

EFEITO DA LEUCINA NA HIPERTROFIA CARDÍACA E NA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE CREATINA QUINASE EM RATOS WISTAR EM HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL

EFFECT OF LEUCINE IN CARDIAC HYPERTROPHY AND SERUM CREATINE KINASE IN RATS IN EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM

Thiago Montes FIDALE¹; Alexandre GONÇALVES²; Leandro Teixeira Paranhos LOPES³; Poliana Rodrigues ALVES¹; Fernanda Rodrigues de SOUZA¹; João Elias Dias NUNES⁴; Antônio Vicente MUNDIM⁵; Elmiro Santos RESENDE⁶

1. Mestrando em Ciências da Saúde - PGCS, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, MG, Brasil. thiagofidale@gmail.com; 2 - Doutorando em Ciências da Saúde - UNB, DF, Brasil; 3. Mestre em Ciências da Saúde - PGCS-UFU, MG, Brasil; 4. Doutorando em Genética e Bioquímica - PGGB-UFU, Professor da Faculdade de Educação Física - FAEFI-UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 5. Doutor em Genética e Bioquímica - PGGB-UFU, Professor da Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV-UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 6. Doutor em Medicina - UNIFESP, Professor da Faculdade de Medicina - FAMED-UFU e PGCS-UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

RESUMO: A leucina é um regulador do metabolismo proteico in vivo, e existem poucas informações referentes à sua ação na hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo experimental e sua relação com a creatina quinase sérica. O estudo teve por objetivo verificar a ação da leucina na hipertrofia cardíaca e na concentração sérica de creatina quinase em ratos Wistar em hipertireoidismo. Foram utilizados 20 animais, divididos em quatro grupos sendo estes o controle, hormônio, leucina e hormônio + leucina. O hipertireoidismo foi induzido administrando-se, diariamente, 20µg/100 gramas de levotiroxina sódica em suspensão aquosa, por gavagem. A leucina foi suplementada adicionando-se 5% do aminoácido à ração convencional. O sangue foi coletado por punção cardíaca e as análises feitas em kits para CK-NAC, CK-MB e TSH. Ao final do período experimental de sete dias o coração foi removido e pesado. Posteriormente, foi separado o ventrículo esquerdo juntamente com o septo interventricular e pesado. Na comparação estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós-teste de Tukey, considerando-se significativos valores de $p < 0,05$. As concentrações séricas de CK-MB sérica foram menores no grupo leucina ($p < 0,05$) e hormônio + leucina ($p < 0,05$) em comparação a controle. O grupo hormônio, apresentou peso relativo do coração maior que o grupo controle ($p < 0,05$) e peso absoluto do coração maior que hormônio + leucina ($p < 0,05$). Em conclusão, a leucina parece reduzir a hipertrofia cardíaca e a concentração sérica da creatina quinase por mecanismos ainda desconhecidos.

PALAVRAS - CHAVE: Creatina quinase. Hipertireoidismo. Leucina. Miocárdio. Wistar.

INTRODUÇÃO

Na presença de hipertireoidismo, a função cardíaca pode se alterar por ação direta do T3 ou por variações hemodinâmicas e vasculares (MESSIAS et al. 1999), aumentando o débito cardíaco, cronotropismo, inotropismo (AMIDI et al. 1968; GRAETTINGER et al. 1959; SKELTON et al. 1970) e provocando adaptações hipertróficas no coração (GEMMILL 1958; PIANTNEK-LEUNISSEN et al. 1967; SANDIER et al. 1959).

O excesso de hormônio tireoideano provoca diferentes respostas cardiovasculares dependentes do tempo de exposição. Ocorre inicialmente uma hipertrofia fisiológica sinalizada intracelularmente pelas vias da proteína quinase B (PKB) e, extracelularmente, pela quinase ativada (ERK 1/2). Cronicamente, pode ocorrer sinalização apoptótica dependente das caspases (FERNANDES 2010).

