

WILSON MAX ALMEIDA MONTEIRO DE MORAES

**Insuficiência Cardíaca por Excesso de Catecolaminas: Influência do
Treinamento Físico Aeróbico associado à Suplementação com Leucina na
Musculatura Esquelética**

SÃO PAULO

2011

WILSON MAX ALMEIDA MONTEIRO DE MORAES

**Insuficiência Cardíaca por Excesso de Catecolaminas: Influência do
Treinamento Físico Aeróbico associado à Suplementação com Leucina na
Musculatura Esquelética**

Dissertação apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Educação Física

Área de concentração: Biodinâmica do
Movimento Humano

Orientador: Professora Dra. Alessandra
Medeiros

SÃO PAULO

2011

DE MORAES, Wilson Max Almeida Monteiro

Insuficiência cardíaca por excesso de catecolaminas: influência do treinamento físico aeróbico associado à suplementação com leucina na musculatura esquelética

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física, na área de concentração Biodinâmica do Movimento Humano

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**Dedico esta dissertação a meu pai,
Maximiano Pereira de Moraes (*in
memorian*) pela sabedoria,
perspicácia e entusiasmo com que
enfrentara as adversidades da vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e dá forças durante mais essa etapa da minha vida.

A minha noiva Pamella Ramona minha sempre incentivadora, pelo carinho e companheirismo! Por estar na minha vida! Com você tudo fica muito mais fácil e agradável!

A minha orientadora Professora Dra. Alessandra Medeiros, pela oportunidade facultada e por sua enorme paciência, indicando e orientando da melhor maneira possível. Por acreditar em mim. Sempre serei grato!

A minha mãe, Marilene Moraes, que me apoiou em mais essa etapa, não medindo esforços para oportunizar a melhor educação possível e meu irmão Armando Moraes pelo incentivo sempre presente.

A Professora Dra. Patrícia Brum, por nos receber tão bem em seu Laboratório, pelas sugestões sempre valiosas, pela amizade e ética acima de tudo.

A amiga e incentivadora Professora Dra. Márcia Koike pelas palavras sempre sábias.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício Fabiana Guimarães, Stéphano Melo, Luis Bechara, Aline Bacurau, Vanessa Voltarelli, Nathalie, Luis Bozi, Daniele Gabriel, Andrea Vanzelli, Telma Cunha, Paulo Jannig, Marco Amadeu, José Bianco, Fátima, Kátia Sampaio, Juliane, Tiago Fernandes, Ellena, Carmão, Luis Gustavo, Alex, Katt, Marcelle, Ney, Luciano, Úrsula e Éverton pelas sugestões, horas de convívio, amizade e companhia nas filas quilométricas do bandejão!

Ao Prof. Dr. Marcelo Rogero, pelas suas sugestões e disponibilidade em ajudar e contribuir.

Ao amigo Ariclécio pelo auxílio nas dosagens de TNF- α .

Ao Kleiton pela “mão” nos experimentos de função renal.

A todos os professores do Curso de Mestrado da EEFÉ, pela contribuição na minha formação das mais diferentes maneiras, em especial, aos docentes Edilamar Menezes, Paulo Ramires e Maria Cláudia Irigoyen.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos amigos Márcio, Paulo e Ilza pela atenção solícita e dúvidas esclarecidas quanto às questões “burocráticas” da Pós- Graduação.

A empresa Ajinomoto do Brasil pelo fornecimento de l-leucina.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	ix
	LISTA DE TABELAS	xiv
	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
	RESUMO	xviii
	ABSTRACT	xix
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Insuficiência Cardíaca e Hiperatividade simpática.....	3
2.2	Modelo Genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.....	4
2.3	Músculo Esquelético na Insuficiência Cardíaca.....	5
2.4	A via da mTOR e o músculo esquelético.....	7
2.5	Regulação da via mTOR.....	8
2.6	Treinamento Físico e Insuficiência Cardíaca.....	10
2.7	Treinamento Físico e Atrofia Muscular.....	11
2.8	Leucina e Músculo Esquelético.....	12
2.9	Regulação do metabolismo dos BCAAs pelo exercício físico.....	14
2.10	Efeitos adversos da suplementação com leucina.....	16
2.11	Leucina e Síntese Protéica.....	17
3	JUSTIFICATIVA.....	19
4	OBJETIVOS.....	20
4.1	Geral.....	20
4.2	Específico.....	20
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1	Amostra.....	22
5.2	Grupos Experimentais.....	22
5.3	Treinamento Físico (estímulo mecânico).....	22
5.4	Suplementação com Leucina.....	23
5.5	Tolerância à Realização de Exercício Físico.....	24
5.6	Função Muscular.....	24
5.7	Registro Indireto da Frequência Cardíaca.....	25
5.8	Avaliação da Função Ventricular através de Ecocardiograma.....	26
5.9	Concentrações plasmáticas de TNF-α e Insulina.....	27

5.10	Glicemia e Teste de tolerância à glicose.....	27
5.11	Massa Corporal e dos Órgãos e Quantificação da Área de Secção Transversa do Músculo Sóleo e Plantar.....	27
5.12	Quantificação do Número de Capilares por Fibra.....	28
5.13	Análise das proteínas envolvidas na via mTOR do Músculo Sóleo e plantar por western blot.....	28
5.14	Parâmetros renais.....	30
5.15	Análise dos Resultados.....	30
6	RESULTADOS.....	31
6.1	Caracterização do modelo e sinais clínicos de IC desencadeada por hiperatividade simpática.....	31
6.1.1	Função e estrutura cardíaca em camundongos com IC.....	31
6.1.2	Frequência cardíaca de repouso.....	33
6.1.3	Parâmetros plasmáticos.....	34
6.2	Consumo alimentar em gaiola metabólica e massa corporal e adiposa.....	38
6.3	Parâmetros funcionais e morfológicos da musculatura esquelética.....	43
6.3.1	Testes funcionais.....	43
6.3.2	Estrutura morfofuncional da musculatura esquelética em camundongos com IC.....	47
6.4	Expressão de proteínas envolvidas na via mTOR.....	55
6.5	Parâmetros renais.....	58
6.6	Análise de sobrevida.....	60
6.7	Sumário dos resultados.....	62
7	DISCUSSÃO.....	63
8	Considerações finais.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema generalizado da via de síntese protéica AKT/mTOR envolvida na regulação da massa muscular.....	10
Figura 2	Sobrevida de camundongos com cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.....	21
Figura 3	Esquema ilustrativo do protocolo de exercício físico escalonado progressivo até a exaustão para camundongos.....	24
Figura 4	Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento por gavagem e tempo de jejum para eutanásia.....	29
Figura 5	Fração de encurtamento em camundongos dos grupos controle (WT, n=5), KO placebo (KO, n=5), KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=5). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA com post hoc de <i>Student Newman-Keuls</i> . \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$).....	32
Figura 6	Razão massa úmida/massa seca do pulmão e fígado nos grupos: controle(WT), KO placebo (KO), KO suplementado com leucina (KOL), KO treinado (KOT) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT). Painel A: razão massa úmido/massa seca do pulmão (n=9/ grupo). Painel B: razão massa úmido/massa seca do fígado (n=8/ grupo). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; \neq diferença versus WT; versus # KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com post hoc de <i>Student Newman-Keuls</i>	33
Figura 7	Frequência cardíaca de repouso, ao longo das semanas de intervenção, em camundongos dos grupos controle (WT, n=7), KO placebo (KO, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). * versus pré; \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL no mesmo período ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA p/ medidas repetidas com post hoc de <i>Student Newman-Keuls</i>	34
Figura 8	Teste de tolerância à glicose em camundongos dos grupos controle (WT, n=8), KO placebo (KO, n=8), KO treinado (KOT, n=8), KO suplementado com leucina (KOL, n=8) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=8), aos sete meses de idade. Painel A: Níveis plasmáticos de glicose ao longo do tempo. Painel B: Área sob a curva. ($p > 0,05$). Painel C: Níveis de glicose sanguínea. Painel D: Níveis plasmáticos de insulina. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com <i>post-hoc</i> de <i>Student-Newman-Keuls</i>	36
Figura 9	Níveis plasmáticos de TNF- α em camundongos dos grupos controle (WT, n=6), KO recebendo solução placebo (KO, n=6), KO treinado (KOT, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=6) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6), aos sete meses de idade. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$).	

	ANOVA com <i>post-hoc</i> de <i>Student-Newman-Keuls</i>	37
Figura 10	Eficiência alimentar nos diferentes grupos: controle (WT, n=6), KO placebo (KO, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=6), KO treinado (KOT, n=6) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; \neq versus WT; $\#$ versus KO; $\&$ versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com <i>post-hoc</i> de <i>Student-Newman-Keuls</i>	40
Figura 11	Evolução da massa corporal durante o período experimental dos grupos controle (WT, n=18), KO placebo (KO, n=8), KO suplementado com leucina (KOL, n=11), KO treinado (KOT, n=12) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=14). α diferença <i>versus</i> todos no mesmo período ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA para medidas repetidas com <i>post hoc</i> de <i>Student Newman-Keuls</i> ..	41
Figura 12	Índice de Lee dos grupos controle (WT, n=13), KO placebo (KO, n=13), KO suplementado com leucina (KOL, n=13), KO treinado (KOT, n=12) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=11). \neq diferença <i>versus</i> WT ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA para medidas repetidas com <i>post hoc</i> de <i>Student Newman-Keuls</i>	42
Figura 13	Massa do tecido adiposo corrigida pelo comprimento da tíbia. Painel A: Massa do tecido adiposo retroperitoneal corrigida pelo comprimento da tíbia em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=9); KO placebo (KO, n=9); KO suplementado com leucina (KOL, n=9), KO treinado (KOT, n=9); KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=9). Painel B: Massa do tecido adiposo periepididimal corrigida pelo comprimento da tíbia em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=9); KO placebo (KO, n=9); KO suplementado com leucina (KOL, n=9), KO treinado (KOT, n=8) KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=8). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT ($p < 0,05$). ANOVA com <i>post-hoc</i> de <i>Student-Newman-Keuls</i>	43
Figura 14	Teste de tolerância ao esforço físico nos camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=12), KO recebendo solução placebo (KO, n=12), KO suplementado com leucina (KOL, n=11), KO treinado (KOT, n=11) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=13). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; \neq WT no mesmo período; $\#$ <i>versus</i> KO no mesmo período; $\&$ <i>versus</i> KOL no mesmo período; \ddagger <i>versus</i> KOT no mesmo período; * pré <i>versus</i> pós ($p < 0,05$). ANOVA p/ medidas repetidas com <i>post hoc</i> de <i>Student Newman-Keuls</i>	44
Figura 15	Testes de função muscular em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=9); KO placebo (KO, n=8); KO suplementado com leucina (KOL, n=8), KO treinado (KOT, n=8) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=9). Painel A: Teste de Rotarod; Painel B: Teste de deambulação; Painel C: Teste de grip. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT no mesmo período; $\#$ <i>versus</i> KO no	

- mesmo período; & versus KOL no mesmo período; ‡ versus KOT no mesmo período; * pré versus pós ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*..... 46
- Figura 16** Distribuição percentual dos diferentes tipos de fibras musculares em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). **Painel A:** Distribuição das fibras musculares no músculo sóleo. **Painel B:** Distribuição das fibras musculares no músculo plantar. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*..... 48
- Figura 17** Área de secção transversa (AST) nos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo. **Painel A:** AST de fibras tipo I; **Painel B:** AST de fibras tipo IIA; **Painel C:** AST de fibras tipo IIX em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*..... 50
- Figura 18** Área de secção transversa (AST) nos diferentes tipos de fibras no músculo plantar. **Painel A:** AST de fibras tipo IIA; **Painel B:** AST de fibras tipo IIB; **Painel C:** AST de fibras tipo IIX em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL; ‡ versus KOT. ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*. 52
- Figura 19** Razão capilar/fibra no músculo sóleo em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*..... 53
- Figura 20** Exemplos de área de secção transversa em camundongos, utilizando reação histoquímica para miosina ATPase..... 54
- Figura 21** Imagens representativas dos imunoblots de p70S6K, p-p70S6K, 4EBP1, p-4EBP1, AMPK, p-AMPK, e GAPDH nos músculos sóleo e plantar de camundongos controle (WT, n=5), grupo que recebeu uma única dose de leucina (KO, n=5), grupo treinamento que recebeu uma única dose de leucina (KOT, n=5), aos sete meses de idade..... 56
- Figura 22** Expressão de proteínas no músculo sóleo (painéis A, B, C) e plantar (painéis D, E, F) em camundongos controle (MCKENZIE ET AL.) e com ablação dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos. Painel A: Relação p-4EBP1:4EBP1 em sóleo; Painel B: Relação p-p70S6K: p70S6K. em sóleo. Painel C: Relação p-AMPK: AMPK em sóleo p-

4EBP1:4EBP1 em plantar; Painel E: Relação p-p70S6K:p70S6K em plantar. Painel F: Relação p-AMPK: AMPK em plantar. Dados são demonstrados como percentual (%) dos valores encontrados no grupo WT. Todos os grupos receberam uma dose de leucina. Grupo controle (MCKENZIE ET AL.), com ablação dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) e KO treinado (Kotler) aos sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$). \neq versus WT; $\#$ versus KO..... 57

Figura 23 Curva de sobrevivência de camundongos controle (WT, n=23) e com ablação dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos. Grupo que recebeu solução placebo (KO, n=25), suplementado com leucina (KOL, n=24), solução placebo e treinamento (KOT, n=23), e suplementado com leucina e treinamento (KOLT, n=24) aos sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pelo Teste de Log-Hank ($p = 0,08$)..... 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Massa das câmaras cardíacas e massa cardíaca total corrigida pelo comprimento da tíbia dos grupos Wild-type (MCKENZIE ET AL.), KO placebo (KO), KO suplementado com leucina (GUDER ET AL.), KO treinado (Kotler) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT). Os resultados estão apresentados como média±desvio padrão ou apresentados em mediana [intervalo interquartis]; ($p>0,05$). ANOVA ou ANOVA por postos de Kruskal-Wallis..... 31
- Tabela 2-** Consumo de ração diário em diferentes tempos em quantidades absolutas e relativas a massa corporal do animal dos grupos controle (WT, n=6), KO placebo (KO, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=6), KO treinado (KOT, n=6) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Não há diferença entre os grupos (ANOVA, $p>0,05$). Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão da média..... 39
- Tabela 3** Marcadores de função renal no grupo wild type (WT), KO que recebeu solução placebo (KO), KO suplementado com leucina (KOL), KO que recebeu solução placebo e treinamento (KOT) e KO suplementado com leucina e treinamento (KOLT) aos sete meses de idade. Os resultados estão apresentados como média±desvio padrão ou apresentados em mediana [intervalo interquartis]. Análise de variância (ANOVA) com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls* ou ANOVA por postos de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn ($p\leq 0,05$). ≠ Representa diferença significativa *versus* WT; # *versus* KO; & *versus* KOL; ‡ *versus* KOT. Os números entre parênteses expressam o n para cada grupo..... 59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α_{2A}/α_{2C} ARKO	Knockout para receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos
4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
80S	Subunidade Ribossomal 80
ADP	Adenosina Difosfato
AKT	Protein Kinase B – Proteína Cinase B
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Area de Secção Transversa
ATP	Adenosina Trifosfato
BCKAs	α -Cetoácido de Cadeia Ramificada
BCKDH	Complexo Desidrogenase de Cetoácidos de Cadeia Ramificada
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DDVE	Diametro Diastólicos do Ventrículo Esquerdo
DSVE	Diametro Sistólico do Ventrículo Esquerdo
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilenodiaminoacético
eEF2	Elongation factor 2 – Fator de alongamento 2
eEF2K	eukaryotic elongation factor-2 kinase – Cinase do fator de alongamento eucariótico 2
eIF2	Eukaryotic Initiation Factor 2 - fator de iniciação eucariótico 2
eIF3F	Eukariotic Translation Initiation Factor 3 Subunit F
eIF4A	Eukariotic Translation Initiation Factor 4 Subunit A
eIF4B	Eukariotic Translation Initiation Factor 4 Subunit B
eIF4E	Eukariotic Translation Initiation Factor 4 Subunit E
eIF4F	Eukariotic Translation Initiation Factor 4 Subunit F
eIF4G	Eukariotic Translation Initiation Factor 4 Subunit G
eIF	Eukariotic Translation Initiation
eNO ^{-/-}	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
FOXO	Forkhead Box

FS	Fração de encurtamento
GAPDH	Glicerolaldeído-Fosfato-Desidrogenase
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
GTP	Guanosine Triphosphate – Guanosina Trifosfato
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-Coenzima A
HMB β	β -hidroximetilbutirato
HPLC	High Performance Pressure Liquid Chromatography
hVps34	human vacuolar protein sorting
IC	Insuficiência Cardíaca
IGF1	Insulin-like growth factor
IMC	Índice de massa corporal
IRS1	Insulin receptor substrate 1
Kcal	Kilocalorias
Kg	Kilograma
KIC	α -cetoisocaproato
KO	Knockout
KOL	Knockout Suplementado com Leucina
KOLT	Knockout Suplementado com Leucina Treinado
KOT	Knockout Treinado
MAPK-4	Mitogen-Activated Protein Kinase
mM	milimolar
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
mTOR	mammalian target of rapamycin
MURF	muscle ring finger
NaCl	Cloreto de Sódio
NaF	Fluoreto de sódio
p70 ^{S6K}	p70 ribosomal protein S6 kinase 1
PDK	Cinase Dependente de Fosfoinosítídeos
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Fosfatidil Inositol-3-Kinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato

PP2Cm	Fosfatase 2C mitocondrial
Rheb	Ras homologue enriched in brain
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBS	Tris Buffered Saline
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
WT	Wild Type

RESUMO

DE MORAES, W. M. A. **Insuficiência cardíaca por excesso de catecolaminas: influência do treinamento físico aeróbico e da suplementação com leucina na musculatura esquelética.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Alterações na musculatura esquelética (ME) como atrofia contribuem para intolerância aos esforços físicos e pior prognóstico na Insuficiência Cardíaca (IC). O treinamento físico é uma conduta capaz de atenuar esses efeitos na ME. Estratégias capazes de otimizar os efeitos do TF como a suplementação com aminoácidos são potencialmente terapêuticas. Assim, investigamos os efeitos da suplementação com leucina associada ou não ao treinamento físico aeróbico na função e morfologia da musculatura esquelética em camundongos com IC induzida por hiperatividade simpática. O TF consistiu de 4 semanas em esteira, com sessões de 60 min baseados na máxima fase estável de lactato (6 dias/sem) e administração de leucina (1.35g/kg) ou placebo (água destilada) via intra-gástrica. Os animais foram divididos em 5 grupos: controle sem IC (WT) e 4 grupos de camundongos knockout para receptores $\alpha 2a$ e $\alpha 2c$ adrenérgicos, divididos em sedentários recebendo placebo (KO) ou leucina (KOL); treinado+placebo (KOT) ou treinado+leucina (KOLT). Foram analisados tolerância ao esforço (teste máximo em esteira rolante), área de secção transversa (AST) por histoquímica para miosina ATPase, desempenho motor por teste de deambulação, grip e rotarod, expressão protéica por western blot. A suplementação com leucina isoladamente não demonstrou qualquer efeito na função muscular nem fenótipo das fibras. O TF melhorou a intolerância ao exercício, aumentou a área de secção transversa (AST) em fibras tipo I no músculo soleo e tipo IIA, IIB no músculo plantar, além de melhorar o desempenho motor. A suplementação com leucina associada ao TF otimizou a tolerância aos esforços, a AST nas fibras IIA e IIB e a função muscular. Em experimento à parte, após jejum de 18 horas, observamos que a resposta à leucina em estimular a via da mTOR estava atenuada nos animais KO, mas o TF restaurou essa resposta (diminuiu a razão p-AMPK:AMPK, e aumentou p-4EBP1: 4EBP1 e p-p70s6K:p70s6K). Essa reversão da resistência anabólica à leucina pelo TF não estava associada aos efeitos relacionados à homeostase de glicose, nem função renal, embora o TF tenha melhorado (reduziu proteinúria). Não houve efeitos deletérios da leucina nos parâmetros relacionados à homeostase de glicose, nem aos parâmetros renais. Os resultados sugerem que a suplementação com leucina potencializa os efeitos do treinamento físico aeróbico por melhorar a tolerância ao exercício, preservar a massa em fibras de características predominantemente glicolíticas e prevenir queda no desempenho motor. O TF previniu a resistência anabólica à leucina no músculo esquelético dos animais com IC.

Palavras-chave: Insuficiência Cardíaca, Exercício Físico, Leucina, Músculo Esquelético

ABSTRACT

DE MORAES, W. M. A. **Sympathetic hyperactivity-induced heart failure: Effects of endurance training and leucine supplementation in skeletal muscle.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Changes in skeletal muscle such as atrophy contribute to intolerance to physical exertion and worse prognosis in heart failure (HF). The exercise training (ET) will mitigate these effects in ME. Strategies to optimize and/ or mimic the effects of ET as the amino acid supplements are potentially therapeutic. Thus, we investigated the effects of leucine supplementation associated with ET on function and morphology of skeletal muscle in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice, and whether these effects were associated with activation of mTOR pathway. Treatment consisted of 4-wk of ET on a motor treadmill, which consisted in sessions of 60 min based on maximum lactate steady state (6d/wk), and administration of leucine (1.35g/kg) or placebo (distilled water) intragastrically. We established five groups: a control without heart failure (WT) and four groups of mice lacking both $\alpha 2A$ and $\alpha 2C$ adrenergic receptor subtypes, which were randomly divided into sedentary receiving placebo (KO) or Leucine (KOLT); trained receiving placebo (KOT) or trained receiving leucine (KOLT). It was analyzed exercise capacity by graded treadmill exercise protocol performed until exhaustion, cross-sectional area (CSA) by histochemical myosin ATPase, motor performance by ambulation, grip e rotarod tests, protein expression levels by western blot. The leucine supplementation alone showed no effect on muscle function or the phenotype of the fibers, but associated to ET improved CSA in IIA and IIB fibers in plantaris muscle, and motor performance, at a rate greater than improve in KOT. In separate experiments, after 18 hours fasting, we observed that the response to leucine stimulate mTOR pathway was attenuated in KO, but the ET restored this response (decreased the ratio p-AMPK, AMPK, and increased p-4EBP1 : p-p70S6K and 4EBP1, p70S6K). This reversal of anabolic resistance to leucine by ET was not associated with the effects related to glucose homeostasis or renal function, although the ET has improved (reduced proteinuria). There were no deleterious effects of leucine on the parameters related to glucose homeostasis or renal parameters. The results suggest that leucine supplementation enhances the effects of exercise training to improve exercise tolerance, preserve mass of fibers with characteristics predominantly glycolytic and prevent worsening of motor performance. The ET prevents an anabolic resistance to leucine in muscle of HF animals.

Keywords: Heart Failure, Exercise, Leucine, Skeletal Muscle

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) crônica é uma síndrome clínica complexa, de alta prevalência e mau prognóstico, caracterizada por fadiga precoce, dispnéia, grande limitação aos esforços físicos proveniente de alterações hemodinâmicas e metabólicas progressivas (LUNDE ET AL., 2001) com repercussões consideráveis na autonomia e qualidade de vida (WILSON ET AL., 1999).

Apesar das alterações no tecido cardíaco serem causais e principais na IC, são insuficientes para explicar a intolerância aos esforços físicos, uma vez que a melhora da função cardíaca não se correlaciona ou apresenta apenas baixa correlação com a capacidade funcional no paciente com IC (JONDEAU ET AL., 1992; HARRINGTON ET AL., 1997). Por outro lado, fatores periféricos, como alterações intrínsecas na musculatura esquelética, exercem um papel fundamental sobre indicadores dessa sintomatologia (COATS ET AL., 1994).

Essas alterações resultam, com frequência, em um quadro de miopatia esquelética, o qual é bem descrito na literatura, tanto em humanos como em modelos animais, compreendendo um aumento da prevalência das fibras glicolíticas, redução da função muscular, densidade capilar e capacidade oxidativa, somando-se ainda a uma atrofia muscular (LUNDE ET AL., 2001). Esta última, em estágio avançado, pode culminar em caquexia, um preditor independente de sobrevida em pacientes com IC congestiva (ANKER ET AL., 1997). Dessa forma, o controle da massa muscular passa a ter uma importância fundamental, e deve ser considerada como parte das estratégias terapêuticas visando à manutenção da qualidade de vida na IC.

O treinamento físico aeróbico tem sido considerado uma conduta importante no tratamento da IC, por promover melhoras na tolerância aos esforços e na qualidade de vida dos pacientes (BELARDINELLI ET AL., 1999; WILLENHEIMER ET AL., 2001). Em nosso laboratório, utilizando camundongos com ablação dos genes para os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} ARKO), o que acarreta cardiomiopatia grave aos sete meses de idade induzida por hiperatividade simpática (BRUM ET AL., 2002), demonstramos que o treinamento físico aeróbico é capaz de prevenir a atrofia muscular e intolerância aos esforços físicos (BACURAU ET AL., 2009; BUENO ET AL., 2010).

Por outro lado, uma estratégia que se conhece menos e emerge na literatura é a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) valina, leucina e isoleucina. Destes, a leucina destaca-se pela capacidade ímpar de regulação de processos anabólicos, envolvendo tanto a síntese quanto a degradação protéica muscular (ANTHONY ET AL., 2001; STIPANUK, 2007; AVRUCH ET AL., 2009). Apesar de não haver estudos com leucina, isoladamente, em humanos, nem mesmo em animais com IC e considerando que parte dos efeitos benéficos de dietas hiperprotéicas é atribuída ao aminoácido leucina (KATSANOS ET AL., 2006; NORTON ET AL., 2009), pode-se inferir que a suplementação deste aminoácido é uma estratégia promissora, visto que dois estudos recentes com pacientes cardíacos idosos que receberam suplementos à base de aminoácidos essenciais com altas concentrações de leucina (SCOGNAMIGLIO ET AL., 2008) e pacientes com caquexia cardíaca, que receberam aminoácidos associados a uma dieta hipercalórica (ROZENTRYT ET AL., 2010), durante 12 semanas, melhoraram o desempenho em testes de tolerância aos esforços físicos, a percepção de esforço, escores de questionário de qualidade de vida sem efeitos adversos em relação aos grupos que receberam apenas placebo.

Dessa forma, propomos a utilização de camundongos com ablação dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} ARKO), como modelo experimental bem estabelecido de IC (BRUM ET AL., 2002), para estudar a resposta da suplementação com leucina associada ou não ao treinamento físico aeróbico nas alterações musculares esqueléticas.

Levantamos as hipóteses de que a suplementação com leucina atenuará a atrofia muscular nesses animais, além de otimizar os efeitos do treinamento físico aeróbico na musculatura esquelética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Insuficiência Cardíaca e Hiperatividade Simpática

Descrita primariamente como um distúrbio meramente hemodinâmico, restringindo-se apenas a “uma doença do coração”, conhecimentos gerados principalmente na década de 90 sustentaram a visão atual da natureza

neurohormonal da IC, notadamente a hiperativação nervosa simpática e do sistema renina-angiotensina (MANN; BRISTOW, 2005).

Essas alterações neurohormonais, apesar de benéficas inicialmente, pois ocorrem como mecanismo compensatório no intuito de manter o débito cardíaco e a pressão de perfusão tecidual adequada em estágios iniciais da disfunção ventricular, quando cronicamente estimulados, estes mecanismos levam à deterioração progressiva na função contrátil causando perda de cardiomiócitos e aumento na fração de volume de colágeno (ALTMAN ET AL., 1999; LOHSE; ENGELHARDT; ESCHENHAGEN, 2003; BRUM ET AL., 2006).

A exacerbada atividade do sistema nervoso simpático tem repercussão clínica considerável, pois tem uma relação direta com a gravidade da doença (ESLER; KAYE, 2000; NEGRAO ET AL., 2001) e com seu prognóstico, quer medida pelos níveis de noradrenalina plasmática (COHN ET AL., 1984), ou diretamente pela frequência de disparos no nervo tibial anterior (BARRETTO ET AL., 2009).

Bem menos conhecidos são os efeitos da atividade nervosa simpática na musculatura esquelética, que são exercidas em quase sua totalidade pelos receptores adrenérgicos β_2 (LYNCH; RYALL, 2008). Tal como ocorre no tecido cardíaco, há uma dicotomia envolvendo a exposição por curto período de tempo e a exposição prolongada (YANG; MCELLIGOTT, 1989; BACURAU ET AL., 2009). Isso ocorre por uma redução da densidade dos receptores adrenérgicos pela exposição crônica ao agonista. Em curto prazo, enquanto se observa hipertrofia muscular (YIMLAMAI ET AL., 2005) ou atenuação da atrofia (BEITZEL ET AL., 2004), a exposição por um longo período, como observada com tratamento por tempo prolongado com clenbuterol (um agonista β_2 adrenérgico), a densidade dos receptores β_2 adrenérgicos no músculo esquelético é reduzida em 50% (ROTHWELL; STOCK; SUDERA, 1987).

Em nosso laboratório, utilizando camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, demonstramos os efeitos crônicos da hiperativação simpática na presença de cardiomiopatia. Os animais apresentaram diferentes níveis de noradrenalina musculares aos três e aos sete meses de idade (BACURAU ET AL., 2009). De maneira interessante, aos três meses de idade, fase em que ainda não são observados sinais de cardiomiopatia, os animais estavam com níveis de noradrenalina musculares preservados e apresentaram uma maior área de secção transversa no músculo plantar que camundongos selvagens. Em

contrapartida, aos sete meses de idade, fase em que a cardiomiopatia está em estágio avançado, havia atrofia muscular associada ao aumento do estresse oxidativo e intolerância ao esforço físico, associados aos elevados níveis de noradrenalina musculares, o que sugerem uma ação tóxica direta da noradrenalina nas fibras musculares esqueléticas. De fato, além de aumentar a vasoconstrição, afetando o metabolismo energético, reduzindo a disponibilidade de oxigênio e impactando negativamente no desempenho durante os esforços físicos (LANG ET AL., 1997), as catecolaminas podem induzir efeitos tóxicos através de sua auto-oxidação, com formação de espécies reativas de oxigênio e de outros intermediários reativos (BINDOLI; RIGOBELLO; DEEBLE, 1992).

