

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Influência da suplementação com  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) em  
músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação

Daiane Cristina Christofolletti

2014

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DAIANE CRISTINA CHRISTOFOLETTI

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM  $\beta$ -  
HIDROXI- $\beta$ -METILBUTIRATO (HMB) EM  
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
SUBMETIDOS À DESNERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade neuromuscular e Desenvolvimento neuromotor: Avaliação e intervenção fisioterapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA

2014

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP  
Bibliotecária: Luciene Cristina Correa

**Christofoletti, Daiane Cristina**  
C556a      Influência da suplementação com  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (hmb) em músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação. / Daiane Cristina Christofoletti. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2014. 77 f. ; il.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Faculdade de Ciências da Saúde / Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia - Universidade Metodista de Piracicaba. 2014.

Orientador: Carlos Alberto da Silva

Inclui Bibliografia

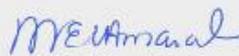
1. Hmb. 2. Suplemento Nutricional. 3. Desnervação Muscular . 4. Atrofia. 5. Fisioterapia. I. Silva, Carlos Alberto da. II. Universidade Metodista de Piracicaba. III. Título.

CDU 615.8

Os membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **DAIANE CRISTINA CHRISTOFOLETTI** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em Sessão Pública realizada em 30 de julho de 2014, consideraram o(a) candidato(a) aprovado(a).

BANCA EXAMINADORA:

  
Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva - UNIMEP

  
Profa. Dra. Maria Esméria Corezola do Amaral  
Centro Universitário Hermínio Ometto - FHO/UNIARARAS

  
Profa. Dra. Adriana Perle - UNIMEP

Aos meus queridos pais Angela e Claudemir, meus pilares de sustentação e maiores incentivadores de todas as minhas conquistas. Ao meu noivo Adriel, meu melhor amigo, meu amor.

Amo Vocês! **Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, essência de todo amor. Papai, obrigada por me sustentar em todos os momentos, por ter me concedido o dom da vida e da sabedoria, por me abençoar com amigos queridos e com uma família amada, e por usá-los para me lembrar de que é o Senhor que está no controle de todas as coisas, e que por mais que tudo pareça contrário a Tua mão poderosa está sempre ali, de forma a sustentar, guiar, cuidar e amar. Esse mestrado só foi possível pela ação da Tua poderosa mão. Obrigada por tornar os meus sonhos reais.

Aos meus pais por serem a base de toda a minha formação. Pai e Mãe, seu amor, zelo, carinho, atenção, são dádivas de Deus na minha vida. Obrigada por viverem comigo os meus sonhos, por me ajudarem a realizar cada um deles e por se alegrarem comigo em cada conquista. Agradeço a Deus todos os dias por serem os meus pais. Amo Vocês.

Ao meu noivo Adriel pelo incentivo e apoio incondicional, por estar presente em todos os momentos, me dando força e dizendo sempre que eu conseguiria. Você é um presente de Deus em minha vida. Obrigada meu amor!

Agradeço ao professor “pai” Carlos por ser um grande orientador e amigo, por compartilhar seus conhecimentos e experiências, permitindo meu crescimento intelectual, científico e profissional, por ser essa pessoa abençoada e abençoadora que não apenas ensina a fazer ciência, mas, também tem o dom de ensinar seus alunos a serem melhores seres humanos. Obrigada por acreditar em mim e por ter me aceitado como sua orientanda. Serei eternamente grata!

Aos professores membros da banca, que prontamente aceitaram o convite para avaliar o trabalho e dar suas valiosas contribuições que serão extremamente

significativas para a formação do texto final dessa dissertação. É uma honra tê-los em minha banca. Muito obrigada.

À professora Ester da Silva, que me acolheu em seu laboratório por 1 ano e meio, como apoio técnico e permitiu que eu aprendesse mais sobre Reabilitação Cardíaca, além de enriquecer meu currículo e me aproximar da pesquisa. Por seus ensinamentos e oportunidade meu eterno agradecimento.

Agradeço as meninas do laboratório de Cardiologia, Nayara, Roberta, Carol, Meire, Vandi e aos meninos Beto e Elie Fiogbe pelo apoio, incentivo, amizade e alegrias que juntos vivenciamos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, onde tive a oportunidade de dar um importante rumo ao crescimento pessoal e profissional.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos animais de laboratório, que com suas vidas proporcionam notória contribuição ao desenvolvimento de novas técnicas e tratamentos médicos, convergindo significativamente para o avanço da ciência e trazendo benefício para nossa saúde. Meu respeito e eterna gratidão.

À todas as pessoas que participaram e contribuíram para realização deste trabalho, direta ou indiretamente, "MUITO OBRIGADA".

“Para realizar grandes conquistas,  
devemos não apenas agir, mas também  
sonhar; não apenas planejar, mas também  
acreditar”

(Anatole France)

## RESUMO

O músculo esquelético exerce importante função no controle glicêmico. Nesse sentido, a homeostasia metabólica das fibras musculares pode ser comprometida por diferentes fatores, dentre eles, a desnervação. O suplemento nutricional  $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -Metilbutirato (HMB), que é um metabólito do aminoácido leucina, tem se destacado por sua eficácia como inibidor das vias de sinalização da proteólise e sua ação na síntese proteica. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os eventos quimio-metabólicos ligados à suplementação com HMB, bem como as características morfométricas do músculo sóleo submetidos à desnervação e à suplementação com HMB. Foram utilizados ratos *Wistar*, distribuídos em 4 grupos experimentais (n=6), a saber: grupo controle (C), grupo suplementado com HMB (S), grupo desnervado (D) e grupo desnervado suplementado com HMB (DS). A suplementação com HMB foi realizada por via gastroesofágica (gavagem), na concentração de 320 mg/kg durante 7 dias consecutivos. As análises realizadas foram: índice de toxicidade hepática através da avaliação das enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina hepática; índice de função renal através da dosagem da creatinina; perfil eletrocardiográfico; secreção de insulina (ilhotas isoladas); responsividade das ilhotas pancreáticas através do teste de tolerância à glicose (GTT); índice de decaimento da glicemia através do teste de tolerância a insulina (ITT); captação da 2-deoxiglicose; conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo, gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV); área de secção transversa das fibras do músculo sóleo. A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA: *two way* e teste de Tukey, ( $P \leq 0,05$ ). Os resultados mostraram que: 1) a suplementação com HMB (320 mg/kg), não promoveu toxicidade hepática e renal, e não modificou o perfil eletrocardiográfico; 2) na secreção de insulina foi observado aumento significativo apenas na presença de 16.7 mmol/L de glicose; 3) o GTT não apresentou diferença significativa; 4) no ITT observou-se aumento significativo da velocidade de decaimento da taxa de glicose; 5) a captação da 2-deoxiglicose mostrou-se significativamente elevada, associada a um aumento na taxa de oxidação e um expressivo aumento na síntese de glicogênio; 6) as reservas glicogênicas do sóleo foram elevadas na presença do HMB mesmo frente à desnervação, já no GB não houve diferença significativa, no entanto o GV apresentou aumento nas reservas apenas no grupo DS; 7) no que se refere à análise morfométrica não foi observado diferença significativa diante da suplementação com HMB. Assim, conclui-se que a suplementação com HMB proporcionou melhora no padrão metabólico do músculo esquelético desnervado, porém, não impediu a atrofia muscular.

**Palavras-chave:** HMB, Suplemento Nutricional, Desnervação Muscular, Atrofia, Fisioterapia.

## ABSTRACT

Skeletal muscle plays an important role in glycemic control. Accordingly, the metabolic homeostasis of muscle fibers may be compromised by different factors, among them, the denervation. The  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate nutritional supplement (HMB), which is a metabolite of the amino acid leucine, has been noted for its likely effectiveness as an inhibitor of signaling pathways of proteolysis and its effects on protein synthesis. The objective of this study was to investigate the chemo-metabolic events related to supplementation with HMB and the morphometric characteristics of the soleus muscle undergoing denervation and supplementation with HMB. Wistar rats were used and allocated into 4 experimental groups (n=6), namely: control group (C), HMB supplemented group (S), denervated group (D) and denervated group supplemented with HMB (DS). HMB supplementation was administered via gastrostomy (gavage) at a concentration of 320 mg/kg for 7 consecutive days. The analyzed data were: index of liver toxicity by evaluating the AST, ALT and Alkaline Phosphatase Liver enzymes; index of renal function through the measurement of creatinine; electrocardiographic profile; insulin secretion (isolated islands); responsiveness of pancreatic islets by glucose tolerance test (GTT); decay rate of glucose through the insulin tolerance test (ITT); uptake of 2- deoxyglucose; glycogen content of the soleus, gastrocnemius white portion (GB) and red portion of gastrocnemius (GV); cross-sectional area of the fibers of the soleus muscle. Statistical analysis was performed using the Shapiro-Wilk normality test, ANOVA: two-way and Tukey test ( $P \leq 0,05$ ). The results showed that: 1) supplementation with HMB (320 mg/kg) did not promote liver and kidney toxicity, and did not modify the electrocardiographic profile; 2) significant increase in insulin secretion was observed only in the presence of 16.7 mmol / L glucose; 3) the GTT showed no significant difference; 4) in the ITT was observed a significant increase in the rate of peripheral glucose uptake; 5) the uptake of 2- deoxyglucose was significantly elevated, associated with an increase in oxidation rate and a significant increase in glycogen synthesis; 6) the soleus glycogen reserves were elevated in the presence of HMB even after denervation, as in GB there were no significant difference, however GV showed an increase in reserves only in the DS group; 7) with respect to the morphometric analysis no significant difference was observed before with HMB supplementation. Thus, it is concluded that supplementation with HMB provided improvement in metabolic pattern of the denervated skeletal muscle, but did not prevent atrophy.

**Key words:** HMB, Nutritional Supplement, Muscle Denervation, Atrophy, Physiotherapy.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Administração do HMB por meio de gavagem (via orogástrica), na qual uma sonda é introduzida pela via gastroesofágica até o estômago e o conteúdo liberado. Fonte: (Andersen et al., 2004). ..... 33
- Figura 2:** Procedimento cirúrgico utilizado para desnervação. A: exposição do membro posterior tricotomizado; B: incisão para localização da inervação; C e D: nervo isquiático isolado e em destaque; E: porção do nervo isquiático seccionado (1 cm); F: incisão suturada. Fonte: Elaborada pelo autor..... 34
- Figura 3:** Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos controle (C) e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias (S). As ilhotas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose (2.8; 5.6; 8.3 e 16.7 mmol/L). Os valores estão expressos em ng/ilhota/80minutos (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ). ..... 43
- Figura 4:** Representação da área sob a curva (glicose/mg/dL/120min) após o teste de tolerância a glicose (GTT) de ratos dos grupos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  epm (n=5). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ). ..... 44
- Figura 5:** Representação da constante de decaimento da glicose (KITT; % min) após o teste de tolerância a insulina (ITT) em ratos dos grupos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  epm (n=5). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ). ..... 45
- Figura 6:** Captação de 2-deoxiglicose [ $\mu\text{mol/g}$ (de tecido úmido)h] pelo músculo sóleo (10 fatias musculares por grupo) de ratos controle e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores representam a média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ). ..... 46
- Figura 7:** Oxidação da glicose [ $\mu\text{mol/g}$  (de tecido úmido)h] no músculo sóleo (10 fatias musculares por grupo) de ratos controle e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg, via orogástrica) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ). ..... 47
- Figura 8:** Síntese de glicogênio [ $\mu\text{mol/g}$  (peso úmido)h] no músculo sóleo (10 fatias musculares por grupo) de ratos controle e de ratos suplementados com

HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, (P  $\leq$  0,05). ..... 48

**Figura 9:** Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo de ratos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do Controle; (#) Difere significativamente do suplementado com HMB; (†) Difere significativamente do desnervado, (P  $\leq$  0,05). ..... 49

**Figura 10:** Conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção branca de ratos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle; (#) Difere significativamente do suplementado com HMB, (P  $\leq$  0,05). ..... 50