A creatina quinase (CK) consiste de um dímero composto de duas subunidades B e M, separadas em três isoformas distintas que ocorrem

predominantemente no tecido cerebral (CK-BB), no miocárdio (CK-MB) e na musculatura esquelética (CK-MM) (HORDER et al. 1991). A dosagem da concentração sérica de CK é usada como método auxiliar no diagnóstico da distrofia muscular progressiva (EBASHI et al. 1959) e no infarto do miocárdio. Variações de sua concentração apresentam-se como um importante marcador clínico para lesão muscular muitas vezes presentes nas disfunções da tireóide (ROSALKI 1970; MELTEZER 1971).

Os hormônios tireoideanos, particularmente o T3, modulam a síntese geral da fosfocreatina (PCr), aumentam a taxa de fosforilação oxidativa mitocondrial, regulam a atividade total da CK e a distribuição de suas isoenzimas. O hipertireoidismo produz aumento da permeabilidade passiva do sarcolema à creatina quinase e, como resultado, ocorre desacoplamento da PCr mitocondrial. Como a taxa de utilização da energia no estado de repouso está aumentada no hipertireoidismo, uma diminuição da PCr intracelular, aumenta a

susceptibilidade do miocárdio à hipóxia e a possíveis danos (SEPPET et al. 1994).

A leucina pertence ao grupo dos aminoácidos de cadeia ramificada e alifática (BCAA). Estes aminoácidos são reguladores do metabolismo proteico muscular *in vivo* e constituem-se em terapia nutricional a ser utilizada em situação de desuso muscular, agindo como estimuladora de síntese proteica ou inibindo a proteólise (KOBAYASHI et al. 2006).

Diante disso, o objetivo do estudo foi esclarecer a ação da leucina na hipertrofia cardíaca e na concentração de creatina quinase, em ratos Wistar, utilizando-se o modelo experimental de hipertireoidismo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Medicina Experimental da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU) sob o parecer nº193/11. Foram utilizados no estudo 20 ratos Wistar, machos, com aproximadamente três meses de vida e peso corporal de $313g \pm 18$, conforme ilustrado na Tabela 1.

O estudo teve duração de sete dias e durante o período experimental as condições ambientais do laboratório foram mantidas constantes, no que se refere à temperatura, nível de ruído e luminosidade, com foto períodos de 12 horas de ciclo claro e escuro.

Delineamento experimental

Os animais foram agrupados aleatoriamente em quatro grupos de cinco ratos cada e mantidos separados. Os grupos estão descritos abaixo.

Grupo controle (C), composto por cinco animais com acesso livre a ração comercial RHOSTER® de acordo com American Institute of Nutrition (AIN-93G).

Grupo hormônio (H), composto por cinco animais em hipertireoidismo experimental e com acesso livre a ração.

Grupo leucina (L), composto por cinco animais com acesso livre a ração suplementada com leucina a 5%.

Grupo hormônio + leucina (HL), composto por cinco animais em hipertireoidismo experimental com acesso livre à ração suplementada com leucina a 5%.

Todos os animais tiveram acesso livre à água.

Indução do Hipertireoidismo

Os Grupos H e HL receberam, durante todo o período experimental, por meio de gavagem, a dose diária de $20\mu\text{g}/100$ gramas de peso corporal em suspensão aquosa, ou seja, $2\text{ml}/\text{kg}$ de peso de T4 a 0,01%, obtida a partir de 10 comprimidos de $100\mu\text{g}$ de T4 diluídos em 10ml de água destilada (ENGELMAN et al. 2001; FERNANDES et al. 2007).

Eutanásia dos animais e coleta de sangue

Ao final de sete dias de experimento, todos os animais foram pesados em balança Marte® AS 500, anestesiados com uma dose de 0,1 ml/100g de Cetamina a 10%, associado a 0,1 ml/100g de Xilasina a 2%. Foi coletado sangue através de punção cardíaca e, posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia.