2.2 Modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática

Os receptores α -adrenérgicos estão localizados na membrana celular e pertencem à família de receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (XIANG; KOBILKA, 2003) e compreendem os subtipos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , e α_{2C} (LYNCH; RYALL, 2008).

O modelo experimental α_{2A}/α_{2C} ARKO consiste na ablação dos receptores α_2 -adrenérgicos, subtipos A e C. No bulbo rostro-ventro-lateral, os receptores α_{2A} são pós-sinápticos e atuam desencadeando bradicardia e hipotensão (ALTMAN ET AL., 1999). Já em neurônios simpáticos periféricos, os receptores localizam-se no terminal pré-sináptico regulando a liberação de noradrenalina juntamente com o subtipo C e são denominados “auto-receptores”, pois quando ativados, inibem a liberação de noradrenalina pelo terminal nervoso simpático (HEIN; ALTMAN; KOBILKA, 1999). Dessa forma, a ablação desses receptores provoca uma falha no processo inibitório da liberação de noradrenalina, induzindo um quadro de hiperatividade simpática (ALTMAN ET AL., 1999).

O curso temporal em que a cardiopatia se apresenta nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO é um grande atrativo em relação a outros modelos experimentais, uma vez que a função cardíaca está alterada por elevação prolongada da atividade do sistema nervoso simpático e não por modificações

genéticas que alteram diretamente a expressão de proteínas estruturais ou funcionais do coração o que permite estudá-la em diferentes níveis de gravidade (BRUM ET AL., 2002).

Aos quatro meses de idade, à microscopia eletrônica, camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentam alterações ultra-estruturais nos cardiomiócitos, caracterizadas pelo desarranjo miofibrilar, vacuolização do tecido cardíaco e degeneração mitocondrial (BRUM ET AL., 2002). Aos sete meses de idade, com 50% de mortalidade, apresentam diminuição da fração de encurtamento e remodelamento cardíaco, com aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e da fração de colágeno cardíaco (ROLIM ET AL., 2007), acompanhado por edema pulmonar (FERREIRA ET AL., 2008) e sugerindo características similares aquelas encontradas em humanos. Ademais, a hiperatividade simpática é uma característica comum em pacientes com IC, independente da etiologia.

2.3 O Músculo Esquelético na Insuficiência Cardíaca

A musculatura esquelética compreende um sistema com mais de 600 músculos, constituindo o maior tecido com capacidade de mobilização de proteínas do corpo e representando, normalmente, cerca de 40% da massa corporal e 50% da proteína corporal total, provendo importantes funções como movimento, força, respiração, balanço postural e temperatura corporal (LIGHTFOOT; MCARDLE; GRIFFITHS, 2009; LENK; SCHULER; ADAMS, 2010). É um tecido com bastante plasticidade, capaz de responder a uma grande variedade de estímulos, das mais diversas naturezas. Assim, é razoável que na presença de patologias como a IC, sejam observadas características distintas nas fibras musculares que aquelas observadas em uma situação não patológica. Essas alterações envolvem tanto mudanças metabólicas como estruturais (LUNDE ET AL., 2001).

Com relação às alterações metabólicas, foi observado que pacientes portadores de IC apresentavam níveis de lactato aumentados mais precocemente que controles sem IC perante esforços físicos (HAMBRECHT ET AL., 1997) e maior razão fosfocreatina/ATP, evidenciando ressíntese de ATP prejudicada após exercício físico (MASSIE ET AL., 1987). Além disso, há redução da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo como succinato

desidrogenase, citrato sintase (METTAUER ET AL., 2001), β -hidroxiacildesidrogenase (KATZ ET AL., 1993) e citocromo c oxidase (HAMBRECHT ET AL., 1997). Outros (OPASICH ET AL., 1996) observaram que pacientes com IC depletavam mais glicogênio muscular e fosfato de creatina com concomitante aumento de piruvato kinase, enzima envolvida no metabolismo anaeróbico que indivíduos controles sem IC, após um período de repouso “*overnight*”. Essas reduzidas concentrações de glicogênio muscular podem exacerbar a dependência de metabolismo energético muscular por substratos alternativos como aminoácidos, o que pode ser observado mesmo durante atividades físicas da vida diária na IC (AQUILANI ET AL., 2005). Em nosso laboratório foi demonstrado que camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentavam menor desempenho em teste de esforço físico (MEDEIROS ET AL., 2008), diminuição da atividade de citrato sintase e aumento da enzima da via glicolítica hexocinase (BACURAU ET AL., 2009) confirmando alteração metabólica periférica nesse modelo animal. Essas alterações demonstram que na IC, há um acionamento do metabolismo anaeróbico de maneira precoce.

Dentre as alterações estruturais, observa-se que as fibras musculares sofrem transição de um fenótipo mais oxidativo para um fenótipo mais glicolítico, havendo uma redução na porcentagem de fibras do tipo I (lentas, oxidativas e resistentes a fadiga) e aumento das fibras do tipo IIb (rápidas, glicolíticas e menos resistentes a fadiga) (HAMBRECHT ET AL., 1997; KETEYIAN ET AL., 2003) bem como um quadro de rarefação vascular (SCARPELLI ET AL., 1999) e volume e densidade mitocondrial reduzidos (HAMBRECHT ET AL., 1997).

Outra alteração importante é a atrofia muscular, que é a perda não-intencional de pelo menos 5% da massa muscular total (Kotler, 2000) e é caracterizada por diminuição no conteúdo protéico, redução no diâmetro das fibras, diminuição da força e menor resistência à fadiga (JACKMAN; KANDARIAN, 2004). Embora não haja estudos que identifiquem a prevalência de atrofia muscular em amostras representativas de pacientes com IC, em uma amostra de pacientes cardíacos ambulatoriais 68% destes apresentaram evidência de atrofia muscular (MANCINI ET AL., 1992).

O controle da massa muscular é realizado através de um equilíbrio dinâmico entre proteínas que são constantemente sintetizadas e degradadas. A relação entre os processos catabólicos e anabólicos é conhecida como balanço

protéico (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). Na atrofia muscular, esse equilíbrio é alterado, resultando em um balanço protéico negativo, ou seja, uma redução da síntese, aumento da degradação ou ambos (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). Na IC, os pacientes apresentam tanto uma redução na síntese protéica como um aumento da degradação (MORRISON; GIBSON; RENNIE, 1988; TOTH ET AL., 2010).

2.4 A via da mTOR e o músculo esquelético

Uma das vias de sinalização ativadas que envolvem a regulação de massa e que envolve tanto o processo sintético de proteínas como de degradação protéica musculares é a da proteína serina-treonina cinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (GLASS, 2005; SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011).

Esta compreende dois complexos protéicos distintos, o complexo 1 (TORC 1) e o complexo 2 (TORC 2). TORC 1 é sensível à rapamicina, uma droga imunossupressora, que, ao formar um complexo com outra proteína FKBP-12 é capaz de inibir a atividade de mTOR (HEITMAN; MOVVA; HALL, 1991) e recebe sinais provenientes de diversos estímulos como hormonais e fatores de crescimento, contráteis e nutricionais (aminoácidos) (DRUMMOND ET AL., 2009). O complexo 1 é formado pela mTOR, Raptor, mLST8 e PRAS40. Já o complexo 2 é formado pela mTOR, Rictor, mLST8 e mSin 1, é insensível à rapamicina agudamente e é responsável pela fosforilação do resíduo serina 473 da AKT, um efector “*upstream*” da mTOR (SARBASSOV ET AL., 2006). Em estado de hiperativação, a mTOR fosforila outra proteína, denominada p70^{S6K} (*p70 ribosomal protein S6 kinase 1*), além de 4E-BP1 que ativa a tradução de proteínas envolvidas no aparato de síntese protéica (KIMBALL; JEFFERSON, 2006).

A tradução do mRNA à proteína ocorrem em três fases distintas: a fase de iniciação, alongamento e a terminação que são compostas por diferentes fatores que possuem papéis específicos, altamente regulados e coordenados como os Fatores de Iniciação eucarióticos (eIFs) e os Fatores de Elongação (eEFs) (Proud, 2007). Embora haja vários desses fatores, a seguir, serão expostos apenas os de maior interesse para os propósitos desse trabalho.

Um fator de iniciação denominado de eIF2 (*eukaryotic Initiation Factor* 2) se liga ao GTP e ao met-tRNA_i, formando o complexo eIF2-GTP-met-tRNA_i. Parte desse complexo liga-se a subunidade ribossomal 40S, formando o complexo pré-iniciador 43S. Para que esse reconheça e possa se ligar ao RNAm, é necessária a atuação de outro complexo, denominado de eIF4F, formado pelas proteínas: eIF4A, eIF4B, eIF4G e eIF4E (WANG; PROUD, 2006). O complexo eIF4F liga o complexo 43S com a subunidade ribossomal 60S, estabelecendo a unidade 80S. O complexo eIF4F atua reconhecendo, desenrolando e guiando o RNAm durante a tradução. O fator eIF4E associado ao eIF4G identifica a região terminal 5' do RNAm na região m⁷GTP e após o reconhecimento do códon AUG, a tradução é iniciada, onde o movimento do complexo pelo RNAm é guiado pela atividade do eIF4A, estimulado pelo eIF4B (VARY; LYNCH, 2007).

O mecanismo pelo qual a atividade de eIF4F regula a iniciação da tradução envolve a modulação e disponibilidade de eIF4E. Este último pode ligar-se à 4E-BP1 (repressora da tradução) e, enquanto estiver associado ao complexo 4E-BP1, o RNAm não pode ligar-se à unidade ribossomal 80S. A dissociação do complexo 4E-BP1 é regulada pela atividade da proteína mTOR, que fosforila a 4E-BP1 e, conseqüentemente, causa dissociação do complexo, liberando o eIF4E que se associa ao eIF4G (KIMBALL; JEFFERSON, 2004).

Já entre os fatores de alongamento, considera-se como um dos mais importantes o eEF2 que move o mRNA e o peptidil-tRNA após a formação da ligação peptídica. É regulada pela mTOR, já que esta ativa a p70^{S6K1} que fosforila e inativa a enzima cinase fator de alongamento 2 (eEF2K), que por sua vez permite que o eEF2 seja ativado e, conseqüentemente, ocorra a fase de prolongamento (WANG; PROUD, 2006).

2.5 Regulação da via mTOR

A ativação da via ocorre em resposta a diferentes fatores como a insulina, o IGF-1 e outros ligantes do receptor de tirosina cinase. Depois de ligado ao receptor, o IGF-1 promove a fosforilação do mesmo e, subseqüente fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS1). Este ativa a translocação da PI3K (fosfatidil-inositol-3-kinase) para a membrana plasmática,

que, por sua vez, promove a transfosforilação de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). Este último, fosforila a PDK (cinase dependente de fosfoinosítídeos). A PDK fosforila AKT que pode regular a via por pelo menos por dois fatores: um deles envolve a inibição das proteínas TSC (*tuberous sclerosis complex*) 1 e 2. TSC1/TSC2 suprimem a atividade de Rheb (RAS homolog enriched in brain), que ativam GTPases que tem efeito estimulatório na ativação de mTOR. Além disso, AKT também fosforila e inativa GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) (GLASS, 2005; KUBICA ET AL., 2005).

A fosforilação de AKT também repercute diretamente na degradação protéica por inibir os fatores de transcrição da família FOXO (Forkhead box) (MANNING; CANTLEY, 2007). Os fatores de transcrição FOXO estimulam proteínas ubiquitinas ligases como atrogin e MURF 1 (*muscle ring finger 1*), enzimas encarregadas de adicionar uma cauda de poli-ubiquitina à um substrato protéico e direcioná-lo para degradação pelo proteassoma (BODINE ET AL., 2001). Esse sistema proteolítico recebe substratos dos outros sistemas proteolíticos, seleciona, marca e degrada proteínas alvo. Atrogin, por sua vez, também controla a síntese protéica por promover a ubiquitinação e a degradação de eIF3F (eukariotic translation initiation factor 3 subunit F), reprimindo a ativação de S6K por mTOR (CSIBI ET AL., 2010).

Em estado de hiperfosforilação, AKT também é um modulador negativo do metabolismo oxidativo via inibição de AMP-activated protein kinase (AMPK). A fosforilação da AMPK inibe a via mTOR por ativar TSC-2 e por estimular a fosforilação e inativação do eEF-2 (MOUNIER ET AL., 2011). Além disso, AMPK também pode mediar a degradação protéica por aumentar a expressão de atrogin e MURF (KRAWIEC ET AL., 2007). Outro sistema proteolítico que sofre regulação negativa de mTORC-1 é autofagálico/ lisossomal, um processo envolvendo proteases lisossomais como as catepsinas, que degradam principalmente proteínas de membrana (MORDIER ET AL., 2000).

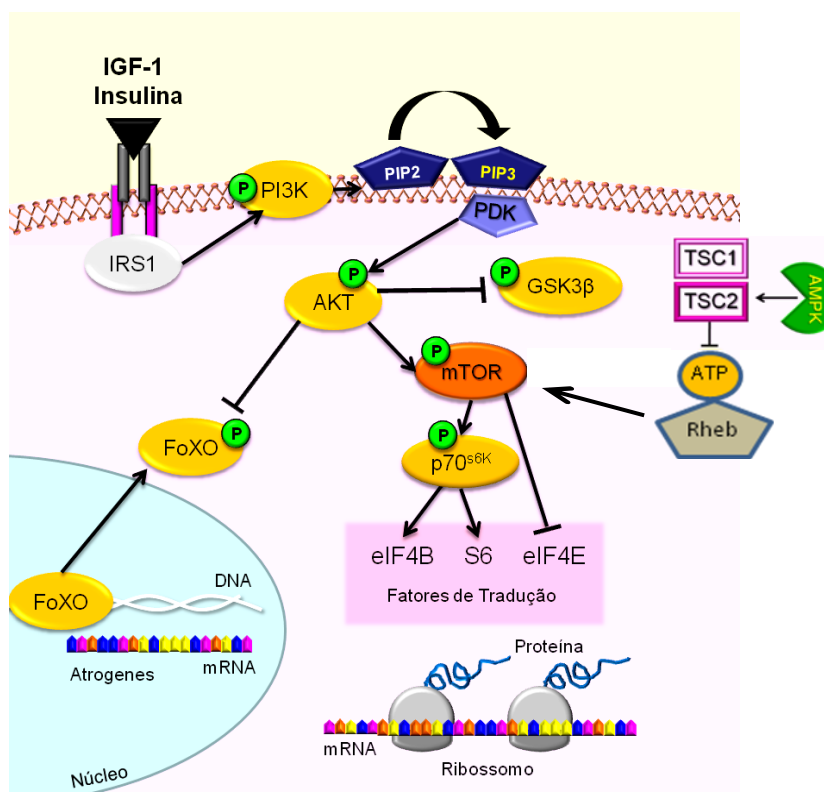


FIGURA 1: Esquema generalizado da via de síntese proteica AKT/mTOR envolvida na regulação da massa muscular.

A ativação da via ocorre em resposta a diferentes fatores como a insulina e o IGF-1. Uma vez ligado ao receptor, o IGF-1 promove a transfosforilação do mesmo e, subsequente fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS1). Este ativa a translocação da PI3K para a membrana, que promove a fosforilação do PIP2 em PIP3 e a subsequente fosforilação da PDK. A PDK fosforila AKT, estimulando a ativação da mTOR que regula os fatores de início da tradução e alongamento. A AKT também fosforila inibitoriamente FOXO, um fator de transcrição responsável pela ativação de genes constituintes de sistemas proteolíticos, como ubiquitina-proteassoma e autofagia. A proteína Rheb é uma GTPase que também tem efeito estimulatório sobre mTOR. Esta pode ser inibida por TSC 1/2. O eixo TSC e AMPK (*AMP-activated protein kinase*) tem importante regulação na homeostasia da energia celular, e regulam a mTOR, inibindo-a. As setas indicam ativação, as barras indicam inibição e os círculos verdes fosforilação.

2.6 Treinamento Físico e Insuficiência Cardíaca

Ao contrário do que ocorria até meados da década de 80, quando se aconselhava o repouso absoluto como conduta destinada a reduzir o estresse sobre o sistema cardiovascular já comprometido na IC, o treinamento físico demonstrou ser uma conduta muito útil, segura e capaz de melhorar a capacidade funcional de pacientes, após infarto agudo do miocárdio (BELARDINELLI ET AL., 1996).

Atualmente, o treinamento físico aeróbico vem sendo apontado como uma estratégia não farmacológica coadjuvante no tratamento da IC demonstrando potenciais benefícios que se traduzem em melhora significativa na tolerância ao exercício, no alívio parcial dos sintomas de dispnéia e fadiga, distúrbios do sono, melhora na classe funcional, na qualidade de vida além de redução da frequência de internações hospitalares (BELARDINELLI ET AL., 1999; KULCU ET AL., 2007; DAVIES ET AL., 2010).

Foram observados com treinamento físico aeróbico melhora do fluxo sanguíneo na musculatura, ressaltando uma diminuição da resistência vascular periférica (ROVEDA ET AL., 2003), atenuação da sensibilidade ergoreflexa, com melhora das respostas ventilatórias (PIEPOLI ET AL., 1996), função endotelial e perfusão coronariana (HAMBRECHT ET AL., 1998; GIELEN; HAMBRECHT, 2001).

Na musculatura esquelética, o treinamento físico aumentou a capacidade oxidativa muscular e a densidade mitocondrial (BELARDINELLI ET AL., 1995). Também demonstrada reduzida depleção de fosfocreatina e aumento dos níveis de ADP durante o exercício, além de aumento da ressíntese de fosfocreatina, após o exercício (ADAMOPOULOS ET AL., 1993). Outros investigadores observaram aumentos significativos na atividade enzimática de citrato sintase (TYNI-LENNE ET AL., 1997), angiogênese (Gustafsson *et al.*, 2001) e reversão da razão entre fibras do tipo I/ fibras do tipo II (HAMBRECHT ET AL., 1997).

2.7 Treinamento Físico e Atrofia Muscular

O tecido muscular esquelético é capaz de responder ao aumento de demanda mecânica, que tem sido considerado o mais eficiente estímulo para a resposta hipertrófica (MIYAZAKI; ESSER, 2009).

Quando expostos ao aumento de tensão ativa, tal como ocorre na contração muscular, com realização de trabalho pelo recrutamento do aparato contrátil, formam-se novos sarcômeros “em paralelo”, ao que se denomina de hipertrofia radial (ADAMS ET AL., 2004), mas também pode responder com novos sarcômeros “em série” no caso de aplicação de tensão passiva, como ocorre com estiramento prolongado, chamada de hipertrofia longitudinal (GOLDSPINK; WILLIAMS; SIMPSON, 2002).

Consistente com o seu papel no aumento da síntese protéica muscular, a via da mTOR é fundamental para o crescimento do músculo esquelético, frente à demanda mecânica, seja ela proveniente de tensão ativa (BODINE ET AL., 2001; PALLAFACCHINA ET AL., 2002), bem como à tensão passiva (AOKI ET AL., 2006). Corroborando com esses dados, em animais α_{2A}/α_{2C} ARKO utilizando treinamento físico aeróbico em esteira, já foi demonstrado que este era capaz de prevenir totalmente a atrofia muscular observada pela área de secção transversa no músculo sóleo, mas que este efeito era totalmente abolido quando estes animais eram tratados com rapamicina, um inibidor de mTOR (Jannig, 2010), sugerindo não somente o envolvimento dessa via no modelo referente, mas que o treinamento físico aeróbico é capaz de agir através desta. Fato este particularmente interessante, pois apesar de reconhecermos que o treinamento físico resistido é mais eficiente do ponto de vista de gerar hipertrofia, os potenciais efeitos adversos do aumento da pós carga durante a fase de levantamento de massa limitam suas aplicações em programas de reabilitação, necessitando serem executados em baixa intensidade, por medida de segurança e apenas como complemento do treinamento físico aeróbico (Forjaz et al., 2006). Além disso, optamos pelo treinamento físico aeróbico como estratégia anti-atrófica, pois já foi reportada anteriormente no mesmo modelo animal, que este era capaz de atenuar a atrofia muscular restabelecendo o trofismo para níveis próximos aos camundongos sem IC (BACURAU ET AL., 2009).

2.8 Leucina e Músculo Esquelético

Dentre as diversas funções da leucina, destacam-se a sua participação como substrato para a síntese protéica, como substrato energético, carreadora de nitrogênio para síntese de alanina e glutamina e desencadeadora de sinalização anabólica nutricional (Layman, 2002).

Dos BCAAs, que são os aminoácidos mais abundantes nos músculos, correspondendo a cerca de 1/3 de toda a proteína muscular, a leucina é quantitativamente o mais oxidado (Mero, 1999). O primeiro passo do catabolismo da leucina é a reação catalizada por uma aminotransferase específica para BCAAs. Por possuir baixa atividade de aminotransferase de

BCAAs o fígado não os degrada diretamente (SURYAWAN ET AL., 1998) e isso permite que após serem absorvidos no intestino, os BCAAs sejam direcionados principalmente aos tecidos extra-hepáticos como o músculo esquelético, diferentemente de outros aminoácidos, que são oxidados primariamente no tecido hepático (SHIMOMURA ET AL., 2004).

Ao sofrerem ação da aminotransferase mitocondrial específica para BCAAs no músculo, a leucina é convertida em um α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKA), o α -cetoisocaproato (KIC) e glutamato (SHIMOMURA; HARRIS, 2006). O glutamato é transaminado com o piruvato formando alanina; ou aminado por meio da reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, para formar glutamina (ROGERO; TIRAPGUI, 2008). O KIC, por sua vez, pode seguir duas vias: uma, na qual sofre outra reação catalizada por uma desidrogenase específica para BCAAs, o complexo cetoácidos de cadeia ramificada (BCKDH) (HARPER; MILLER; BLOCK, 1984; HARRIS; JOSHI; JEOUNG, 2004). A outra via seria a oxidação de KIC a β -hidroximetilbutirato (HM β) no citosol dos hepatócitos e outros tecidos através da ação da enzima KIC-desidrogenase, na qual se calcula que, cerca de 5% do total de leucina ingerida seja oxidada à HM β (VAN KOEVERING; NISSEN, 1992). A partir desta, poderia se ter duas rotas alternativas: a excreção urinária de HM β (10 a 40% do total sintetizado) e a outra, a conversão do HM β em *Hidroximetilglutaril-Coenzima A* (HMG-CoA) redutase, envolvida na formação de colesterol (NISSEN ET AL., 2000).

Embora os efeitos da leucina no trofismo muscular pareçam ser, em parte, através do aumento da síntese protéica, mais especificamente através da via da mTOR (ANTHONY ET AL., 2000; KIMBALL; JEFFERSON, 2006), os efeitos nessa via parecem ser tempo-dependentes, com duração em torno de 1 a 1^{1/2} hora (CROZIER ET AL., 2005) retornando aos valores basais após. Levando isso em consideração, foi sugerido que a leucina fosse consumida durante várias vezes ao dia com intuito de ampliar seus efeitos tróficos (NORTON ET AL., 2009). Também foi demonstrado que a leucina é capaz de atenuar a degradação protéica através da inibição de autofagia (MORDIER ET AL., 2000; NICKLIN ET AL., 2009) e do sistema ubiquitina proteassoma (COMBARET ET AL., 2005), especialmente quando associada ao treinamento físico (SALOMAO ET AL., 2010). Além de seus efeitos na via mTOR e sistemas proteolíticos

autofágico/lisossomal e ubiquitina-proteassoma foi observado que determinados aminoácidos podem alterar a expressão de microRNAs e atenuar a expressão gênica de miostatina, que reprime o crescimento muscular (DRUMMOND ET AL., 2009).

Uma questão ainda pouco compreendida é a relação entre “o quanto” os efeitos na síntese/degradação são causados pela leucina ou os produtos de seu metabolismo como HMB β , KIC ou mesmo a glutamina. Os efeitos na degradação protéica, por exemplo, parecem ser atribuídos, em parte, ao HMB β ou mesmo o KIC uma vez que inibidores da transaminação da leucina inibem seu efeito sobre o catabolismo protéico, mas não afetam seu efeito estimulatório sobre a síntese protéica (SMITH; WYKE; TISDALE, 2004). Lynch e cols. (2002) sugeriram que o KIC é responsável pela ativação da via e não a leucina. Contudo, sabe-se que a reação catalizada pela aminotransferase de BCAA mitocondrial é reversível, e, portanto, a conversão de KIC à leucina pode acontecer mesmo após o tratamento com KIC. Um estudo envolvendo um modelo de camundongo *knockout* (KO) para aminotransferase de BCAA mitocondrial, portanto, inibindo a geração de KIC, demonstrou que esses animais KO eram capazes de aumentar a fosforilação de 4EBP1 e S6K1 no músculo esquelético com a realimentação, sugerindo que a leucina, não KIC, estimula sinalização de mTORC (SHE ET AL., 2007).

A glutamina, por sua vez, também pode influenciar a ativação da via mTOR (NICKLIN ET AL., 2009) sendo o aminoácido com a mais alta taxa de síntese no músculo esquelético (Wagenmakers, 1999). Um estudo (SHE ET AL., 2010), utilizando o mesmo modelo de camundongo KO para aminotransferase de BCAA mitocondrial, demonstrou que esses animais KO apresentavam síntese de glutamina intramuscular reduzida o que repercutia em menor tolerância ao esforço que os camundongos selvagens.

2.9 Regulação do metabolismo dos BCAAs pelo exercício físico

A maioria dos estudos envolvendo manipulação nutricional de BCAAs e metabolismo do exercício tem focado nos efeitos dos BCAAs e as repercussões deste no desempenho no esforço, mas poucos têm buscado

elucidar os mecanismos pelo quais o exercício desempenha sobre o metabolismo de BCAAs.

Como o passo limitante do catabolismo dos BCAAs é a reação irreversível catalisada pela BCKD, a atividade dessa enzima é que controla o estado de equilíbrio dos BCCAs e BCKAs. Em níveis baixos de BCAAs no plasma, a subunidade E1 α é hiperfosforilada pela cinase de BCKD, levando a menor atividade de BCKD e uma maior preservação de BCAAs. Em altos níveis de BCAAs, a subunidade E1 α é desfosforilada pela fosfatase BCKD, levando a uma maior atividade de BCKD e a remoção do excesso de BCAAs (HARRIS; JOSHI; JEOUNG, 2004).

Durante décadas, a maior parte dos estudos envolvendo a regulação dos BCAAs e BCKAs enfatizavam apenas a cinase de BCKD e só recentemente a identificação de uma serina/treonina fosfatase do tipo 2C mitocondrial (PP2Cm) esclareceu melhor sobre o seu papel no catabolismo dos BCAAs (LU ET AL., 2007; LU ET AL., 2009).

Em relação ao treinamento, ao contrário do que ocorre com o exercício agudo, no qual há uma baixa atividade de BCKDH-cinase e aumento da forma ativa de BCKDH (KASPEREK, 1989; JACKMAN ET AL., 1997; MCKENZIE ET AL., 2000; XU, M. ET AL., 2001) o treinamento diminui o estado de ativação do complexo BCKDH. Foi demonstrado que ratos treinados apresentam maior atividade de BCKD-cinase que destreinados (FUJII ET AL., 1998). Por outro lado, estudos com humanos (MCKENZIE ET AL., 2000; HOWARTH ET AL., 2007) demonstraram que o treinamento diminui o estado de ativação do complexo BCKDH, provavelmente por uma resposta adaptativa. Outro estudo (MCKENZIE ET AL., 2000) demonstrou que após 38 dias de treinamento em cicloergômetro a 60% do VO₂ pico durante 90 min./sessão houve redução da oxidação de leucina e do estado de ativação do complexo BCKDH durante uma única sessão de exercício. Adicionalmente, após seis semanas de treinamento, tanto aeróbico contínuo como intervalado de alta intensidade foram capazes de diminuir o estado de ativação de BCKDH e aumentar a expressão protéica de BCKDH cinase em músculo esquelético (HOWARTH ET AL., 2007).

2.10 Efeitos adversos da suplementação com leucina

Alguns efeitos adversos também têm sido relatados pela administração excessiva de leucina. Por exemplo, uma possível redução plasmática dos outros dois aminoácidos de cadeia ramificada, valina e isoleucina (NAIR ET AL., 1992; TOM; NAIR, 2006), pelo excesso de KIC gerado como consequência do consumo excessivo de leucina, inibindo a atividade de BCKD cinase e consequentemente o aumento da atividade do complexo BCKDH que reduziria a disponibilidade de outros aminoácidos (PAXTON; HARRIS, 1984; SHIMOMURA; HARRIS, 2006).

Reforçando o fato de que a ativação do complexo BCKDH pode alterar a disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica, também foi demonstrada diminuída ativação de mTOR por KIC (ISHIGURO ET AL., 2006; NAKAI ET AL., 2006), e de miopatia e redução da concentração protéica muscular em ratos após tratamento com ácido clofíbrico, um análogo estrutural de KIC (TERAVAINEN; LARSEN; HILLBOM, 1977; PAUL; ADIBI, 1979). Outro efeito relatado é a resistência à insulina (BALAGE ET AL., 2011). De fato, a leucina é um dos aminoácidos que apresenta efeito secretagogo da insulina mais potente, principalmente através de seu catabólito KIC e da geração de α -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase, gerando ATP, aumentando o influxo de cálcio necessário para a secreção de insulina (XU, G. ET AL., 2001).

A hiperativação da via mTOR por aminoácidos também causa, por um mecanismo de “feedback”, a fosforilação de resíduos serina do substrato do receptor de insulina (IRS1), que por sua vez causa uma rápida desativação da PI3K, comprometendo desta forma a resposta periférica frente à insulina (TREMBLAY; MARETTE, 2001; BOURA-HALFON; ZICK, 2009). Assim, foi argumentado que aminoácidos utilizados para promover o anabolismo protéico muscular pode, por sua vez, inibirem os primeiros passos de sinalização da insulina e ulteriormente promover resistência à sua ação (TREMBLAY ET AL., 2007).

