGOSTONI, P. e GUAZZI, M. D. **Effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus on pulmonary function and exercise tolerance in chronic congestive heart failure**. *Am J Cardiol* 89(2): 191-197. 2002

- HALTON, T. L. e HU, F. B. **The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: a critical review.** J Am Coll Nutr 23(5): 373-385. 2004
- HAMALAINEN, N. e PETTE, D. **The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit.** The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 41(5): 733-743. 1993
- HAMBRECHT, R., FIEHN, E., YU, J., NIEBAUER, J., WEIGL, C., HILBRICH, L., ADAMS, V., RIEDE, U. e SCHULER, G. **Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure.** J Am Coll Cardiol 29(5): 1067-1073. 1997
- HAMBRECHT, R., SCHULZE, P. C., GIELEN, S., LINKE, A., MOBIUS-WINKLER, S., ERBS, S., KRATZSCH, J., SCHUBERT, A., ADAMS, V. e SCHULER, G. **Effects of exercise training on insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of non-cachectic patients with chronic heart failure.** Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 12(4): 401-406. 2005
- HAMBRECHT, R., SCHULZE, P. C., GIELEN, S., LINKE, A., MOBIUS-WINKLER, S., YU, J., KRATZSCH, J. J., BALDAUF, G., BUSSE, M. W., SCHUBERT, A., ADAMS, V. e SCHULER, G. **Reduction of insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of noncachectic patients with chronic heart failure.** Journal of the American College of Cardiology 39(7): 1175-1181. 2002
- HANNIGAN, G. E., LEUNG-HAGESTEIJN, C., FITZ-GIBBON, L., COPPOLINO, M. G., RADEVA, G., FILMUS, J., BELL, J. C. e DEDHAR, S. **Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase.** Nature 379(6560): 91-96. 1996
- HARA, K., YONEZAWA, K., WENG, Q. P., KOZLOWSKI, M. T., BELHAM, C. e AVRUCH, J. **Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism.** J Biol Chem 273(23): 14484-14494. 1998
- HARDIE, D. G. **AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise.** Med Sci Sports Exerc 36(1): 28-34. 2004
- HARRINGTON, D., ANKER, S. D. e COATS, A. J. **Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function.** Eur Heart J 22(5): 392-399. 2001
- HARRINGTON, L. S., FINDLAY, G. M., GRAY, A., TOLKACHEVA, T., WIGFIELD, S., REBHOLZ, H., BARNETT, J., LESLIE, N. R., CHENG, S., SHEPHERD, P.

- R., GOUT, I., DOWNES, C. P. e LAMB, R. F. **The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins.** J Cell Biol 166(2): 213-223. 2004
- HAYKOWSKY, M. J., BRUBAKER, P. H., JOHN, J. M., STEWART, K. P., MORGAN, T. M. e KITZMAN, D. W. **Determinants of exercise intolerance in elderly heart failure patients with preserved ejection fraction.** J Am Coll Cardiol 58(3): 265-274. 2011
- HAYKOWSKY, M. J., BRUBAKER, P. H., MORGAN, T. M., KRITCHEVSKY, S., EGGEBEEN, J. e KITZMAN, D. W. **Impaired aerobic capacity and physical functional performance in older heart failure patients with preserved ejection fraction: role of lean body mass.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 68(8): 968-975. 2013
- HEIN, L., ALTMAN, J. D. e KOBILKA, B. K. **Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission.** Nature 402(6758): 181-184. 1999
- HEIN, L., LIMBIRD, L. E., EGLEN, R. M. e KOBILKA, B. K. **Gene substitution/knockout to delineate the role of alpha 2-adrenoceptor subtypes in mediating central effects of catecholamines and imidazolines.** Annals of the New York Academy of Sciences 881: 265-271. 1999
- HEITMAN, J., MOVVA, N. R., HIESTAND, P. C. e HALL, M. N. **FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*.** Proc Natl Acad Sci U S A 88(5): 1948-1952. 1991