Análises laboratoriais

Após a punção cardíaca, as amostras de sangue foram colocadas em tubos de ensaio VACUETTE® com gel separador e levadas ao laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário da UFU para análise. Para a quantificação da CK-NAC e CK-MB foram utilizados KIT-CK-NAC e KIT-CK-MB Liquiform, da marca LABTEST®. Para determinação do TSH (hormônio estimulante da tireoide) foram utilizados os kits da marca INTERKIT® e a análise foi feita através do método de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA).

Peso do coração

O coração foi removido realizando-se abertura do tórax do animal sendo, a seguir, lavado em solução fisiológica par a pesagem. Posteriormente, os corações foram armazenados em formol a 10%.

Após 72 horas foi separado o ventrículo esquerdo juntamente com o septo interventricular e pesado. O peso relativo do coração foi determinado dividindo-se o peso absoluto do coração em miligramas (mg) pelo peso corporal total do animal em gramas.

Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos em média \pm desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias e teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de média e desvio padrão relativos ao peso corporal total.

Houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal total final, quando se comparou o grupo C aos grupos H (8,44%, $p < 0,05$) e HL (8,55%, $p < 0,05$) com maior peso encontrado no grupo controle nas duas situações.

Tabela 1. Peso Corporal Total

Grupos	N	Peso corporal em g (dia 0)	Peso corporal em g (final)
Controle	5	326,2 ($\pm 15,89$)	348,2 ($\pm 7,32$)
Hormônio	5	305,4 ($\pm 23,61$)	318,8 ($\pm 22,86$) *
Leucina	5	312,0 ($\pm 9,89$)	328,2 ($\pm 10,44$)
Hormônio + leucina	5	301,4 ($\pm 9,55$)	318,4 ($\pm 12,66$) *

Valores expressos em média \pm desvio padrão para, peso corporal inicial (dia 0) e peso corporal final (final); * $P < 0,05$ em relação ao Grupo controle.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de média e desvio padrão relativos ao peso do coração.

Houve diferença estatisticamente significativa no peso absoluto do coração, quando se comparou o grupo H aos grupos HL (14,11% $p < 0,05$) e grupo C (18,13% $p < 0,05$) com maior peso encontrado no grupo hormônio. Quanto ao peso relativo do coração, houve diferença

estatisticamente significativa ao comparar o grupo H ao grupo C (19,43%, $p < 0,05$), com o maior peso presente no grupo hormônio.

Houve diferença estatisticamente significativa para o peso do ventrículo esquerdo na comparação do grupo H aos grupos C (18,4%, $p < 0,05$) e HL (20,23%, $p < 0,05$), com o grupo hormônio apresentando o maior peso (Tabela 2).

Tabela 2. Peso do coração e do ventrículo esquerdo nos diversos grupos

Grupos	N	Peso absoluto do coração, g	Peso relativo do coração, mg/g	Peso ventricular esquerdo, g
Controle	5	1,201 ($\pm 0,10$)	3,73 ($\pm 0,28$)	0,632 ($\pm 0,05$)
Hormônio	5	1,467 ($\pm 0,08$) *	4,66 ($\pm 0,56$) *	0,775 ($\pm 0,07$) *
Leucina	5	1,253 ($\pm 0,10$) †	3,82 ($\pm 0,36$) †	0,668 ($\pm 0,06$)
Hormônio + leucina	5	1,260 ($\pm 0,11$) †	3,95 ($\pm 0,22$)	0,618 ($\pm 0,03$) †

Valores expressos em média \pm desvio padrão para, peso absoluto do coração, peso relativo do coração e peso do ventrículo esquerdo; * $P < 0,05$ em relação ao Grupo controle e † $P < 0,05$ em relação ao Grupo hormônio.

Na Tabela 3 observam-se os valores de média e desvio padrão referentes às concentrações séricas de TSH, CK-NAC e CK-MB.