Outro efeito adverso possível é a citotoxicidade do acúmulo de BCAAs/BCKAs na sobrevivência dos cardiomiócitos, já que foi demonstrando que camundongos deficientes de PP2Cm apresentam níveis significativamente

mais elevados de espécies reativas de oxigênio e são mais suscetíveis à transição de permeabilidade mitocondrial induzida pelo cálcio, uma permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna que leva à disfunção dessa organela levando à morte celular por apoptose (LU ET AL., 2007). Os efeitos metabólicos do acúmulo de BCAAs/BCKA pode ser particularmente patológico ao coração, pois podem inibir o transporte e a utilização de ácido graxos e piruvato, principais substratos energéticos cardíacos (SAHA ET AL., 2010).

Os efeitos da carga excessiva de aminoácidos/ proteínas sobre a função renal também tem sido alvo de discussão (MARTIN; ARMSTRONG; RODRIGUEZ, 2005). Entretanto, as evidências para efeitos deletérios, são mais consistentes apenas para indivíduos com doença renal pré-existente (LENTINE; WRONE, 2004). A hipótese mais sustentada a esse respeito é a Hipótese de Brenner (BRENNER; MEYER; HOSTETTER, 1982) que propõe que o consumo de proteínas excessivo aumenta a pressão glomerular e a hiperfiltração renal, pelo aumento do fluxo sanguíneo gerado por estas, o que induziria à uma série de respostas hormonais e, à longo prazo, alterações estruturais como esclerose glomerular. Outro aspecto levantado é que a alta carga protéica pode levar à excreção de substâncias potencialmente litogênicas como cálcio e ácido úrico (Reddy, 2002). E ainda, outros argumentam que a produção de uréia, linearmente proporcional ao consumo de proteínas na dieta, poderia aumentar e causar uma sobrecarga renal, pelo fato destes serem responsáveis pela excreção de uréia (BANKIR ET AL., 1996).

2.11 Leucina e Síntese Protéica

Os efeitos da leucina na síntese protéica são atribuídos ao aumento da eficiência da iniciação da tradução protéica e a fase de alongamento (ANTHONY ET AL., 2000; BOLSTER; KIMBALL; JEFFERSON, 2003). Pelo menos dois dos passos envolvidos nestas estão sujeitas à regulação pela leucina. Um deles é o sequestro de eIF4E por 4E-BP1. A leucina estimula a fosforilação de 4E-BP1, que na forma fosforilada não se liga ao eIF4E, e, assim, a iniciação da tradução é iniciada (KIMBALL; JEFFERSON, 2006). Outro mecanismo é através da p70^{S6K}, pois quando esta é ativada, fosforila e inativa a enzima cinase do fator de

alongamento 2 (eEF2K), que por sua vez permite que o eEF2 seja ativado, e, assim, a fase de prolongamento (Stipanuk, 2007). Por outro lado, não parece que a leucina exerce efeito estimulatório na ligação do met-tRNAi (met-tRNAi) à subunidade 40S (VARY; JEFFERSON; KIMBALL, 1999).

Outro aspecto interessante é que mesmo na ausência de aumentos nos níveis de insulina, a leucina demonstrou ser capaz de estimular a síntese protéica (ANTHONY; ANTHONY; LAYMAN, 1999), contudo, quando se administra leucina exógena e há aumento dos níveis de insulina, é observado um aumento mais exacerbado na taxa sintética protéica (ANTHONY ET AL., 2002; CROZIER ET AL., 2005) sugerindo que a leucina estimula a síntese protéica independentemente da insulina, mas que esta última oferece um efeito permissivo e sinérgico com a leucina. Adicionalmente, as ações da leucina na mTOR e fatores de iniciação são independentes de AKT (LIU ET AL., 2002), que é estimulada pela insulina (WANG; SUL, 1998).

O mecanismo pelo qual a leucina estimula mTOR diretamente ainda não é bem compreendido. Contudo, alguns candidatos têm sido sugeridos, como por exemplo, uma classe 3 de fosfatidil inositol-3-cinase (PI3K) denominada de *human vacuolar protein sorting* (hVps34), que estimula mTOR e seus substratos *downstream* (BYFIELD; MURRAY; BACKER, 2005; NOBUKUNI ET AL., 2005); uma classe 4 de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK-4), única MAPK sensível à aminoácidos (FINDLAY ET AL., 2007); por um mecanismo dependente de um transportador bidirecional que regula a entrada de glutamina e aminoácidos neutros na célula (NICKLIN ET AL., 2009); e através de *Ras homologue enriched in brain* (RHEB), que em sua forma ativa (ligada ao GTP) interage diretamente com mTORC 1 por se ligar a Raptor (SANCAK ET AL., 2008); através de fosfolipase D e de seu produto, ácido fosfatídico, que se liga à TORC através da proteína FKBP12 (XU ET AL., 2011).

Por fim, considerando o fato de que a leucina e o estímulo mecânico ativam mTOR de maneira independente (HORNBERGER; CHIEN, 2006), que a mTOR também é um ponto de “convergência” dos sinais desencadeados por ambos (KIMBALL; JEFFERSON, 2010) e que a interação dos dois estímulos geralmente resulta em “amplificação da sinalização celular anabólica” (KOOPTMAN ET AL., 2005; DREYER ET AL., 2008; MACKENZIE ET AL., 2009) é possível

que a associação de treinamento físico aeróbico com a suplementação de leucina se traduzam em otimização dos efeitos anabólicos, já demonstrados por cada estratégia separadamente.

3. JUSTIFICATIVA

Apontada como a via final de quase todas as doenças do aparelho circulatório, a IC representa um importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e a morbimortalidade associada. Estima-se que existam 5,8 milhões de pacientes com IC somente nos Estados Unidos (*American Heart Association, 2010*) e 15,8 milhões no Continente Europeu (*European Society of Cardiology, 2008*). Já no Brasil, o número de pacientes chega a 7 milhões, gerando despesas de mais de 37,5 milhões de reais anualmente, apesar do número de internações ter diminuído, comparando-se os anos de 2000 e 2007 (BOCCHI ET AL., 2009). Não obstante, o envelhecimento populacional tende a aumentar a incidência de IC, uma vez que esse segmento específico da população apresenta maior prevalência de doenças cardiovasculares e a IC é a principal causa de internação de pacientes a partir dos 65 anos de idade no Sistema Único de Saúde (ARAUJO ET AL., 2005). Esses dados, em conjunto, demonstram que nos próximos anos teremos o desafio de conviver com mais pacientes cardíacos e sustentam a importância das estratégias terapêuticas.

Apesar de vários trabalhos demonstrarem que a suplementação de leucina pode ser benéfica em várias condições atroficas (DE BANDT; CYNOBER, 2006; NICASTRO; ARTIOLI; ET AL., 2011) e que suplementos ricos em leucina em pacientes com IC (SCOGNAMIGLIO ET AL., 2008; ROZENTRYT ET AL., 2010) apresentaram resultados bastante promissores, não se tem conhecimento, ainda, sobre seus efeitos isoladamente na IC e se os efeitos do treinamento físico aeróbico podem ser potencializados com a suplementação de leucina em um estágio avançado dessa síndrome.

A hiperatividade simpática apesar de inicialmente compensatória e benéfica (BREDE ET AL., 2002), cronicamente, além dos já bem conhecidos prejuízos na função contrátil cardíaca (ALTMAN ET AL., 1999; BRUM ET AL., 2002;

LOHSE; ENGELHARDT; ESCHENHAGEN, 2003; BRUM ET AL., 2006), também incide na musculatura esquelética, estando associada à atrofia muscular (BACURAU ET AL., 2009). Como a atrofia muscular tem sido relacionada à diminuição da qualidade de vida e pior prognóstico, o modelo de camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO parece adequado para o estudo das modificações induzidas pela hiperatividade simpática, bem como para avaliar estratégias de intervenção. Assim, foi de grande interesse o estudo do possível efeito protetor do treinamento físico e da suplementação de leucina, podendo abrir perspectivas nas estratégias capazes de modular o trofismo muscular esquelético e, possivelmente, melhorar a qualidade de vida e prognóstico de pacientes com IC.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Estudar a contribuição das diferentes terapias associadas (treinamento físico e suplementação com leucina), no fenótipo de fibras e na atrofia muscular esquelética apendicular desencadeada por IC em modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

4.2 Específicos

Avaliar em camundongos controle, α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentário, α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado, α_{2A}/α_{2C} ARKO recebendo suplementação com leucina e α_{2A}/α_{2C} ARKO treinado recebendo suplementação com leucina:

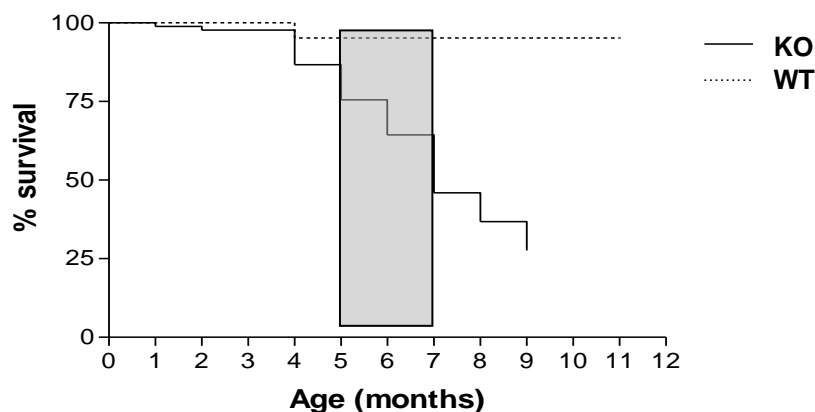
- a) A função ventricular esquerda;
- b) A frequência cardíaca semanalmente;
- c) A massa corporal semanalmente;
- d) A razão massa úmida/massa seca dos pulmões e fígado;
- e) As concentrações plasmáticas de TNF- α e Insulina e a tolerância à glicose;
- f) O consumo alimentar;
- g) A distribuição dos diferentes tipos de fibras nos músculos sóleo e plantar;
- h) A área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares nos músculos sóleo e plantar;
- i) A capilarização do músculo sóleo;

- j) A expressão de proteínas envolvidas na via da mTOR nos músculos sóleo e plantar;
- k) A função renal;
- l) A curva de sobrevida durante o período experimental.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostra

Utilizamos camundongos machos KO e controle (MCKENZIE ET AL.) da linhagem C57/BL6, provenientes do Biotério do laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da USP. No início do estudo os camundongos estavam com seis meses de idade, onde a cardiomiopatia é considerada grave e a mortalidade cerca de 70% (Figura 2).



(Brum et al., 2002)

Figura 2. Sobrevida de camundongos com cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício na Escola de Educação Física e Esporte 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.

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) sendo o Projeto referente a esta Dissertação de Mestrado aprovada pelo Comitê de ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo em 4 de Setembro de 2009 (Protocolo 2009/28). A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical.

5.2 Grupos Experimentais

Foram estabelecidos cinco grupos experimentais, um controle e quatro α_{2A}/α_{2C} ARKO, sendo eles:

- Grupo Controle (WT): camundongos C57/BL6 sedentários e recebendo placebo (água destilada).
- KO sedentário (KO): camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentários e recebendo placebo.
- KO leucina (KOL): camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO sedentários suplementados com leucina.
- KO treinado (KOT): camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO recebendo placebo e submetidos ao treinamento físico.
- KO treinado+leucina (KOLT): camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO submetidos ao treinamento físico e suplementados com leucina.

5.3 Treinamento Físico (estímulo mecânico)

O treinamento físico foi realizado em esteira rolante, em intensidade moderada, com predomínio de metabolismo aeróbico, conforme padronizado anteriormente em nosso laboratório (FERREIRA ET AL., 2007). Mais especificamente, realizamos quatro semanas de treinamento físico em esteira rolante (do 6º aos 7º mês de idade), com sessões de exercício com duração de

60 minutos, seis vezes por semana, a 60% da velocidade máxima atingida no teste de exercício físico progressivo até a exaustão.

Para verificarmos a eficácia do treinamento físico avaliamos: a) a frequência cardíaca de repouso, medida semanalmente pelo método de pletismografia de cauda e a tolerância ao esforço físico por meio de teste progressivo até a exaustão (ver descrição abaixo), antes e após o período de treinamento físico.

5.4 Suplementação com Leucina

A suplementação com L-leucina (Ajinomoto® lote 08LEA001) foi utilizada com o intuito de minimizar a perda de massa muscular nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO e foi realizada via intragástrica (gavagem) a partir do 6º mês de idade, durante quatro semanas, na dose de 1,35g/kg diariamente (ANTHONY ET AL., 2002). Os animais tiveram livre acesso à água e ração (padrão para roedores Nuvilab CR-1), a qual fornecia 3,4Kcal por grama.

Para verificarmos se o quadro de IC desenvolvido pelos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO é acompanhado de redução na ingesta e, portanto, se a suplementação com leucina traria benefícios adicionais, uma parte dos animais do estudo foi mantida em gaiolas metabólicas para camundongos (Beiramar) a partir da qual permitiu a quantificação da ingesta e a excreção de urina destes animais, em três diferentes períodos. Antes do período experimental, aproximadamente na metade (15º dia do período experimental) e após 30 dias. Ressalta-se que antes de serem colocados em gaiolas metabólicas em períodos de 24 horas, os animais passavam por um período de adaptação (cerca de 4 a 6 horas).

A partir dos dados referentes ao consumo alimentar, foi calculada a eficiência alimentar através da fórmula: $P_f - P_i / \text{ingestão alimentar média}$, onde P_f = massa corporal no final do experimento, P_i = massa corporal no início do experimento e ingestão alimentar média = média entre energia total ingerida durante os três diferentes momentos supracitados, em kilocalorias (Kcal). As informações fornecidas pelo fabricante da ração foram utilizadas para os cálculos referentes ao consumo. Além disso, para verificar a quantidade específica dos aminoácidos contida na ração, enviamos duas amostras da

ração para análise da composição aminoacídica por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) em um Laboratório de Bromatologia na Cidade de Campinas-SP. O aminograma encontra-se no ANEXO A.

5.5 Tolerância à Realização de Exercício Físico

A tolerância ao esforço físico foi avaliada por meio de teste progressivo em esteira até a exaustão, onde os animais realizaram um teste de protocolo escalonado de exercício físico, com velocidade inicial de 6 m/min e incrementos na velocidade da esteira de 3 m/min a cada 3 minutos, até a exaustão do animal (Figura 3). Este teste foi realizado antes do início do protocolo de treinamento físico e da suplementação, e após o término dos mesmos (FERREIRA ET AL., 2007).

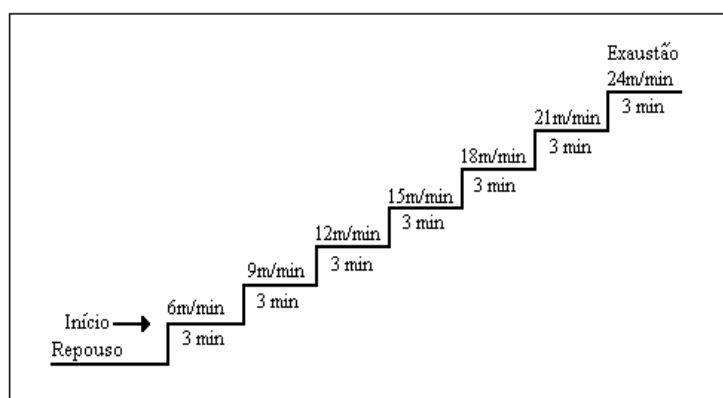


Figura 3. Esquema ilustrativo do protocolo de exercício físico escalonado progressivo até a exaustão para camundongos.

5.6 Função Muscular

Embora grande parte da resposta ao teste máximo em esteira esteja relacionada ao sistema muscular esquelético, para confirmar se esses resultados se reproduziriam em outros testes funcionais, optamos por realizar mais outros três testes: o de força de preensão (grip), o do *rotarod* e o de deambulação. Resumidamente, no primeiro, o de grip, os animais foram posicionados de maneira a utilizar as patas tracionando contra um sistema capaz de mensurar a força (em Newtons) (transdutor de força modelo: DFE-002, San Diego Instruments, San Diego, Cal, EUA) (ANDERSON; ABDUL;

STEWART, 2004). O outro teste, o do Rotarod, tem o propósito de avaliar o desempenho motor, equilíbrio e a fadiga muscular. O teste foi realizado no aparelho 755 da *IITC Life Science (Woodland Hills, CA, EUA)*, o qual possui um cilindro 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. O animal equilibrava-se sob o cilindro e o tempo (em segundos) alcançado até a queda era anotado e o resultado do teste considerado como o maior tempo alcançado em três tentativas (TURGEMAN ET AL., 2008). O teste de deambulação é baseado no comprimento da passada, sendo inferido que quanto maior o comprimento da passada melhor a função muscular do animal. Os animais foram previamente mantidos em contato (pelas patas traseiras) em um depósito contendo tinta, com intuito de promover pegadas sobre um papel mantido em um corredor com comprimento de 50cm; 8cm de largura e 20cm de altura das paredes laterais (VIEIRA ET AL., 2008). Através dessas pegadas sobre o papel, foram mensuradas e calculadas o tamanho médio do comprimento da passada.

5.7 Registro Indireto da Frequência Cardíaca

A medida indireta da frequência cardíaca foi realizada pelo método de pletismografia de cauda, por meio de um sistema específico para camundongos (Kent Scientific, EUA), o qual foi composto por quatro caixas restritoras (3 cm de largura e 3,3 cm de altura), montadas sobre uma superfície aquecida.

A cauda dos animais passava através dos manguitos e era fixada com fita adesiva entre a fonte de luz e o fotorresistor, localizados acima e abaixo da cauda, respectivamente. Avaliado fotoeletricamente, o fluxo sanguíneo nas caudas produzia ondas oscilatórias que foram digitalmente mostradas 200 vezes por segundo por canal, e analisadas antes e durante uma rotina programável de inflagem e desinflagem do manguito. Os valores médios de frequência cardíaca de repouso foram obtidos após cada rotina do equipamento.

Previamente ao início e durante todo o protocolo experimental, a frequência cardíaca foi registrada uma vez por semana, no dia em que os

animais dos grupos de treinamento físico não realizarem a sessão de exercício físico. Para a determinação da frequência cardíaca de repouso foram consideradas as médias de seis registros realizados no mesmo dia. Cabe ressaltar que na semana anterior ao início do protocolo experimental, todos os animais foram adaptados ao sistema, ou seja, diariamente, todos os animais passavam pela rotina de registro indireto da frequência cardíaca, com o objetivo de adaptação ao equipamento e consequente diminuição do estresse.

5.8 Avaliação da Função Ventricular através de Ecocardiograma

Para confirmar a IC, um dos parâmetros utilizados foi a avaliação da função ventricular a qual foi realizada através de avaliação ecocardiográfica. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN ET AL., 1978).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado antes e após o período de intervenção em todos os grupos estudados por um único observador e com os animais anestesiados através do anestésico halotano 1% com fluxo 1 l/min. Este animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de cerca de 14 MHz, para a otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultra-som de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL. Reedsville, EUA) e foram armazenadas em CD e em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD).

A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e obtidas as medidas do diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo. Com estas medidas, foi calculada a fração de encurtamento (FS) do ventrículo esquerdo: $FS (\%) = [(DDVE - DSVE) / DDVE] \times (100)$.

5.9 Concentrações plasmáticas de TNF- α e Insulina

Foram quantificadas por kits específicos para Elisa, seguindo as recomendações do fabricante para insulina e para TNF- α (Millipore, INC-EUA).

5.10. Glicemia e Teste de tolerância à glicose

Parte dos animais foi mantida em jejum por 12h e foi verificada a glicemia de jejum com o aparelho Accu-Check Advantage II. Para o teste de tolerância à glicose, o mesmo período de jejum, seguido de administração na cavidade peritoneal de uma solução de glicose 20% (2,0 g/Kg de massa corpórea). Amostras de sangue foram então coletadas das caudas dos animais nos tempos 30, 60, 90, 120 minutos e, utilizadas para determinação das concentrações de glicose (SHE ET AL., 2007).

5.11 Massa Corporal e dos Órgãos e Quantificação da Área de Secção Transversa do Músculo Sóleo e Plantar

Avaliamos a massa corporal e o comprimento naso-anal, a razão massa úmida/ seca dos pulmões e fígado, bem como a massa do tecido adiposo retroperitoneal e periepididimal e a área de secção transversa dos músculos sóleo e plantar dos camundongos controle e KO aos 7 meses de idade.

A massa corporal de todos os grupos foi acompanhada semanalmente em balança semi-analítica (Gehaka). Os dados referentes à massa corporal e ao comprimento naso-anal foram usados para o cálculo do índice de Lee dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em gramas pelo comprimento naso-anal em centímetros e multiplicando-se por cem (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Este índice equivale ao índice de massa corporal (IMC) para humanos.

Para a razão massa úmido/ massa seca os tecidos do pulmão e fígado foram retirados sempre pelo mesmo indivíduo, pesados no momento da eutanásia (massa úmida) e após 48 horas em estufa (massa seca). Além disso, após a eutanásia, foi aferida a massa dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal.

A avaliação da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares nos músculos sóleo e plantar, foi realizada pela avaliação da atividade da enzima miosina ATPase por meio de soluções com diferentes pHs (4.3 e 10.3). A captura das imagens foi realizada com magnificação de 200x e objetiva de 20x. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um sistema de vídeo por meio de um programa de captura e análise de imagens (Leica Qwin, Bensheim-Alemanha).

5.12 Quantificação do Número de Capilares por Fibra

Para avaliar a rarefação e o possível efeito das estratégias utilizadas neste parâmetro, realizamos a quantificação do número de capilares por fibra nos músculos sóleo e plantar dos animais utilizados.

Para isso, após o sacrifício, os músculos sóleo e plantar foram imediatamente imersos em formalina tamponada (4%) por 48 horas, para posterior processamento histológico, com cortes de 4 µm e coloração por *periodic acid-Schiff* (PAS). A quantificação das fibras musculares e dos capilares foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500), com aumento de 400x. O critério de escolha do campo para contagem foi a integridade das fibras. O número de fibras e capilares foi considerado a partir do máximo de campos contados para cada animal.

5.13 Análise das proteínas envolvidas na via mTOR do Músculo Sóleo e plantar por western blot

Com base na literatura (ANTHONY ET AL., 2002; CROZIER ET AL., 2005), que aponta a síntese protéica e a fosforilação de proteínas da via mTOR ativadas transientemente em um período em torno de 30 minutos à 120 minutos após o estímulo, a “janela de síntese”, nós utilizamos um protocolo à parte, que consistiu do tratamento crônico, mas antes dos animais serem eutanasiados, estes foram privados de ração durante 18 horas e então, foi realizada a gavagem (leucina ou placebo). Após 60 minutos da gavagem, os animais permaneceram em jejum e foram eutanasiados (Figura 4). Foram

obedecidos um mínimo de 48 horas após a última sessão de treino ou teste máximo para o início do protocolo de jejum.

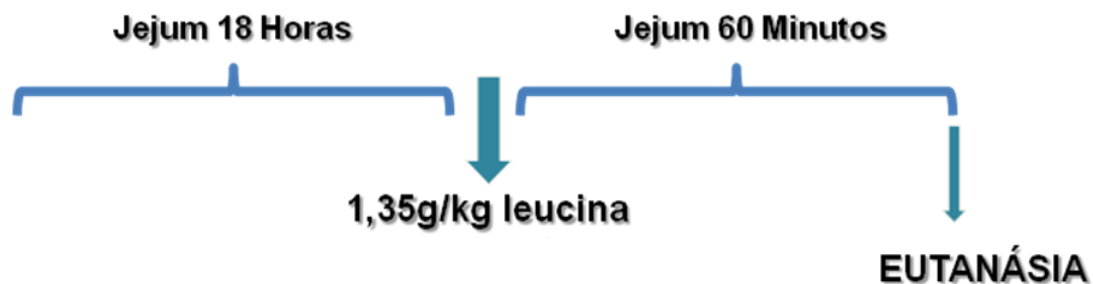


Figura 4. Esquema ilustrativo do protocolo de tratamento por gavagem e tempo de jejum para eutanásia.

Após serem removidos, os músculos sóleo e plantar foram submetidos a congelamento em nitrogênio líquido, sob temperatura de -185°C . Em um segundo momento, as amostras foram trituradas e homogeneizadas em solução de extração ($\text{pH}=7$) composta por: tampão de fosfato de potássio 50 mM, 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). Em seguida, o homogeneizado foi submetido à centrifugação de 12000 rpm a 4°C , durante 20 minutos. Após o descarte dos homogenatos, foi realizada a quantificação protéica dos extratos resultantes (Bradford, 1976).

As amostras foram então solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (sodium-dodecyl-sulfate) e em seguida as proteínas presentes nas amostras 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 três vezes com solução tampão (TBS), contendo Tris 1M pH 2,8, NaCl 5M e Tween 20 (0,1%). Em seguida, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos realizado por meio de uma mistura contendo TBS e leite desnatado (5%) por 120 minutos em temperatura ambiente com agitação constante. A membrana foi então incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora a 4°C por 12 a 14 horas com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por uma hora e meia em temperatura

ambiente com agitação constante. Após isso, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T e a imuno-deteção realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-EUA):

Foram utilizadas como anticorpos primários:

- AMPK α , coelho (Cell Signaling Technology – EUA).
- AMPK α fosforilada na treonina 172, coelho (Cell Signaling Technology – EUA).
- p70^{S6k}, coelho (Cell Signaling Technology – EUA).
- p70^{S6k} fosforilado na treonina 389, coelho (Cell Signaling Technology – EUA).
- 4EBP-1, coelho (Cell Signaling Technology – EUA).
- 4EBP-1 fosforilado na treonina 37/46, coelho (Cell Signaling Technology – EUA).

Como proteína normalizadora utilizamos a gliceraldeído-fosfato-desidrogenase- GAPDH (Sigma – EUA).

5.14 Parâmetros renais

Para avaliar a função renal após o período experimental foram utilizados os parâmetros: massa renal, dosagem de uréia e creatinina plasmática e na urina utilizando kits comerciais Labtest Diagnostica® sendo calculado o clearance de creatinina pelo método de depuração da creatinina, calculado a partir da fórmula: Clearance de Creatinina (ml/min): ([Creatinina] urina x Fluxo urinário) / [Creatinina] plasma.

Além disso, foi mensurada a diurese de 24hrs, os níveis de pH urinário e proteinúria pelo método colorimétrico utilizando-se kits Sensiprot Labtest.

5.15 Análise dos Resultados

Os dados obtidos foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média e comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA) de 1 fator para tipagem de fibras, área de secção transversa, capilarização, função

ventricular esquerda, razão massa úmida/massa seca, expressão protéica e parâmetros relacionados à função renal e de 1 fator para medidas repetidas para frequência cardíaca, massa corporal, tolerância ao esforço físico e testes de função muscular utilizando-se *post-hoc* de *Student Newman Kells*. Quando os dados não apresentaram distribuição Gaussiana, verificada pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov, e/ou não homogênea pelo Teste de Shapiro-Wilk, a análise por Ranques de Wilcoxon com *post-hoc* de Dunn foi utilizada. O software utilizado para tais análises foi o SigmaStat 3.5/ SigmaPlot 10.0. Para todas as análises foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização do modelo e sinais clínicos de IC desencadeada por hiperatividade simpática

6.1.1 Função e estrutura cardíaca em camundongos com IC

Com intuito de verificar possíveis alterações na morfologia cardíaca, a massa das câmaras cardíacas e massa cardíaca total foram mensuradas. Conforme observado na tabela 1, não houve diferença significativa entre os grupos, na massa das câmaras cardíacas, nem massa cardíaca total corrigida pelo comprimento da tibia.

Tabela 1. Massa das câmaras cardíacas e massa cardíaca total corrigida pelo comprimento da tibia dos grupos Wild-type (WT), KO placebo (KO), KO suplementado com leucina (KOL), KO treinado (KOT) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT). Os resultados estão apresentados como média±desvio padrão ou apresentados em mediana [intervalo interquartis]; ($p > 0,05$). ANOVA ou ANOVA por postos de Kruskal-Wallis.

Parâmetro (mg/mm*100)	WT	KO	KOL	KOT	KOLT
Átrios	0,51[0,35-0,60] (8)	0,37[0,36-0,46] (9)	0,39[0,33-0,49] (9)	0,33[0,28-0,41] (9)	0,41[0,36-0,54] (8)
VD	1,53±0,23 (8)	1,54±0,31 (7)	1,40±0,12 (7)	1,37±0,18 (8)	1,30±0,28 (8)
VE	4,97±0,46 (9)	5,28±0,68 (8)	5,34±0,56 (8)	4,98±0,61 (9)	4,80±1,14 (8)
Massa cardíaca	6,92±0,61 (9)	7,43±0,85 (10)	6,71±0,69 (9)	6,66±1,37 (8)	6,89±0,56 (7)

VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; mg: miligramas; mm: milímetros. Os números entre parênteses representam o n de cada grupo.

Em relação à função cardíaca dos animais, a fração de encurtamento avaliada no exame ecocardiográfico foi usada como parâmetro de função sistólica, revelando que camundongos KO apresentam função sistólica prejudicada, a qual é melhorada com o treinamento físico, embora não se restaure totalmente em relação ao grupo controle (Figura 5). Não foi observado qualquer efeito com a suplementação de leucina seja sozinha ou associada ao treinamento físico nesse parâmetro (Figura 5).

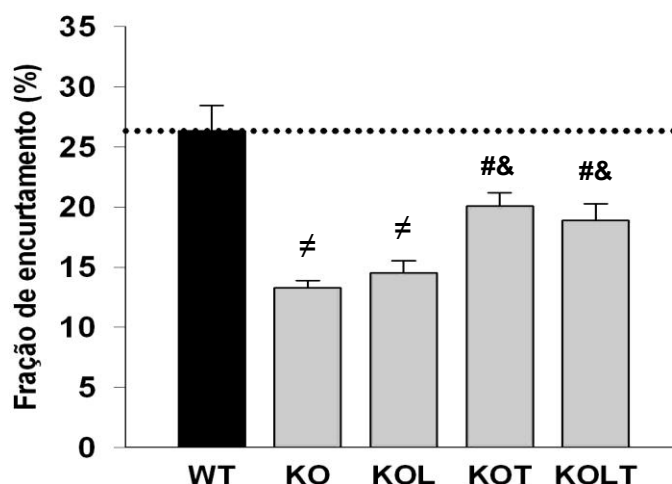


Figura 5. Fração de encurtamento em camundongos dos grupos controle (WT, n=5), KO placebo (KO, n=5), KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=5). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA com post hoc de *Student Newman-Keuls*. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$).