- HESZELE, M. F. e PRICE, S. R. **Insulin-like growth factor I: the yin and yang of muscle atrophy.** Endocrinology 145(11): 4803-4805. 2004
- HO, K. K., PINSKY, J. L., KANNEL, W. B. e LEVY, D. **The epidemiology of heart failure: the Framingham Study.** J Am Coll Cardiol 22(4 Suppl A): 6A-13A. 1993
- HOWELL, J. J. e MANNING, B. D. **mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis.** Trends Endocrinol Metab 22(3): 94-102. 2011
- HU, X., FRIEDMAN, D., HILL, S., CAPRIOLI, R., NICHOLSON, W., POWERS, A. C., HUNTER, L. e LIMBIRD, L. E. **Proteomic exploration of pancreatic islets in mice null for the alpha2A adrenergic receptor.** J Mol Endocrinol 35(1): 73-88. 2005

- INOKI, K., LI, Y., XU, T. e GUAN, K. L. **Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling.** Genes Dev 17(15): 1829-1834. 2003
- INOKI, K., ZHU, T. e GUAN, K. L. **TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.** Cell 115(5): 577-590. 2003
- IZUMIYA, Y., HOPKINS, T., MORRIS, C., SATO, K., ZENG, L., VIERECK, J., HAMILTON, J. A., OUCHI, N., LEBRASSEUR, N. K. e WALSH, K. **Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice.** Cell Metab 7(2): 159-172. 2008
- JACINTO, E., LOEWITH, R., SCHMIDT, A., LIN, S., RUEGG, M. A., HALL, A. e HALL, M. N. **Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive.** Nat Cell Biol 6(11): 1122-1128. 2004
- JACKMAN, R. W. e KANDARIAN, S. C. **The molecular basis of skeletal muscle atrophy.** American Journal of Physiology Cell Physiology 287(4): C834-843. 2004
- JANSSEN, T. W., DALLMEIJER, A. J. e VAN DER WOUDE, L. H. **Physical capacity and race performance of handcyclers.** J Rehabil Res Dev 38(1): 33-40. 2001
- KANDARIAN, S. C. e JACKMAN, R. W. **Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy.** Muscle Nerve 33(2): 155-165. 2006
- KATO, H., FARIA, T. N., STANNARD, B., ROBERTS, C. T., JR. e LEROITH, D. **Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action.** Mol Endocrinol 8(1): 40-50. 1994
- KATZ, A. M. e KATZ, P. B. **Diseases of the heart in the works of Hippocrates.** Br Heart J 24: 257-264. 1962
- KIM, D. H., SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. e SABATINI, D. M. **mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.** Cell 110(2): 163-175. 2002
- KIMBALL, S. R. e JEFFERSON, L. S. **Role of amino acids in the translational control of protein synthesis in mammals.** Semin Cell Dev Biol 16(1): 21-27. 2005
- LAGIRAND-CANTALOUPE, J., OFFNER, N., CSIBI, A., LEBOVITCH, M. P., BATONNET-PICHON, S., TINTIGNAC, L. A., SEGURA, C. T. e LEBOVITCH, S. A. **The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy.** EMBO J 27(8): 1266-1276. 2008

- LAPLANTE, M. e SABATINI, D. M. **mTOR signaling in growth control and disease**. Cell 149(2): 274-293. 2012
- LAYMAN, D. K. **The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis**. J Nutr 133(1): 261S-267S. 2003
- LAYMAN, D. K., SHIUE, H., SATHER, C., ERICKSON, D. J. e BAUM, J. **Increased dietary protein modifies glucose and insulin homeostasis in adult women during weight loss**. J Nutr 133(2): 405-410. 2003
- LECKER, S. H., SOLOMON, V., PRICE, S. R., KWON, Y. T., MITCH, W. E. e GOLDBERG, A. L. **Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats**. J Clin Invest 104(10): 1411-1420. 1999
- LEROITH, D. e ROBERTS, C. T., JR. **Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine versus local action?** Mol Cell Endocrinol 77(1-3): C57-61. 1991