**Figura 11:** Conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção vermelha de ratos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle; (#) Difere significativamente do suplementado com HMB; (†) Difere significativamente do desnervado, (P  $\leq$  0,05). ..... 51

**Figura 12:** Área de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) do músculo sóleo de ratos dos grupos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores representam a média  $\pm$  dpm (n=5). (\*) Difere significativamente do controle; (#) difere significativamente do grupo suplementado com HMB, (P  $\leq$  0,05). ..... 52

**Figura 13:** Análise histológica do músculo Sóleo controle (C), suplementado com HMB (S), desnervado (D) e desnervado suplementado com HMB (DS), (320 mg/kg) durante 7 dias. É possível visualizar a fibra Muscular (\*) e seus núcleos periféricos (→), tecido conjuntivo (➤) e artefato (★), (barra= 40  $\mu\text{m}$ ). ..... 53

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Distribuição dos ratos em grupos experimentais. .... 32
- Tabela 2:** Parâmetros eletrocardiográficos (QT, QTc, QRS, intervalo PR e segmento PR em ms) e frequência cardíaca (FC/bpm) de ratos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). .... 41
- Tabela 3:** Avaliação bioquímica da concentração plasmática de enzimas marcadoras de toxicidade de ratos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). .... 42

## LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> - Concentração de cálcio intracelular

< - Menor

**Umol/g.h** - Unidade mol por grama por hora

**ADP** - Adenosina difosfato

**Akt** - Proteína serina/treonina quinase ou proteína quinase B

**ATP** - Adenosina trifosfato

**BCAAT** - Enzima transaminase do aminoácido de cadeia ramificada

**BCKD** - Enzima desidrogenase de α-cetoácido de cadeia ramificada

**bpm** - Batimentos por minuto

**Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio

**dpm** - Desvio padrão da média

**epm** - Erro padrão da média

**FC** - Frequência cardíaca

**GLUT** - Proteína transportadora de glicose

**GLUT 4** - Proteína transportadora de glicose tipo 4

**GLUT1** - Proteína transportadora de glicose tipo 1

**Grb2** - Proteína ligante do receptor do fator de crescimento 2

**GTP** - Guanosina trifosfato

**GDP** - Guanosina difosfato

**GTT** - Teste de tolerância à glicose

**h** - Horas

**HMG-CoA** - β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA

**HMG-CoA Liase** - β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA liase

**i.m** - Intramuscular

**IGF-I** - Fator de crescimento insulínico

**IP3** - Inositol trifosfato

**IR** - Receptor de insulina

**IRS** - Substrato do receptor de insulina

**IRS-1** - Substrato 1 do receptor de insulina

**IRS-2** - Substrato 2 do receptor de insulina

**ITT** - Teste de tolerância à insulina

**K<sup>+</sup>** - Potássio

**KIC** -  $\alpha$ -cetoisocaproato

**KICD** -  $\alpha$ -cetoisocaproato dioxigenase

**Kitt** - Decaimento da glicose expressa em porcentagem por minuto

**KOH** - Hidróxido de Potássio

**MAPK** - Proteína quinase ativada por mitógenos

**mg** – Miligrama

**mg/kg** - Miligramas por kilograma

**mg/mg** - Miligrama por miligrama

**mL** - Mililitros

**mM** - Milimol

**mMol/g** - Milimol por grama

**ms** - Milisegundo

**mTOR** - Enzima alvo da rapamicina

**MuRF-1** - Muscle ring finger protein-1

**°C** - Grau Celsius

**P** - Valores de probabilidades

**PI3K** - Fosfatidilinositol-3-quinase

**Ras** - Subtipo monomérico de proteína ligante de nucleotídeos de guanina

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucleico mensageiro

**rpm** - Rotação por minuto

**ANOVA** - Análise de variância

**i.p.** - Intraperitoneal

**SH2** - Domínio 2 homólogo a Src

**Shc** - Proteína adaptadora de ligação a fosfotirosina contendo SH2

**SHP-2** - SH2 contendo domínio de proteína tirosina fosfatase

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SOS** - Fator de troca do nucleotídeo guanina

**Src** - Família de proteínas tirosina quinase

**U/Kg** - Unidade por kilograma

**$\beta$**  - Beta

**$\mu\text{m}^2$**  - Micrômetros quadrado

# SUMÁRIO

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                 | 14 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                  | 30 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                            | 30 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                      | 30 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                         | 32 |
| 3.1 ANIMAIS .....                                                   | 32 |
| 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....                                       | 32 |
| 3.3 SUPLEMENTAÇÃO COM $\beta$ -HIDROXI- $\beta$ -METILBUTIRATO..... | 33 |
| 3.4 DESNERVAÇÃO.....                                                | 33 |
| 3.5 AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA.....                              | 34 |
| 3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE .....                                   | 35 |
| 3.7 SECREÇÃO DE INSULINA.....                                       | 35 |
| 3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT) .....                       | 37 |
| 3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) .....                      | 37 |
| 3.10 CAPTAÇÃO DE 2-DEOXIGLICOSE .....                               | 37 |
| 3.11 DOSAGEM DA SÍNTESE DE GLICOGÊNIO .....                         | 38 |
| 3.12 GLICOGÊNIO MUSCULAR .....                                      | 39 |
| 3.13 ANÁLISE DA SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES             | 39 |
| 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                       | 40 |
| 4. RESULTADOS .....                                                 | 41 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                  | 54 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                 | 63 |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                                 | 64 |

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema musculoesquelético necessita de inervação motora e atividade proprioceptiva íntegra e de uma carga mecânica adequada para que possa exercer suas funções (Silveria, Perot e Goubel, 1994).

Para uma dinâmica contrátil eficaz e manutenção da massa muscular, é necessário um suporte estrutural composto por células musculares, tecido conjuntivo, suprimento sanguíneo e inervação. A movimentação corpórea exige o controle neuromuscular, e também ajustes complexos que abrangem sinalizadores químicos, aporte de substratos metabolizáveis e geração de energia (Berne e Levy, 2003; Koeppen e Stanton, 2009).

Histologicamente, o músculo estriado esquelético é composto por fibras musculares do tipo I ou tipo II que podem ser subdividida em IIa e IIb, classificadas de acordo com suas propriedades estruturais e fisiológicas. As fibras do tipo I (vermelhas), de contração lenta, são extremamente resistentes à fadiga, possuem grande quantidade de mitocôndrias volumosas, menor capacidade de liberar e captar o cálcio, apresentam baixa atividade da enzima miosina ATPase e conseqüentemente velocidade de contração reduzida e sua principal fonte de geração de energia é o sistema aeróbio. Por outro lado, as fibras do tipo IIb (brancas), de contração rápida, são menos resistentes à fadiga, possuem uma quantidade reduzida de mitocôndrias, alta liberação e captação de cálcio, maior atividade da enzima miosina ATPase, e geram energia predominantemente através do sistema anaeróbio. Já as fibras do tipo IIa, são mistas, ou seja, apresentam um comportamento intermediário entre as fibras musculares vermelhas e brancas, no entanto, a presença de mioglobina em sua estrutura

atribui a ela características semelhantes às fibras vermelhas (Zierath e Hawley, 2004; Ross e Pawlina, 2012; Gartner, Leslie e James, 2013).

No que se refere ao padrão metabólico do tecido muscular, dentre os principais substratos utilizados para se obter energia, destaca-se a glicose, responsável por fornecer a adenosina trifosfato (ATP) tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Os sistemas de captação de hexose pelo músculo são regulados pela insulina, pela atividade metabólica tecidual, ou ainda pela atividade contrátil das fibras (De Fronzo, 1988; Klip e Paquet, 1990; Andersen et al., 1993).

Sabe-se que a captação de glicose pelo músculo é um processo mediado por uma família de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs), denominadas transportador de glicose tipo 1 (GLUT1) e transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) (Klip e Paquet, 1990). Essas proteínas apresentam funções distintas, o GLUT1 é responsável pela captação basal de glicose, já o GLUT4 participa efetivamente do controle glicêmico.

O GLUT4 é modulado pelo sistema endócrino, uma vez que a insulina promove a translocação dessa proteína de reservatórios citosólicos para a membrana, e eleva a captação muscular de glicose, que pode ser oxidada ou direcionada para formação de reservas energéticas de glicogênio (Henriksen et al., 1990; Bell et al., 1990; Richardson et al., 1991).

O conteúdo de glicogênio no músculo esquelético está diretamente relacionado à capacidade aeróbia ou à capacidade de “endurance” do organismo de forma que as alterações no perfil enzimático, das mitocôndrias e das reservas glicogênicas são os responsáveis pela eficiência muscular, assim como, a

depleção das reservas de glicogênio é o evento marcador do estado de exaustão muscular (Taylor, Thayer e Rao, 1972; Curi et al., 2003).

Na década de 90 pesquisadores investigaram na musculatura esquelética a relação entre a captação de glicose e a contração muscular, e observaram que, com a elevação da atividade contrátil, ocorre uma maior translocação de GLUT4 para a membrana, e conseqüentemente aumento da captação de glicose (Goodyear et al., 1992; Neuffer, Shinebarger e Dohm, 1992; Rodnick et al., 1992). Segundo Klip e Paquet (1990), a captação de glicose desencadeada pela elevação da contração muscular pode variar de acordo com o tipo de músculo ou do status metabólico e que provavelmente existe variação interespecie, de forma que os músculos de humanos diferenciam-se por serem mais sensíveis à insulina.

A elevação dos níveis de glicose na corrente sanguínea induz efeitos pleiotrópicos nas células beta ( $\beta$ ) do pâncreas, efeitos esses mediados pela ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular. O metabolismo da glicose altera a razão adenosina trifosfato/adenosina difosfato (ATP/ADP) e reduz a condutância ao potássio ( $K^+$ ) que quando se acumula nas células  $\beta$ , promove a despolarização da membrana e conseqüente abertura dos canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) sensíveis à voltagem. O influxo de  $Ca^{2+}$  com conseqüente aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) desencadeia o processo secretório da insulina (Ashcroft, Harrison e Ashcroft 1984; Cook e Hales, 1984; Prentki e Corkey, 1996).

A ação da insulina em células alvo inicia-se a partir do acoplamento ao seu receptor específico localizado na membrana celular, uma proteína

heterotetramérica com atividade quinase intrínseca. O receptor de insulina (IR) é formado por duas subunidades  $\alpha$  localizadas na região externa da membrana e duas subunidades  $\beta$  transmembrana. Uma vez ligada à subunidade  $\alpha$ , a insulina estimula a autofosforilação da região intracelular do receptor que corresponde à subunidade  $\beta$  (Patti e Kahn, 1998). A autofosforilação do IR fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Dentre os substratos do receptor insulínico (IRS) que já foram descritos, destacam-se quatro IRS (IRS - 1, 2, 3 e 4) (White, 1998).

Os principais substratos do receptor de insulina são IRS-1 e o IRS-2, que, quando fosforilados em tirosina criam sítios de ligação para moléculas que contém domínios com homologia a Src 2 (SH2), como a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), que é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulada pela insulina (Bernal-Mizrachi et al., 2001). A PI3K uma vez ativada aumenta a fosforilação de uma serina da proteína quinase B (PKB/ Akt), a qual, promove a translocação do Glut 4 para a membrana plasmática, e permite a captação de glicose por difusão facilitada em tecidos periféricos como o músculo e o tecido adiposo (Czech e Corvera, 1999).

A insulina, semelhante a outros fatores de crescimento também estimula a *mitogen-activated protein* quinase (MAPK), por meio da fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína ligante do receptor do fator de crescimento 2 (Grb2) envolvida na transdução de sinal, e resulta na ativação de uma complexa sinalização mitogênica (Paez-Espinosa et al, 1999). A proteína Grb2 está associada ao fator de troca do nucleotídeo guanina (SOS), que troca GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) da Ras (subtipo monomérico de proteína ligante de nucleotídeos de guanina) ativando-a.