Além disso, pode ser observado na figura 6, que aos sete meses de idade os camundongos KO apresentam evidência de edema, observada por meio da relação massa úmida/ massa seca, não somente nos pulmões, mas também hepático. Não foram observados efeitos da suplementação com leucina sozinha ou efeitos adicionais ao treinamento físico nesses parâmetros. Os grupos KOT e KOLT apresentaram menor razão massa úmida/ massa seca dos pulmões (Painel A), restaurando esse parâmetro a valores similares ao grupo WT e atenuaram essa relação no tecido hepático (Painel B) em relação ao grupo WT de forma similar.

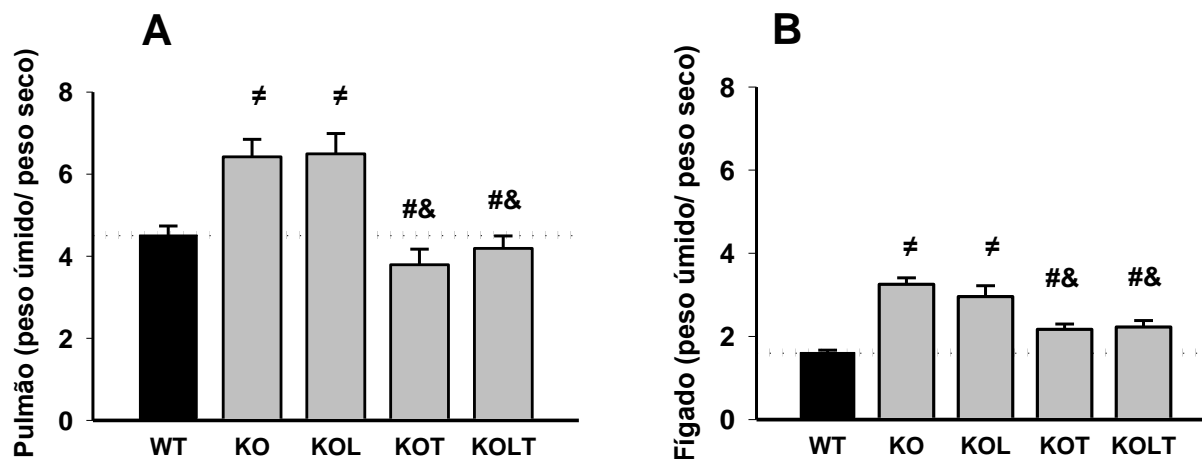


Figura 6. Razão massa úmido/massa seca do pulmão e fígado nos grupos: controle (MCKENZIE ET AL.), KO placebo (KO), KO suplementado com leucina (GUDER ET AL.), KO treinado (Kotler) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT). **Painel A:** razão massa úmido/massa seca do pulmão (n=9/ grupo). **Painel B:** razão massa úmido/massa seca do fígado (n=8/ grupo). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; \neq diferença *versus* WT; *versus* # KO; & *versus* KOL ($p < 0,05$). ANOVA com post hoc de *Student Newman-Keuls*.

6.1.2 Frequência cardíaca de repouso

Na figura 7 podemos observar que os camundongos do grupo KO apresentaram taquicardia basal quando comparados ao grupo WT. Além disso, pode se perceber que a partir da quarta semana já ocorre bradicardia de repouso de maneira significativa dos grupos KOT e KOLT em relação aos grupos KO e KOL no mesmo período e em relação ao período pré-intervenção, embora não se restaurem totalmente em relação ao grupo WT.

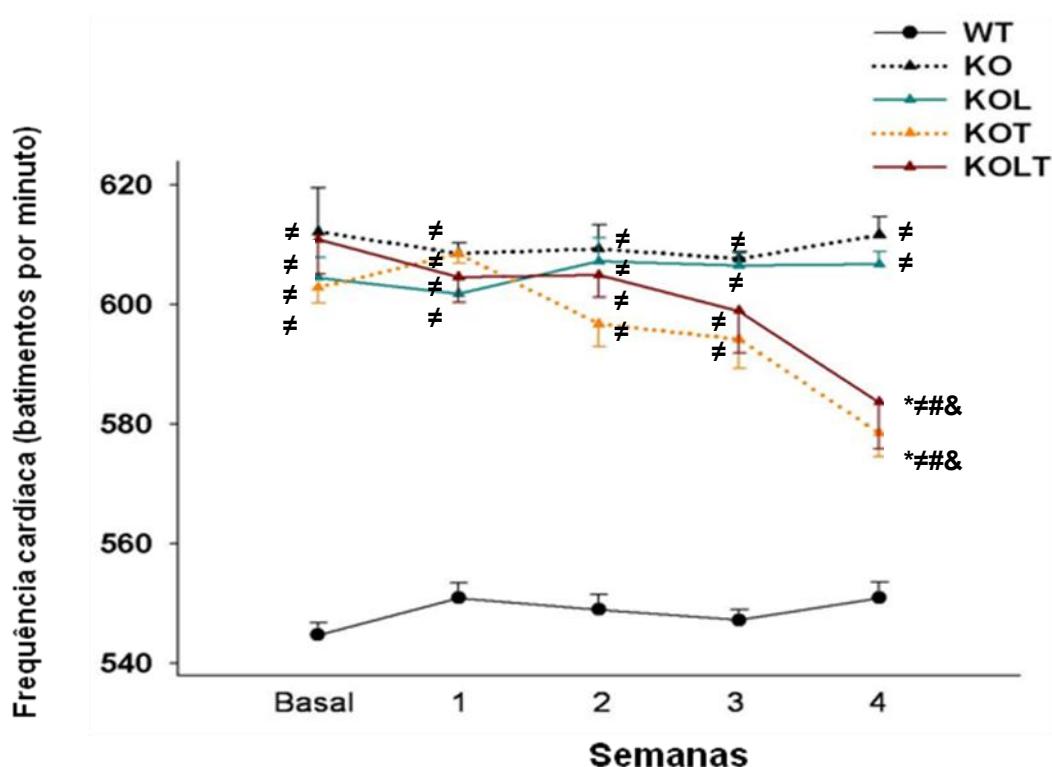
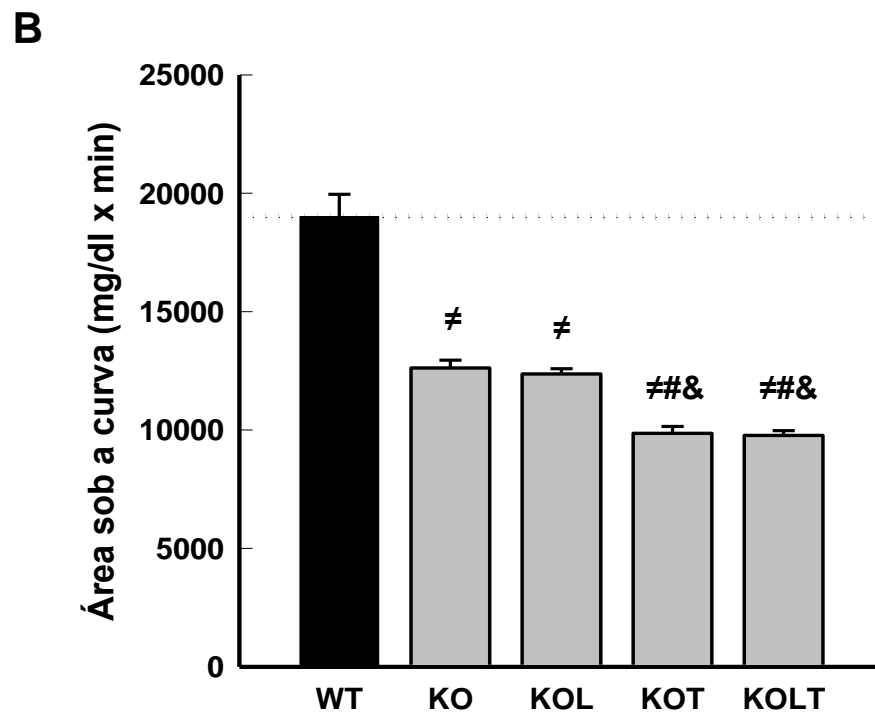
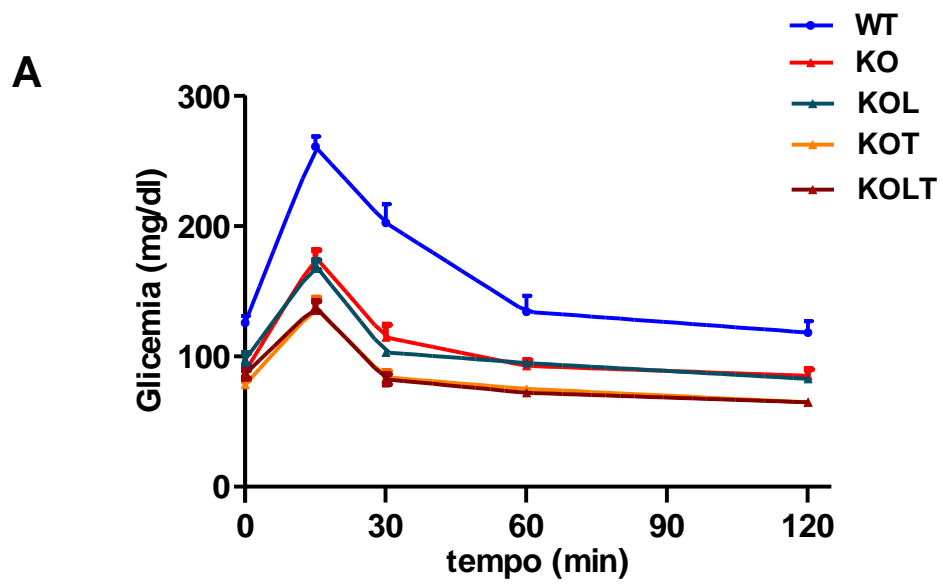


Figura 7. Frequência cardíaca de repouso, ao longo das semanas de intervenção, em camundongos dos grupos controle (WT, n=7), KO placebo (KO, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). * versus pré; ≠ versus WT; # versus KO; & versus KOL no mesmo período ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA p/ medidas repetidas com post hoc de *Student Newman-Keuls*.

6.1.3 Parâmetros plasmáticos

Uma questão importante a ser levantada era a respeito do metabolismo de glicose, já que, até então, eram desconhecidas as características relacionadas a esse aspecto neste modelo de IC, além do fato de ter sido sugerido que um dos efeitos adversos relatados com a suplementação com leucina de forma isolada poderia estar associado a distúrbios na homeostase de glicose (BALAGE ET AL., 2011). Dessa forma, realizamos o teste de tolerância à glicose, bem como as concentrações plasmáticas de insulina nos animais controle e com IC (Figura 8).



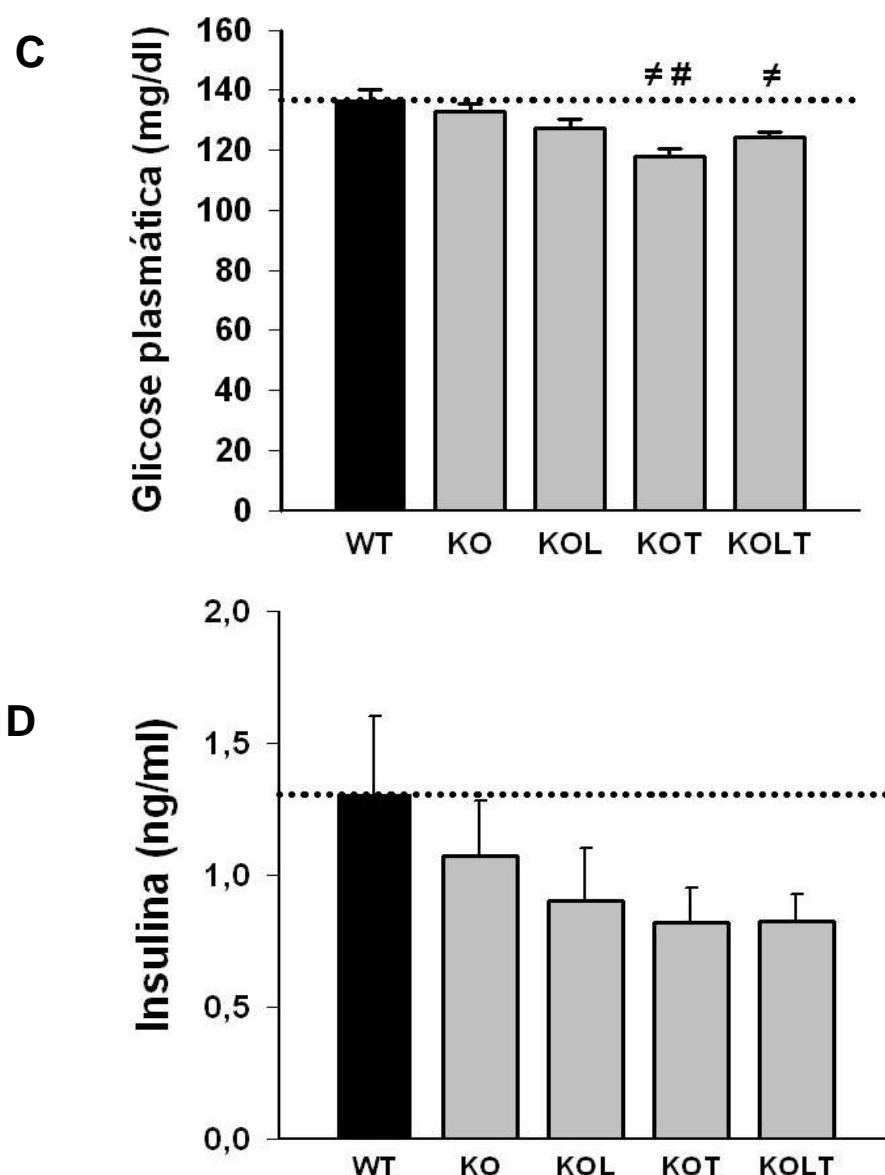


Figura 8. Teste de tolerância à glicose em camundongos dos grupos controle (WT, n=8), KO placebo (KO, n=8), KO treinado (KOT, n=8), KO suplementado com leucina (KOL, n=8) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=8), aos sete meses de idade. **Painel A:** Níveis plasmáticos de glicose ao longo do tempo. **Painel B:** Área sob a curva. ($p > 0,05$). **Painel C:** Níveis de glicose sanguínea. **Painel D:** Níveis plasmáticos de insulina. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; $\#$ versus KO; $\&$ versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

Como observado na figura 8, o grupo KO apresentou maior tolerância à glicose quando comparado ao grupo WT, expresso pela menor área sob a curva no teste de tolerância à glicose, não sendo observados efeitos da suplementação com leucina na forma isolada. O treinamento físico melhorou ainda mais essa resposta indicado pela menor área sob a curva nos grupos KOT e KOLT, sem evidência de efeitos adicionais da suplementação com

leucina ao treinamento. Adicionalmente não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos níveis plasmáticos de insulina.

Outra avaliação realizada foi a dosagem dos níveis plasmáticos de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, já que a sua elevação plasmática sustentada é outra característica marcante da IC (SHARMA; COATS; ANKER, 2000). De fato, estava aumentada significativamente em relação ao grupo controle e não sofreu impacto do tratamento com leucina, permanecendo elevada (Figura 9). Verificamos ainda que o treinamento físico foi capaz de restaurar os níveis plasmáticos de TNF- α sem evidência de efeitos da suplementação com leucina.

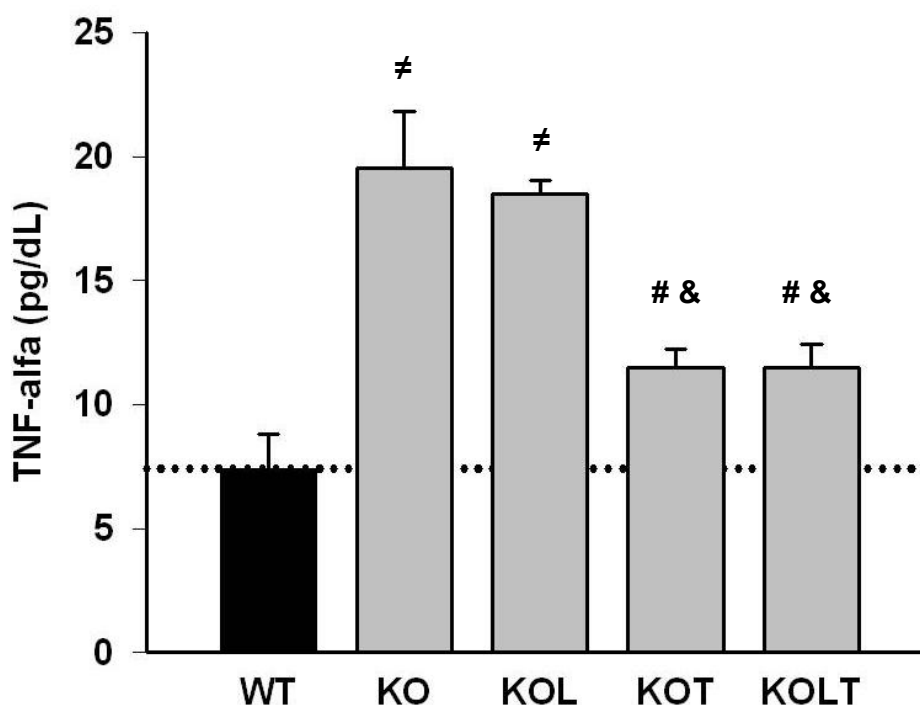


Figura 9. Níveis plasmáticos de TNF- α em camundongos dos grupos controle (WT, n=6), KO recebendo solução placebo (KO, n=6), KO treinado (KOT, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=6) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6), aos sete meses de idade. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*

6.2 Consumo alimentar em gaiola metabólica e massa corporal e adiposa

Acompanhamos os animais durante 24 horas em gaiolas metabólicas individuais e demonstramos que os animais consomem a mesma quantidade diária de ração (Tabela 2), tanto em quantidades absolutas, como relativas aos seus respectivos valores de massa corporal independentemente do período observado: antes, 15 dias ou no período pós.

Tabela 2. Consumo de ração diário em diferentes tempos em quantidades absolutas e relativas a massa corporal do animal dos grupos controle (WT, n=6), KO placebo (KO, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=6), KO treinado (KOT, n=6) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Não há diferença entre os grupos (ANOVA, p>0,05). Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão da média.

Consumo diário	WT			KO			KOL			KOT			KOLT		
	Pré	15 dias	Pós	Pré	15 dias	Pós	Pré	15 dias	Pós	Pré	15 dias	Pós	Pré	15 dias	Pós
Ração (g)	2,59±0,39	2,57±0,28	2,58±0,25	2,40±0,28	2,46±0,27	2,40±0,19	2,42±0,20	2,43±0,21	2,43±0,24	2,54±0,14	2,57±0,30	2,64±0,25	2,71±0,24	2,53±0,15	2,52±0,12
Ração(g/g*100)	8,79±1,46	8,72±1,05	8,74±0,92	8,47±1,05	8,79±0,99	8,70±0,67	8,50±0,64	8,64±0,65	8,73±0,81	8,92±0,51	8,99±1,02	9,22±0,84	8,86±0,82	8,89±0,49	8,87±0,47
Kilocalorias (Kcal)	8,79±1,34	8,73±0,97	8,78±0,84	8,17±0,96	8,36±0,91	8,16±0,63	8,22±0,67	8,26±0,71	8,27±0,83	8,62±0,49	8,72±1,02	8,97±0,87	8,55±0,81	8,60±0,51	8,61±0,41
Kilocalorias (Kcal/g*100)	29,89±4,97	29,63±3,57	29,71±3,13	28,78±3,56	29,90±3,38	29,59±2,29	28,89±2,18	29,37±2,21	29,69±2,75	30,32±1,73	30,56±3,48	31,34±2,86	30,14±2,80	30,21±1,67	30,16±1,59
Leucina ¹	52,48±8,01	52,14±5,78	52,41±5,04	48,79±5,71	49,90±5,45	48,72±3,78	49,06±4,02	49,30±4,21	49,36±4,94	51,46±2,94	52,07±6,07	53,56±5,17	51,05±4,85	51,33±3,02	51,43±2,44

1. Quantidade de leucina ingerida proveniente da ração. As informações do consumo foram obtidas a partir do aminograma da ração (ANEXO A).

A ingestão de leucina proveniente do consumo diário da ração, também não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ou mesmo entre períodos. A suplementação com leucina proposta como 1,35g/kg diariamente correspondeu a um acréscimo de cerca de 80% da ingestão diária média de leucina ingerida através da ração.

Além dos dados referentes ao consumo alimentar, pudemos calcular a eficiência alimentar (Figura 10), um parâmetro indicativo de aproveitamento endógeno da ração consumida. Os dados demonstram que animais com IC apresentaram uma menor eficiência alimentar que animais controle, sendo que o treinamento físico restaurou esse parâmetro. Não foram observados efeitos da suplementação com leucina, nem mesmo efeito adicional quando associada ao treinamento físico.

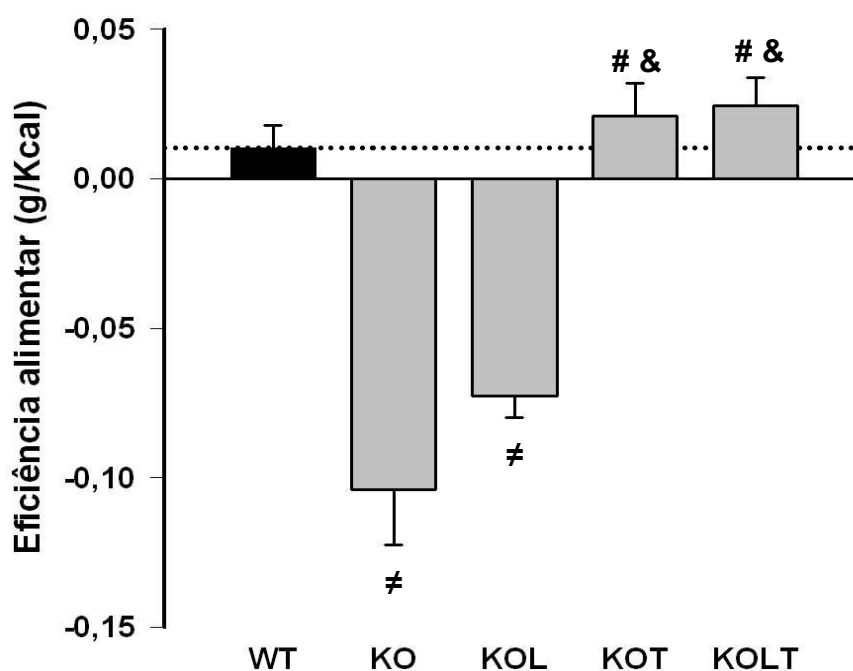


Figura 10. Eficiência alimentar nos diferentes grupos: controle (WT, n=6), KO placebo (KO, n=6), KO suplementado com leucina (KOL, n=6), KO treinado (KOT, n=6) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; # versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

Durante todo o período experimental, ou seja, na semana que antecedeu os tratamentos, durante as quatro semanas de tratamento e após, pesamos os

animais e detectamos que camundongos KO apresentavam menor massa corporal quando comparado aos camundongos controle, e que essa situação se mantinha independentemente do tratamento utilizado: treinamento físico e/ou suplementação com leucina (Figura 11).

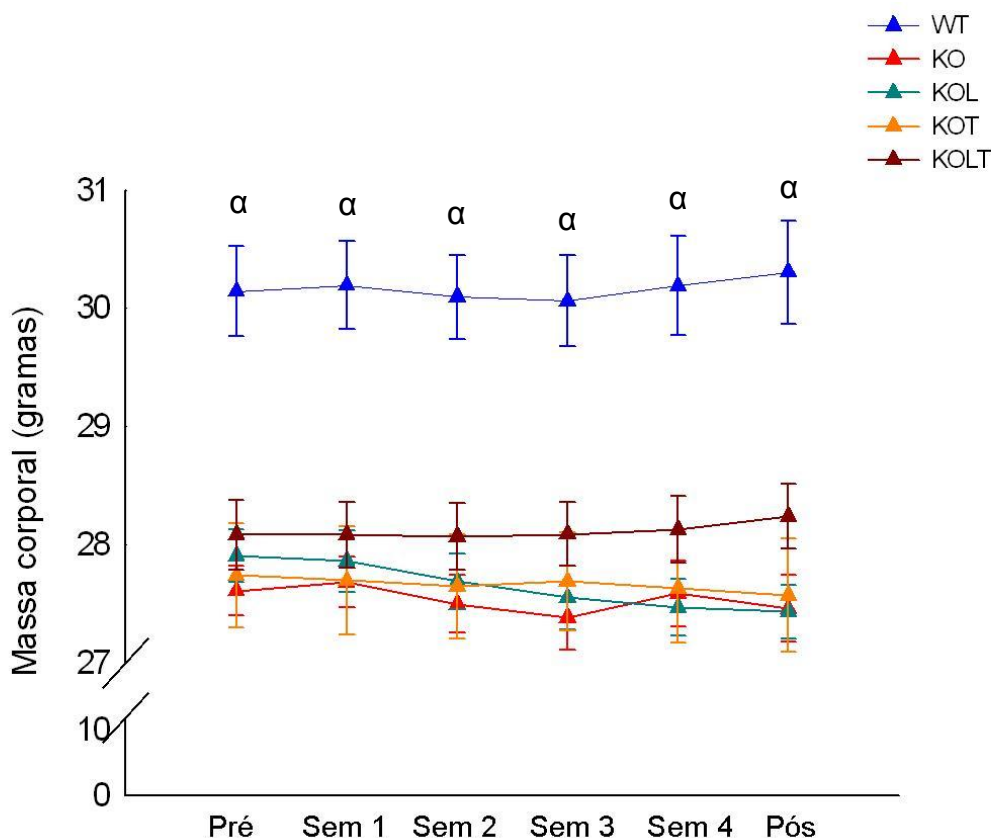


Figura 11. Evolução da massa corporal durante o período experimental dos grupos controle (WT, n=18), KO placebo (KO, n=8), KO suplementado com leucina (KOL, n=11), KO treinado (KOT, n=12) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=14). α diferença *versus* todos no mesmo período ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA para medidas repetidas com post hoc de *Student Newman-Keuls*.

Da mesma forma, o Índice de Lee apresentou-se menor nos camundongos KO, mas não sofreu alteração significativa com os tratamentos (Figura 12).

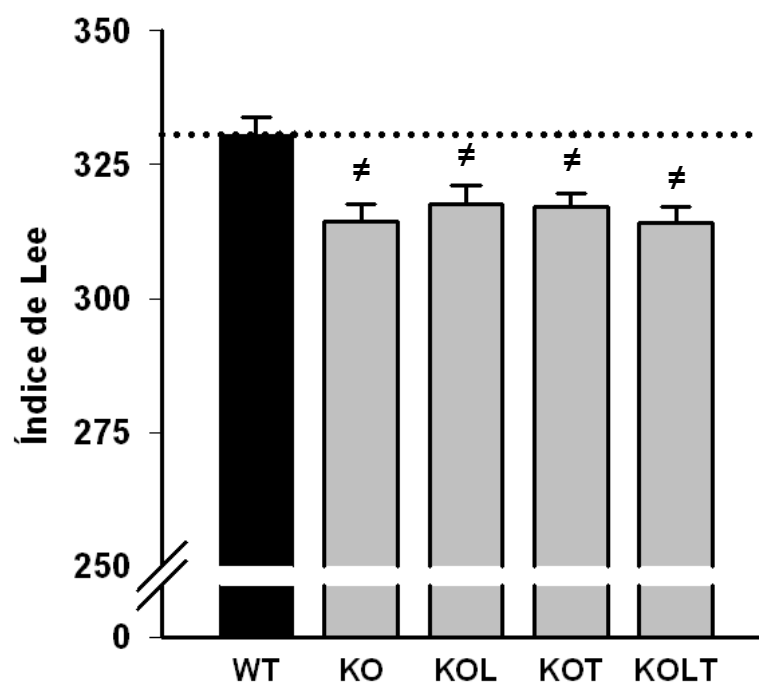


Figura 12. Índice de Lee dos grupos controle (WT, n=13), KO placebo (KO, n=13), KO suplementado com leucina (KOL, n=13), KO treinado (KOT, n=12) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=11). # diferença *versus* WT ($p < 0,05$). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; ANOVA para medidas repetidas com post hoc de *Student Newman-Keuls*.

A massa adiposa também foi mensurada após o período experimental por meio da massa do tecido adiposo retroperitoneal e periepididimal e conforme observamos na Figura 13, apenas a massa do tecido adiposo retroperitoneal apresentou-se significativamente menor nos camundongos KO em relação aos camundongos selvagens. Os diferentes tratamentos não modificaram esses parâmetros.