- LIBERA, L. D., ZENNARO, R., SANDRI, M., AMBROSIO, G. B. e VESCOVO, G. **Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure**. The American Journal of Physiology 277(5 Pt 1): C982-986. 1999
- LITWIN, S. E., KATZ, S. E., MORGAN, J. P. e DOUGLAS, P. S. **Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat**. Circulation 89(1): 345-354. 1994
- LIU, Q., THOREEN, C., WANG, J., SABATINI, D. e GRAY, N. S. **mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery**. Drug Discov Today Ther Strateg 6(2): 47-55. 2009
- LIU, Z., JAHN, L. A., LONG, W., FRYBURG, D. A., WEI, L. e BARRETT, E. J. **Branched chain amino acids activate messenger ribonucleic acid translation regulatory proteins in human skeletal muscle, and glucocorticoids blunt this action**. J Clin Endocrinol Metab 86(5): 2136-2143. 2001
- LONG, Y. C. e ZIERATH, J. R. **AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation**. J Clin Invest 116(7): 1776-1783. 2006
- LOPEZ-JARAMILLO, P. **Defining the research priorities to fight the burden of cardiovascular diseases in Latin America**. J Hypertens 26(9): 1886-1889. 2008
- LORNE, E., ZHAO, X., ZMIJEWSKI, J. W., LIU, G., PARK, Y. J., TSURUTA, Y. e ABRAHAM, E. **Participation of mammalian target of rapamycin complex 1 in Toll-like receptor 2- and 4-induced neutrophil activation and acute lung injury**. Am J Respir Cell Mol Biol 41(2): 237-245. 2009

- LUNDE, P. K., SJAASTAD, I., SCHIOTZ THORUD, H. M. e SEJERSTED, O. M. **Skeletal muscle disorders in heart failure.** *Acta Physiologica Scandinavica* 171(3): 277-294. 2001
- LYNCH, C. J., HUTSON, S. M., PATSON, B. J., VAVAL, A. e VARY, T. C. **Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(4): E824-835. 2002
- LYNCH, C. J., PATSON, B. J., ANTHONY, J., VAVAL, A., JEFFERSON, L. S. e VARY, T. C. **Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(3): E503-513. 2002
- MANCINI, D. M., WALTER, G., REICHEK, N., LENKINSKI, R., MCCULLY, K. K., MULLEN, J. L. e WILSON, J. R. **Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure.** *Circulation* 85(4): 1364-1373. 1992
- MARKUNS, J. F., WOJTASZEWSKI, J. F. e GOODYEAR, L. J. **Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle.** *J Biol Chem* 274(35): 24896-24900. 1999
- MATHENY, R. W., JR., NINDL, B. C. e ADAMO, M. L. **Minireview: Mechano-growth factor: a putative product of IGF-I gene expression involved in tissue repair and regeneration.** *Endocrinology* 151(3): 865-875. 2010
- MCMURRAY, J. J. e PFEFFER, M. A. **Heart failure.** *Lancet* 365(9474): 1877-1889. 2005
- MEDEIROS, A., ROLIM, N. P., OLIVEIRA, R. S., ROSA, K. T., MATTOS, K. C., CASARINI, D. E., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E. e BRUM, P. C. **Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice.** *J Appl Physiol* 104(1): 103-109. 2008
- MEDEIROS, A., VANZELLI, A. S., ROSA, K. T., IRIGOYEN, M. C. e BRUM, P. C. **Effect of exercise training and carvedilol treatment on cardiac function and structure in mice with sympathetic hyperactivity-induced heart failure.** *Braz J Med Biol Res* 41(9): 812-817. 2008
- MEJIAS, M., GARCIA-PRAS, E., GALLEGO, J., MENDEZ, R., BOSCH, J. e FERNANDEZ, M. **Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension.** *J Hepatol* 52(4): 529-539. 2010

- MITCH, W. E. e GOLDBERG, A. L. **Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway.** The New England Journal of Medicine 335(25): 1897-1905. 1996
- MOORE, F. D., OLESEN, K. H., MCMURRAY, J. D., PARKER, H. V., BALL, M. R. e BOYDEN, C. M. (1963). The Body Cell Mass and Its Supporting Environment. Philadelphia, Saunders.