A ativação da Ras requer a participação da SHP2 (SH2 que contém domínio de proteína tirosina fosfatase). A Ras ativada estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celular (Boulton et al., 1991).

O hormônio insulínico aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas no tecido muscular através da ativação da mTOR (enzima alvo da rapamicina ligada ao anabolismo). A via mTOR controla o crescimento celular em resposta à energia, aminoácidos, nutrientes, fatores de crescimento e outros estímulos ambientais, através da fosforilação da p70- ribossomal S6 quinase (p70rsk), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1 (enzima da via anabólica intracelular), que aumenta a síntese proteica via aumento da translação de proteínas (Cross et al., 1995; Brooks e Myburgh, 2014).

O músculo esquelético tem a capacidade intrínseca de alterar suas características fenotípicas e de se adaptar frente aos estímulos recebidos, o que deflagra mudanças no seu tamanho ou na tipagem da sua fibra. Vários estímulos podem causar essas alterações, dentre eles, destaca-se o desuso muscular, alterações hormonais, status nutricional, exercício físico, entre outros (Salvini, 2000; Capitanio et al., 2006).

Nesse sentido, vários estudos utilizaram técnicas não invasivas como, suspensão do corpo (Morey et al., 1979; Tanaka, Kariya e Hoshin, 2004), órtese de tecido de algodão (Coutinho et al., 2002), talas de gesso (Heslinga, Kronnie e Huijing, 1995), órtese de resina acrílica (Silva et al., 2006) e técnicas invasivas como, tenotomia (Jakubiec-Puka, Catani e Carraro 1992; Abrams et al., 2000;

Seabra, 2012), fixação da articulação por meio de pinos e bloqueio químico da junção neuromuscular (Hirose et al., 2000) e desnervação (Marques, 1992; Fernandes et al., 2005; Macdonald et al., 2014) que foram realizados com o intuito de aprimorar o conhecimento sobre os eventos causados pelo desuso do músculo esquelético.

Conhecer as adaptações que ocorrem no músculo frente o desuso é de extrema importância para direcionar intervenções fisioterapêuticas, o que permite maior e melhor efetividade na interface avaliação e tratamento (Rose e Rothstein, 1982).

Na prática clínica, comumente aparecem casos de lesões de nervos periféricos, que ocorrem com maior frequência devido a acidentes automobilísticos e de esporte, seguidos de traumas penetrantes e lesões ao nascimento decorrentes de tração nervosa excessiva (Ijkema-Paassen et al., 2004).

As lesões nervosas periféricas além de causar alterações no padrão funcional do sistema nervoso central e periférico, os tecidos por estes inervados acabam por ser comprometidos pelo desuso. Quando ocorre a interrupção completa da inervação motora, observa-se a perda imediata da ação voluntária deste tecido bem como sua ação reflexa, proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, redução da área de secção transversa da fibra muscular, diminuição ou perda na capacidade de gerar força, entre outros (Eberstein e Eberstein, 1996; Henriksen et al., 1997; Dow et al., 2006).

Após secção completa de um nervo periférico, ocorrem mudanças significativas no tecido muscular relacionadas ao metabolismo de carboidratos,

dentre elas, resistência periférica insulínica, devido a diminuição na concentração de PI3K, redução do número de GLUT 4, na expressão gênica do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do GLUT 4, atividade reduzida das enzimas participantes da glicólise e inativação da enzima glicogênio sintetase.

Os efeitos causados pela desnervação convergem para a redução na captação e metabolismo da glicose, o que leva à diminuição das reservas energéticas, proteólise miofibrilar do tecido afetado, além de predispor as fibras musculares à atrofia (Sowell, Dutton e Buse, 1989, Coderre et al., 1992; Henriksen et al., 1997; Forti, Guirro e Silva, 2004). Estudos mostram que essas alterações já podem ser observadas três horas após secção do nervo e que a partir do terceiro dia após a desnervação há redução de 80% na sensibilidade ao hormônio insulínico (Smith e Lawrence, 1984; Turinsky, Damrau-Abney e Loegering, 1998).

A redução da massa muscular no processo de atrofia é desencadeada pelo desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas miofibrilares, fato este que tem estimulado a investigação de vias metabólicas envolvidas nesse processo (Bodine et al., 2001; Baar, Nader e Bodine 2006; Sandri, 2008).

Pesquisadores têm observado que em situação de atrofia do músculo esquelético ocorre inibição de *Insulin-like growth factors I* (IGF-I), que é o principal ativador da via de síntese proteica Akt/mTOR (Jackman e Kandarian, 2004; Kandarian e Jackman, 2006).

Alguns sistemas proteolíticos têm sido descritos como participantes no processo de atrofia causada por desuso muscular. Entre eles, podem ser citadas

a via das calpaínas, a via de sinalização lisossomal (via das catepsinas) e a via ubiquitina-proteassoma (Jackman e Kandarian, 2004).

A via das calpaínas é ativada quando há elevação da concentração de cálcio intracelular e é responsável pela clivagem de proteínas miofibrilares como as proteínas titina e nebulina, responsáveis pela ancoragem do sarcômero (Powers, Kavazis e Deruisseau, 2005).

As catepsinas não degradam proteínas citosólicas, no entanto, são responsáveis principalmente pela degradação de proteínas de membrana, como receptores, canais de íons e transportadores, além de poderem degradar proteínas ubiquitinadas (Jackman e Kandarian, 2004).

Já a via ubiquitina-proteassoma está intimamente relacionada à perda de massa muscular e envolve a cooperativa interação de três componentes enzimáticos, enzima ativadora de ubiquitina (E1) que ativa a ubiquitina com gasto de ATP, enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que forma um complexo poliubiquitina, e enzima ubiquitina-ligase (E3). Inicialmente, a E1 é ativada e, em uma reação dependente de energia, transfere, através da E2, a ubiquitina para a E3, que catalisa a ligação da ubiquitina à proteína, e a sinaliza para ser degradada. Esse processo de degradação de proteínas poliubiquitinadas ocorre no proteossoma (20S ou 26S), que é um complexo composto por uma ou três grandes enzimas com a função de degradar proteínas desnecessárias ou danificadas da célula (Hasselgren, Wray e Mammen, 2002; Baptista et al., 2010).

As enzimas E3, como, por exemplo, atrogin-1 e muscle ring finger protein-1 (MuRF-1), tem a função de garantir a especificidade do sistema de degradação proteassomal, pois estas se ligam a sítios específicos das proteínas

que serão degradadas, e as sinalizam para o reconhecimento e posterior morte no proteassoma 26S (Lecker, 2003; Li et al., 2003).

A degradação de proteínas miofibrilares decorrente da desnervação afeta tanto fibras musculares lentas (tipo I) quanto rápidas (tipo II), no entanto, este efeito é mais severo em fibras do tipo I, as quais apresentam maior grau de atrofia após desuso muscular (Michel e Gardiner, 1989; Lieber, 2002). Nesse contexto, Appell (1990) sugere que tal fato ocorra devido às enzimas oxidativas responderem pela redução da sua atividade, dessa forma, as fibras musculares que possuem metabolismo predominantemente oxidativo (tipo I) são mais susceptíveis à atrofia do tecido muscular.

Herrera et al. (2001), estudaram a inatividade muscular em membros posteriores de ratos, e observaram que o músculo sóleo atrofia mais que o extensor longo dos dedos. Isto provavelmente está relacionado com a composição do tipo de fibra, visto que o sóleo apresenta mais fibras do tipo I e o extensor longo dos dedos maior número de fibras do tipo II, além da função destes durante a condição normal de descarga de peso. Assim, devido ao menor estímulo e solicitação das fibras posturais durante o desuso, o músculo sóleo tem maior comprometimento.

A recuperação da função muscular após lesão nervosa periférica não depende apenas da regeneração nervosa, mas também das condições do músculo no momento da reinervação, tais como trofismo muscular, tamanho da área de fibrose e capacidade miogênica das células satélites (Dow et al., 2004).

No intuito de atenuar os eventos desencadeados pelo desuso muscular, alguns recursos fisioterapêuticos, farmacológicos, bem como

suplementos nutricionais têm sido estudados. Nesse sentido, Durigan (2006), utilizou estimulação elétrica neuromuscular na busca de melhorar os padrões metabólicos e histológicos do músculo. Já Lim e Han (2010) utilizaram estimulação elétrica neuromuscular na tentativa de minimizar a atrofia e reduzir a apoptose celular após desnervação. Pardi (2010) analisou o efeito da nandrolona na musculatura imobilizada e concluiu que esse esteroide na dose clínica (0,7 mg/Kg/semana) exerceu ação anticatabólica e manteve o padrão anabólico através de uma ação direta sobre a efetividade das enzimas AKT e mTOR.

Nesse contexto, pesquisas que envolvam recursos que possam minimizar os efeitos da inatividade muscular são de extrema importância, pois podem ter impacto positivo sobre a saúde e qualidade de vida dos indivíduos que estejam em uma condição patológica associada à severa perda de massa muscular.

Diversos estudos na literatura buscam compreender os efeitos dos suplementos alimentares no combate à atrofia do músculo esquelético. Dentre os mais estudados, está o  $\beta$ -Hidroxi- $\beta$ -Metilbutirato (HMB), que é derivado exclusivamente da metabolização de um aminoácido essencial de cadeia ramificada, a leucina, com isso, sua produção endógena é proporcional à quantidade ingerida deste aminoácido por meio da dieta. O HMB tem se destacado por sua provável eficácia como inibidor das vias de sinalização da proteólise e sua possível ação na síntese proteica (Nissen e Sharp, 2003).

A leucina modula várias funções celulares e possui efeitos tanto em aumentar a síntese proteica (Gonçalves, 2013) quanto em reduzir a degradação proteica (Baptista et al., 2010). No entanto, estudos mostram que a utilização de

inibidores da transaminação da leucina foi capaz de abolir os seus efeitos sobre a redução da degradação proteica, o que sugere que o HMB seja o responsável por esse efeito (Sabourin e Bieber, 1981; Nonnecke, Franklin e Nissen, 1991).

A síntese do HMB ocorre principalmente no fígado e nos músculos, tanto em humanos como em animais. Pode ser iniciada no citoplasma e nas mitocôndrias de células musculares, por meio da transferência do grupamento amino da leucina para o  $\alpha$ -cetoglutarato pela enzima transaminase do aminoácido de cadeia ramificada (BCAAT). Essa reação origina o produto  $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC). O KIC sintetizado segue dois caminhos metabólicos, aproximadamente 90-95% sofre descarboxilação oxidativa irreversível pela ação da enzima desidrogenase de  $\alpha$ -cetoácido de cadeia ramifica (BCKD), e gera moléculas de isovaleril-CoA nas mitocôndrias hepáticas. O isovaleril-CoA passa por reações sequenciais na mitocôndria e origina o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é transformado em acetoacetato e acetil-CoA pela enzima  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA liase (HMG-CoA Liase). Aproximadamente 5-10 % de KIC que não foram metabolizados pela BCKD são oxidados a HMB no citosol hepático e possivelmente em outros tecidos por meio da ação da enzima *KIC-dioxigenase* (KICD) na presença de oxigênio (Sabourin e Bieber, 1982; Driskell, 2007; Zanchi et al., 2011).

Vale ressaltar que um dos destinos do HMB após sua síntese é a excreção na urina que pode variar entre 10 a 40 % do total produzido. Outro destino dessa molécula é a conversão do HMB para HMG-CoA, um substrato da enzima HMG-CoA redutase, essencial na formação do colesterol no fígado e no músculo (Vukovich et al., 2001; Nissen et al., 2000).