Para a CK-NAC, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando se comparou o grupo H com o grupo HL (53,4%, $p < 0,05$), com o maior valor apresentado pelo grupo

H. Observou-se diferença estatisticamente significativa para a CK-MB quando foram comparados os grupos L (46,43%, $p < 0,05$) e HL (46,90%, $p < 0,05$) com o grupo C. As menores concentrações foram encontradas nos grupos L e HL.

Tabela 3. Concentrações séricas de TSH, CK-NAC e CK-MB

Grupos	N	TSH (ng/ml)	CK-NAC (U/L)	CK-MB (U/L)
Controle	5	1,45 ($\pm 0,35$)	1510,80 (± 482)	1005,75 (± 314)
Hormônio	5	0,39 ($\pm 0,07$) *	1682,26 (± 796)	934,31 (± 363)
Leucina	5	1,36 ($\pm 0,29$) †‡	788,28 (± 180)	538,75 (± 112) *
Hormônio + Leucina	5	0,42 ($\pm 0,08$) *	704,00 (± 133) †	533,99 (± 43) *

Valores expressos em média \pm desvio padrão para hormônio estimulador da tireoide (TSH), creatina quinase (CK-NAC) e creatina quinase fração MB (CK-MB); * $P < 0,05$ em relação ao Grupo controle; † $P < 0,05$ em relação ao Grupo hormônio; ‡ $P < 0,05$ em relação ao Grupo hormônio e leucina.

DISCUSSÃO

O hormônio estimulador da tireoide (TSH) estimula a síntese e secreção de T3 e T4, as concentrações séricas de TSH são inferiores aos valores normais em quase todos os pacientes com hipertireoidismo (CORVILAIN et al. 2000). Este fato foi registrado no presente estudo confirmando o estado de hipertireoidismo dos animais que receberam o T4. Os valores de TSH foram significativamente menores nos grupos H (73,79%, $p < 0,05$) e HL (71,03%, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Resultados semelhantes foram descritos utilizando a mesma metodologia por Fernandes et al. (2007) e Guimarães (2004).

No presente estudo, após 7 dias de experimento, o peso absoluto do coração, no grupo H apresentou um valor 14,11% maior que o grupo HL e 18,13% maior que o grupo C, evidenciando que o modelo aplicado foi eficiente em promover a hipertrofia cardíaca em curto período de tempo. Resultados semelhantes foram encontrados, também em ratos, por Hu et al. (2003), que após 7 dias de exposição a uma dose de 100µg/100g/dia, constataram um peso absoluto do coração 15,% maior em relação ao grupo controle.

Também foram observadas modificações no peso corporal final dos animais, com valores significativamente menores nos grupos H e HL. Quanto ao peso relativo do coração, o grupo H apresentou um valor 19,43% maior que o grupo C. A tiroxina provoca adaptações morfológicas podendo variar tanto o peso do coração, quanto o peso corporal total. Estes fatos estão relacionados às altas demandas metabólicas impostas no hipertireoidismo. Estudos utilizando calorimetria indireta demonstraram que o gasto energético de pacientes com hipertireoidismo encontra-se significativamente elevado, e que a demanda calórica extra, associada à tireotoxicose é proveniente principalmente da maior oxidação de lipídios. (NORRELUND, et al., 1999).

O peso do ventrículo esquerdo mostrou aumento de 18,4% no grupo H quando comparado ao grupo C, sugerindo que o modelo aplicado provocou adaptações hipertroficas nesta câmara. Hu et al. (2003) também encontraram diferenças significantes entre o peso ventricular esquerdo em ratos em hipertireoidismo em relação ao grupo controle, após 7 dias de exposição à tiroxina.

Um achado importante do presente estudo é a relação da leucina com a hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo. Encontramos um peso absoluto do coração significamente maior no

grupo H quando comparado ao grupo HL (14,11%). Também o peso do ventrículo esquerdo foi 20% maior no grupo H quando comparado ao grupo HL. Estes resultados indicam uma ação da leucina como inibidor da hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo experimental. As implicações clínicas deste fato, aqui descrito pela primeira vez, são, no entanto, desconhecidas.