- MORLEY, J. E., THOMAS, D. R. e WILSON, M. M. **Cachexia: pathophysiology and clinical relevance.** Am J Clin Nutr 83(4): 735-743. 2006
- MORLEY, J. E., THOMAS, D. R. e WILSON, M. M. **Cachexia: pathophysiology and clinical relevance.** The American Journal of Clinical Nutrition 83(4): 735-743. 2006
- MU, J., BROZINICK, J. T., JR., VALLADARES, O., BUCAN, M. e BIRNBAUM, M. J. **A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle.** Mol Cell 7(5): 1085-1094. 2001
- MUSARO, A., MCCULLAGH, K., PAUL, A., HOUGHTON, L., DOBROWOLNY, G., MOLINARO, M., BARTON, E. R., SWEENEY, H. L. e ROSENTHAL, N. **Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle.** Nat Genet 27(2): 195-200. 2001
- MUSTAFA, I. e LEVERVE, X. **Metabolic and nutritional disorders in cardiac cachexia.** Nutrition 17(9): 756-760. 2001
- NADER, G. A. **Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together.** Int J Biochem Cell Biol 37(10): 1985-1996. 2005
- NAIR, K. S., SCHWARTZ, R. G. e WELLE, S. **Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans.** Am J Physiol 263(5 Pt 1): E928-934. 1992
- NAIRIZI, A., SHE, P., VARY, T. C. e LYNCH, C. J. **Leucine supplementation of drinking water does not alter susceptibility to diet-induced obesity in mice.** J Nutr 139(4): 715-719. 2009
- NAVE, B. T., OUWENS, M., WITHERS, D. J., ALESSI, D. R. e SHEPHERD, P. R. **Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation.** Biochem J 344 Pt 2: 427-431. 1999
- NEGRAO, C. E., IRIGOYEN, M. C., MOREIRA, E. D., BRUM, P. C., FREIRE, P. M. e KRIEGER, E. M. **Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control,**

- and blood pressure responsiveness.** Am J Physiol 265(2 Pt 2): R365-370. 1993
- NEWSHOLME, P., BRENNAN, L., RUBI, B. e MAECHLER, P. **New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes.** Clin Sci (Lond) 108(3): 185-194. 2005
- OLIVEIRA, R. S., FERREIRA, J. C., GOMES, E. R., PAIXAO, N. A., ROLIM, N. P., MEDEIROS, A., GUATIMOSIM, S. e BRUM, P. C. **Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice.** J Physiol 587(Pt 15): 3899-3910. 2009
- OWAN, T. E., HODGE, D. O., HERGES, R. M., JACOBSEN, S. J., ROGER, V. L. e REDFIELD, M. M. **Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction.** N Engl J Med 355(3): 251-259. 2006
- PARKER, B., NOAKES, M., LUSCOMBE, N. e CLIFTON, P. **Effect of a high-protein, high-monounsaturated fat weight loss diet on glycemic control and lipid levels in type 2 diabetes.** Diabetes Care 25(3): 425-430. 2002
- PATTERSON, J. A., NAUGHTON, J., PIETRAS, R. J. e GUNNAR, R. M. **Treadmill exercise in assessment of the functional capacity of patients with cardiac disease.** Am J Cardiol 30(7): 757-762. 1972
- PEDERSEN, B. K. e FEBBRAIO, M. A. **Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ.** Nat Rev Endocrinol 8(8): 457-465. 2012
- PENG, J., FU, J., DENG, S. Z., WANG, R. G., LIU, L., SUN, D. M. e XIA, K. **[Changes in serum insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-binding protein-3, and their significance in children with left-to-right shunt congenital heart disease associated with heart failure].** Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi 15(4): 277-280. 2013
- PENG, X. D., XU, P. Z., CHEN, M. L., HAHN-WINDGASSEN, A., SKEEN, J., JACOBS, J., SUNDARARAJAN, D., CHEN, W. S., CRAWFORD, S. E., COLEMAN, K. G. e HAY, N. **Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2.** Genes Dev 17(11): 1352-1365. 2003
- PETERHOFF, M., SIEG, A., BREDE, M., CHAO, C. M., HEIN, L. e ULLRICH, S. **Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice.** Eur J Endocrinol 149(4): 343-350. 2003
- PHUNG, T. L., ZIV, K., DABYDEEN, D., EYIAH-MENSAH, G., RIVEROS, M., PERRUZZI, C., SUN, J., MONAHAN-EARLEY, R. A., SHIOJIMA, I., NAGY, J.