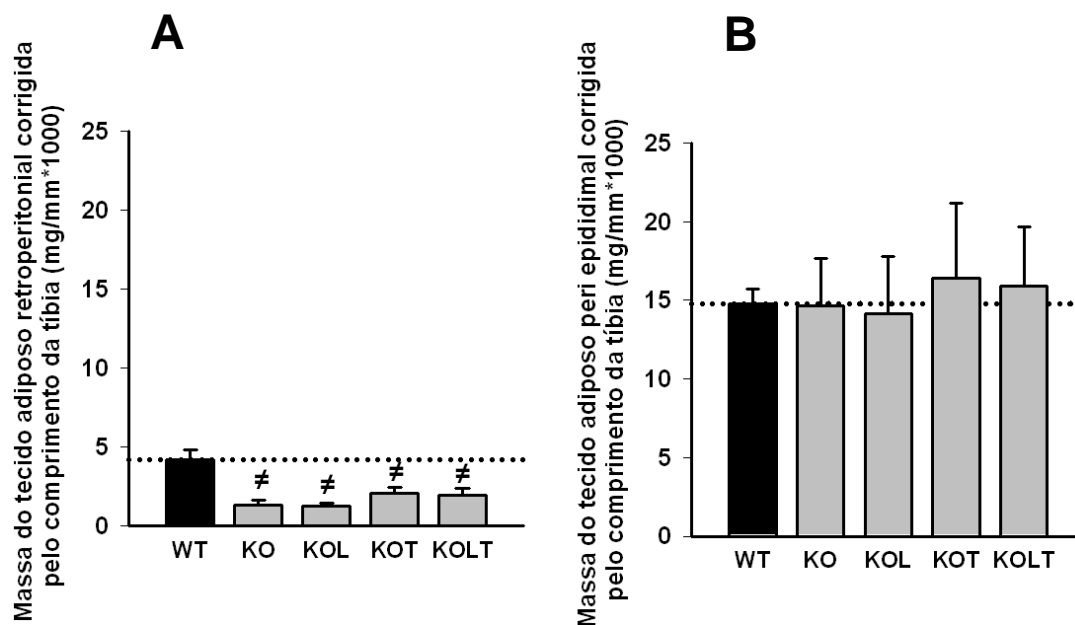


Figura 13. Massa do tecido adiposo corrigida pelo comprimento da tíbia. **Painel A:** Massa do tecido adiposo retroperitoneal corrigida pelo comprimento da tíbia em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=9); KO placebo (KO, n=9); KO suplementado com leucina (KOL, n=9), KO treinado (KOT, n=9); KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=9). **Painel B:** Massa do tecido adiposo periepididimal corrigida pelo comprimento da tíbia em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=9); KO placebo (KO, n=9); KO suplementado com leucina (KOL, n=9), KO treinado (KOT, n=8) KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=8). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. [#] versus WT ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

6.3 Parâmetros funcionais e morfológicos da musculatura esquelética

6.3.1 Testes funcionais

Os resultados apontados na figura 14 demonstraram que camundongos KO apresentam intolerância aos esforços em relação ao grupo WT e que o treinamento físico foi capaz de melhorar a tolerância ao esforço físico.

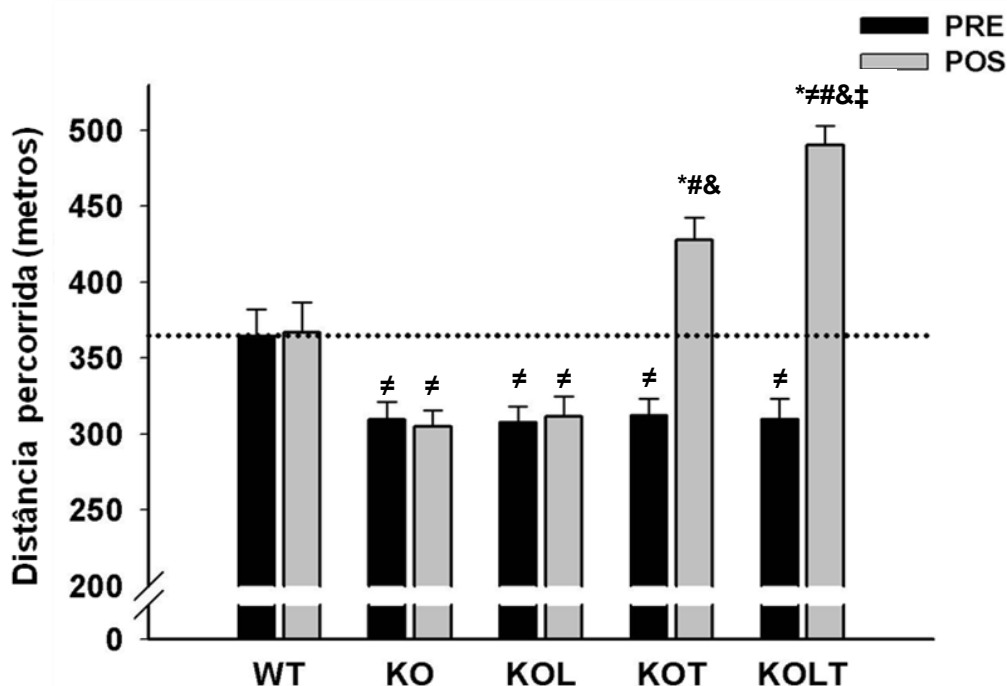


Figura 14. Teste de tolerância ao esforço físico nos camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=12), KO recebendo solução placebo (KO, n=12), KO suplementado com leucina (KOL, n=11), KO treinado (KOT, n=11) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=13). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média; # WT no mesmo período; # versus KO no mesmo período; & versus KOL no mesmo período; ‡ versus KOT no mesmo período; * pré versus pós ($p < 0,05$). ANOVA p/ medidas repetidas com post hoc de *Student Newman-Keuls*.

Podemos observar ainda que a leucina, sozinha, não foi capaz de induzir a melhora da capacidade física. Encontramos um aumento percentual na distância máxima percorrida maior no grupo KOLT (47% versus 28% no grupo KOT), bem como uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados pós do grupo KOLT quando comparado aos resultados pós do grupo KOT indicando efeito adicional da suplementação com leucina quando associada ao treinamento.

Para confirmar se esses resultados se reproduziam em outros testes funcionais, optamos por realizar mais três testes que avaliam o desempenho motor (Figura 15) e podemos perceber que animais com hiperatividade simpática apresentaram menor desempenho nos testes de deambulação (Figura 15B) e grip no sexto mês de idade (Figura 15C), mas não no rotarod (Figura 15A). Entretanto, ao sétimo mês o desempenho no rotarod piora

significativamente, demonstrando uma queda no desempenho motor ocorrido nos três testes, embora ocorram temporalmente distintas.

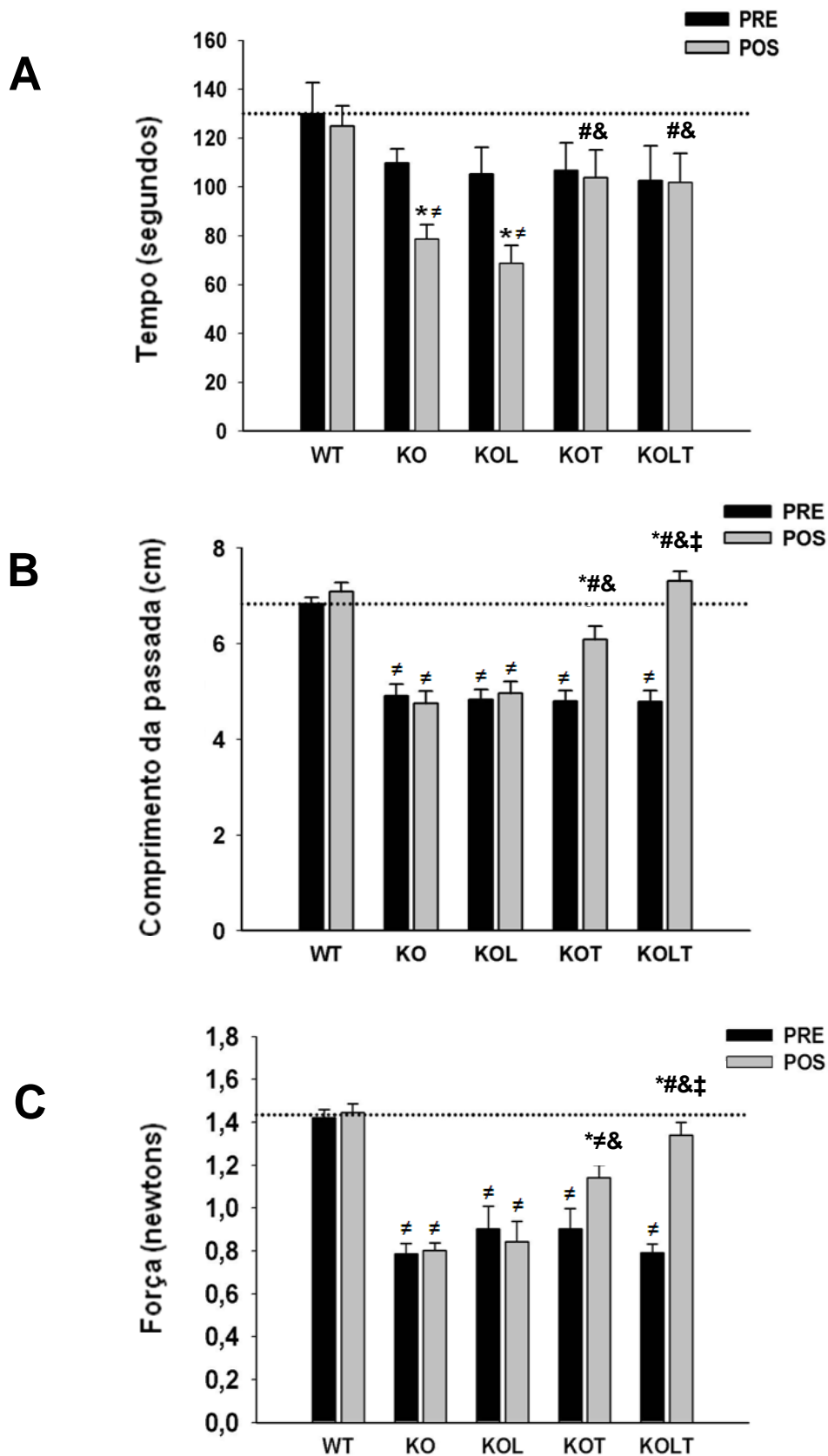


Figura 15. Testes de função muscular em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=9); KO placebo (KO, n=8); KO suplementado com leucina (KOL, n=8), KO treinado (KOT, n=8) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=9). **Painel A:** Teste de Rotarod; **Painel B:** Teste de

deambulação; **Painel C:** Teste de grip. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT no mesmo período; $\#$ versus KO no mesmo período; $\&$ versus KOL no mesmo período; \ddagger versus KOT no mesmo período; $*$ pré versus pós ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

A suplementação com leucina sozinha não mostrou ser efetiva em melhorar o desempenho em nenhum dos testes. O treinamento físico por sua vez, foi capaz de prevenir a piora do teste rotarod, sem efeitos adicionais da leucina. Quanto aos testes de deambulação e grip, pode se observar que o treinamento físico atenuou a queda de desempenho dos animais com IC, mas a associação leucina e treinamento físico geraram maior desempenho motor que o treinamento sozinho.

6.3.2 Estrutura morfofuncional da musculatura esquelética em camundongos com IC

Em relação às modificações morfológicas da musculatura esquelética podemos perceber na figura 16, uma redução da prevalência de fibras do tipo I (oxidativas, resistentes à fadiga) e o aumento de fibras do tipo II (glicolíticas, menos resistentes à fadiga) no músculo sóleo dos animais do grupo KO placebo.

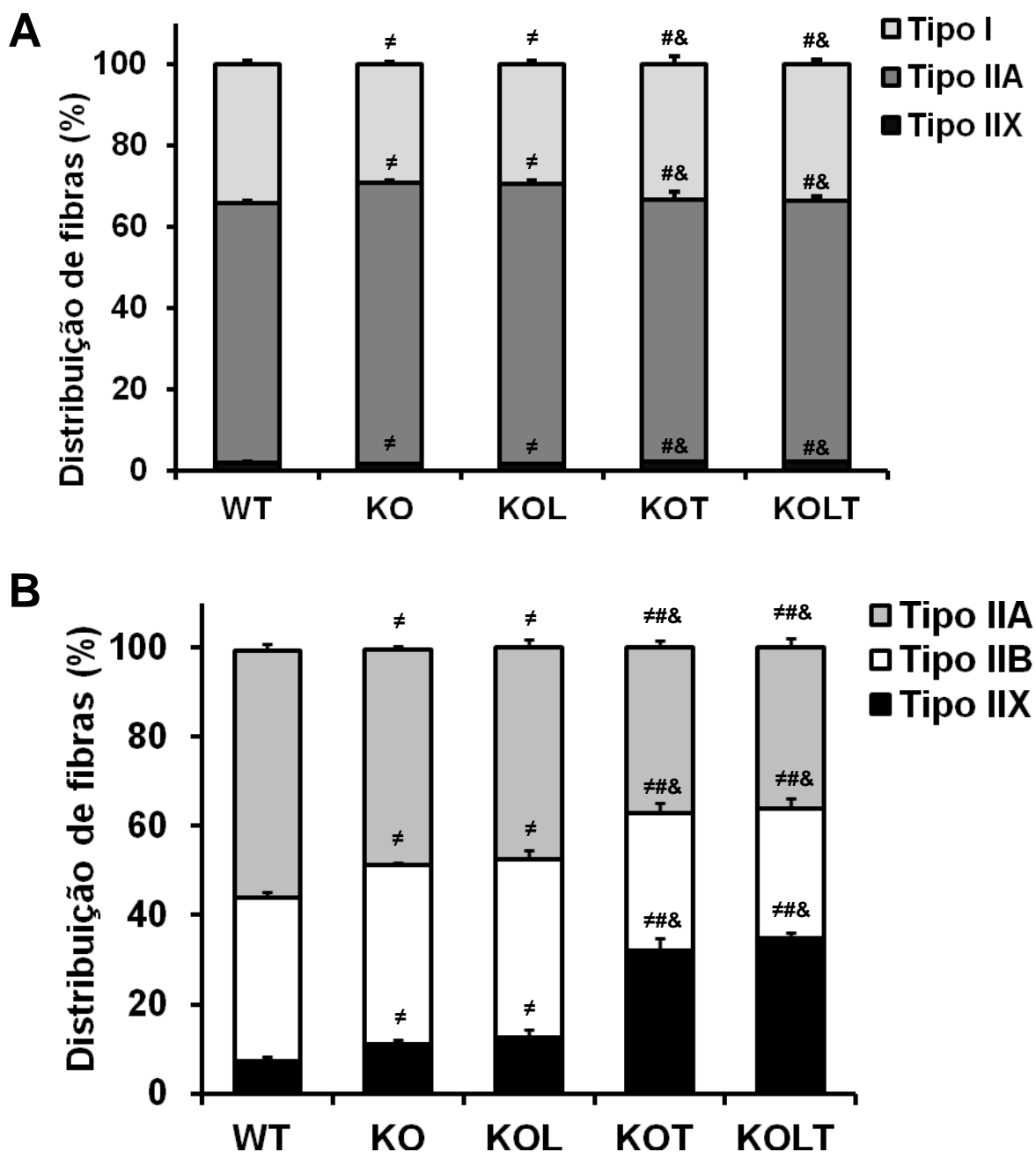


Figura 16. Distribuição percentual dos diferentes tipos de fibras musculares em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). **Painel A:** Distribuição das fibras musculares no músculo sóleo. **Painel B:** Distribuição das fibras musculares no músculo plantar. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

Podemos perceber que as alterações ocorrem nos três fenótipos de fibras no músculo sóleo, de maneira que aos sete meses de idade,

camundongos do grupo KO apresentam alteração no padrão de distribuição do tipo de fibra no músculo sóleo em direção a fibras mais glicolíticas. O treinamento físico preveniu as mudanças observadas no grupo KO, já que os grupos KOT e KOLT apresentaram a distribuição dos tipos de fibras praticamente restauradas em relação ao grupo WT. A suplementação com leucina de forma isolada, não foi capaz de reverter as alterações observadas no grupo KO, além de não serem observados efeitos adicionais da suplementação com leucina ao treinamento físico (Figura 16).

No músculo plantar, observa-se uma redução das fibras do tipo IIA, em detrimento do aumento das fibras do tipo IIB e IIX nos animais do grupo KO em relação ao grupo WT, o que sugere que as fibras estejam em processo de transição de fenótipo de IIA para IIB nos animais KO. Em contrapartida, os grupos KOT e KOLT apresentaram distribuição de fenótipo de forma similar, com aumento do percentual das fibras do tipo IIX em detrimento das fibras do tipo IIA e IIB, sugerindo que pode estar havendo um processo de transição de fenótipo no sentido IIB para IIA. Tal como no músculo sóleo, a suplementação com leucina, seja na forma isolada, ou associada ao treinamento, não demonstrou efeitos nessas características fenotípicas.

Outra característica observada na IC, bem documentada na literatura, é a perda de massa muscular, que se apresenta como uma séria consequência da IC uma vez que está associada com o aumento da morbidade e mortalidade nessa condição (ANKER ET AL., 1997). A atrofia pode ser determinada pela área de secção transversa (AST) e dessa forma analisamos a AST do músculo sóleo, nos três tipos de fibras: I, IIA e IIX (Figura 17) e no músculo plantar nos tipos de fibras IIA, IIB e IIX (Figura 18).

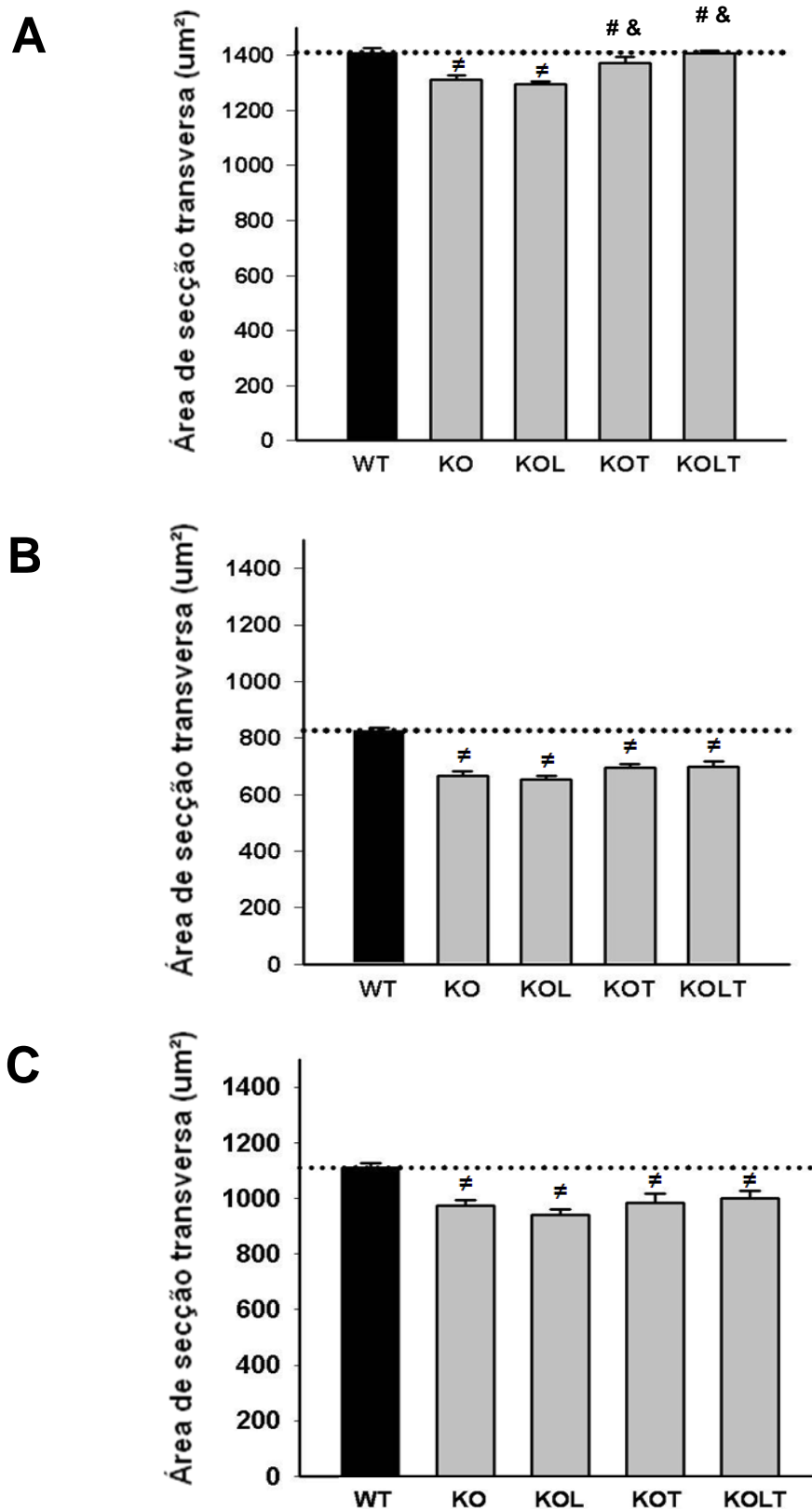


Figura 17. Área de secção transversa (AST) nos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo. **Painel A:** AST de fibras tipo I; **Painel B:** AST de fibras tipo IIA; **Painel C:** AST de fibras tipo IIX em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e

treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; $\#$ versus KO; $\&$ versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

Os dados da figura 17 demonstram que ocorre atrofia muscular no sétimo mês de idade nos camundongos KO, nos três fenótipos de fibras analisados no músculo sóleo e que a leucina, *per se*, não é capaz de atenuar essa atrofia. Com relação ao efeito do treinamento físico, ao contrário do que ocorre na AST nas fibras do tipo I, as do tipo IIA e IIX não sofrem alteração com o treinamento físico. A leucina não parece exercer influência na AST, nem mesmo quando adicionado ao treinamento físico.

As análises da AST das fibras do músculo plantar, por sua vez (figura 18), revelaram que a AST das fibras do tipo IIA, IIB e IIX apresentaram-se menor no grupo KO que o grupo WT. Entretanto, o treinamento físico foi capaz de não somente restaurar, mas aumentar a área das fibras do tipo IIA e IIX. Os resultados que mais chamam a atenção são: a ausência de efeitos da suplementação com leucina sozinha e os efeitos da associação da suplementação com leucina com o treinamento físico que parece ter efeitos sinérgicos, uma vez que as fibras do tipo IIA e IIB nos grupos KOLT apresentaram-se maiores que as encontradas no grupo KOT.

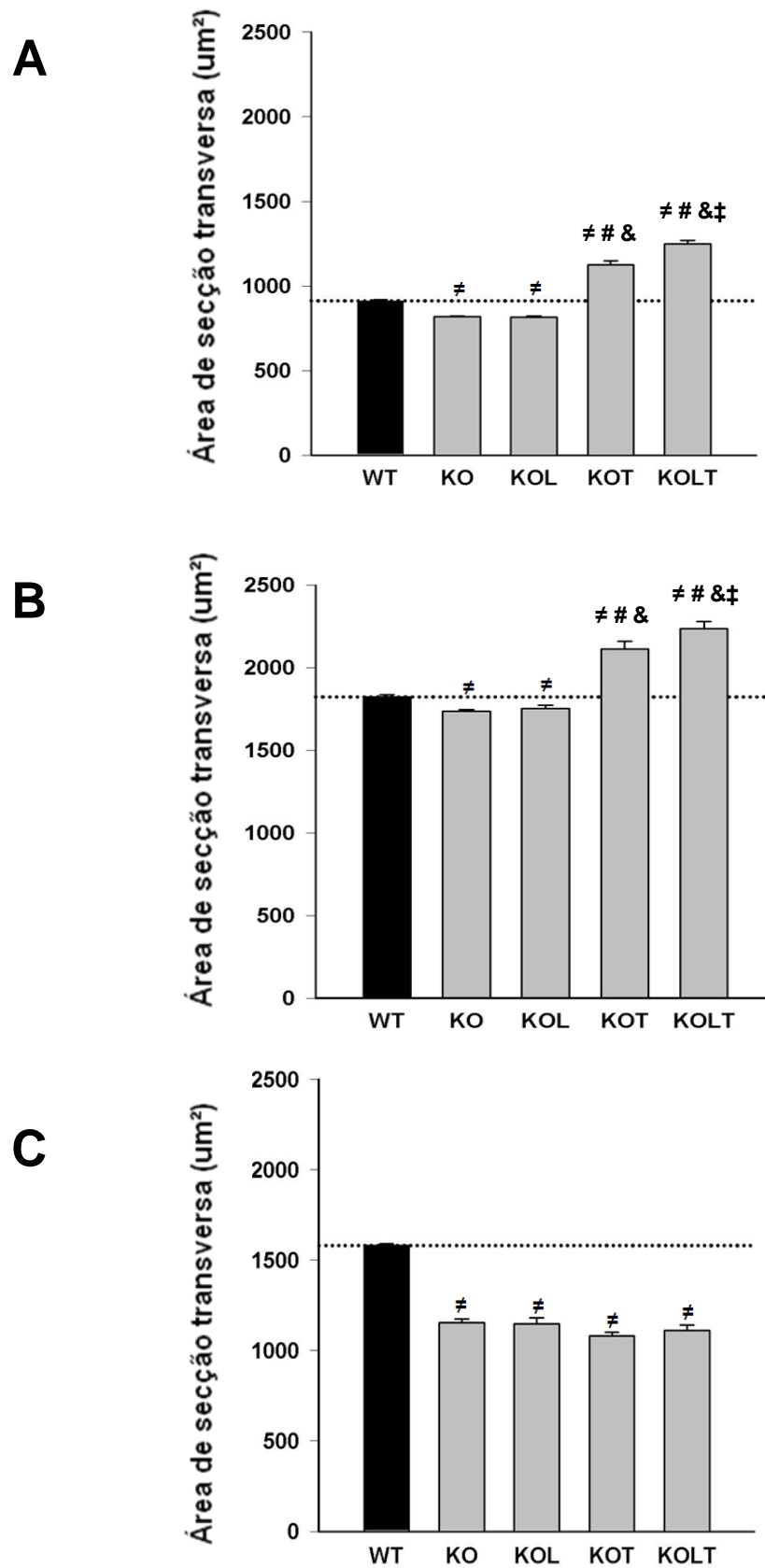


Figura 18. Área de secção transversa (AST) nos diferentes tipos de fibras no músculo plantar. **Painel A:** AST de fibras tipo IIA; **Painel B:** AST de fibras tipo IIB; **Painel C:** AST de fibras tipo IIX em camundongos dos diferentes grupos:

controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL; ‡ versus KOT. ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

Outra característica estrutural na musculatura esquelética, proeminente na IC, refere-se à rarefação capilar que pode contribuir ainda mais para a reduzida captação de oxigênio muscular periférico (NEGRAO; MIDDLEKAUFF, 2008). Corroborando esse fato, nós detectamos uma menor razão capilar/fibra muscular nos animais dos grupos KO e KOL em relação aos camundongos controle (Figura 19).

O treinamento físico aeróbico promoveu aumento significativo nesse parâmetro, como pode ser observado nos grupos KOT e KOLT e não foram observados efeitos adicionais da suplementação com leucina. A suplementação com leucina, de forma isolada, não alterou a razão capilar/fibra quando comparado ao grupo KO.

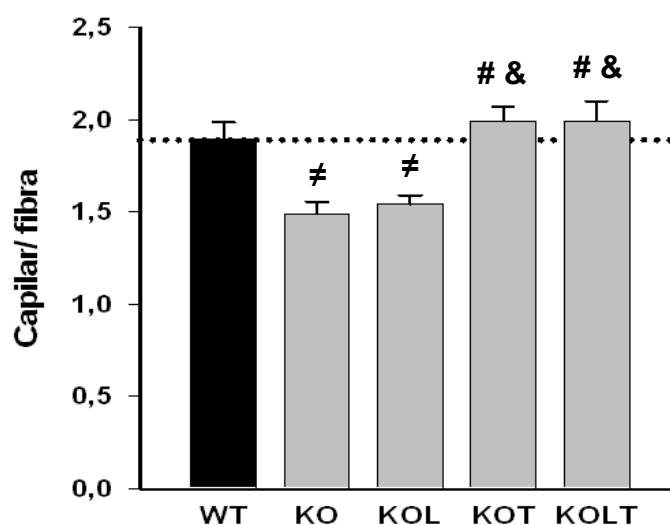


Figura 19. Razão capilar/fibra no músculo sóleo em camundongos dos diferentes grupos: controle (WT, n=7); KO placebo (KO, n=5); KO suplementado com leucina (KOL, n=5), KO treinado (KOT, n=5) e KO suplementado com leucina e treinado (KOLT, n=6). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. \neq versus WT; # versus KO; & versus KOL ($p < 0,05$). ANOVA com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls*.

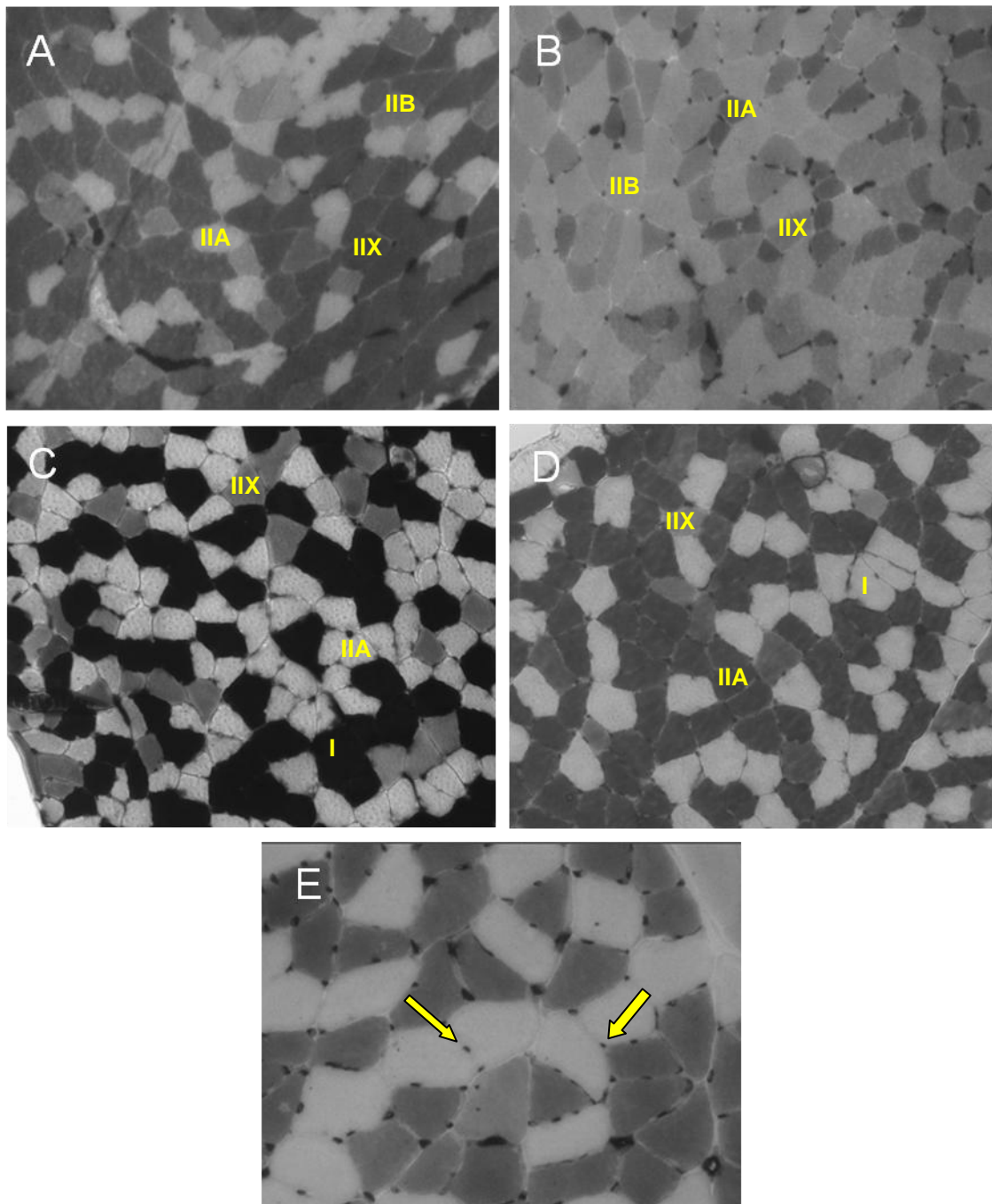


Figura 20. Exemplos de área de secção transversa em camundongos, utilizando reação histoquímica para miosina ATPase. Pré incubação em pH 4.6 no músculo plantar (A) e músculo sóleo (C) e pH 10.3 no músculo plantar (B) e músculo sóleo (D). Fibras tipo I, IIA, IIX foram identificadas em músculo sóleo e fibras tipo IIA, IIX, e IIB identificadas em músculo plantar. Capilares (setas amarelas) no músculo soleo (E) em pH 10.3.