Quantitativamente, cerca de 5-10 % de toda leucina ingerida é oxidada e convertida em HMB, o que corresponde a aproximadamente 0,3-0,4 g por dia em um indivíduo adulto com aproximadamente 70 kg (Kovering e Nissen, 1992). Essa quantidade é insuficiente para que o HMB exerça seus efeitos de redução da proteólise e aumento de síntese proteica descritos na literatura, visto que a maioria dos estudos em humanos encontram tais efeitos em doses equivalentes a 3 g de HMB por dia (Nissen et al., 1996; Panton et al., 2000; Molfino et al., 2013). Dessa forma, cerca de 60 g de leucina teria que ser consumida para atingir a dosagem utilizada nos estudos. As principais fontes da leucina, tais como leite, ovos e carnes, contêm cerca de 7 % a 10 % do aminoácido. Portanto, seria necessário consumir, no mínimo, 600 g diariamente desses alimentos. Este nível de consumo pode até ser viável, porém extrapola os princípios dietéticos de uma alimentação balanceada (Wilson, Wilson e Manninen, 2008). Assim, para se obter 3 g de HMB por dia, a suplementação é necessária.

A maior parte das pesquisas que envolvem suplementação com HMB utilizam doses entre 1-3 g/indivíduo/dia (Nissen e Sharp, 2003), no entanto há estudos que trabalharam com doses de 6 g.dia ou ainda, doses que foram ministradas de acordo com o peso dos indivíduos (Van e Nissen, 1992; Peterson et al., 1999). Um estudo com indivíduos não treinados comparou o efeito de duas doses do suplemento HMB (38 e 76 mg/kg/dia). Foi observado que não houve aumento significativo de força entre os grupos, contudo, o grupo que consumiu 38 mg/kg/dia de HMB apresentou aumento significativo de massa magra quando comparado ao grupo que consumiu 76 mg/kg/dia (Gallagher et al., 2000a).

Estudos realizados com animais mostraram que o consumo de elevadas doses de HMB estão relacionadas a menores taxas de captação do suplemento pelo tecido muscular. O músculo esquelético de suínos somente absorveu HMB quando este estava presente em baixas concentrações no sangue (Talleyrand et al., 1993). Se ocorrer de forma semelhante em humanos, a suplementação de 76 mg/kg/dia pode ter estado menos biodisponível e, por isso, não influenciou os ganhos de força e massa magra dos sujeitos (Gallagher et al., 2000a).

Segundo Alvares e Meirelles (2008), não há registros na literatura em relação a possíveis efeitos adversos sobre a saúde que o HMB possa produzi-los, e ainda possui suporte do Comitê Olímpico Internacional que o classifica como uma substância legal. Nesse contexto, Nissen et al. (2000) elaboraram uma meta-análise composta por nove estudos duplo-cego com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos colaterais da suplementação na dosagem de 3 g de HMB por dia. Através de protocolos, foram avaliados sintomas psicológicos, funcionais e bioquímicos. Os pesquisadores concluíram que os dados encontrados significativamente relevantes foram benéficos. Assim, sugerem que a suplementação de HMB na dosagem de 3 g por dia é bem tolerada e saudável para humanos.

O *turnover* do HMB pode ser considerado rápido. Alguns estudos analisaram a meia-vida do HMB em suínos e ovinos, e observaram que após a ingestão de 2 g de HMB a meia-vida foi de aproximadamente 2 h (Nissen e Abumrad, 1997). Uma pesquisa com humanos investigou a cinética do HMB após ingestão de 1 g ou 3 g. Os resultados desse estudo demonstram que as

concentrações plasmáticas de HMB atingem pico de, aproximadamente, 118 nmol/mL após 2 h da ingestão de 1 g, enquanto pico em torno de 480 nmol/mL foi atingido em apenas 1 h após a ingestão de 3 g de HMB. A meia-vida plasmática foi de, aproximadamente, 2-3 h, enquanto que a excreção na urina foi dependente da dose, 14 % para a de 1 g e 29 % para a de 3 g (Vukovich et al., 2001).

Na literatura alguns possíveis mecanismos de ação do HMB foram descritos, no entanto, mais recentemente foi observado que este suplemento atua na mesma via do aminoácido leucina, inibindo o catabolismo muscular e estimulando a síntese proteica. Estudos que induziram um estado de proteólise em ratos evidenciaram que o HMB atenuou a degradação proteica quando comparado aos animais controle, através da inibição da via ubiquitina-proteossoma, efeito este observado apenas no músculo sóleo (Kovarik et al., 2010).

Pimentel et al. (2011) avaliaram o efeito de 30 dias de suplementação diária com HMB (320 mg/kg), na hipertrofia muscular e na expressão de proteínas envolvidas na sinalização insulínica em ratos saudáveis e sedentários. Foi observado que a suplementação induziu um aumento significativo no peso do músculo sóleo e extensor longo dos dedos, e também aumentou em 245 % a insulina em jejum e reduziu em 6% a glicemia em jejum, além disso eles observaram aumento de 429,2 % na expressão da via mTOR e 470 % na fosforilação da p70S6K, vias responsáveis pela hipertrofia muscular. Os autores sugerem que a suplementação com HMB pode ser utilizada para aumentar a massa muscular sem causar efeitos adversos à saúde.

O HMB tem sido amplamente utilizado como um suplemento alimentar no meio esportivo, com o intuito de melhorar o desempenho e aumentar a massa muscular (Palisin e Stacy, 2005; Wilson et al., 2013). Devido aos resultados promissores da suplementação na prática esportiva, o HMB tornou-se alvo de pesquisas na prática clínica em algumas condições e modelos experimentais caracterizados pela alta taxa proteolítica muscular. Alguns estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da suplementação com diferentes dosagens de HMB associada a várias situações de severa perda de massa muscular. Clark et al. (2000), realizaram um estudo em indivíduos infectados pelo vírus do HIV, e observaram que após 8 semanas de suplementação com a mistura HMB/Arginina/Glutamina (3 g de HMB $\beta$  + 14 g arginina + 14 g de glutamina) divididas em 2 doses diárias, os indivíduos apresentaram ganho significativo de massa magra e melhora no quadro imunológico.

Smith, Mukeji e Tisdale (2005) estudaram o efeito do HMB (0,25 g/Kg) durante 12 dias em ratos implantados com tumor (MAC16) na região pélvica, e observaram que a suplementação foi efetiva em preservar a massa magra, além de estimular a síntese proteica e atenuar a proteólise através da inibição da via proteolítica ubiquitina proteossoma. Aversa et al. (2011) avaliaram os efeitos da suplementação com HMB (4 % enriquecido na ração) durante 24 dias em ratos com carcinoma hepatocelular, e relataram que houve aumento da fosforilação da p70S6K e mTOR e de vias responsáveis pela síntese proteica, o que sugere que a redução da perda de massa muscular e peso corporal observados no estudo, são devidos ao aumento do anabolismo proteico do músculo esquelético.

Um estudo de Kovarik et al. (2010), avaliaram os efeitos do HMB (0,5 g/kg) após 24 horas de suplementação em ratos com endotoxemia, e concluíram que este metabólito foi eficaz em atenuar a atividade da via proteolítica e de reduzir a degradação proteica, no entanto não observaram aumento na síntese proteica. Aversa et al. (2012) mostraram que o HMB (50  $\mu$ M) após 24 horas de suplementação foi capaz de prevenir a atrofia do músculo esquelético causada pelo uso de glicocorticoides.

A suplementação com HMB também tem mostrado resultados positivos no aumento da força e na prevenção da perda da massa muscular no envelhecimento (Fitschen et al., 2013; Stout et al., 2013). Um recente estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, avaliou o efeito do HMB na dosagem de 3 g por dia (1,5 g de manhã e 1,5 g à tarde) em idosos acamados no leito durante 10 dias. Os autores concluíram que o HMB é uma intervenção nutricional eficaz para evitar o declínio agudo na massa muscular em idosos acamados, e isso provavelmente será refletido na manutenção da força e da função muscular durante a imobilização prolongada (Deutz et al., 2013).

Assim, diante das considerações supracitadas, a hipótese do presente estudo é de que, a suplementação com HMB pode desempenhar efeitos positivos sobre a atrofia do músculo esquelético induzida pela desnervação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos da suplementação com  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) sobre parâmetros envolvidos na atrofia induzida pela desnervação, através de análise morfométrica e quimio-metabólica do músculo esquelético.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliação eletrocardiográfica;
- Avaliar se a suplementação com HMB apresenta toxicidade, através da análise das concentrações plasmáticas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina Hepática, Creatinina;
- Avaliar a secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos suplementados com HMB;
- Avaliar a responsividade das ilhotas pancreáticas através do teste de tolerância à glicose (GTT);
- Avaliar a constante de decaimento da glicemia através do teste de tolerância a insulina (ITT);

- Avaliar a responsividade metabólica em fatias de músculo sóleo incubados com 2-deoxiglicose, com destaque na captação, metabolização e síntese de glicogênio;
- Avaliar as reservas de glicogênio muscular nas diferentes condições experimentais;
- Avaliar morfometricamente a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo nas diferentes condições experimentais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos *Wistar* adquiridos na empresa ANILAB (Paulínia- SP) com idade entre 3 e 4 meses, com peso aproximado de 180 a 220 g, os quais foram mantidos no biotério da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), alimentados com ração (Purina® para roedores), água *ad libitum* e alojados em gaiolas coletivas contendo 4 animais, mantidos sob ambiente com ciclo foto periódico de 12h claro/escuro e em condições controladas de temperatura ( $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIMEP sob o Protocolo nº 09/2012.

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em grupos experimentais, como demonstra a Tabela 1.

**Tabela 1:** Distribuição dos ratos em grupos experimentais.

| <b>Grupos Experimentais</b>                 | <b>N</b> |
|---------------------------------------------|----------|
| Controle (C)                                | 12*      |
| Suplementados com HMB 7 dias (S)            | 12*      |
| Desnervado 7 dias (D)                       | 6        |
| Desnervado suplementado com HMB 7 dias (DS) | 6        |

**\*Os grupos experimentais foram duplicados em virtude da diversidade de análises.**

### 3.3 SUPLEMENTAÇÃO COM $\beta$ -HIDROXI- $\beta$ -METILBUTIRATO

Os animais foram suplementados com HMB na concentração de 320 mg/kg de peso corporal, diluídos em 1,0 mL de água deionizada, administrado pela via gastroesofágica (gavagem) durante 7 dias consecutivos (Pimentel et al., 2011), (Figura 1).

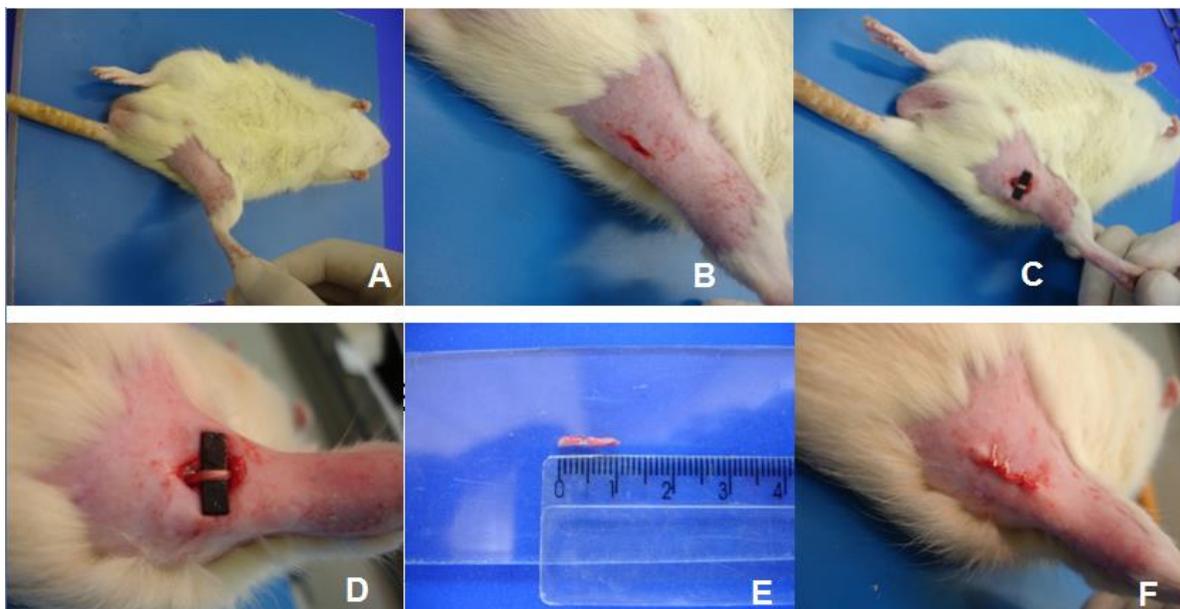


**Figura 1:** Administração do HMB por meio de gavagem (via orogástrica), na qual uma sonda é introduzida pela via gastroesofágica até o estômago e o conteúdo liberado. Fonte: (Andersen et al., 2004).