- A., LIN, M. I., WALSH, K., DVORAK, A. M., BRISCOE, D. M., NEEMAN, M., SESSA, W. C., DVORAK, H. F. e BENJAMIN, L. E. **Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin.** Cancer Cell 10(2): 159-170. 2006
- PIEPOLI, M. F. e COATS, A. J. **The 'skeletal muscle hypothesis in heart failure' revised.** Eur Heart J 34(7): 486-488. 2013
- PIEPOLI, M. F., CONRAADS, V., CORRA, U., DICKSTEIN, K., FRANCIS, D. P., JAARSMA, T., MCMURRAY, J., PIESKE, B., PIOTROWICZ, E., SCHMID, J. P., ANKER, S. D., SOLAL, A. C., FILIPPATOS, G. S., HOES, A. W., GIELEN, S., GIANNUZZI, P. e PONIKOWSKI, P. P. **Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation.** Eur J Heart Fail 13(4): 347-357. 2011
- PIEPOLI, M. F., DAVOS, C., FRANCIS, D. P. e COATS, A. J. **Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH).** BMJ 328(7433): 189. 2004
- PIEPOLI, M. F., SCOTT, A. C., CAPUCCI, A. e COATS, A. J. **Skeletal muscle training in chronic heart failure.** Acta Physiologica Scandinavica 171(3): 295-303. 2001
- PITTMAN, J. G. e COHEN, P. **The Pathogenesis of Cardiac Cachexia.** N Engl J Med 271: 453-460 CONCL. 1964
- PROUD, C. G. **Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery.** Biochem J 403(2): 217-234. 2007
- RADLEY, H. G., DE LUCA, A., LYNCH, G. S. e GROUNDS, M. D. **Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions.** Int J Biochem Cell Biol 39(3): 469-477. 2007
- RAJARAM, S., BAYLINK, D. J. e MOHAN, S. **Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions.** Endocr Rev 18(6): 801-831. 1997
- RAKATZI, I., STOSIK, M., GROMKE, T., SIDDLE, K. e ECKEL, J. **Differential phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 by insulin and IGF-I receptors.** Arch Physiol Biochem 112(1): 37-47. 2006
- RINDERKNECHT, E. e HUMBEL, R. E. **Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II.** Proc Natl Acad Sci U S A 73(7): 2365-2369. 1976

- ROCHA, D. M., FALOONA, G. R. e UNGER, R. H. **Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs**. J Clin Invest 51(9): 2346-2351. 1972
- ROGER, V. L., GO, A. S., LLOYD-JONES, D. M., BENJAMIN, E. J., BERRY, J. D., BORDEN, W. B., BRAVATA, D. M., DAI, S., FORD, E. S., FOX, C. S., FULLERTON, H. J., GILLESPIE, C., HAILPERN, S. M., HEIT, J. A., HOWARD, V. J., KISSELA, B. M., KITTNER, S. J., LACKLAND, D. T., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., MAKUC, D. M., MARCUS, G. M., MARELLI, A., MATCHAR, D. B., MOY, C. S., MOZAFFARIAN, D., MUSSOLINO, M. E., NICHOL, G., PAYNTER, N. P., SOLIMAN, E. Z., SORLIE, P. D., SOTOODEHNIA, N., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WONG, N. D., WOO, D., TURNER, M. B., AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS, C. e STROKE STATISTICS, S. **Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association**. Circulation 125(1): 188-197. 2012
- ROLIM, N. P., MEDEIROS, A., ROSA, K. T., MATTOS, K. C., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., KRIEGER, J. E., NEGRAO, C. E. e BRUM, P. C. **Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure**. Physiol Genomics 29(3): 246-252. 2007
- ROMMEL, C., BODINE, S. C., CLARKE, B. A., ROSSMAN, R., NUNEZ, L., STITT, T. N., YANCOPOULOS, G. D. e GLASS, D. J. **Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways**. Nat Cell Biol 3(11): 1009-1013. 2001
- ROUX, P. P. e BLENIS, J. **ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions**. Microbiol Mol Biol Rev 68(2): 320-344. 2004