Possivelmente a leucina tenha ação inibitória na atividade da PI3-K induzida pela tiroxina (Figura 1), efeito este decorrente da ativação da mTOR, que inibe a sinalização da tiroxina por fosforilação do receptor hormonal. Entretanto, a leucina não apresenta nenhum efeito descrito na fosforilação da proteína quinase B (PKB ou Akt), envolvidas na via da tiroxina. Curiosamente, um efeito semelhante foi observado relacionando a leucina, a ação da insulina (TREMBLAY et al., 2005; TORRES-LEAL et al. 2010). Mas a relação eventual com o mecanismo da leucina é, no máximo, de natureza especulativa.

A creatina quinase está presente no músculo esquelético, cardíaco e tecido cerebral, conforme descrito anteriormente e o aumento de sua concentração sérica é um marcador de lesão celular. A CK-MB está confinada quase que exclusivamente no tecido cardíaco e concentrações elevadas de CK-MB são de grande significado para diagnóstico de dano no miocárdio (HORDER et al. 1991).

Estudos realizados por Birk (1989) mostraram que a administração crônica de grandes quantidades de hormônios tireóideos parece provocar mudanças no perfil das isoformas de creatina quinase caracterizadas pela alteração das concentrações das isoenzimas CK-BB e CK-MM, como resultado da ação direta do hormônio.

Observou-se no presente estudo que não houve mudanças estatisticamente significantes na concentração sérica da CK-NAC e de sua fração MB, comparando-se o grupo H com o grupo C. Resultados semelhantes foram descritos por Prakash et al. (2007) em pacientes com hipertireoidismo clínico. Estes resultados parecem indicar que no modelo experimental utilizado, o hormônio tireoidiano administrado por sete dias, não altera as concentrações da creatina quinase e de sua fração MB, provavelmente por não induzir danos teciduais expressivos.

Outro achado importante se refere à concentração sérica da creatina quinase nos grupos suplementados com leucina. Observou-se que os valores de CK-NAC foram mais elevadas no grupo H quando comparados aos valores do grupo HL. Quanto à CK-MB, observou-se que os grupos L e HL apresentam concentrações séricas mais baixas

do que o grupo C sugerindo uma ação moduladora da leucina. Esta ação pode estar ligada a efeitos anabólicos ou anti-catabólicos no metabolismo das

proteínas (CANEDO et al. 2010; KOBAYASHI et al. 2006; ESCOBAR et al. 2005).