6.4 Expressão de proteínas envolvidas na via da mTOR

Até então, os resultados haviam demonstrado que a suplementação com leucina sozinha não atenuava a atrofia nem a função muscular, mas quando associada ao treinamento físico esta apresentava efeitos superiores quando comparado ao grupo apenas treinamento físico. Sabe-se que em vários estados atróficos, a musculatura esquelética também apresenta uma resposta a estímulos anabólicos como treinamento físico e suplementação com aminoácidos prejudicadas (TOTH ET AL., 2010; BREEN; PHILLIPS, 2011; CHEN ET AL., 2011), a partir disso e buscando explicação para achados não esperados de nosso estudo, já que tínhamos expectativas de que a suplementação com leucina sozinha fosse atenuar a atrofia muscular e melhorar tolerância aos esforços, testamos se animais α_{2A}/α_{2C} ARKO em fase avançada de cardiomiopatia (7 meses), responderiam de forma similar aos animais controles e se o estímulo mecânico (na forma de treinamento físico aeróbico) influenciaria essa resposta. Para isso, avaliamos a expressão de proteínas envolvidas na via mTOR nos músculos sóleo e plantar em resposta à uma única dose de leucina (1,35g/kg).

Nas figuras 21 e 22, podemos perceber o grupo KO estava com a sinalização dessa via atenuada em resposta à leucina em relação ao grupo controle, como podemos observar na menor relação p-p70S6K:p70S6K (~43% menor no sóleo e ~57% no plantar), p-4EBP1:4EBP1 (~26% menor no sóleo e 66% no plantar) e maior de um antagonista da via, p-AMPK:AMPK (~113% maior no sóleo e 44% no plantar). O treinamento físico preveniu o déficit de resposta anabólica à suplementação com leucina conforme observado pelo aumento da relação p-p70S6K:p70S6K (~71% maior no sóleo e ~86% no plantar). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre KOT e KO na relação p-4EBP1:4EBP1 no músculo sóleo, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos KOT e WT o que sugere que o treinamento físico promoveu uma melhor resposta anabólica à leucina, pelo menos parcial. Em contrapartida, no músculo plantar, a relação p-4EBP1:4EBP1 foi de ~38% maior no grupo KOT em relação ao grupo KO. Além disso, o treinamento físico reduziu p-AMPK: AMPK (~70% maior no sóleo e ~75% no plantar) nos grupos KOT em relação ao KO. Por motivos

metodológicos não conseguimos a detecção da proteína mTOR na membrana de forma a possibilitar quantificá-la, o que será realizado futuramente.

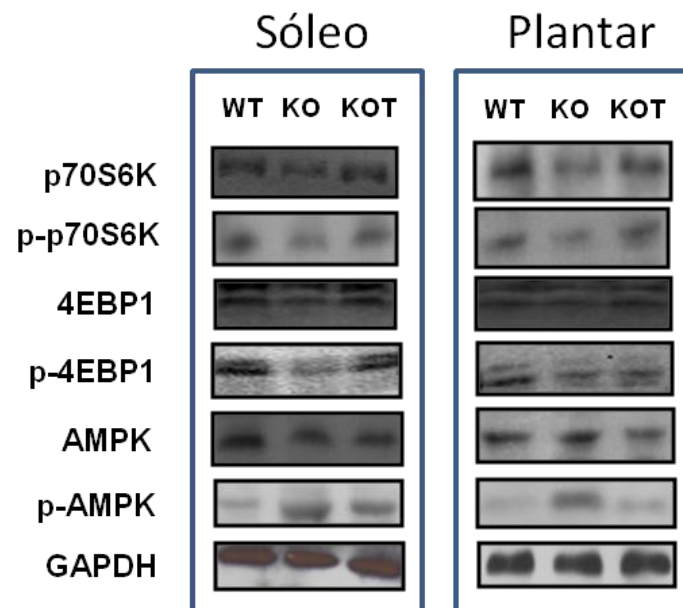


Figura 21: Imagens representativas dos imunoblots de p70S6K, p-p70S6K, 4EBP1, p-4EBP1, AMPK, p-AMPK, e GAPDH nos músculos sóleo e plantar de camundongos controle (WT, n=5), grupo que recebeu uma única dose de leucina (KO, n=5), grupo treinamento que recebeu uma única dose de leucina (KOT, n=5), aos sete meses de idade.

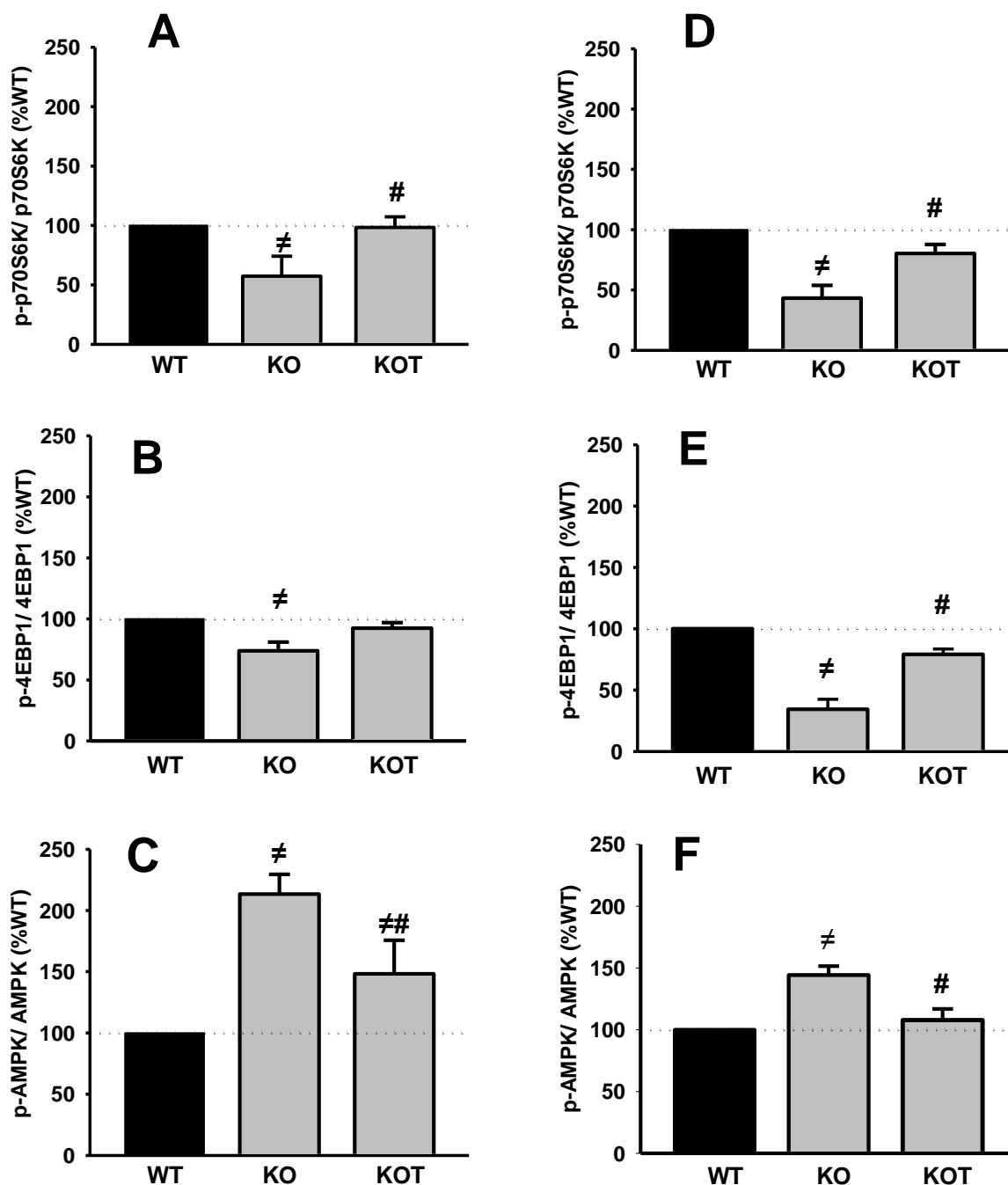


Figura 22. Expressão de proteínas no músculo sóleo (painéis A, B, C) e plantar (painéis D, E, F) em camundongos controle (MCKENZIE ET AL.) e com ablação dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos. Painel A: Relação p-4EBP1:4EBP1 em sóleo; Painel B: Relação p-p70S6K: p70S6K. em sóleo. Painel C: Relação p-AMPK: AMPK em sóleo p-4EBP1:4EBP1 em plantar; Painel E: Relação p-p70S6K:p70S6K em plantar. Painel F: Relação p-AMPK: AMPK em plantar. Dados são demonstrados como percentual (%) dos valores encontrados no grupo WT. Todos os grupos receberam uma dose de leucina. Grupo controle (MCKENZIE ET AL.), com ablação dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) e KO treinado (Kotler) aos sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$). ≠ versus WT; # versus KO.

6.5 Parâmetros renais

Para verificar se os animais α_{2A}/α_{2C} ARKO já apresentavam alguma alteração na função renal e se os diferentes tratamentos influenciaram nesta, nós avaliamos a função renal de maneira que os resultados desses parâmetros podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3. Marcadores de função renal no grupo wild type (WT), KO que recebeu solução placebo (KO), KO suplementado com leucina (KOL), KO que recebeu solução placebo e treinamento (KOT) e KO suplementado com leucina e treinamento (KOLT) aos sete meses de idade. Os resultados estão apresentados como média±desvio padrão ou apresentados em mediana [intervalo interquartis]. Análise de variância (ANOVA) com *post-hoc* de *Student-Newman-Keuls* ($p \leq 0,05$) ou ANOVA por postos de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn ($p \leq 0,05$). ≠ Representa diferença significativa *versus* WT; # *versus* KO; & *versus* KOL; ‡ *versus* KOT. Os números entre parênteses expressam o n para cada grupo.

Parâmetro	WT	KO	KOL	KOT	KOLT
Massa renal ¹ (mg/mm*1000)	0,17±0,01 (7)	0,17±0,01 (8)	0,18±0,02 (9)	0,18±0,03 (8)	0,19±0,03 (8)
Ingestão hídrica (ml/dia)	3,00[3,00-3,17] (7)	3,20[3,20-3,20] (7)	3,00[2,93-3,08] (7)	3,15[3,03-3,20] (7)	3,00[2,93-3,23] (7)
Creatinina plasmática (mg/dl)	0,34±0,06 (8)	0,38±0,02 (8)	0,38±0,05 (8)	0,36±0,04 (8)	0,37±0,08 (8)
Uréia plasmática (mg/dl)	35,91±7,95 (8)	40,74±7,49 (8)	39,54±9,30 (8)	36,00±7,96 (8)	36,05±9,28 (8)
Creatinina urinária (mg/dl)	3,98±0,93 (8)	3,27±0,49 (8)	3,12±0,51 (8)	4,44±1,16#& (8)	4,52±0,64#& (8)
Clearence de creatinina (ul/min/kg)	9,71±1,81 (7)	12,27±3,91 (8)	9,20±2,34 (8)	18,04±3,93#& (7)	17,62±6,55#& (7)
Proteinúria (mg/24h)	2,68±1,22 (7)	10,32±2,50≠ (8)	9,06±1,47≠ (8)	6,07±3,43#& (7)	5,01±1,67#& (7)
pH urinário	6,62[6,42-6,68] (7)	6,25[6,21-6,26]≠ (7)	6,25[6,20-6,27]≠ (7)	6,42[6,39-6,46]#& (7)	6,42[6,39-6,45]#& (7)
Proteína/creatinina urinária	0,53[0,39-0,90] (7)	3,07[2,72-3,56]≠ (8)	2,83[2,48-3,33]≠ (8)	1,15[0,64-1,70] (7)	0,87[0,78-1,41]# (7)
Diurese (ml/24h)	1,61±0,36 (8)	2,28±0,45≠ (8)	1,91±0,31 (8)	2,53±0,60#& (7)	2,21±0,36≠ (7)

1. Massa renal corrigida pelo comprimento da tíbia (mm)

Pode se perceber que os parâmetros massa renal, ingestão hídrica, creatinina e uréia plasmática não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de creatinina urinária e o clearance de creatinina também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos KO e KOL para os camundongos selvagens. Em contraste, o treinamento físico demonstrou efeito pronunciado sobre os níveis de creatinina urinária e no clearance de creatinina, aumentando-os nos grupos KOT e KOLT. Outro resultado que chama a atenção são os elevados índices de proteinúria acompanhados de baixos níveis de pH urinários nos grupos KO e KOL sugerindo comprometimento da função renal. O treinamento físico, mas não a suplementação com leucina atenuou pronunciadamente esses marcadores.

6.6 Análise de sobrevida

Utilizando o método de Kaplan-Meier, nós analisamos a sobrevida (Figura 23) durante a realização do tratamento de todos os animais utilizados.

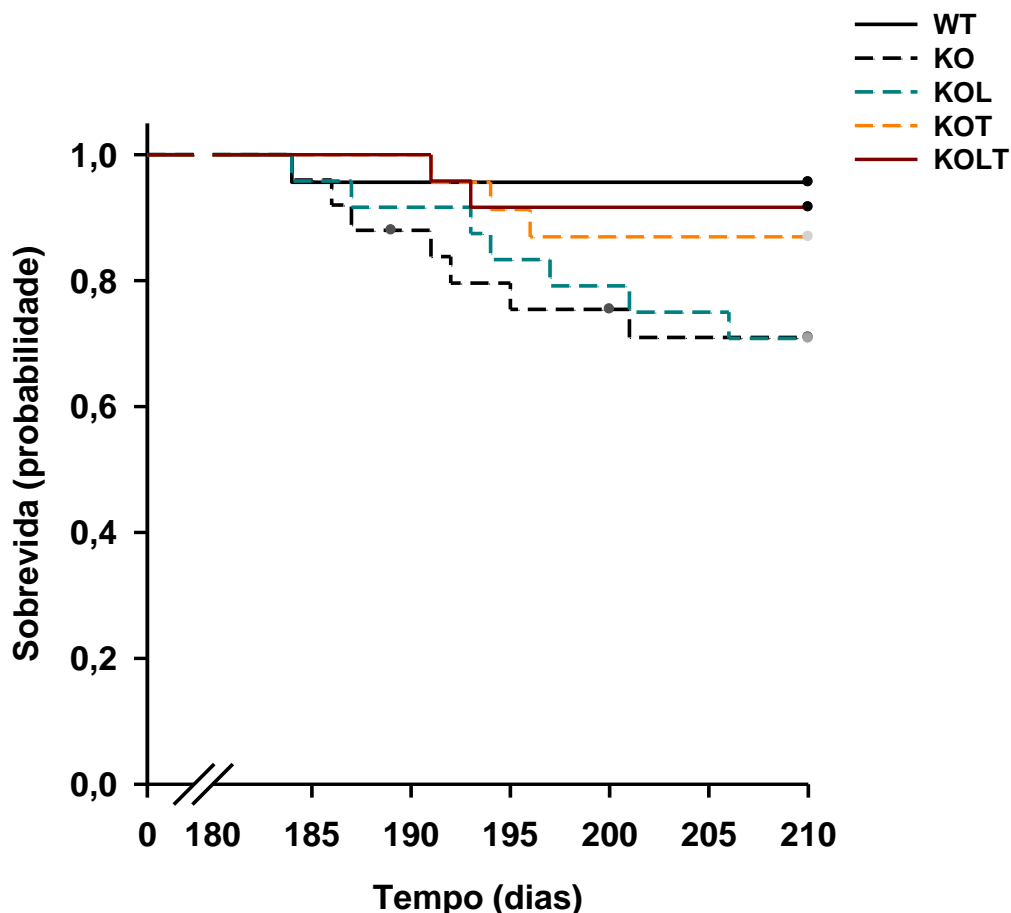


Figura 23. Curva de sobrevivência de camundongos controle (WT, n=23) e com ablação dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos. Grupo que recebeu solução placebo (KO, n=25), suplementado com leucina (KOL, n=24), solução placebo e treinamento (KOT, n=23), e suplementado com leucina e treinamento (KOLT, n=24) aos sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pelo Teste de Log-Hank ($p=0,08$).

Embora não tenhamos encontrado diferença estatisticamente significativa entre a sobrevivência nos diferentes grupos, provavelmente pelo “n” reduzido para esse tipo de análise e um curto tempo de intervenção, pode ser observada uma tendência que não deve ser desprezada dos animais dos grupos KO e KOL terem uma sobrevivência ~72% aos 30 dias de experimento (correspondendo a 210 dias de idade), bem como dos grupos KOT e KOLT (~87% e 92%, respectivamente), que apresentaram uma curva com valores próximos ao grupo WT (96%).

6.7 Sumário dos resultados

Os resultados demonstrados acima sugerem que camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO têm:

- sinais evidentes de IC, como frequência cardíaca mais elevada no repouso, função do ventrículo esquerdo prejudicada e presença de edema pulmonar e hepático, além de melhor tolerância à glicose e níveis de TNF- α plasmáticos mais elevados;
 - menor massa corporal e, embora ingiram a mesma quantidade de ração, têm menor eficiência alimentar;
 - maior intolerância aos esforços e função muscular prejudicada, além de aumento da prevalência de fibras glicolíticas, atrofia em todos os tipos de fibras musculares (I, IIA, IIX no músculo sóleo e IIA, IIB, IIX no músculo plantar), bem como rarefação vascular no músculo sóleo;
 - apresentaram uma sinalização anabólica atenuada nos músculos sóleo e plantar em resposta à uma dose de leucina e elevada proteinúria;
- O treinamento físico foi eficiente em:
- induzir bradicardia de repouso a partir da quarta semana e atenuar a perda de função ventrículo esquerdo, além de restaurar alguns sintomas clássicos da IC como edema pulmonar bem como reduzir edema hepático; melhorar a tolerância à glicose e prevenir a elevação dos níveis de TNF- α plasmático;
 - Aumentar a eficiência alimentar sem alterar a massa corporal e o Índice de Lee, bem como a quantidade de alimento ingerida; Melhorar a tolerância ao esforço e o desempenho motor, prevenir a transição para um fenótipo mais glicolítico, a rarefação vascular e a atrofia nas fibras do tipo I no músculo sóleo e tipo IIA e IIB no músculo plantar;
 - aumentar a sinalização da via mTOR nos músculos sóleo e plantar em resposta à uma dose de leucina;
 - alterar a função renal, diminuindo a proteinúria e aumentando o clearance de creatinina;
 - a suplementação com leucina, isoladamente, não provocou alterações significativas nos parâmetros mencionados acima, mas associada ao

treinamento físico, potencializou os efeitos deste último na tolerância ao esforço e no desempenho motor, além de aumentar a área de secção transversa nas fibras IIA e IIB do músculo plantar.

7. Discussão

Esse foi o primeiro estudo que investigou os efeitos da suplementação com leucina em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, que desenvolvem cardiopatia gradual e progressiva, tornando-se grave aos sete meses de idade (BRUM ET AL., 2002) e que foi confirmada em nosso estudo através de sinais clínicos *in vivo* como reduzida fração de encurtamento, taquicardia basal e intolerância aos esforços físicos e *post-mortem* como congestão hepática e pulmonar, o que corrobora achados anteriores do Laboratório e a caracteriza como IC eminentemente congestiva (FERREIRA ET AL., 2007; ROLIM ET AL., 2007). Interessante ressaltar que o fato de não encontrarmos alterações significativas na massa das câmaras cardíacas normalizada pelo comprimento da tíbia, não compromete o diagnóstico de IC, pois estes parâmetros não levam em consideração a estrutura do tecido cardíaco. Além disso, trabalhos anteriores do grupo demonstraram aumento na fração de colágeno cardíaco e perda de cardiomiócitos em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, quando comparado com o grupo controle, nesta mesma faixa etária (ROLIM ET AL., 2007; BARTHOLOMEU ET AL., 2008).

No presente estudo, observamos reduzidos valores de massa corporal e do Índice de Lee, considerado para roedores, um análogo ao IMC em humanos (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). A redução desses dois parâmetros nos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO, parece estar relacionada, além da perda de massa muscular (discutida mais adiante), à menor massa gorda destes animais, uma vez que observamos uma redução significativa no peso da gordura retroperitoneal, provavelmente em virtude da hiperatividade simpática presente nesses animais, levando a uma atividade lipolítica exacerbada (COLLINS; SURWIT, 2001). A redução da massa corporal e índice de Lee também não podem ser explicados simplesmente pela ingestão energética já que animais com IC não ingeriram quantidades significativamente menores de alimento.

A redução da massa corporal na IC tem sido associada à preservação do metabolismo protéico muscular (AQUILANI ET AL., 2011) e ao pior prognóstico nessa população (ANKER ET AL., 2003; KENCHIAH ET AL., 2007; GUDER ET AL., 2009), sendo um preditor de mortalidade independente de outros fatores como idade, gênero e classe funcional (OREOPOULOS ET AL., 2008). Portanto, apesar do aumento da massa corporal ser, nesse aspecto, desejável, nenhuma das intervenções utilizadas em nosso estudo foi capaz de alterá-lo. É possível que os efeitos do treinamento físico, nesse parâmetro, tenham sido “mascarados” pela concomitante redução de transudato em concordância aos indicadores de edema pulmonar e hepático diminuídos.

O treinamento físico foi a única intervenção eficaz em diminuir a presença de edema pulmonar e hepático. A redução da intensidade desses sinais clínicos apresenta relevância clínica considerável. Por exemplo, tem-se especulado que o déficit funcional observado na musculatura respiratória, notadamente no diafragma, pode ser atribuído aos pulmões congestos (LOPES FDA ET AL., 2008). Além disso, a congestão visceral pode prejudicar a absorção de nutrientes (KING ET AL., 1996; SANDEK ET AL., 2009) e contribuir para o elevado grau de inflamação na IC (ANKER ET AL., 1997; SANDEK ET AL., 2009). Ressalta-se ainda que a presença de edema anula os efeitos “protetores” da massa corporal preservada (OREOPOULOS ET AL., 2008). Assim, a melhora desses sinais pode refletir a melhora não apenas da bomba cardíaca, mas também a melhora sistêmica.

Um achado interessante foi a respeito da eficiência alimentar, uma quantificação indireta da capacidade do animal transformar a ração consumida em massa corporal, que estava muito reduzida nos animais com IC e o treinamento físico foi a única intervenção capaz de aumentá-la. Diferentemente de nossos achados, nos quais apenas o treinamento físico foi capaz de aumentá-la, em outros modelos experimentais de caquexia (Salomão, 2005; Salomão et al., 2011) foi demonstrado que tanto a suplementação com leucina como o treinamento físico aumentam a eficiência alimentar. Nos grupos KOT e KOLT, esperávamos um aumento do consumo energético para justificar o aumento da eficiência alimentar. Entretanto, como isso não ocorreu, não pode ser descartada a possibilidade de subaproveitamento de nutrientes nos animais

dos grupos KO e KOL, diferentemente dos grupos KOT e KOLT que foram restauradas com o treinamento físico. De fato, na IC, a absorção de nutrientes a nível intestinal está prejudicada (CELIK ET AL., 2010). Outra possibilidade é que esse subaproveitamento não seja restrito apenas ao nível intestinal. Um estudo (KATO ET AL., 2011) que utilizou modelo de caquexia cardíaca “Dahl salt-sensitive” demonstrou que o fígado desses animais, apesar de incorporar mais glicose, apresentava capacidade de gliconeogênese reduzida. Esses dados sugerem que o treinamento físico pode ser uma ferramenta interessante no sentido de melhorar as “desordens nutricionais” como anorexia e desnutrição, frequentes na IC (VON HAEHLING; DOEHNER; ANKER, 2007; KALANTAR-ZADEH ET AL., 2008).

Ainda corroborando manifestações clínicas da IC, um dos marcadores de presença ou gravidade da síndrome mais utilizado é a intolerância à realização de esforço físico, definida como redução na capacidade de realizar exercício físico dinâmico, limitado por sintomas como dispnéia e/ou fadiga periférica (PIEPOLI ET AL., 2010). O teste progressivo em esteira até a exaustão revelou que a capacidade de exercício nos animais α_{2A}/α_{2C} ARKO estava reduzida em concordância aos achados prévios do nosso Laboratório (BACURAU ET AL., 2009; BUENO ET AL., 2010; VANZELLI ET AL., 2010). Esse prejuízo funcional é causado por uma redução na função cardíaca, no fluxo sanguíneo periférico e prejuízo funcional e metabólico da musculatura esquelética (BRUM ET AL., 2011).

Embora não seja novidade o fato de o treinamento físico melhorar a capacidade física, até então, em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, em fase mais avançada de IC, isso havia sido demonstrado apenas através de protocolos com oito semanas de duração, com início a partir da quinta semana (ROLIM ET AL., 2007; BACURAU ET AL., 2009; BUENO ET AL., 2010; VANZELLI ET AL., 2010). Nesse sentido, era possível que um protocolo com duração reduzida, como o nosso, algumas adaptações provenientes do treinamento físico não fossem tão evidentes. De fato, Rolim e cols. (2007) demonstraram que camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO apresentavam bradicardia de repouso apenas na sétima semana de treinamento, ao contrário dos nossos resultados nos quais encontramos a bradicardia de repouso a partir da quarta semana. Esse fato pode ser atribuído

a dois aspectos: o início do tratamento de nosso estudo foi com idade mais avançada (seis meses de idade), portanto a hiperatividade simpática provavelmente já estaria mais exacerbada que na quinta semana, o que pode ter gerado uma maior resposta para esse parâmetro ao exercício em nosso estudo. Outro ponto é que, o volume de treinamento total semanal utilizado em nosso protocolo foi maior, já que utilizamos um dia a mais na semana (seis dias na semana), diferente dos cinco dias realizado por Rolim e cols., o que pode ter contribuído para a redução na frequência cardíaca precocemente. Não obstante, outros parâmetros confirmaram a eficiência do protocolo de treinamento físico utilizado por nós como melhora da função cardíaca, tolerância ao esforço e capilarização no músculo sóleo.

Esperávamos que a leucina, ainda que sozinha, fosse capaz de melhorar a capacidade de esforço e que este seria efeito indireto de uma provável manutenção da massa muscular. Outros estudos demonstraram que a suplementação aguda com BCAAs aumentava a capacidade de esforço através do incremento da anaplerose muscular (CALDERS ET AL., 1997; CROWE; WEATHERSON; BOWDEN, 2006). Contudo, é improvável que esse mecanismo tenha influenciado, já que a suplementação foi realizada sempre após as sessões de treino, bem como da realização do teste máximo, a fim de evitar uma possível interferência aguda da leucina suplementar. A associação do treinamento aeróbico com a leucina foi a intervenção mais interessante no sentido de potencializar a tolerância aos esforços, o que se deve, prioritariamente, aos efeitos periféricos, já que os grupos KOT e KOLT melhoraram de forma similar a função ventricular esquerda, mas o grupo KOLT melhorou a tolerância aos esforços de forma mais acentuada, paralelamente à melhora da função muscular. De fato, a função muscular é um dos principais determinantes da capacidade de esforço na IC (LUNDE ET AL., 2001). Em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, essa disfunção está associada ao desequilíbrio entre proteínas envolvidas na liberação/recaptação de cálcio do retículo sarcoplasmático, independente do tipo de fibra muscular (BUENO ET AL., 2010). Além disso, um desequilíbrio entre a produção exacerbada das espécies reativas de oxigênio em detrimento dos sistemas de defesa antioxidantes, tal como ocorre em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO (BACURAU ET AL., 2009), parece contribuir de forma significativa para a disfunção muscular observada na IC,

provocando a perda de capacidade contrátil muscular através de diversos mecanismos como oxidação direta de proteínas contráteis, de alteração da função do retículo sarcoplasmático, bem como da função mitocondrial (DALLA LIBERA ET AL., 2005; SUPINSKI; CALLAHAN, 2007). Assim como no teste máximo, o fato de a leucina não produzir efeitos no desempenho motor quando administrada sozinha foi inesperado. Contraditoriamente, estudo com camundongos sugerem que a suplementação com BCAAs (1,5g/kg/dia por 9 meses) melhora a função muscular avaliada através do teste rotarod (D'ANTONA ET AL., 2010); em outro estudo envolvendo modelo de caquexia do câncer com dieta hiperprotéica enriquecida com leucina e óleo de peixe houve melhora da função muscular avaliada ex-vivo independente de massa muscular envolvida (VAN NORREN ET AL., 2009). O treinamento físico, por sua vez, foi capaz de prevenir a piora no desempenho motor corroborando dados recentes do nosso grupo (BUENO ET AL., 2010), que, utilizando um protocolo de treinamento físico aeróbico com oito semanas de duração, demonstraram uma melhora significativa no desempenho nos testes de rotarod e de deambulação. Nossos achados também evidenciaram que a suplementação com leucina potencializa os efeitos do treinamento físico na função muscular. Esses efeitos adicionais da leucina ao treinamento podem não envolver apenas o aumento da massa muscular. D'antona e cols. (2010), por exemplo, demonstraram que a suplementação com BCAAs aumentou o desempenho no teste de rotarod e a expressão de proteínas envolvidas com a biogênese mitocondrial em miócitos esqueléticos, culminando em aumento das enzimas de defesa antioxidante, mas que estes efeitos eram ainda maiores quando a suplementação era associada a um período de quatro semanas de treinamento aeróbico de moderada intensidade. Corroborando esses dados, foi relatado que a suplementação com leucina aumenta a síntese protéica pós-prandial mitocondrial em ratos (GUILLET ET AL., 2004) e aumenta atividade da enzima antioxidante superóxido desmutase (SOD) (BROCCA ET AL., 2008), mas os mecanismos exatos pelos quais a suplementação com BCAA pode alterar a função mitocondrial ainda não estão claros. Tem se sugerido que os mecanismos podem ser dependentes e não-dependentes de mTOR (VALERIO; D'ANTONA; NISOLI, 2011).