- ROVEDA, F., MIDDLEKAUFF, H. R., RONDON, M. U., REIS, S. F., SOUZA, M., NASTARI, L., BARRETTO, A. C., KRIEGER, E. M. e NEGRAO, C. E. **The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial**. Journal of American College Cardiology 42(5): 854-860. 2003
- ROZENTRYT, P., VON HAEHLING, S., LAINSCAK, M., NOWAK, J. U., KALANTAR-ZADEH, K., POLONSKI, L. e ANKER, S. D. **The effects of a high-caloric protein-rich oral nutritional supplement in patients with chronic heart failure and cachexia on quality of life, body composition, and inflammation markers: a randomized, double-blind pilot study**. J Cachex Sarcopenia Muscle 1(1): 35-42. 2010
- RUBIM, V. S., DRUMOND NETO, C., ROMEO, J. L. e MONTERA, M. W. **[Prognostic value of the Six-Minute Walk Test in heart failure]**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 86(2): 120-125. 2006

- RUSSELL-JONES, D. L., BATES, A. T., UMPLEBY, A. M., HENNESSY, T. R., BOWES, S. B., HOPKINS, K. D., JACKSON, N., KELLY, J., SHOJAEE-MORADIE, F., JONES, R. H. e ET AL. **A comparison of the effects of IGF-I and insulin on glucose metabolism, fat metabolism and the cardiovascular system in normal human volunteers.** Eur J Clin Invest 25(6): 403-411. 1995
- SABATINI, D. M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., LUI, M., TEMPST, P. e SNYDER, S. H. **RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs.** Cell 78(1): 35-43. 1994
- SABERS, C. J., MARTIN, M. M., BRUNN, G. J., WILLIAMS, J. M., DUMONT, F. J., WIEDERRECHT, G. e ABRAHAM, R. T. **Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells.** J Biol Chem 270(2): 815-822. 1995
- SAHN, D. J., DEMARIA, A., KISSLO, J. e WEYMAN, A. **Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements.** Circulation 58(6): 1072-1083. 1978
- SAKAMOTO, K., ARNOLDS, D. E., FUJII, N., KRAMER, H. F., HIRSHMAN, M. F. e GOODYEAR, L. J. **Role of Akt2 in contraction-stimulated cell signaling and glucose uptake in skeletal muscle.** Am J Physiol Endocrinol Metab 291(5): E1031-1037. 2006
- SANCAK, Y., THOREEN, C. C., PETERSON, T. R., LINDQUIST, R. A., KANG, S. A., SPOONER, E., CARR, S. A. e SABATINI, D. M. **PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase.** Mol Cell 25(6): 903-915. 2007
- SANDRI, M., SANDRI, C., GILBERT, A., SKURK, C., CALABRIA, E., PICARD, A., WALSH, K., SCHIAFFINO, S., LECKER, S. H. e GOLDBERG, A. L. **Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** Cell 117(3): 399-412. 2004
- SARBASSOV, D. D., ALI, S. M., SENGUPTA, S., SHEEN, J. H., HSU, P. P., BAGLEY, A. F., MARKHARD, A. L. e SABATINI, D. M. **Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB.** Mol Cell 22(2): 159-168. 2006
- SAVONTAUS, E., FAGERHOLM, V., RAHKONEN, O. e SCHEININ, M. **Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in alpha2A-adrenoceptor knockout mice.** Eur J Pharmacol 578(2-3): 359-364. 2008

- SCHIAFFINO, S., DYAR, K. A., CICILIOT, S., BLAAUW, B. e SANDRI, M. **Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy.** FEBS J. 2013
- SCHULZE, P. C., FANG, J., KASSIK, K. A., GANNON, J., CUPESI, M., MACGILLIVRAY, C., LEE, R. T. e ROSENTHAL, N. **Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction.** Circ Res 97(5): 418-426. 2005