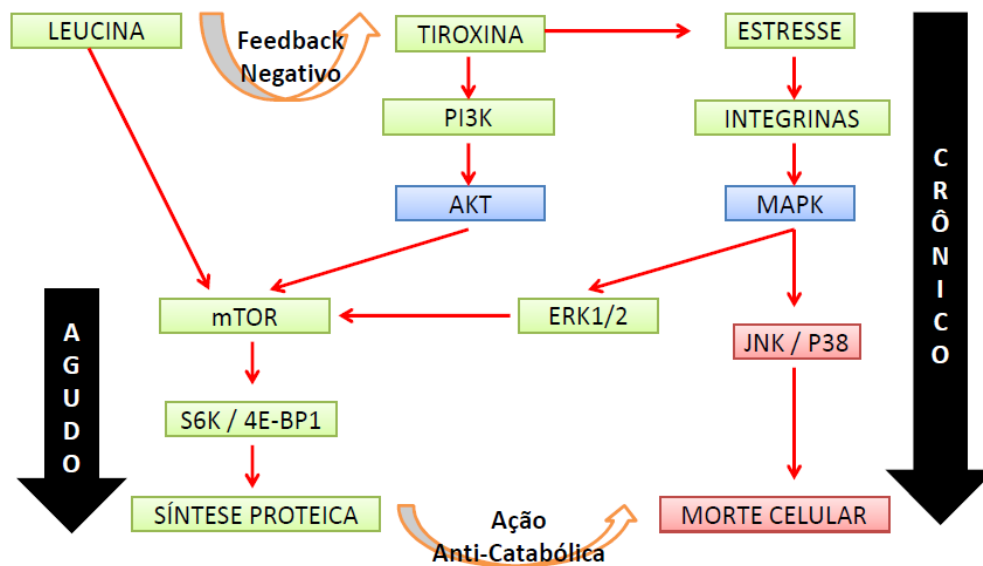


Figura 1. Vias de sinalização intracelular da leucina, tiroxina e estresse mecânico. Vias de sinalização intracelular, (PI3K), fosfatidil-inositol 3 quinase; (PDK1), phosphoinositide-dependent protein kinase; (S6k), ribosomal protein S6 kinase; (4E-BP1), Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1; (mTOR), mammalian target of rapamycin; (AKT-PI3K), Fosfatidil-inositol 3 quinase; (MAPK), proteína quinase ativado por mitogenos; (ERK 1/2), quinase reguladora de sinais extracelulares; Jun N-terminal kinase (JNK); (p38) mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members.

CONCLUSÃO

A leucina parece inibir a hipertrofia cardíaca induzida no hipertireoidismo experimental, além de reduzir as concentrações séricas de CK-NAC e CK-MB.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PGCS-UFU), ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM-UFU) e ao Laboratório Clínico do Hospital Veterinário (UFU) pelo apoio técnico científico.

ABSTRACT: Leucine is a regulator of protein metabolism in vivo, and there is little information regarding its action on cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism and its relationship to serum creatine kinase. The study aimed to verify the effect of leucine in cardiac hypertrophy and serum creatine kinase in rats with hyperthyroidism. We used 20 animals were divided into four groups and these control, hormone, hormone + leucine and leucine. Hyperthyroidism was induced by administration of daily 20µg/100 grams of levothyroxine sodium in aqueous suspension by gavage. Leucine was supplemented by adding 5% of the amino conventional diet. Blood was collected by cardiac puncture and analyzes made in kit CK-NAC, CK-MB and TSH. At the end of the trial period of seven days the hearts were removed and weighed. Subsequently, the left ventricle was separated together with the interventricular septum and weighed. In statistical comparison was used analysis of variance (ANOVA) and two-way post-Tukey test, considering p values <0.05. Serum concentrations of serum CK-MB were lower in leucine (p <0.05) and hormone + leucine (p <0.05) compared to control. The hormone group, showed greater relative heart weight than the control group (p <0.05) and absolute heart weight greater than hormone + leucine (p <0.05). In conclusion, leucine appears to reduce cardiac hypertrophy and serum concentration of creatine kinase by unknown mechanisms.

KEYWORDS: Creatine kinase; Hyperthyroidism; Leucine; Infarction; Wistar.