### 3.4 DESNERVAÇÃO

Os animais foram anestesiados com Ketamina-Xilazina (35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso, im) e a pata posterior esquerda foi tricotomizada e 1 cm do nervo

isquiático foi seccionado e retirado segundo proposta de Corderre et al. (1992), (Figura 2).



**Figura 2:** Procedimento cirúrgico utilizado para desnervação. **A:** exposição do membro posterior tricotomizado; **B:** incisão para localização da inervação; **C e D:** nervo isquiático isolado e em destaque; **E:** porção do nervo isquiático seccionado (1 cm); **F:** incisão suturada. Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.5 AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA

Para a avaliação das ondas e intervalos eletrocardiográficos, os ratos foram anestesiados com Ketamina-Xilazina (35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso, im), mantidos em posição supina, com respiração espontânea para registro do ECG. Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com sensibilidade 2 N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isométrica definido como

segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ( $QTc = QT / \sqrt{RR}$ ) e posteriormente foi calculada a dispersão do intervalo QTc, subtraindo o intervalo QTc mais curto do QTc mais longo ( $QTcd = QTc \text{ Max} - QTc \text{ min}$ ). As análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão (Costa, 2008).

### **3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE**

Para dirimir quanto a possível toxicidade do suplemento foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração plasmática das enzimas aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina hepática, Creatinina através de técnicas rotineiramente aplicadas em laboratórios clínicos.

### **3.7 SECREÇÃO DE INSULINA**

Para avaliação da resposta secretória da insulina à glicose, as ilhotas pancreáticas foram isoladas segundo a técnica originalmente descrita por Boschero, Delatree e Santos (1984).

Foram sacrificados de um a três animais por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 mL de solução de Hanks contendo 8 mg de

colagenase, foram injetados via cânula, provocando um fluxo retrógrado e a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12 x 2 cm) e incubado por aproximadamente 18 min a 37 °C.

Em seguida, ainda em 37 °C, o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em um Becker sendo misturado com solução de Hanks. O sobrenadante foi aspirado com seringa (50 mL) depois de 3 minutos de decantação. Após repetir essa operação por 3 vezes, o produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, e sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas de ratos, pertencentes aos grupos controle e suplementado com HMB, foram coletadas alternadamente em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 mL de solução tampão Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina, a qual foi adicionado glicose 5,6 mM e incubada por 45 minutos (pré-incubação), a 37 °C em atmosfera de carbogênio, pH 7,4, a solução de Krebs foi substituída por 1,0 mL do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L.

Procedeu-se uma nova incubação durante 90 min, nas condições acima referidas. Ao término deste período, as placas foram colocadas no freezer (-20 °C) por 10 min e, o sobrenadante de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservado a -20 °C, até o momento da dosagem da insulina secretada. A insulina secretada durante o período de incubação foi avaliada de acordo com o método descrito por Scott, Atwater e Rojas (1981).

### **3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)**

Para avaliação do GTT, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,5 %,ip) e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado glicose (2 g/Kg/ip) seguido de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e a glicemia novamente avaliada (Rafacho, Roma e Tabaga, 2007).

### **3.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)**

Para a realização do ITT, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (2,5 %,ip) e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado insulina (2 U/Kg/ip - Biohulin) seguido de coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada (Rafacho, Roma e Tabaga, 2007).

### **3.10 CAPTAÇÃO DE 2-DEOXIGLICOSE**

Após sacrifício dos animais por decapitação, o músculo sóleo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25-35 mg foram primeiro incubadas por 30 minutos a 37 °C em banho Maria de

Dubinoff (FANEN, Modelo 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6 %, HEPES 6,64 mM, KCL 0,032 %, CaCl<sub>2</sub> 1,14 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,015 %, NaHCO<sub>3</sub> 0,19 %, MgSO<sub>4</sub> 0,03 %) equilibrado com a mistura de 95 % O<sub>2</sub>-5 %/CO<sub>2</sub>, pH 7,4. Após este período as fatias musculares foram transferidas para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [U<sup>14</sup>C] glicose, 0,25 mCi/mL e [3H+] 2-deoxiglicose (2 DG, 0,5 mCi/mL) e insulina (100 µM/mL). Dentro do frasco externo foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700 µL de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana de borracha redonda através de uma pequena abertura nesta última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa plástica, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo. O sistema contendo as fatias musculares foi incubado em banho Maria e Dubinoff por 60 minutos. Após este período, as fatias musculares foram retiradas do contato com as soluções. A liberação do CO<sub>2</sub> foi estimulada pela injeção de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25 % no frasco externo e CO<sub>2</sub> foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a 37 °C.

### **3.11 DOSAGEM DA SÍNTESE DE GLICOGÊNIO**

A incorporação da glicose em glicogênio (síntese de glicogênio) foi determinada pela mensuração da radioatividade do <sup>14</sup> C no precipitado obtido

durante o processo de extração do glicogênio muscular (Sjorgreen et al., 1938). A oxidação da glicose foi estimada pela mensuração da radioatividade do  $^{14}\text{C}$  no líquido contido no frasco interno. A captação da 2-deoxiglicose foi avaliada na fase alcalina obtida durante o processo de extração do glicogênio muscular, pela mensuração da radioatividade do  $^3\text{H}^+$ . Toda mediação da radioatividade foi feita em contador PACKARD Tricarb 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno.

### **3.12 GLICOGÊNIO MUSCULAR**

Após sacrifício dos animais por decapitação, um pedaço das amostras dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, foram retiradas, digeridas em KOH 30 % a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu, Russeau e Taylor (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

### **3.13 ANÁLISE DA SECÇÃO TRANSVERSA DAS FIBRAS MUSCULARES**

A porção ventral da outra metade da amostra do músculo sóleo foi pesada e colocada em solução tamponada de formol 10 % para fixação.

Após 48 h, as peças passaram por desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e foram incluídas em paraplast®. Cortes transversais de 7  $\mu\text{m}$  não seriados foram obtidos e corados em Hematoxilina-Eosina (H:E). Foram

selecionados 5 cortes e para cada um deles foram escolhidas 3 áreas. Para a captação e análise das imagens, utilizou-se um *software* Image Pró-plus® 6.2, e uma câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com uma objetiva de 40x. Em cada área, foram selecionadas 10 fibras para a obtenção da secção transversa, escolhidas aleatoriamente, e o programa gerava um número correspondente à área da fibra, sendo analisadas 150 (15x10) fibras por animal 750 fibras (150x5) por grupo experimental. As análises cegas das lâminas foram feitas por um único pesquisador, segundo metodologia morfométrica de Mandarim- de-Lacerda, Fernandes-Santos e Aguila (2010).

### **3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da aplicação da análise de variância ANOVA: *Two way* e do pós-teste de Tukey, com relevância estatística de  $P \leq 0,05$ .

A área sob a curva e a constante de decaimento da glicemia foram determinadas pelo *software* Origin®.

## 4. RESULTADOS

### AVALIAÇÃO DO PADRÃO ELETROCARDIOGRÁFICO E DA TOXICIDADE

A fim de esclarecer a existência de fatores ligados à toxicidade decorrente da suplementação com HMB frente à concentração utilizada que foi de 320 mg/kg, foram analisados órgãos alvo, como o coração através do eletrocardiograma (ECG) e o fígado que é o principal centro de metabolização, através de uma análise bioquímica.

Nas avaliações eletrocardiográficas dos grupos suplementados com HMB, não foram observadas alterações significativas que justificassem a interrupção da suplementação (Tabela 2).

**Tabela 2:** Parâmetros eletrocardiográficos (QT, QTc, QRS, intervalo PR e segmento PR em ms) e frequência cardíaca (FC/bpm) de ratos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6).

| Grupos              | FC<br>(bpm)       | QT<br>(ms)     | QTc<br>(ms)    | QRS<br>(ms)     | INTER PR<br>(ms) | SEG PR<br>(ms) |
|---------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|----------------|
| <b>Controle</b>     | 260,12 $\pm$ 4,4  | 45,0 $\pm$ 1,6 | 85,5 $\pm$ 4,4 | 11,5 $\pm$ 2,06 | 178,0 $\pm$ 9,48 | 31,5 $\pm$ 4,5 |
| <b>Suplementado</b> | 233,12 $\pm$ 10,5 | 44,0 $\pm$ 1,5 | 89,5 $\pm$ 2,9 | 11,0 $\pm$ 1,9  | 176,25 $\pm$ 7,5 | 32,0 $\pm$ 2,6 |

Considerando que o fígado é o órgão com expressiva ação no controle metabólico, foi analisado o perfil das principais enzimas que refletem o comportamento hepático, uma vez que estas são marcadoras de lesão. Neste íterim foi avaliada também a concentração plasmática de creatinina, que representa o índice de função renal. Os dados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos controle e suplementado com HMB. (Tabela 3).

**Tabela 3:** Avaliação bioquímica da concentração plasmática de enzimas marcadoras de toxicidade de ratos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6).

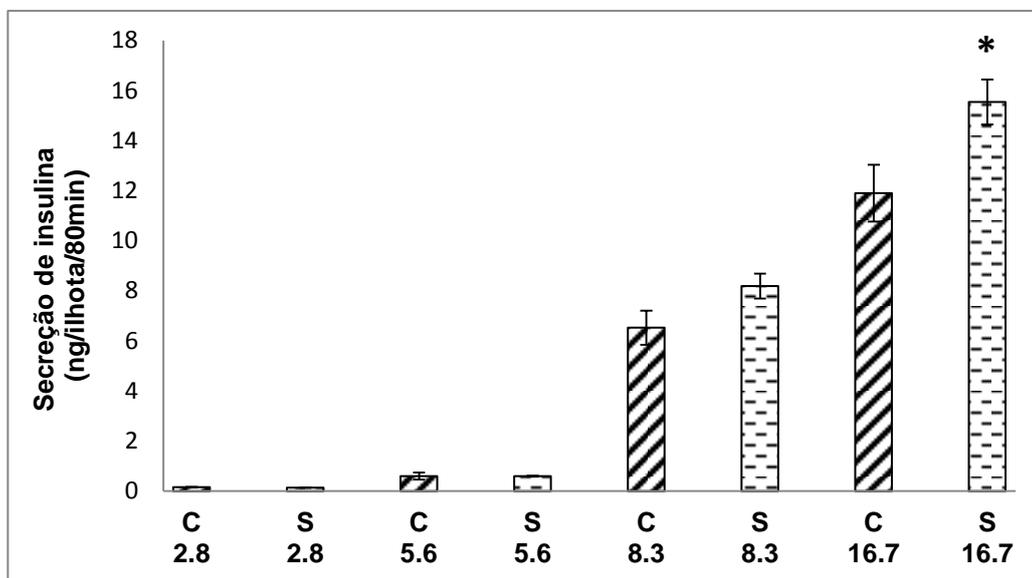
| <b>Enzimas</b>                                                                             | <b>Controle</b> | <b>Suplementado</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------|
| Aspartato aminotransferase (AST) = U.L <sup>-1</sup>                                       | 130 $\pm$ 8,9   | 144,12 $\pm$ 6,1    |
| Alanina aminotransferase (ALT) = U.L <sup>-1</sup>                                         | 42,80 $\pm$ 3,7 | 35,75 $\pm$ 2,8     |
| Creatinina (mg/dL)                                                                         | 0,46 $\pm$ 0,05 | 0,44 $\pm$ 0,03     |
| Fosfatase Alcalina Hepática (nmol. $\mu$ g de proteína <sup>-1</sup> . min <sup>-1</sup> ) | 0,15 $\pm$ 0,01 | 0,13 $\pm$ 0,006    |

### **AValiação DA SECREÇÃO, RESPONSABILIDADE INSULÍNICA E PROVA DE FUNÇÃO PANCREÁTICA.**

Conhecidamente, o processo secretório da insulina é influenciado por vários fatores, dentre os quais alguns agentes provenientes do metabolismo de aminoácidos. Assim, por se tratar desta condição, passou-se a avaliar a resposta secretória de insulina de ilhotas isoladas de ratos suplementados com HMB, que é um metabólito do aminoácido leucina. Os resultados mostram que não houve mudança na secreção de insulina das ilhotas incubadas na presença de glicose na concentração de 2.8 mmol/L. tanto no grupo controle quanto no suplementado. Este evento também não foi observado quando as ilhotas foram expostas a glicose na concentração de 5.6 mmol/L.