Além da disfunção muscular observada na IC, algumas alterações na morfologia das fibras musculares já bem descritas na literatura em roedores e humanos (SULLIVAN ET AL., 1997; LUNDE ET AL., 2001; TOTH ET AL., 2005; BACURAU ET AL., 2009), como uma transição de fenótipo mais oxidativo para um mais glicolítico (I→ IIA→IIX no músculo sóleo e IIA→IIX→IIB no músculo plantar) e uma rarefação capilar no músculo sóleo também foi observado. O treinamento físico, mesmo realizado com um volume menor total (quatro semanas), restabeleceu o padrão das fibras para um fenótipo mais oxidativo, similarmente aos resultados encontrados previamente no Laboratório (BACURAU ET AL., 2009). A rarefação vascular observada no músculo sóleo nos grupos KO e KOL também foi prevenida pelo treinamento físico. Essa alteração pode refletir uma melhora da perfusão periférica, como observado em pacientes com IC, e que ocorrem tão pronunciadamente, podendo ser observadas mesmo em membros não ativados pelo exercício (ROVEDA ET AL., 2003). Como esperado, a leucina parece não ser suficiente para promover modificações nesses parâmetros.

Outra característica estrutural nos músculos e determinante importante da capacidade de tolerar esforços na IC é a massa muscular (HARRINGTON ET AL., 1997; TOTH ET AL., 1997), que em estados avançados, pode culminar em caquexia, que, por sua vez, além de dificultar a realização das tarefas cotidianas, pode prolongar o tempo de hospitalizações (RICH ET AL., 1989), aumentar as chances de complicações após procedimentos cirúrgicos (ABEL ET AL., 1976; VAN VENROOIJ ET AL., 2011) e aumentar a mortalidade em pacientes com baixa capacidade física (ANKER ET AL., 1997). Confirmada através da medida da área de secção transversa (AST), a atrofia ocorreu nos diferentes tipos de fibras nos músculos sóleo e plantar, em concordância aos achados prévios de nosso Laboratório (BACURAU ET AL., 2009).

O treinamento físico, mesmo apesar de aeróbico, e não gerar hipertrofia muscular em indivíduos saudáveis (BOOTH; THOMASON, 1991), pode culminar em uma maior preservação da massa muscular, pelo restabelecimento homeostático, em condições patológicas (BACURAU ET AL., 2009). Esse restabelecimento é observado em resposta à diversos mecanismos que estão diretamente relacionados à atrofia muscular como uma melhora no balanço entre citocinas anti-inflamatórias: inflamatórias, entre hormônios anabólicos:

catabólicos, aumento dos sistemas de defesa antioxidantes, e, provavelmente, à melhor resposta à estímulos anabólicos como ingestão alimentar (LENK; SCHULER; ADAMS, 2010; BRUM ET AL., 2011). Em trabalho do Laboratório em andamento, camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO após treinamento físico, apresentaram alteração da expressão gênica de componentes do sistema ubiquitina-proteassoma, concomitantemente à uma maior expressão protéica de AKT, o que sugere ajustes entre vias de síntese e degradação, refletindo uma tentativa de restabelecimento do trofismo muscular. Dessa forma, pode-se justificar os aumentos da AST nas fibras do tipo I no músculo sóleo e do tipo IIA e IIB no músculo plantar nos grupos KOT e KOLT.

Talvez o resultado mais inesperado do presente estudo tenha sido o fato de que a suplementação com leucina, sozinha, não foi capaz de atenuar a perda de massa muscular em nenhum dos tipos de fibras. Nesse sentido, não podemos desprezar a relação entre os três BCAAs. Na ração oferecida aos animais do presente estudo, a relação leucina: valina: isoleucina era de 2:1:1, mas com a suplementação, estes foram de 3,5:1:1, portanto, pode ter ocorrido um desbalanço na relação entre os outros dois BCAAs. Uma redução plasmática de valina e isoleucina (NAIR ET AL., 1992; TOM; NAIR, 2006), um fenômeno conhecido como “paradoxo da leucina”, pode ser explicado pelo aumento do produto de sua transaminação, o KIC, que inibe a atividade de BCKD cinase e conseqüentemente o aumento da atividade do complexo BCKDH depletando os cetoácidos dos outros aminoácidos e alterando a disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica (PAXTON; HARRIS, 1984; SHIMOMURA; HARRIS, 2006).

O treinamento físico por sua vez, “reverteu” a resposta à leucina, sugerindo uma interação entre os efeitos do treinamento físico e o estímulo nutricional. Assim, o treinamento físico, por regular homeostaticamente a célula, poderia gerar um ambiente favorável aos efeitos da leucina no interior celular. Portanto, a simples presença de doses elevadas de leucina no plasma, não seria o determinante “primário” das respostas da leucina na célula, mas o estado homeostático da célula seria o determinante da resposta à presença de leucina. Isso nos remete a possibilidade da existência de receptores específicos à leucina na membrana plasmática, os “transceptores” (transportadores e receptores), que ajustariam a quantidade de leucina que

entraria no interior celular e modulariam a expressão de proteínas envolvidas na via mTOR (HUNDAL; TAYLOR, 2009).

Outra argumentação seria que os aminoácidos, como relatado anteriormente, poderiam potencializar os sistemas de defesa antioxidantes pelo melhor funcionamento mitocondrial (D'ANTONA ET AL., 2010; VALERIO; D'ANTONA; NISOLI, 2011) e dessa forma, conferir proteção à elevação exacerbada de espécies reativas, que na IC, está associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , contribuindo para o estabelecimento da atrofia (MOYLAN; REID, 2007; BACURAU ET AL., 2009). Nesse sentido, mTORC 1, estimulada por aminoácidos, por exemplo, quando ativada, favorece o aumento da expressão gênica de PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), uma importante mediadora da biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa celular (SCHIEKE ET AL., 2006; CUNNINGHAM ET AL., 2007). Outra possibilidade, independente de mTOR seria através do catabolismo dos BCAAs, que, uma vez localizadas na matriz mitocondrial, as enzimas envolvidas na sua oxidação induziriam um aumento da expressão de proteínas envolvidas com a biogênese mitocondrial como sirtuin (SIRT) (NAKAGAWA; GUARENTE, 2009). De fato, foi demonstrado que o exercício agudo aumenta a forma ativa de BCKDH tanto em ratos (KASPEREK, 1989; XU, M. ET AL., 2001) como em humanos (JACKMAN ET AL., 1997; MCKENZIE ET AL., 2000) e o treinamento diminui o estado de ativação do complexo BCKDH (MCKENZIE ET AL., 2000; HOWARTH ET AL., 2007), confirmando que o treinamento é um importante modulador das enzimas envolvidas no metabolismo dos BCAAs.

Ristow e cols. (2009)(RISTOW ET AL., 2009) demonstraram que algumas das adaptações benéficas ao treinamento, são abolidas com a administração concorrente de antioxidantes exógenos (vitamina C e vitamina E), prevenindo a indução de mecanismo dependente de PGC-1 α no aumento de enzimas relacionados ao sistema de defesa antioxidante, o que não ocorreria com os BCAAs. Dessa forma, Valerio e cols. (2011) preconizam que a suplementação com BCAAs poderia ser utilizada concomitantemente ao treinamento, diferentemente de outros nutrientes com potencial “antioxidante”.

Uma questão curiosa foi em relação aos efeitos adicionais da leucina ao treinamento serem observados especificamente nas fibras do tipo IIA e IIB no músculo plantar, ou seja, com características predominantemente glicolíticas. O

conhecimento referente à estímulos tróficos dos aminoácidos e sua relação com os tipos de fibras ainda é muito incipiente, mas esperava-se que seus efeitos fossem mais proeminentes em fibras do tipo I, pelo metabolismo preferencial desse tipo de fibras por BCAAs (BIOLO ET AL., 1995), uma vez que a maior parte das enzimas transaminases e desidrogenases de seus cetoácidos, envolvidas no seu metabolismo, estão localizadas em compartimentos mitocondriais, por sua vez, presentes em maior número nas fibras com características predominantemente oxidativas. É possível que o treinamento físico modifique esse padrão de resposta e dessa forma, os BCAAs por terem demonstrado um efeito estimulatório sobre o sistema de defesa antioxidante, poderiam conferir uma proteção mais exacerbada em fibras mais desprovidas desses mecanismos protetores antioxidantes, como as fibras com características mais glicolíticas. De fato, foi observado que a associação de suplementação com uma mistura de aminoácidos (1,5g/kg/dia diluído na água de beber com 30,5% de leucina em sua formulação) a um protocolo de corrida voluntária para camundongos durante oito semanas, proporcionou um aumento mais pronunciado na AST das fibras do tipo 2A que do tipo I no músculo sóleo, embora os autores não tenham encontrado justificativa para tal resultado (PELLEGRINO ET AL., 2005).

A perda de proteínas musculares sustentadamente, tal como a encontrada nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO, pode ser explicada parcialmente por uma diminuição da capacidade do músculo em responder de maneira apropriada a estímulos anabólicos como ingestão alimentar (mais especificamente aminoácidos) e exercício físico. Na IC, o turnover protéico está negativo, sendo que tanto a degradação protéica está aumentada como a síntese está reduzida (MORRISON; GIBSON; RENNIE, 1988; TOTH; MATTHEWS, 2006). Dessa forma, investigamos uma das vias relacionadas ao processo de síntese e de degradação, a via da mTOR, que é ativada na presença de aminoácidos e por estímulo mecânico, mas ao contrário do mecanismo estimulado por aminoácidos, a ativação pelo exercício se dá através das vias IGF1/AKT (DRUMMOND ET AL., 2009), mas principalmente através das vias MAPKinase (MIYAZAKI ET AL., 2011). Na IC, a ativação da via Akt/mTOR estimulada por insulina/IGF-1 está atenuada (ANKER ET AL., 2001; HAMBRECHT ET AL., 2002; SCHULZE; SPATE, 2005; SANTOS ET AL., 2010), mas a resposta ao

estímulo mecânico parece estar mantida (BACURAU ET AL., 2009; BUENO ET AL., 2010). O impacto da IC na sinalização de mTOR mediada pela leucina no músculo esquelético era, até então, desconhecido.

Os resultados demonstraram que no modelo de IC induzida por hiperatividade simpática a leucina pode apenas parcialmente estimular a via mTOR visto que os indicadores de fosforilação das proteínas p70S6k, 4EBP-1 e AMPK não estavam totalmente restaurados. Além disso, observamos também que na IC, essa resposta anabólica à leucina era restaurada quando havia o estímulo mecânico crônico. Isso nos permite afirmar que o treinamento físico foi uma ferramenta válida em reverter os efeitos de resistência anabólica à leucina, independente do tipo de fibra muscular.

O déficit de sinalização anabólica ou a restauração incompleta da síntese protéica basal é interpretada na literatura como “resistência anabólica” (Rennie, 2009). Quando essa resistência se dá especificamente à leucina é denominada de “resistência anabólica à leucina” e envolve principalmente uma sinalização da via mTOR atenuada, tal como tratamento com glicocorticóides (RIEU ET AL., 2004; NICASTRO; ZANCHI; ET AL., 2011), miopatia induzida por excesso de álcool (LANG ET AL., 2003), ratos idosos (DARDEVET ET AL., 2000), sepse (LANG; FROST, 2004; LANG; PRUZNAK; FROST, 2005), uremia (CHEN ET AL., 2011) e mesmo em humanos em determinadas condições atróficas, como desuso muscular (GLOVER ET AL., 2008) e sarcopenia senil (KATSANOS ET AL., 2006).

Os mecanismos pelos quais o treinamento físico atenua a resistência anabólica ainda não estão esclarecidos, mas é interessante notar que o tratamento com antagonista farmacológico de TNF- α , o efeito estimulatório da leucina em fosforilar proteínas da via mTOR é parcialmente restaurado (LANG; FROST, 2006), sugerindo que, pelo menos em parte, diminuir o estado inflamatório pode atenuar a resistência anabólica à leucina e pode ser um dos mecanismos pelo qual o treinamento melhora as respostas à suplementação com leucina. De fato, no presente trabalho, verificamos que o treinamento físico foi capaz de restaurar totalmente os níveis plasmáticos de TNF- α , demonstrando os efeitos anti-inflamatórios do exercício, conforme observado previamente em modelo de IC secundária ao infarto agudo do miocárdio (BATISTA ET AL., 2010).

Outro estudo (MARZANI ET AL., 2008) demonstrou que uma mistura de antioxidantes pode restaurar o déficit na síntese protéica observado em ratos idosos, ao passo que a suplementação com BCAAs é incapaz de aumentar a fosforilação de proteínas da via mTOR em camundongos que não expressam a enzima óxido nítrico sintase constitutiva (eNO^{-/-}), e como consequência, exacerbação do estresse oxidativo (D'ANTONA ET AL., 2010), sugerindo que a melhor resposta anabólica induzida pela leucina pode envolver a redução do estresse oxidativo. Outro interessante trabalho demonstrou que o estresse do retículo pode mediar o déficit de sinalização anabólica precedendo a sinalização da via AKT-mTOR (DELDICQUE ET AL., 2011).

No contexto da suplementação com leucina em doses elevadas, tal como a utilizada por nós, poderiam ser observados alguns efeitos indesejáveis descritos na literatura como a resistência à insulina (BALAGE ET AL., 2011). De fato, em trabalho recente com a nossa colaboração, em um modelo de atrofia muscular e resistência à insulina induzido por dose suprafisiológica de glicocorticóide, a suplementação com leucina (0,135g/kg por 7 dias) não preveniu a atrofia muscular e exacerbou os efeitos diabetogênicos induzidos pelo tratamento com glicocorticóide (NICASTRO; ZANCHI; ET AL., 2011). Dessa forma, essa poderia ser uma das explicações plausíveis para não termos observados efeitos da leucina sozinha no presente estudo. Contudo, observamos que a suplementação com leucina não induziu efeitos negativos nos parâmetros relacionados à homeostase de glicose. Apesar da resposta glicêmica em jejum por tempo mais prolongado (12 horas) e os níveis de insulina permanecerem os mesmos entre os animais KO e WT, a menor tolerância à glicose nos animais sugere uma melhor homeostasia de glicose. Essa melhor resposta glicêmica, 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 menores níveis de glicose sanguínea (PETERHOFF ET AL., 2003). A suplementação com leucina não demonstrou ação moduladora nesses parâmetros relacionados à homeostasia glicêmica, sugerindo que a resistência à insulina não ocorreu. Como esperado, o treinamento físico melhorou ainda mais a tolerância à glicose, mas sem efeitos adicionais da associação treinamento e leucina, o que permite inferir

que os efeitos da leucina associada ou não ao treinamento também não estiveram associados aos parâmetros relacionados à homeostase glicolítica.

Outro possível efeito indesejável da suplementação envolve a função renal (MARTIN; ARMSTRONG; RODRIGUEZ, 2005). Na IC, as complicações renais são bastante prevalentes e em conjunto a uma série de manifestações que envolvem alterações patológicas cardíacas, é denominada de “síndrome cardio-renal” (CICOIRA; ANKER; RONCO, 2011). A interrelação entre coração e rim é tão evidente que apenas 7% dos pacientes com IC têm função renal preservada (DE SILVA ET AL., 2006). Não obstante, os mecanismos fisiopatológicos que levam à IC e deterioram sua função também impactam diretamente sobre os rins, como a hiperativação neurohormonal, que reduz a perfusão renal e pode levar às alterações progressivas na vasculatura renal e ao aumento da resistência vascular (POKHREL ET AL., 2008). A ativação contínua de sistemas neurohumorais, como a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, leva à sobrecarga de volume, à disfunção endotelial e à inflamação, podendo contribuir para mudanças funcionais e estruturais no coração e vasos, além de agravar a função cardíaca, tornando-se, portanto, um ciclo vicioso (CICOIRA; ANKER; RONCO, 2011). Corroborando esses dados foi observada uma intensa atividade dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona em camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO (PEREIRA ET AL., 2009). Presumivelmente, os resultados indicam que nesse modelo animal há perda de função renal, como indicado pelos elevados níveis de proteína urinária. Já a creatinina plasmática, que reflete a redução no volume de filtração glomerular, não estava alterada de forma significativa em nosso modelo de IC.

Durante a ultrafiltração do plasma pelos glomérulos para a formação de urina, passam através dele, em situações normais, água, pequenas moléculas como glicose e uréia, mas não proteínas de alto peso molecular (>70 kDa), sendo que algumas proteínas do ultrafiltrado são reabsorvidas pelo túbulo proximal, mesmo já tendo passado pelos glomérulos (POORTMANS; VANDERSTRAETEN, 1994). A proteinúria pode ser devido à lesão glomerular, permitindo a passagem de proteínas de alto peso molecular, bem como tubular, caracterizada principalmente por proteínas de baixo peso molecular, pela não-reabsorção das proteínas pelas células tubulares e proteinúria intersticial

devido à liberação de proteínas para o espaço urinário devido a processos inflamatórios (Guyton & Hall, 2002). Análises histológicas já estão sendo realizadas para melhor elucidar essa questão. Portanto, seja qual for o local(is) específico(s) de comprometimento renal, um elevado nível de proteínas na urina é indicativo de perda funcional, o que pode ser nitidamente demonstrada através dos níveis urinários elevados nos camundongos α_{2A}/α_{2C} ARKO. O treinamento físico atenuou a proteinúria acentuadamente nos grupos KOT e KOLT, corroborando a melhora observada em outros estudos (PECHTER ET AL., 2003).

Em relação à suplementação com leucina, apesar de documentada a possibilidade da carga excessiva de aminoácidos levar a um prejuízo na taxa de filtração glomerular, por estimular o co-transporte de sódio/ aminoácidos (BRENNER; MEYER; HOSTETTER, 1982), isso parece não ocorrer para a leucina nas doses utilizadas em nosso estudo. Uma provável explicação seria a ampla distribuição de enzimas que regulam o metabolismo de BCAAs nos diversos compartimentos corporais, inclusive no parênquima renal, que apresenta alta atividade de BCAA transferase e baixa de BCKA- deidrogenase (KUHLMANN; KOPPLE, 1990). Ademais, estudos com ratos suplementados com altas doses de BCAAs (1,50g/kg/dia) apresentaram melhora da função e morfologia renal (CORSETTI ET AL., 2010). Outro estudo também não apontou efeitos adversos em ratos que ingeriram uma dose diária de leucina de 1,57g/kg, por trinta semanas, portanto, superior a nossa em dose e tempo de tratamento (TSUBUKU ET AL., 2004), nem efeitos tóxicos foram observados quando ratos ingeriram 2,50g/kg de BCAA diariamente durante 3 meses ou 1,25g/kg diariamente por um ano (Shimomura et al., 2005). Ainda, uma revisão de vários estudos enfocando os efeitos da dose e toxicidade da ingestão de BCAAs em humanos e vários modelos animais e concluiu que os BCAAs são os aminoácidos mais “bem tolerados” quando se ultrapassa as recomendações de ingestão (Baker, 2005).

Ainda nessa linha, o treinamento físico alterou robustamente as respostas relacionadas à função renal, o que pode ser observado mesmo quando não há evidência de alterações no grupo KO, como no caso dos níveis do clearance de creatinina. O músculo esquelético é o maior sítio de produção da creatinina, que é excretada pela filtração glomerular e qualquer

anormalidade que diminua a velocidade do fluxo urinário irá resultar na elevação da sua concentração no plasma (BAXMANN ET AL., 2008). Nos grupos KOT e KOLT, como o aumento do clearance de creatinina foi acompanhado de níveis aumentados de creatinina urinária e os níveis plasmáticos não se modificaram, pode se inferir que o aumento do turnover protéico pode ter elevado a necessidade de excreção de produtos finais provenientes do metabolismo do exercício e concomitantemente, uma melhora na função renal, já que este eliminou mais eficientemente os níveis de creatinina plasmática. Para essa última possibilidade, pode se argumentar que é possível que no grupo KO e KOL, estes ainda que estejam com clearance de creatinina aparentemente normal, a disfunção renal apenas não seja ainda detectável por esse parâmetro.

Em face dos benefícios do treinamento físico, alguns deles evidentes em nosso trabalho, a maioria dos estudos têm demonstrado que o treinamento físico melhora a sobrevida nos pacientes com IC (PIEPOLI ET AL., 2004). Isso é atraente, uma vez que, mesmo com o advento de terapia farmacológica reconhecidamente eficaz, os pacientes com IC ainda apresentam alta taxa de mortalidade (*American Heart Association, 2010*).

Além do treinamento físico, em outros estudos (D'ANTONA ET AL., 2010; LANG; LYNCH; VARY, 2010; VALERIO; D'ANTONA; NISOLI, 2011), a suplementação com leucina isoladamente foi capaz de ampliar o tempo de vida cronológico em modelos animais.

Em nosso estudo, apesar de uma tendência, não houve diferença estatisticamente significativa na curva de sobrevida ($p=0,08$) entre os grupos, provavelmente em virtude do tempo de intervenção, que ocorreu em uma fase mais tardia, ou seja, a IC provavelmente já estivesse em uma fase avançada, bem como pelo número reduzido de animais para este tipo de análise. Entretanto, das diferentes intervenções, a associação do treinamento físico e a suplementação com leucina foi a que mais se aproximou do nível de sobrevida do grupo WT. Os mecanismos pelos quais essa associação pode aumentar a sobrevida ainda não estão esclarecidos, mas parecem envolver aumento da biogênese mitocondrial em miócitos cardíacos e esqueléticos e aumento da capacidade de defesa antioxidante (D'ANTONA ET AL., 2010).

8. Considerações finais

Os maiores achados do presente estudo foram que a suplementação com leucina foi inócua quando administrada como única forma de intervenção, mas associada ao treinamento físico potencializou os efeitos deste na atenuação da atrofia muscular em fibras com características predominantemente glicolíticas, melhorando a tolerância aos esforços e a função muscular. O fato de não serem observados efeitos nesses parâmetros supracitados com a suplementação de leucina isoladamente não estava associada à interação entre dose utilizada e efeitos adversos relatados na literatura como distúrbios na homeostase glicolítica e função renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, R. M. ET AL. Etiology, incidence, and prognosis of renal failure following cardiac operations. Results of a prospective analysis of 500 consecutive patients. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 71, n. 3, p. 323-33, Mar 1976.

ADAMOPOULOS, S. ET AL. Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 21, n. 5, p. 1101-6, Apr 1993.

ADAMS, G. R. ET AL. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 5, p. 1613-8, May 2004.

ALTMAN, J. D. ET AL. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2a-adrenergic receptor knockout mice. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 154-61, Jul 1999.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart Disease and Stroke Statistics-2010 Update**. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/121/7/e46>>. Acesso em: 11 set. 2011.

ANDERSON, K. D.; ABDUL, M.; STEWARD, O. Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. **Exp Neurol**, v. 190, n. 1, p. 184-91, Nov 2004.

ANKER, S. D. ET AL. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: An observational study. **Lancet**, v. 361, n. 9363, p. 1077-83, Mar 29 2003.

ANKER, S. D. ET AL. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. **Lancet**, v. 349, n. 9058, p. 1050-3, Apr 12 1997.

ANKER, S. D. ET AL. Acquired growth hormone resistance in patients with chronic heart failure: Implications for therapy with growth hormone. **J Am Coll Cardiol**, v. 38, n. 2, p. 443-52, Aug 2001.

ANTHONY, J. C. ET AL. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J Nutr**, v. 131, n. 3, p. 856S-860S, Mar 2001.

ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T. G.; LAYMAN, D. K. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. **J Nutr**, v. 129, n. 6, p. 1102-6, Jun 1999.

ANTHONY, J. C. ET AL. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 5, p. E1092-101, May 2002.

ANTHONY, J. C. ET AL. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **J Nutr**, v. 130, n. 10, p. 2413-9, Oct 2000.

AOKI, M. S. ET AL. Mtor pathway inhibition attenuates skeletal muscle growth induced by stretching. **Cell Tissue Res**, v. 324, n. 1, p. 149-56, Apr 2006.

AQUILANI, R. ET AL. Preserved muscle protein metabolism in obese patients with chronic heart failure. **Int J Cardiol**, Apr 15 2011.

AQUILANI, R. ET AL. Increased skeletal muscle amino acid release with light exercise in deconditioned patients with heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 45, n. 1, p. 158-60, Jan 4 2005.

ARAUJO, D. V. ET AL. [cost of heart failure in the unified health system]. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, n. 5, p. 422-7, May 2005.

AVRUCH, J. ET AL. Amino acid regulation of tor complex 1. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E592-602, Apr 2009.

BACURAU, A. V. ET AL. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: Role of exercise training. **J Appl Physiol**, v. 106, n. 5, p. 1631-40, May 2009.

BAKER, D. H. Tolerance for branched-chain amino acids in experimental animals and humans. **J Nutr**, v. 135, n. 6 Suppl, p. 1585S-90S, Jun 2005.

BALAGE, M. ET AL. Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle ir/pi3k signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 3, p. 219-26, Mar 2011.

BANKIR, L. ET AL. Direct and indirect cost of urea excretion. **Kidney Int**, v. 49, n. 6, p. 1598-607, Jun 1996.

BARRETTO, A. C. ET AL. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients. **Int J Cardiol**, v. 135, n. 3, p. 302-7, Jul 10 2009.

BARTHOLOMEU, J. B. ET AL. 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**, v. 45, n. 2, p. 240-9, Aug 2008.

BATISTA, M. L., JR. ET AL. Exercise training changes il-10/tnf-alpha ratio in the skeletal muscle of post-mi rats. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 102-8, Jan 2010.

BAXMANN, A. C. ET AL. Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin c. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n. 2, p. 348-54, Mar 2008.

BEITZEL, F. ET AL. Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 4, p. 1385-92, Apr 2004.

BELARDINELLI, R. ET AL. Effects of exercise training on left ventricular filling at rest and during exercise in patients with ischemic cardiomyopathy and severe left ventricular systolic dysfunction. **Am Heart J**, v. 132, n. 1 Pt 1, p. 61-70, Jul 1996.

BELARDINELLI, R. ET AL. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: Effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1173-82, Mar 9 1999.

BELARDINELLI, R. ET AL. Low intensity exercise training in patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 26, n. 4, p. 975-82, Oct 1995.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, Apr 1968.

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P.; DEEBLE, D. J. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. **Free Radic Biol Med**, v. 13, n. 4, p. 391-405, Oct 1992.

BIOLO, G. ET AL. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 268, n. 1 Pt 1, p. E75-84, Jan 1995.

BOCCHI, E. A. ET AL. [iii brazilian guidelines on chronic heart failure]. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 1 Suppl 1, p. 3-70, 2009.

BODINE, S. C. ET AL. Akt/mtor pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 11, p. 1014-9, Nov 2001.

BOLSTER, D. R.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Translational control mechanisms modulate skeletal muscle gene expression during hypertrophy. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 31, n. 3, p. 111-6, Jul 2003.

BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: Perspectives of various models. **Physiol Rev**, v. 71, n. 2, p. 541-85, Apr 1991.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. **Vitam Horm**, v. 80, p. 313-49, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BREDE, M. ET AL. Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. **Circulation**, v. 106, n. 19, p. 2491-6, Nov 5 2002.

BREEN, L.; PHILLIPS, S. M. Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the 'anabolic resistance' of ageing. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, p. 68, 2011.

BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: The role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. **N Engl J Med**, v. 307, n. 11, p. 652-9, Sep 9 1982.

BROCCA, L. ET AL. Amino acid supplements improve native antioxidant enzyme expression in the skeletal muscle of diabetic mice. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 11A, p. 57E-62E, Jun 2 2008.

BRUM, P. C. ET AL. Aerobic exercise training in heart failure: Impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 827-35, Sep 2011.

BRUM, P. C. ET AL. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 283, n. 5, p. H1838-45, Nov 2002.

BRUM, P. C. ET AL. Neurohumoral activation in heart failure: The role of adrenergic receptors. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, n. 3, p. 485-503, Sep 2006.

BUENO, C. R., JR. ET AL. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **J Appl Physiol**, v. 109, n. 3, p. 702-9, Sep 2010.

BYFIELD, M. P.; MURRAY, J. T.; BACKER, J. M. Hvps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 s6 kinase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 38, p. 33076-82, Sep 23 2005.

CALDERS, P. ET AL. Pre-exercise branched-chain amino acid administration increases endurance performance in rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 9, p. 1182-6, Sep 1997.

CELIK, T. ET AL. The small intestine: A critical linkage in pathophysiology of cardiac cachexia. **Int J Cardiol**, v. 143, n. 2, p. 200-1, Aug 20 2010.

CHEN, Y. ET AL. Leucine-stimulated mtor signaling is partly attenuated in skeletal muscle of chronically uremic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 5, p. E873-81, Nov 2011.