- SCHULZE, P. C., GIELEN, S., ADAMS, V., LINKE, A., MOBIUS-WINKLER, S., ERBS, S., KRATZSCH, J., HAMBRECHT, R. e SCHULER, G. **Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure.** Basic Res Cardiol 98(4): 267-274. 2003
- SCHULZE, P. C., GIELEN, S., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training.** International Journal of Cardiology 85(1): 141-149. 2002
- SCOTT, P. H. e LAWRENCE, J. C., JR. **Attenuation of mammalian target of rapamycin activity by increased cAMP in 3T3-L1 adipocytes.** J Biol Chem 273(51): 34496-34501. 1998
- SEHGAL, S. N. **Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action.** Transplant Proc 35(3 Suppl): 7S-14S. 2003
- SHIMOMURA, Y. e HARRIS, R. A. **Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1.** J Nutr 136(1 Suppl): 232S-233S. 2006
- SHIOI, T., MCMULLEN, J. R., KANG, P. M., DOUGLAS, P. S., OBATA, T., FRANKE, T. F., CANTLEY, L. C. e IZUMO, S. **Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice.** Mol Cell Biol 22(8): 2799-2809. 2002
- SIPULA, I. J., BROWN, N. F. e PERDOMO, G. **Rapamycin-mediated inhibition of mammalian target of rapamycin in skeletal muscle cells reduces glucose utilization and increases fatty acid oxidation.** Metabolism 55(12): 1637-1644. 2006
- SKOV, A. R., TOUBRO, S., RONN, B., HOLM, L. e ASTRUP, A. **Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity.** Int J Obes Relat Metab Disord 23(5): 528-536. 1999
- SMITH, E. M., FINN, S. G., TEE, A. R., BROWNE, G. J. e PROUD, C. G. **The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the**

- mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses.** J Biol Chem 280(19): 18717-18727. 2005
- STITT, T. N., DRUJAN, D., CLARKE, B. A., PANARO, F., TIMOFEYVA, Y., KLINE, W. O., GONZALEZ, M., YANCOPOULOS, G. D. e GLASS, D. J. **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** Mol Cell 14(3): 395-403. 2004
- SUGAWARA, T., ITO, Y., NISHIZAWA, N. e NAGASAWA, T. **Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet.** Amino Acids. 2008
- SUSKIN, N., MCKELVIE, R. S., BURNS, R. J., LATINI, R., PERICAK, D., PROBSTFIELD, J., ROULEAU, J. L., SIGOUIN, C., SOLYMOSS, C. B., TSUYUKI, R., WHITE, M. e YUSUF, S. **Glucose and insulin abnormalities relate to functional capacity in patients with congestive heart failure.** Eur Heart J 21(16): 1368-1375. 2000
- SWAMINATHAN, S., ARBISER, J. L., HIATT, K. M., HIGH, W., ABUL-EZZ, S., HORN, T. D. e SHAH, S. V. **Rapid improvement of nephrogenic systemic fibrosis with rapamycin therapy: possible role of phospho-70-ribosomal-S6 kinase.** J Am Acad Dermatol 62(2): 343-345. 2010
- TEE, A. R., ANJUM, R. e BLENIS, J. **Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin.** J Biol Chem 278(39): 37288-37296. 2003
- TEE, A. R., MANNING, B. D., ROUX, P. P., CANTLEY, L. C. e BLENIS, J. **Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb.** Curr Biol 13(15): 1259-1268. 2003
- TENENBAUM, A. e FISMAN, E. Z. **Impaired glucose metabolism in patients with heart failure: pathophysiology and possible treatment strategies.** Am J Cardiovasc Drugs 4(5): 269-280. 2004
- THEDIECK, K., POLAK, P., KIM, M. L., MOLLE, K. D., COHEN, A., JENO, P., ARRIEUMERLOU, C. e HALL, M. N. **PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis.** PLoS One 2(11): e1217. 2007
- TIDBALL, J. G. **Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation.** J Appl Physiol 98(5): 1900-1908. 2005

- TRINDER, P. **Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor.** J Clin Pathol 22(2): 246. 1969