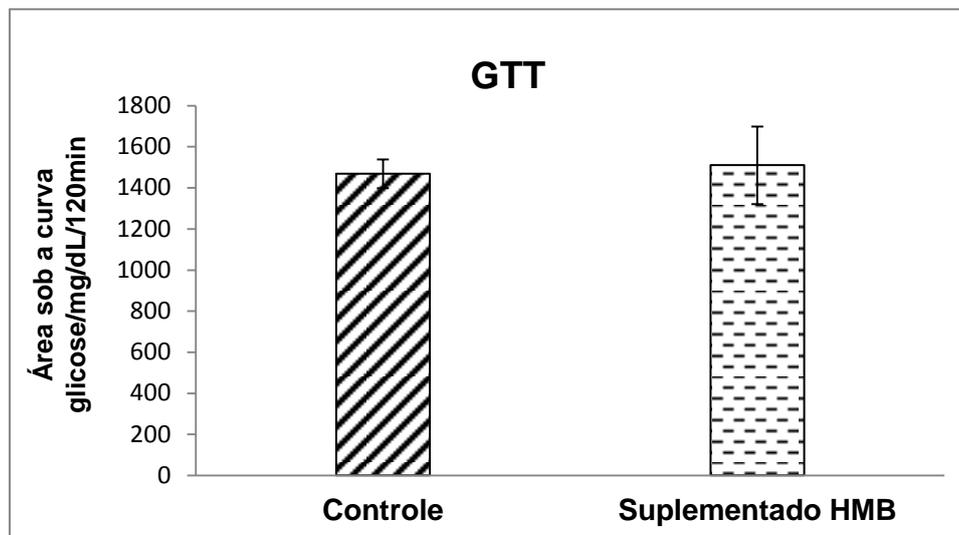
Dentro da lógica de avaliar concentrações secretagogas, passou-se a avaliar o comportamento secretório nas diferentes ilhotas incubadas na presença de 8.3 mmol/L de glicose. Os dados mostram que o grupo suplementado com HMB não diferiu do controle. Por outro lado, ilhotas incubadas na presença de

16.7 mmol/L de glicose foi observado que a secreção foi 27 % maior, como pode ser observado na figura 3.



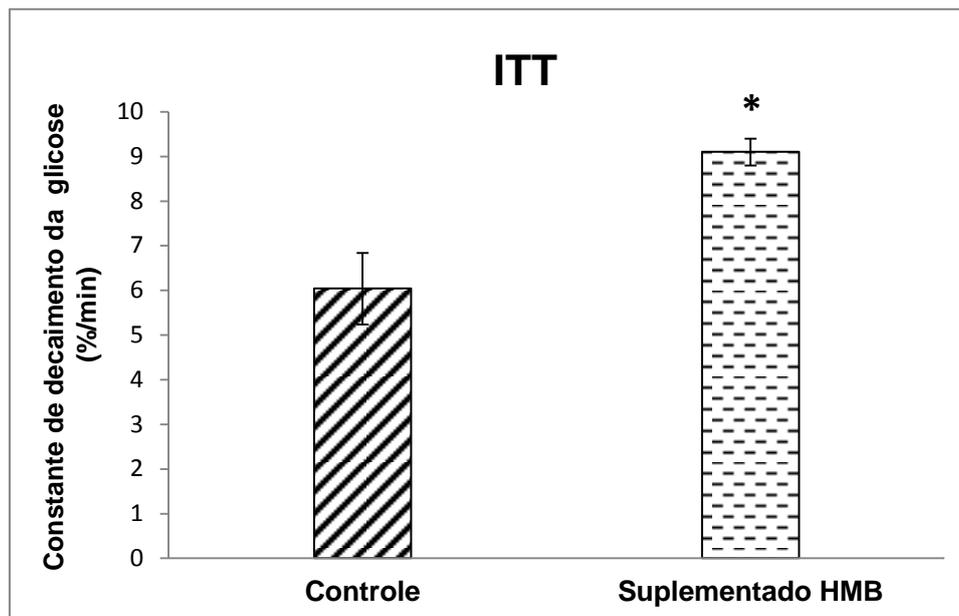
**Figura 3:** Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos controle (C) e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias (S). As ilhotas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose (2.8; 5.6; 8.3 e 16.7 mmol/L). Os valores estão expressos em ng/ilhota/80minutos (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ).

Tendo em vista as alterações observadas *in vitro*, passou-se a avaliar a sensibilidade pancreática, através do teste de tolerância à glicose. Os resultados mostram que a suplementação com HMB não promoveu mudança na resposta das células  $\beta$  do pâncreas ao “bolus” de glicose, dessa forma não diferiu estatisticamente do controle (Figura 4).



**Figura 4:** Representação da área sob a curva (glicose/mg/dL/120min) após o teste de tolerância a glicose (GTT) de ratos dos grupos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  epm (n=5). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ).

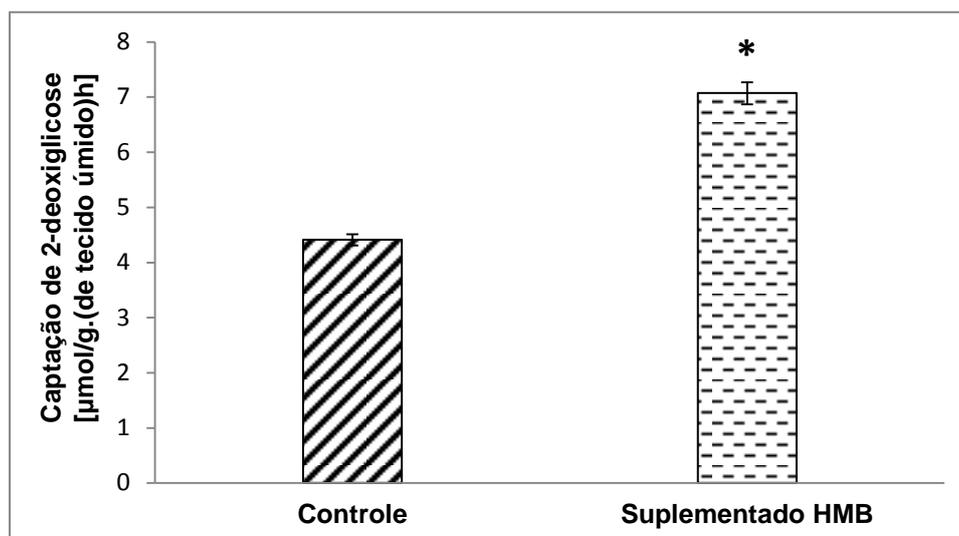
Os dados até aqui apresentados sugerem a avaliação das possíveis relações do HMB com a sensibilidade periférica à insulina, assim, para dirimir esta dúvida avaliou-se a captação da hexose por tecidos periféricos através do teste de tolerância a insulina (ITT), que expressa ação através da constante de decaimento da glicemia (KITT). Nesta avaliação, foi verificado que o grupo suplementado com HMB apresentou velocidade de captação periférica da glicose 51 % maior se comparado ao controle, como pode ser observado na figura 5.



**Figura 5:** Representação da constante de decaimento da glicose (KITT; % min) após o teste de tolerância a insulina (ITT) em ratos dos grupos controle e suplementado com HMB (320 mg/kg). Os valores representam a média  $\pm$  epm (n=5). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ).

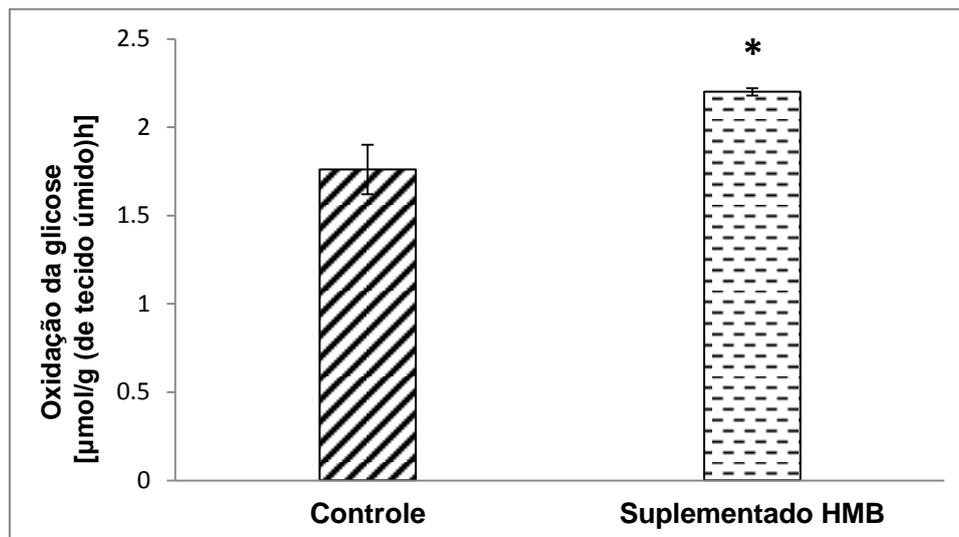
## AVALIAÇÃO METABÓLICA COM 2-DEOXIGLICOSE

A seguir, para complementar as observações até aqui apresentadas foi avaliada a captação da 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo incubadas *in vitro* onde verificou-se que o músculo do grupo suplementado com HMB apresentou elevação na captação de 60,3 % se comparado ao grupo não suplementado (Figura 6).



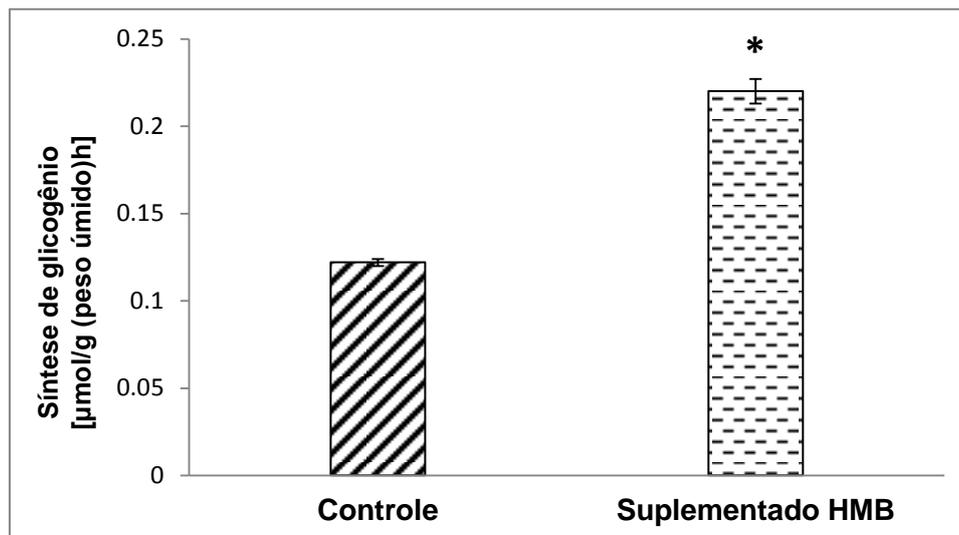
**Figura 6:** Captação de 2-deoxiglicose [μmol/g.(de tecido úmido)h] pelo músculo sóleo (10 fatias musculares por grupo) de ratos controle e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores representam a média ± epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, (P ≤ 0,05).