CICOIRA, M.; ANKER, S. D.; RONCO, C. Cardio-renal cachexia syndromes (cracs): Pathophysiological foundations of a vicious pathological circle. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 2, n. 3, p. 135-142, Sep 2011.

COATS, A. J. ET AL. Symptoms and quality of life in heart failure: The muscle hypothesis. **Br Heart J**, v. 72, n. 2 Suppl, p. S36-9, Aug 1994.

COHN, J. N. ET AL. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **N Engl J Med**, v. 311, n. 13, p. 819-23, Sep 27 1984.

COLLINS, S.; SURWIT, R. S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Recent Prog Horm Res**, v. 56, p. 309-28, 2001.

COMBARET, L. ET AL. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. **J Physiol**, v. 569, n. Pt 2, p. 489-99, Dec 1 2005.

CORSETTI, G. ET AL. Supplementation with essential amino acids in middle age maintains the health of rat kidney. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 23, n. 2, p. 523-33, Apr-Jun 2010.

CROWE, M. J.; WEATHERSON, J. N.; BOWDEN, B. F. Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance. **Eur J Appl Physiol**, v. 97, n. 6, p. 664-72, Aug 2006.

CROZIER, S. J. ET AL. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. **J Nutr**, v. 135, n. 3, p. 376-82, Mar 2005.

CSIBI, A. ET AL. The translation regulatory subunit eif3f controls the kinase-dependent mtor signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e8994, 2010.

CUNNINGHAM, J. T. ET AL. Mtor controls mitochondrial oxidative function through a yy1-pgc-1alpha transcriptional complex. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 736-40, Nov 29 2007.

D'ANTONA, G. ET AL. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. **Cell Metab**, v. 12, n. 4, p. 362-72, Oct 6 2010.

DALLA LIBERA, L. ET AL. Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective effect of carvedilol. **J Mol Cell Cardiol**, v. 38, n. 5, p. 803-7, May 2005.

DARDEVET, D. ET AL. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **J Nutr**, v. 130, n. 11, p. 2630-5, Nov 2000.

DAVIES, E. J. ET AL. Exercise based rehabilitation for heart failure. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD003331, 2010.

DE BANDT, J. P.; CYNOBER, L. Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma, and sepsis. **J Nutr**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 308S-13S, Jan 2006.

DE SILVA, R. ET AL. Incidence of renal dysfunction over 6 months in patients with chronic heart failure due to left ventricular systolic dysfunction: Contributing factors and relationship to prognosis. **Eur Heart J**, v. 27, n. 5, p. 569-81, Mar 2006.

DELDICQUE, L. ET AL. Er stress induces anabolic resistance in muscle cells through pkb-induced blockade of mtorc1. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20993, 2011.

DREYER, H. C. ET AL. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mtor signaling and protein synthesis in human muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 2, p. E392-400, Feb 2008.

DRUMMOND, M. J. ET AL. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mtorc1 signaling. **J Appl Physiol**, v. 106, n. 4, p. 1374-84, Apr 2009.

ESLER, M.; KAYE, D. Measurement of sympathetic nervous system activity in heart failure: The role of norepinephrine kinetics. **Heart Fail Rev**, v. 5, n. 1, p. 17-25, Mar 2000.

EUROPEAN HEART JOURNAL. **European cardiovascular disease statistics 2008 ed.** Disponível em: <<http://www.bhf.org.uk/heart-health/statistics.aspx>>. Acesso em: 8 set. 2011.

FERREIRA, J. C. ET AL. 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**, v. 294, n. 1, p. R26-32, Jan 2008.

FERREIRA, J. C. ET AL. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, Aug 2007.

FINDLAY, G. M. ET AL. A map4 kinase related to ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mtor signalling. **Biochem J**, v. 403, n. 1, p. 13-20, Apr 1 2007.

FORJAZ, C. L. M. ET AL. **Exercícios Resistidos e Sistema Cardiovascular.** In: NEGRÃO, C. E.; PEREIRA BARRETTO, A. C. *Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata.* 2. ed. São Paulo: Manole, 2006, v.1, p.272-285.

FUJII, H. ET AL. Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase content in rat skeletal muscle is decreased by endurance training. **Biochem Mol Biol Int**, v. 44, n. 6, p. 1211-6, May 1998.

GIELEN, S.; HAMBRECHT, R. Effects of exercise training on vascular function and myocardial perfusion. **Cardiol Clin**, v. 19, n. 3, p. 357-68, Aug 2001.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 1974-84, Oct 2005.

GLOVER, E. I. ET AL. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. **J Physiol**, v. 586, n. Pt 24, p. 6049-61, Dec 15 2008.

GOLDSPINK, G.; WILLIAMS, P.; SIMPSON, H. Gene expression in response to muscle stretch. **Clin Orthop Relat Res**, n. 403 Suppl, p. S146-52, Oct 2002.

GUDER, G. ET AL. Reverse epidemiology in systolic and nonsystolic heart failure: Cumulative prognostic benefit of classical cardiovascular risk factors. **Circ Heart Fail**, v. 2, n. 6, p. 563-71, Nov 2009.

GUILLET, C. ET AL. Mitochondrial and sarcoplasmic proteins, but not myosin heavy chain, are sensitive to leucine supplementation in old rat skeletal muscle. **Exp Gerontol**, v. 39, n. 5, p. 745-51, May 2004.

HAMBRECHT, R. ET AL. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v. 98, n. 24, p. 2709-15, Dec 15 1998.

HAMBRECHT, R. ET AL. 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**, v. 29, n. 5, p. 1067-73, Apr 1997.

HAMBRECHT, R. ET AL. Reduction of insulin-like growth factor-i expression in the skeletal muscle of noncachectic patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, n. 7, p. 1175-81, Apr 3 2002.

HARPER, A. E.; MILLER, R. H.; BLOCK, K. P. Branched-chain amino acid metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 4, p. 409-54, 1984.

HARRINGTON, D. ET AL. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 30, n. 7, p. 1758-64, Dec 1997.

HARRIS, R. A.; JOSHI, M.; JEOUNG, N. H. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 2, p. 391-6, Jan 9 2004.

HEIN, L.; ALTMAN, J. D.; KOBILKA, B. K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. **Nature**, v. 402, n. 6758, p. 181-4, Nov 11 1999.

HEITMAN, J.; MOVVA, N. R.; HALL, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 905-9, Aug 23 1991.

HORNBERGER, T. A.; CHIEN, S. Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. **J Cell Biochem**, v. 97, n. 6, p. 1207-16, Apr 15 2006.

HOWARTH, K. R. ET AL. Exercise training increases branched-chain oxoacid dehydrogenase kinase content in human skeletal muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 3, p. R1335-41, Sep 2007.

HUNDAL, H. S.; TAYLOR, P. M. Amino acid transceptors: Gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E603-13, Apr 2009.

ISHIGURO, H. ET AL. Clofibrate treatment promotes branched-chain amino acid catabolism and decreases the phosphorylation state of mtor, eif4e-bp1, and s6k1 in rat liver. **Life Sci**, v. 79, n. 8, p. 737-43, Jul 17 2006.

JACKMAN, M. L. ET AL. Nutritional status affects branched-chain oxoacid dehydrogenase activity during exercise in humans. **Am J Physiol**, v. 272, n. 2 Pt 1, p. E233-8, Feb 1997.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 4, p. C834-43, Oct 2004.

JANNIG, P. **Ativação da quinase mTOR pelo treinamento físico aeróbico previne a atrofia do músculo sóleo em camundongos com insuficiência cardíaca.** 2010. Monografia. Aperfeiçoamento/Especialização em Condicionamento Físico Aplicado à Prevenção Cardiológica. Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

JONDEAU, G. ET AL. Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure. **Circulation**, v. 86, n. 5, p. 1351-6, Nov 1992.

KALANTAR-ZADEH, K. ET AL. Nutritional and anti-inflammatory interventions in chronic heart failure. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 11A, p. 89E-103E, Jun 2 2008.

KASPEREK, G. J. Regulation of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase activity during exercise. **Am J Physiol**, v. 256, n. 1 Pt 1, p. E186-90, Jan 1989.

KATO, T. ET AL. Analysis of liver metabolism in a rat model of heart failure. **Int J Cardiol**, Aug 10 2011.

KATSANOS, C. S. ET AL. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 2, p. E381-7, Aug 2006.

KATZ, S. D. ET AL. Lactate turnover at rest and during submaximal exercise in patients with heart failure. **J Appl Physiol**, v. 75, n. 5, p. 1974-9, Nov 1993.

KENCHAIHAH, S. ET AL. Body mass index and prognosis in patients with chronic heart failure: Insights from the candesartan in heart failure: Assessment of reduction in mortality and morbidity (charm) program. **Circulation**, v. 116, n. 6, p. 627-36, Aug 7 2007.

KETHEYIAN, S. J. ET AL. Differential effects of exercise training in men and women with chronic heart failure. **Am Heart J**, v. 145, n. 5, p. 912-8, May 2003.

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Regulation of global and specific mrna translation by oral administration of branched-chain amino acids. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 2, p. 423-7, Jan 9 2004.

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

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise. **J Biol Chem**, v. 285, n. 38, p. 29027-32, Sep 17 2010.

KING, D. ET AL. Fat malabsorption in elderly patients with cardiac cachexia. **Age Ageing**, v. 25, n. 2, p. 144-9, Mar 1996.

KOOPMAN, R. ET AL. Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 4, p. E645-53, Apr 2005.

KOTLER, D. P. Cachexia. **Ann Intern Med**, v. 133, n. 8, p. 622-34, Oct 17 2000.

KRAWIEC, B. J. ET AL. Amp-activated protein kinase agonists increase mrna content of the muscle-specific ubiquitin ligases mafbx and murf1 in c2c12 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 6, p. E1555-67, Jun 2007.

KUBICA, N. ET AL. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2bepsilon mrna in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. **J Biol Chem**, v. 280, n. 9, p. 7570-80, Mar 4 2005.

KUHLMANN, M. K.; KOPPLE, J. D. Amino acid metabolism in the kidney. **Semin Nephrol**, v. 10, n. 5, p. 445-57, Sep 1990.

KULCU, D. G. ET AL. The effect of cardiac rehabilitation on quality of life, anxiety and depression in patients with congestive heart failure. A randomized controlled trial, short-term results. **Eura Medicophys**, v. 43, n. 4, p. 489-97, Dec 2007.

LANG, C. C. ET AL. Effect of sympathoinhibition on exercise performance in patients with heart failure. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 238-45, Jul 1 1997.

LANG, C. H.; FROST, R. A. Differential effect of sepsis on ability of leucine and igf-i to stimulate muscle translation initiation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 4, p. E721-30, Oct 2004.

LANG, C. H.; FROST, R. A. Glucocorticoids and tnfa interact cooperatively to mediate sepsis-induced leucine resistance in skeletal muscle. **Mol Med**, v. 12, n. 11-12, p. 291-9, Nov-Dec 2006.

LANG, C. H. ET AL. Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4e-bp1, s6k1, eif4g, and mtor in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 6, p. E1205-15, Dec 2003.

LANG, C. H.; LYNCH, C. J.; VARY, T. C. Bcatm deficiency ameliorates endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis and improves survival in septic mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 3, p. R935-44, Sep 2010.

LANG, C. H.; PRUZNAK, A. M.; FROST, R. A. Tnfalpha mediates sepsis-induced impairment of basal and leucine-stimulated signaling via s6k1 and eif4e in cardiac muscle. **J Cell Biochem**, v. 94, n. 2, p. 419-31, Feb 1 2005.

LAYMAN, D. K. Role of leucine in protein metabolism during exercise and recovery. **Can J Appl Physiol**, v. 27, n. 6, p. 646-63, Dec 2002.

LENK, K.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: Molecular pathophysiology and impact of exercise training. **J Cachex Sarcopenia Muscle**, v. 1, n. 1, p. 9-21, Sep 2010.

LENTINE, K.; WRONE, E. M. New insights into protein intake and progression of renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 13, n. 3, p. 333-6, May 2004.

LIGHTFOOT, A.; MCARDLE, A.; GRIFFITHS, R. D. Muscle in defense. **Crit Care Med**, v. 37, n. 10 Suppl, p. S384-90, Oct 2009.

LIU, Z. ET AL. Amino acids stimulate translation initiation and protein synthesis through an akt-independent pathway in human skeletal muscle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 12, p. 5553-8, Dec 2002.

LOHSE, M. J.; ENGELHARDT, S.; ESCHENHAGEN, T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? **Circ Res**, v. 93, n. 10, p. 896-906, Nov 14 2003.

LOPES FDA, S. ET AL. Down-regulation of myod gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. **Int J Exp Pathol**, v. 89, n. 3, p. 216-22, Jun 2008.

LU, G. ET AL. A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. **Genes Dev**, v. 21, n. 7, p. 784-96, Apr 1 2007.

LU, G. ET AL. Protein phosphatase 2cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1678-87, Jun 2009.

LUNDE, P. K. ET AL. Skeletal muscle disorders in heart failure. **Acta Physiol Scand**, v. 171, n. 3, p. 277-94, Mar 2001.

LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: Implications for muscle wasting and disease. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 729-67, Apr 2008.

MACKENZIE, M. G. ET AL. Mvps34 is activated following high-resistance contractions. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 1, p. 253-60, Jan 15 2009.

MANCINI, D. M. ET AL. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. **Circulation**, v. 85, n. 4, p. 1364-73, Apr 1992.

MANN, D. L.; BRISTOW, M. R. Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. **Circulation**, v. 111, n. 21, p. 2837-49, May 31 2005.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Akt/pkb signaling: Navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261-74, Jun 29 2007.

MARTIN, W. F.; ARMSTRONG, L. E.; RODRIGUEZ, N. R. Dietary protein intake and renal function. **Nutr Metab (Lond)**, v. 2, p. 25, Sep 20 2005.

MARZANI, B. ET AL. Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. **J Nutr**, v. 138, n. 11, p. 2205-11, Nov 2008.

MASSIE, B. M. ET AL. ³¹P nuclear magnetic resonance evidence of abnormal skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure. **Am J Cardiol**, v. 60, n. 4, p. 309-15, Aug 1 1987.

MCKENZIE, S. ET AL. Endurance exercise training attenuates leucine oxidation and bcoad activation during exercise in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 4, p. E580-7, Apr 2000.

MEDEIROS, A. ET AL. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. **J Appl Physiol**, v. 104, n. 1, p. 103-9, Jan 2008.

MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. **Sports Med**, v. 27, n. 6, p. 347-58, Jun 1999.

METTAUER, B. ET AL. Exercise training with a heart device: A hemodynamic, metabolic, and hormonal study. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 1, p. 2-8, Jan 2001.

MIYAZAKI, M.; ESSER, K. A. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. **J Appl Physiol**, v. 106, n. 4, p. 1367-73, Apr 2009.

MIYAZAKI, M. ET AL. Early activation of mtorc1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/akt signalling. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 7, p. 1831-46, Apr 1 2011.

MORDIER, S. ET AL. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in c2c12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 275, n. 38, p. 29900-6, Sep 22 2000.

MORRISON, W. L.; GIBSON, J. N.; RENNIE, M. J. Skeletal muscle and whole body protein turnover in cardiac cachexia: Influence of branched-chain amino acid administration. **Eur J Clin Invest**, v. 18, n. 6, p. 648-54, Dec 1988.

MOUNIER, R. ET AL. Antagonistic control of muscle cell size by ampk and mtorc1. **Cell Cycle**, v. 10, n. 16, p. 2640-6, Aug 15 2011.

MOYLAN, J. S.; REID, M. B. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. **Muscle Nerve**, v. 35, n. 4, p. 411-29, Apr 2007.

NAIR, K. S. ET AL. Effect of leucine on amino acid and glucose metabolism in humans. **Metabolism**, v. 41, n. 6, p. 643-8, Jun 1992.

NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, sirt5. **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 6, p. 578-81, Jun 2009.

NAKAI, N. ET AL. Leucine-induced activation of translational initiation is partly regulated by the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in c2c12 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 343, n. 4, p. 1244-50, May 19 2006.

NEGRAO, C. E.; MIDDLEKAUFF, H. R. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 13, n. 1, p. 51-60, Feb 2008.

NEGRAO, C. E. ET AL. Abnormal neurovascular control during exercise is linked to heart failure severity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 3, p. H1286-92, Mar 2001.

NICASTRO, H. ET AL. An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 287-300, Feb 2011.

NICASTRO, H. ET AL. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. **Nutrition**, Nov 11 2011.

NICKLIN, P. ET AL. Bidirectional transport of amino acids regulates mtor and autophagy. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 521-34, Feb 6 2009.

NISSEN, S. ET AL. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (hmb) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. **J Nutr**, v. 130, n. 8, p. 1937-45, Aug 2000.

NOBUKUNI, T. ET AL. Amino acids mediate mtor/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3oh-kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 40, p. 14238-43, Oct 4 2005.

NORTON, L. E. ET AL. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. **J Nutr**, v. 139, n. 6, p. 1103-9, Jun 2009.

OPASICH, C. ET AL. Biochemical analysis of muscle biopsy in overnight fasting patients with severe chronic heart failure. **Eur Heart J**, v. 17, n. 11, p. 1686-93, Nov 1996.

OREOPOULOS, A. ET AL. Effect of obesity on short- and long-term mortality postcoronary revascularization: A meta-analysis. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 2, p. 442-50, Feb 2008.

PALLAFACCHINA, G. ET AL. A protein kinase b-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 14, p. 9213-8, Jul 9 2002.

PAUL, H. S.; ADIBI, S. A. Paradoxical effects of clofibrate on liver and muscle metabolism in rats. Induction of myotonia and alteration of fatty acid and glucose oxidation. **J Clin Invest**, v. 64, n. 2, p. 405-12, Aug 1979.

PAXTON, R.; HARRIS, R. A. Regulation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. **Arch Biochem Biophys**, v. 231, n. 1, p. 48-57, May 15 1984.

PECHTER, U. ET AL. Regular low-intensity aquatic exercise improves cardio-respiratory functional capacity and reduces proteinuria in chronic renal failure patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 3, p. 624-5, Mar 2003.

PELLEGRINO, M. A. ET AL. Effects of voluntary wheel running and amino acid supplementation on skeletal muscle of mice. **Eur J Appl Physiol**, v. 93, n. 5-6, p. 655-64, Mar 2005.

PEREIRA, M. G. ET AL. Exercise training reduces cardiac angiotensin ii levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. **Eur J Appl Physiol**, v. 105, n. 6, p. 843-50, Apr 2009.

PETERHOFF, M. ET AL. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. **Eur J Endocrinol**, v. 149, n. 4, p. 343-50, Oct 2003.

PHILLIPS, S. M.; GLOVER, E. I.; RENNIE, M. J. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 107, n. 3, p. 645-54, Sep 2009.

PIEPOLI, M. ET AL. Contribution of muscle afferents to the hemodynamic, autonomic, and ventilatory responses to exercise in patients with chronic heart failure: Effects of physical training. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 940-52, Mar 1 1996.

PIEPOLI, M. F. ET AL. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (extramatch). **BMJ**, v. 328, n. 7433, p. 189, Jan 24 2004.

PIEPOLI, M. F. ET AL. Exercise intolerance in chronic heart failure: Mechanisms and therapies. Part i. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 17, n. 6, p. 637-42, Dec 2010.

POKHREL, N. ET AL. Cardiorenal syndrome: A literature review. **Exp Clin Cardiol**, v. 13, n. 4, p. 165-70, Winter 2008.

POORTMANS, J. R.; VANDERSTRAETEN, J. Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. An update. **Sports Med**, v. 18, n. 6, p. 419-37, Dec 1994.

PROUD, C. G. Amino acids and mtor signalling in anabolic function. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1187-90, Nov 2007.

REDDY, V. G. Prevention of postoperative acute renal failure. **J Postgrad Med**, v. 48, n. 1, p. 64-70, Jan-Mar 2002.

RENNIE, M. J. Anabolic resistance: The effects of aging, sexual dimorphism, and immobilization on human muscle protein turnover. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 3, p. 377-81, Jun 2009.

RICH, M. W. ET AL. Increased complications and prolonged hospital stay in elderly cardiac surgical patients with low serum albumin. **Am J Cardiol**, v. 63, n. 11, p. 714-8, Mar 15 1989.

RIEU, I. ET AL. Glucocorticoid excess induces a prolonged leucine resistance on muscle protein synthesis in old rats. **Exp Gerontol**, v. 39, n. 9, p. 1315-21, Sep 2004.

RISTOW, M. ET AL. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 21, p. 8665-70, May 26 2009.

ROGERO, M. M.; TIRAPGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 563-575, 2008.

ROLIM, N. P. ET AL. Exercise training improves the net balance of cardiac ca²⁺ handling protein expression in heart failure. **Physiol Genomics**, v. 29, n. 3, p. 246-52, May 11 2007.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J.; SUDERA, D. K. Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta₂-adrenoceptor agonist clenbuterol. **Br J Pharmacol**, v. 90, n. 3, p. 601-7, Mar 1987.

ROVEDA, F. ET AL. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: A randomized controlled trial. **J Am Coll Cardiol**, v. 42, n. 5, p. 854-60, Sep 3 2003.

ROZENTRYT, P. ET AL. 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**, v. 1, n. 1, p. 35-42, Sep 2010.

SAHA, A. K. ET AL. Downregulation of ampk accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2426-34, Oct 2010.

SAHN, D. J. ET AL. Recommendations regarding quantitation in m-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072-83, Dec 1978.

SALOMAO, E. M. ET AL. Physical exercise and a leucine-rich diet modulate the muscle protein metabolism in walker tumor-bearing rats. **Nutr Cancer**, v. 62, n. 8, p. 1095-104, 2010.

SANCAK, Y. ET AL. The rag gtpases bind raptor and mediate amino acid signaling to mtorc1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-501, Jun 13 2008.

SANDEK, A. ET AL. Nutrition in heart failure: An update. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 12, n. 4, p. 384-91, Jul 2009.

SANTOS, D. P. ET AL. Growth hormone attenuates skeletal muscle changes in experimental chronic heart failure. **Growth Horm IGF Res**, v. 20, n. 2, p. 149-55, Apr 2010.

SARBASSOV, D. D. ET AL. Prolonged rapamycin treatment inhibits mtorc2 assembly and akt/pkb. **Mol Cell**, v. 22, n. 2, p. 159-68, Apr 21 2006.

SCARPELLI, M. ET AL. Quantitative analysis of changes occurring in muscle vastus lateralis in patients with heart failure after low-intensity training. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 21, n. 5, p. 374-80, Oct 1999.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the igf1-akt/pkb pathway: Insights from genetic models. **Skelet Muscle**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

SCHIEKE, S. M. ET AL. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. **J Biol Chem**, v. 281, n. 37, p. 27643-52, Sep 15 2006.

SCHULZE, P. C.; SPATE, U. Insulin-like growth factor-1 and muscle wasting in chronic heart failure. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 2023-35, Oct 2005.

SCOGNAMIGLIO, R. ET AL. Impairment in walking capacity and myocardial function in the elderly: Is there a role for nonpharmacologic therapy with nutritional amino acid supplements? **Am J Cardiol**, v. 101, n. 11A, p. 78E-81E, Jun 2 2008.

SHARMA, R.; COATS, A. J.; ANKER, S. D. The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: Cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. **Int J Cardiol**, v. 72, n. 2, p. 175-86, Jan 15 2000.

SHE, P. ET AL. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 6, p. E1552-63, Dec 2007.

SHE, P. ET AL. Disruption of bcaa metabolism in mice impairs exercise metabolism and endurance. **J Appl Physiol**, v. 108, n. 4, p. 941-9, Apr 2010.

SHIMOMURA, Y.; HARRIS, R. A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: Discussion of session 1. **J Nutr**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 232S-3S, Jan 2006.

SHIMOMURA, Y. ET AL. Effects of liver failure on the enzymes in the branched-chain amino acid catabolic pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 2, p. 381-5, Jan 9 2004.

SMITH, H. J.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Cancer Res**, v. 64, n. 23, p. 8731-5, Dec 1 2004.

STIPANUK, M. H. Leucine and protein synthesis: Mtor and beyond. **Nutr Rev**, v. 65, n. 3, p. 122-9, Mar 2007.

SULLIVAN, M. J. ET AL. Altered expression of myosin heavy chain in human skeletal muscle in chronic heart failure. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 7, p. 860-6, Jul 1997.

SUPINSKI, G. S.; CALLAHAN, L. A. Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. **J Appl Physiol**, v. 102, n. 5, p. 2056-63, May 2007.

SURYAWAN, A. ET AL. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 1, p. 72-81, Jul 1998.

TERAVAINEN, H.; LARSEN, A.; HILLBOM, M. Clofibrate-induced myopathy in the rat. **Acta Neuropathol**, v. 39, n. 2, p. 135-8, Aug 16 1977.

TOM, A.; NAIR, K. S. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. **J Nutr**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 324S-30S, Jan 2006.

TOTH, M. J. ET AL. Skeletal muscle atrophy and peak oxygen consumption in heart failure. **Am J Cardiol**, v. 79, n. 9, p. 1267-9, May 1 1997.

TOTH, M. J. ET AL. Impaired muscle protein anabolic response to insulin and amino acids in heart failure patients: Relationship with markers of immune activation. **Clin Sci (Lond)**, v. 119, n. 11, p. 467-76, Dec 2010.

TOTH, M. J.; MATTHEWS, D. E. Whole-body protein metabolism in chronic heart failure: Relationship to anabolic and catabolic hormones. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 30, n. 3, p. 194-201, May-Jun 2006.

TOTH, M. J. ET AL. Skeletal muscle myofibrillar protein metabolism in heart failure: Relationship to immune activation and functional capacity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 4, p. E685-92, Apr 2005.

TREMBLAY, F. ET AL. Identification of irs-1 ser-1101 as a target of s6k1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 35, p. 14056-61, Aug 28 2007.

TREMBLAY, F.; MARETTE, A. Amino acid and insulin signaling via the mtor/p70 s6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 41, p. 38052-60, Oct 12 2001.

TSUBUKU, S. ET AL. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. **Int J Toxicol**, v. 23, n. 2, p. 119-26, Mar-Apr 2004.

TURGEMAN, T. ET AL. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. **Neuromuscul Disord**, v. 18, n. 11, p. 857-68, Nov 2008.

TYNI-LENNE, R. ET AL. Skeletal muscle endurance training improves peripheral oxidative capacity, exercise tolerance, and health-related quality of life in women with chronic congestive heart failure secondary to either ischemic cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 80, n. 8, p. 1025-9, Oct 15 1997.

VALERIO, A.; D'ANTONA, G.; NISOLI, E. Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: An evolutionary perspective. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 5, p. 464-78, May 2011.

VAN KOEVERING, M.; NISSEN, S. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. **Am J Physiol**, v. 262, n. 1 Pt 1, p. E27-31, Jan 1992.

VAN NORREN, K. ET AL. Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice. **Br J Cancer**, v. 100, n. 5, p. 713-22, Mar 10 2009.

VAN VENROOIJ, L. M. ET AL. The impact of low preoperative fat-free body mass on infections and length of stay after cardiac surgery: A prospective cohort study. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 142, n. 5, p. 1263-9, Nov 2011.

VANZELLI, A. S. ET AL. Association of physical training with beta-blockers in heart failure in mice. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 3, p. 373-80, Sep 2010.

VARY, T. C.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 277, n. 6 Pt 1, p. E1077-86, Dec 1999.

VARY, T. C.; LYNCH, C. J. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. **J Nutr**, v. 137, n. 8, p. 1835-43, Aug 2007.

VIEIRA, N. M. ET AL. Sjl dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2391-8, Sep 2008.

VON HAEHLING, S.; DOEHNER, W.; ANKER, S. D. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. **Cardiovasc Res**, v. 73, n. 2, p. 298-309, Jan 15 2007.

WAGENMAKERS, A. J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise. **Diabetes Nutr Metab**, v. 12, n. 5, p. 316-22, Oct 1999.

WANG, D.; SUL, H. S. Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase b/akt. **J Biol Chem**, v. 273, n. 39, p. 25420-6, Sep 25 1998.

WANG, X.; PROUD, C. G. The mtor pathway in the control of protein synthesis. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 362-9, Oct 2006.

WILLENHEIMER, R. ET AL. Effects on quality of life, symptoms and daily activity 6 months after termination of an exercise training programme in heart failure patients. **Int J Cardiol**, v. 77, n. 1, p. 25-31, Jan 2001.

WILSON, J. R. ET AL. Relationship between exertional symptoms and functional capacity in patients with heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 33, n. 7, p. 1943-7, Jun 1999.

XIANG, Y.; KOBILKA, B. K. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1530-2, Jun 6 2003.

XU, G. ET AL. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mtor-signaling pathway by pancreatic beta-cells. **Diabetes**, v. 50, n. 2, p. 353-60, Feb 2001.

XU, L. ET AL. Phospholipase d mediates nutrient input to mammalian target of rapamycin complex 1 (mtorc1). **J Biol Chem**, v. 286, n. 29, p. 25477-86, Jul 22 2011.

XU, M. ET AL. Mechanism of activation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex by exercise. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 287, n. 3, p. 752-6, Sep 28 2001.

YANG, Y. T.; MCELLIGOTT, M. A. Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. **Biochem J**, v. 261, n. 1, p. 1-10, Jul 1 1989.

YIMLAMAI, T. ET AL. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. **J Appl Physiol**, v. 99, n. 1, p. 71-80, Jul 2005.

ANEXOS

ANEXO A: Aminograma da ração consumida

Análise	Unidade	Resultado	Padrão		Status
			Mínimo	Máximo	
Proteína Bruta	%	23,71			
Alanina	%	1,19			
Arginina	%	1,87			
Ác. Aspartico	%	2,53			
Glicina	%	1,26			
Isoleucina	%	1,02			
Leucina	%	2,03			
Ác. Glutâmico	%	4,76			
Lisina	%	1,23			
Cistina	%	0,29			
Metionina	%	0,55			
Fenilalanina	%	1,15			
Tirosina	%	0,87			
Treonina	%	0,91			
Triptofano	%	0,29			
Prolina	%	1,66			
Valina	%	1,09			
Histidina	%	0,67			
Serina	%	1,19			
Soma dos aminoácidos	%	24,57			