- TURGEMAN, T., HAGAI, Y., HUEBNER, K., JASSAL, D. S., ANDERSON, J. E., GENIN, O., NAGLER, A., HALEVY, O. e PINES, M. **Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone.** Neuromuscul Disord 18(11): 857-868. 2008
- VANZELLI, A. S., MEDEIROS, A., ROLIM, N., BARTHOLOMEU, J. B., CUNHA, T. F., BECHARA, L. G., GOMES, E. R., MATTOS, K. C., SIRVENTE, R., SALEMI, V., MADY, C., NEGRAO, C. E., GUATIMOSIM, S. e BRUM, P. C. **Integrative effect of carvedilol and aerobic exercise training therapies on improving cardiac contractility and remodeling in heart failure mice.** PLoS One 8(5): e62452. 2013
- VANZELLI, A. S., MEDEIROS, A., SIRVENTE RDE, A., SALEMI, V. M., MADY, C. e BRUM, P. C. **Association of physical training with beta-blockers in heart failure in mice.** Arq Bras Cardiol 95(3): 373-380. 2010
- VERHOEVEN, S., VANSCHOONBEEK, K., VERDIJK, L. B., KOOPMAN, R., WODZIG, W. K., DENDALE, P. e VAN LOON, L. J. **Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men.** Am J Clin Nutr 89(5): 1468-1475. 2009
- VESCOVO, G. **Skeletal muscle response to exercise and treatment: another sibyl in the heart failure syndrome?** International Journal of Cardiology 83(1): 33-34. 2002
- VEZINA, C., KUDELSKI, A. e SEHGAL, S. N. **Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.** J Antibiot (Tokyo) 28(10): 721-726. 1975
- VYAS, D. R., SPANGENBURG, E. E., ABRAHA, T. W., CHILDS, T. E. e BOOTH, F. W. **GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy.** Am J Physiol Cell Physiol 283(2): C545-551. 2002
- WALLIS, M. **New insulin-like growth factor (IGF)-precursor sequences from mammalian genomes: the molecular evolution of IGFs and associated peptides in primates.** Growth Horm IGF Res 19(1): 12-23. 2009
- WANG, M., YIP, G. W., WANG, A. Y., ZHANG, Y., HO, P. Y., TSE, M. K., YU, C. M. e SANDERSON, J. E. **Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy.** Journal of Hypertension 23(1): 183-191. 2005
- WANG, X., PAULIN, F. E., CAMPBELL, L. E., GOMEZ, E., O'BRIEN, K., MORRICE, N. e PROUD, C. G. **Eukaryotic initiation factor 2B: identification of**

- multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo.** EMBO J 20(16): 4349-4359. 2001
- WANG, X. e PROUD, C. G. **The mTOR pathway in the control of protein synthesis.** Physiology (Bethesda) 21: 362-369. 2006
- WILSON, J. R., SMITH, J. S., DAHLE, K. L. e INGERSOLL, G. L. **Impact of home health care on health care costs and hospitalization frequency in patients with heart failure.** Am J Cardiol 83(4): 615-617, A610. 1999
- WINN, N., PAUL, A., MUSARO, A. e ROSENTHAL, N. **Insulin-like growth factor isoforms in skeletal muscle aging, regeneration, and disease.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol 67: 507-518. 2002
- WOJTASZEWSKI, J. F., HANSEN, B. F., GADE, KIENS, B., MARKUNS, J. F., GOODYEAR, L. J. e RICHTER, E. A. **Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle.** Diabetes 49(3): 325-331. 2000
- YANG, Q. e GUAN, K. L. **Expanding mTOR signaling.** Cell Res 17(8): 666-681. 2007
- ZHANG, Y., GUO, K., LEBLANC, R. E., LOH, D., SCHWARTZ, G. J. e YU, Y. H. **Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms.** Diabetes 56(6): 1647-1654. 2007
- ZONCU, R., EFEYAN, A. e SABATINI, D. M. **mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.** Nat Rev Mol Cell Biol 12(1): 21-35. 2011