Tendo em vista que a glicose, após captação pode ser reservada ou metabolizada, avaliou-se a oxidação da glicose no mesmo modelo de fatias de músculo sóleo incubadas *in vitro* e, como pode ser observado na figura 7, o sóleo do grupo suplementado com HMB apresentou oxidação 25 % maior se comparado ao controle.



**Figura 7:** Oxidação da glicose [ $\mu\text{mol/g}$  (de tecido úmido)h] no músculo sóleo (10 fatias musculares por grupo) de ratos controle e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg, via orogástrica) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ).

Ainda dentro do aspecto metabólico e no intuito de esclarecer o mecanismo de ação do HMB, optou-se por avaliar a síntese de glicogênio, onde verificou-se que o músculo do grupo suplementado apresentou aumento na glicogênese, atingindo valores 80,3 % maiores se comparado a condição controle (Figura 8).



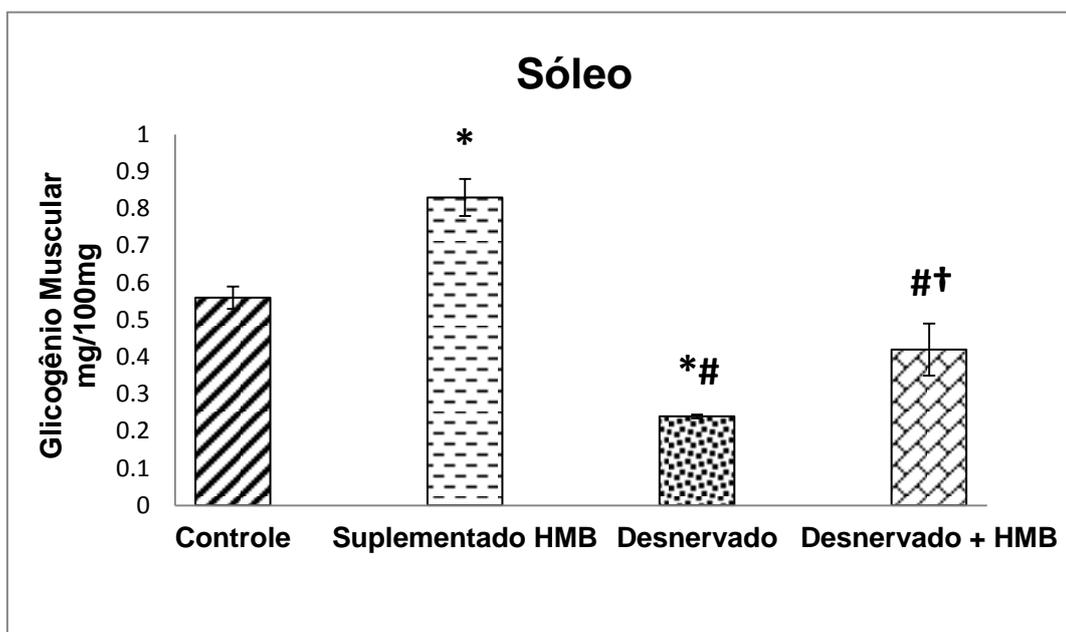
**Figura 8:** Síntese de glicogênio [ $\mu\text{mol/g}$  (peso úmido)h] no músculo sóleo (10 fatias musculares por grupo) de ratos controle e de ratos suplementados com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle, ( $P \leq 0,05$ ).

## AValiação DAS RESERVAS GLICOGÊNICAS

Após a avaliação *in vitro*, passou-se a avaliar o conteúdo muscular de glicogênio em amostras recém coletadas, uma vez que estas reservas exprimem a ação insulínica, sendo escolhidos os músculos sóleo, formado predominantemente por fibras do tipo I (vermelhas), gastrocnêmio porção branca (GB), formado predominantemente por fibras do tipo II (brancas) e gastrocnêmio porção vermelha (GV), formado por fibras mistas.

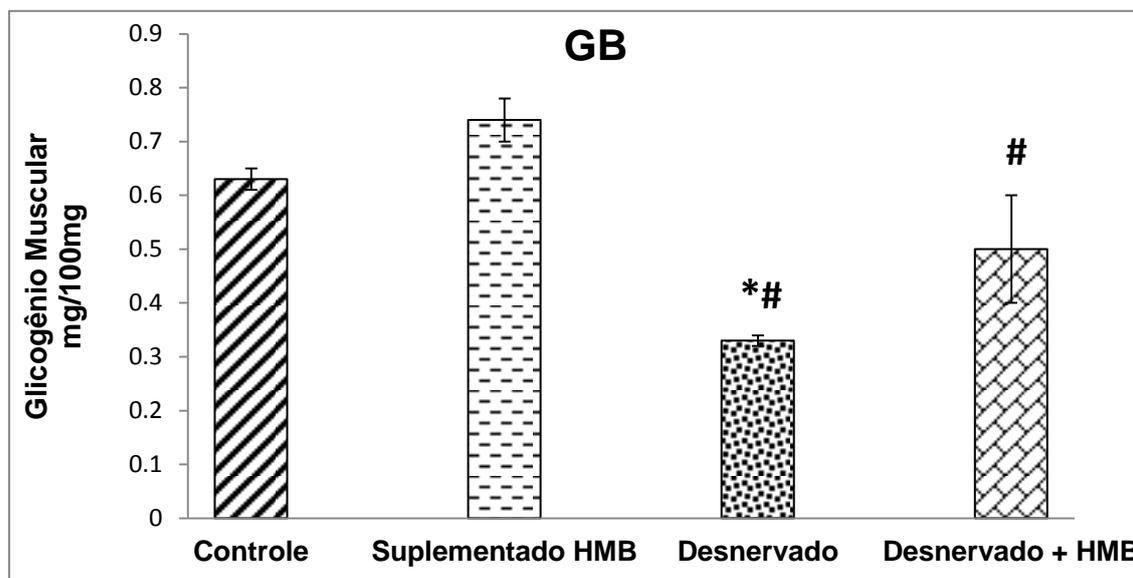
Os resultados mostraram que o conteúdo de glicogênio do músculo sóleo do grupo suplementado com HMB foi 48 % maior, se comparado ao controle, enquanto o músculo desnervado apresentou reservas reduzidas em 57 % se comparado ao controle e 71 % se comparado ao grupo suplementado com HMB. No mesmo perfil de análise, foi observado que o grupo desnervado suplementado com HMB apresentou reservas 49 % menores se comparado com

o grupo suplementado com HMB, no entanto, apresentou aumento significativo de 75 % nas reservas energéticas se comparado ao grupo desnervado e se recuperou ao nível do controle (Figura 9).



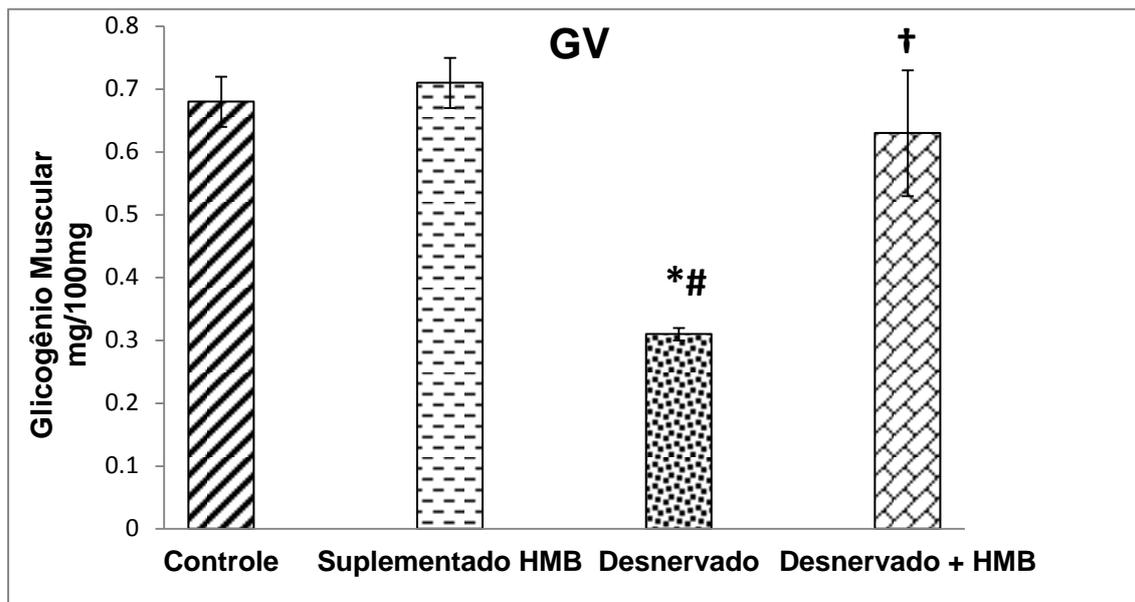
**Figura 9:** Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo de ratos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do Controle; (#) Difere significativamente do suplementado com HMB; (†) Difere significativamente do desnervado, ( $P \leq 0,05$ ).

A análise do conteúdo glicogênico do músculo gastrocnêmio porção branca, mostrou que a desnervação promoveu redução de 48 % nas reservas, se comparado ao controle e 55 % menor se comparado ao grupo suplementado com HMB. Por sua vez, o grupo desnervado suplementado com HMB apresentou reservas 48 % menores em relação ao grupo suplementado com HMB, e se recuperou ao nível do controle, porém não foi observada diferença entre o grupo desnervado e desnervado suplementado (Figura 10).



**Figura 10:** Conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção branca de ratos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle; (#) Difere significativamente do suplementado com HMB, ( $P \leq 0,05$ ).

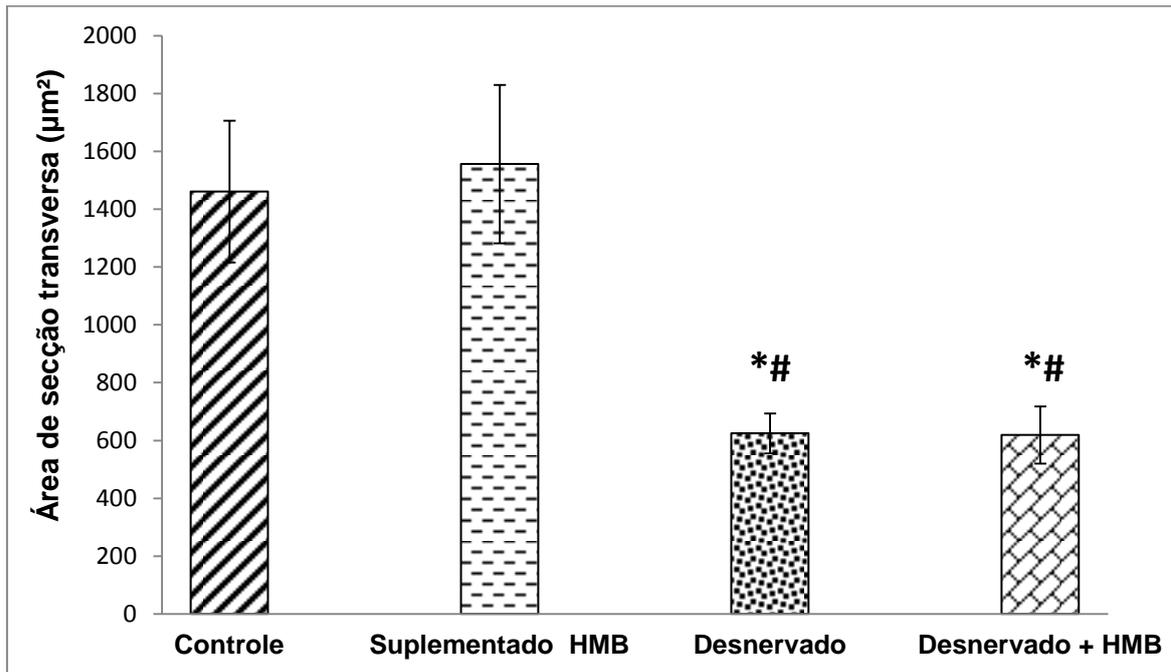
Na avaliação da concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção vermelha, verificou-se que o grupo desnervado apresentou reservas 54 % menores se comparado ao controle e 56 % menores se comparado ao grupo suplementado com HMB. Por outro lado, o grupo desnervado suplementado com HMB apresentou reservas 103 % maiores em relação ao grupo desnervado e se recuperou ao nível do controle (Figura 11).