REFERÊNCIAS

- AMIDI, M. et al. Effect of the thyroid state on myocardial contractility and ventricular ejection rate in man. **Circulation Research**, Baltimore, v. 38, p. 229-239, 1968.
- BIRK, H. et al. Thyroxine-induced redistribution of creatine kinase isoenzymes in rat cardiomyocyte cultures. **Cel and Mol Life Sciences**, Verlag, v. 45 n. 6, p. 591-594, 1989.
- CANEDO, C. S. et al. Activation of the cardiac mTOR/p70S6k pathway by leucine requires PDK1 and correlates with PRAS40 phosphorylation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 298, p. 761-769, jan. 2010.
- CORVILAIN, B. et al. Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 278, n. 4, p. E692-9, Apr 2000.
- EBASHI, S. et al. High Creatine Phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy patients. **Bioch J**. Tokyo, v. 46 p. 103, 1959.
- ENGELMAN, M. F. B. et al. Estudo Morfométrico do Fígado de Ratos Submetidos a Doses Supra-Fisiológicas de Tiroxina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 173-179, 2001.
- ESCOBAR, J. et al. DAVIS, T. A. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 290, p. 612-621, nov. 2005
- FERNANDES, M. L. M. P. et al. Efeitos da espirolactona sobre as alterações miocárdicas induzidas pelo hormônio tireoideano em ratos. **Arq Bras de Cardiol**, São Paulo, v. 89 n. 6, p. 398-402, 2007.
- FERNANDES, R. O. **Hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo experimental: Papel do estado redox sobre proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular para crescimento, sobrevivência e morte celular**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2010.
- GEMMILL, C. L. Cardiac hypertrophy in rats and mice given 3,3',5-triiodo-L-thyronine orally. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 195 p. 385-390, 1958.
- GRAETTINGER, J. S. et al. A correlation of clinical and hemodynamic studies in patients with hyperthyroidism with and without congestive heart failure. **J Clin Invest**, Durham, v. 38 p. 1316-1327, 1959.
- GUIMARÃES, C. V. Histomorfometria dentária de ratos com Hipertireoidismo induzido durante ou após a erupção e com hipotireoidismo após a erupção dentária. **Arquivos em odontologia**, Belo Horizonte, v. 40 n. 1, p. 001-110, març. 2004.
- HORDER, M.; ELSER, R. C.; GERHARDT, W. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes: Part 7. IFCC method for creatine kinase. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem**, Berlin, v. 29, p. 435-56, 1991.
- HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v.285, p. 1473-1480, 2003.
- KOBAYASHI, H. et al. Modulations of Muscle Protein Metabolism by Branched-Chain Amino Acids in Normal and Muscle-Atrophying Rats. **Am Society for Nutrit**, Bethesda, v.136 n.1, p.234S-6S, jan. 2006.

- MELTEZER, H. Y. Factors affecting creatine phosphokinase levels in the general population. The role of race, activity and age. **Clin Chem Acta**, New York, v.33, p.165-72, 1971.
- MESSIAS, E. R. R.; CARMONA, M. J. C.; AULER, J. R. Hormônios Tireóideos e Cirurgia Cardíaca. **Rev Bras de Anestesiol**, Rio de Janeiro, v. 403, n. 49, p. 6, 1999.
- PIANTNEK-LEUNISSEN, K.; OLSON, R. E. Cardiac failure in the dog as a consequence of exogenous hyperthyroidism. **Circulation Research**, Dallas, v. 20, p. 242-252, 1967.
- PRAKASH, A.; LAL, A. K.; NEGI, K. S. Serum Creatine Kinase Activity in Thyroid Disorders. **JK Science**, Jammu, v. 9, n. 1, marc. 2007.
- ROSALKI, S. B. Enzyme assays in diseases of the heart and skeletal muscle. **J Clin Pathol**, London, v.24 p. 60-70, 1970.
- SANDIER, G.; WILSON, G. M. The production of cardiac hypertrophy by thyroxine in the rat. **Q J Exp Physiol**, Bethesda, v. 41, p. 282-289, 1959.
- SEPPET, E. K.; SAKS, V. A. Thyroid hormones and the creatine kinase system in cardiac cells. **Mol and Cel Biochem**, Netherland, v. 133, n. 1, p. 299-309, mai. 1994.
- SKELTON, C. L. et al. Augmentation of myocardial oxygen consumption in hyperthyroid cats. **Circulation Research**, Baltimore, v. 27 p. 301-309, 1970.
- TORRES-LEAL, F. L. et al. Aspectos atuais do efeito da leucina sobre o controle glicêmico e a resistência à insulina. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr**, São Paulo, v. 35, 2010.
- TREMBLAY, F. et al. A. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to AKT and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. **Endocrinology**, Stanford, v. 146, n. 3, p. 1328-1337, 2005.