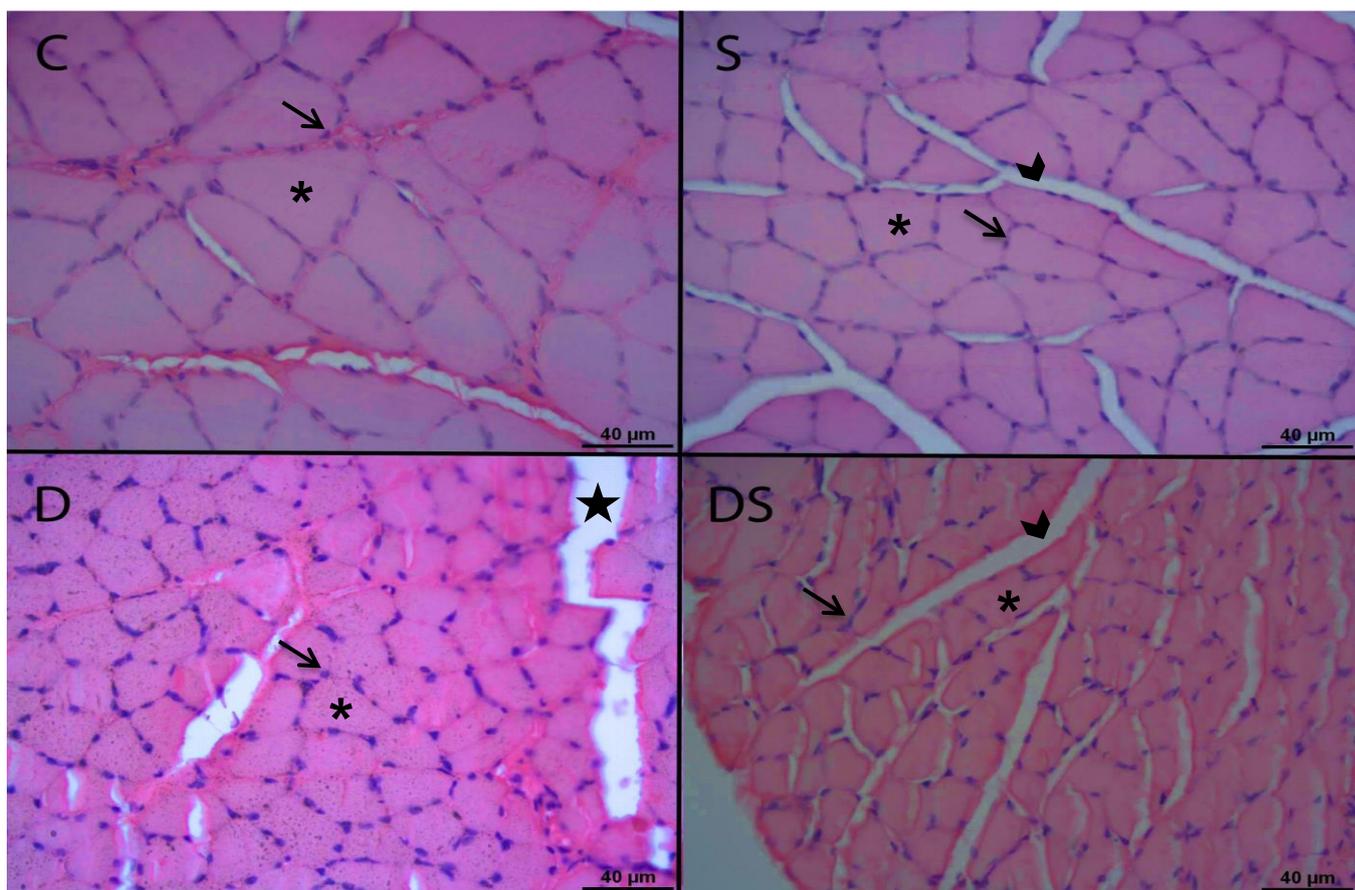
**Figura 11:** Conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio porção vermelha de ratos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  epm (n=6). (\*) Difere significativamente do controle; (#) Difere significativamente do suplementado com HMB; (†) Difere significativamente do desnervado, ( $P \leq 0,05$ ).

## AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Com relação à área de secção transversa das fibras ( $\mu\text{m}^2$ ), o grupo desnervado apresentou área 57 % e 60 % menor se comparado ao grupo controle e ao grupo suplementado com HMB, respectivamente. Já o grupo desnervado suplementado com HMB apresentou área 58 % menor com relação ao grupo controle e 60 % menor com relação ao grupo suplementado com HMB, porém não diferiu do grupo desnervado. As características morfométricas podem ser observadas na figura 12 e na figura 13.



**Figura 12:** Área de secção transversa ( $\mu\text{m}^2$ ) do músculo sóleo de ratos dos grupos controle, suplementado com HMB, desnervado e desnervado suplementado com HMB (320 mg/kg) durante 7 dias. Os valores representam a média  $\pm$  dpm ( $n=5$ ). (\*) Difere significativamente do controle; (#) difere significativamente do grupo suplementado com HMB, ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 13:** Análise histológica do músculo Sóleo controle (C), suplementado com HMB (S), desnervado (D) e desnervado suplementado com HMB (DS), (320 mg/kg) durante 7 dias. É possível visualizar a fibra Muscular (\*) e seus núcleos periféricos ( →), tecido conjuntivo ( ▶) e artefato ( ★, (barra= 40 μm).

## 5. DISCUSSÃO

A literatura científica tem demonstrado esforços no sentido de avaliar a utilização de suplementos nutricionais enquanto coadjuvante ao tratamento fisioterapêutico em diferentes condições, com destaque no desuso muscular. A finalidade é proporcionar condições energéticas adequadas às fibras musculares e possivelmente contribuir para o restabelecimento funcional do músculo esquelético (Machado, 2010; Kitamura et al., 2012; Ribeiro, Borin e Silva, 2012).

Pesquisas que investigam os efeitos de suplementos merecem maior atenção em relação a possível toxicidade, condição que pode promover modificações no equilíbrio homeostático e assim, interferir na função de diferentes órgãos. Dessa forma, para dirimir a dúvida quanto à possível presença de fatores que indiquem que a suplementação com HMB na concentração utilizada de 320 mg/kg apresenta efeito tóxico, iniciou-se o estudo a partir da determinação da concentração plasmática das principais enzimas hepáticas que são indicadoras de lesão no fígado, bem como as condições de normalidade do órgão (Giannini, Testa e Savarino, 2005).

Neste estudo não foi verificada diferença nas concentrações plasmáticas das enzimas fosfatase alcalina hepática, AST e ALT no grupo suplementado com HMB diferindo do estudo de Fuller et al. (2014) onde foi descrita redução nas concentrações plasmáticas da enzima ALT (específica de lesão hepática). Possivelmente, a diferença entre as respostas obtidas esteja fundamentada no fato de Fuller utilizar em seu trabalho doses do HMB 55% maiores durante 91 dias, se comparado à dose e ao tempo estabelecido neste trabalho. Neste sentido, a dose que foi escolhida para o presente estudo

acompanha o estabelecido em estudos clínicos realizados com roedores onde foi proposto que o HMB não exerce ação tóxica em doses compreendidas entre 3,49 – 4,16 g/Kg de peso, condição similar considerando-se machos e fêmeas, respectivamente (Baxter et al., 2005; Gallagher et al. 2000b).

Dentro do mesmo perfil de toxicidade também foi avaliada a concentração plasmática de creatinina e os dados não diferiram de recente publicação onde foram avaliadas diferentes concentrações do HMB (Fuller et al., 2014).

Uma vez que, alterações em parâmetros quimiometabólicos refletem em modificações na homeostasia das funções cardíacas, foi avaliado o padrão eletrocardiográfico dos animais tratados com HMB. Em 2009 Holecek et al. observaram que o suplemento com HMB promoveu diminuição na síntese proteica no músculo cardíaco, e sugeriu que este fato poderia comprometer o equilíbrio funcional deste órgão, no entanto, no presente estudo dentro do período de avaliação, não foram observadas modificações que pudessem refletir em alterações na condução do potencial elétrico no músculo cardíaco. Uma vez que as ondas captadas no grupo controle não diferem dos suplementado com HMB, sugere-se que não haja cardiotoxicidade.

Baseado na proposta deste estudo, cujo fundamento se refere ao estudo de condições metabólicas musculares e por ser impar o controle insulínico de vias metabólicas, optou-se por avaliar a responsividade pancreática em animais suplementados com o metabólito da leucina, com ênfase ao processo secretório de insulina, através do teste de tolerância a glicose (GTT).

Inicialmente deve-se considerar que na literatura não há consenso sobre o efeito do HMB no processo secretório de insulina, uma vez que, haja trabalhos com animais experimentais que mostram que o substrato proveniente da metabolização da leucina não promove secreção de insulina (Clarkson e Rawson, 1999). No mesmo perfil de análise, foi descrito hiperinsulinismo em humanos tratados com HMB, no entanto, neste estudo considera-se a diferença quanto a espécie, a dose e o tempo de tratamento (Wilson et al., 2013). No presente estudo, e fundamentado no tempo e na concentração aqui utilizada não foi observado modificação na resposta pancreática concordando com Vukovich et al. (2001).

No teste de tolerância à insulina (ITT) nas condições experimentais controle e suplementados, os resultados mostraram que o grupo suplementado com HMB apresentou maior velocidade na constante de decaimento da glicemia. Isto indica que o substrato pode exercer atividade sensibilizadora em tecidos periféricos.

Pimentel et al. (2011) estudou a ação da suplementação com HMB em ratos e descreveu aumento significativo na população de receptores de insulina no fígado. É importante ressaltar que o ITT mostra a resultante da constante de captação da hexose nos tecidos periféricos, sendo sugestivo o aumento na sensibilidade insulínica nos demais tecidos e ainda, pode-se sugerir que o HMB na concentração aqui utilizada, ao apresentar perfil sensibilizador tecidual promove adaptação na função das ilhotas pancreáticas ajustando a responsividade de acordo com a modificação na população de receptores

insulínicos nos tecidos periféricos. Frente a este ajuste e a normoglicemia é sugestivo que as ilhotas possam ter modificado sua sensibilidade.

Redução na sensibilidade insulínica foi descrito em um estudo onde foi administrado 320 mg/kg de HMB durante um mês, diferindo do tempo de tratamento estabelecido no presente trabalho (Pinheiro et al., 2012; Yonamine, 2013) .

Quanto ao perfil secretório em ilhotas isoladas, foi verificado elevação na secreção de insulina somente nas ilhotas incubadas em alta concentração de glicose. Estes dados acompanham a literatura ao ser demonstrado que o HMB potencializa o efeito secretório das ilhotas frente a altas concentrações glicêmicas, não apresentando ação enquanto secretagogo (Gerlinger-Romero et al., 2011; Wilkinson et al., 2013).

Uma recente publicação que pode referendar as mudanças na dinâmica secretória descritas neste trabalho indica que o HMB quando combinado com resveratrol, um polifenol natural que ocorre na casca das uvas vermelhas produz expressivo aumento na sensibilidade à insulina bem como promove elevação na captação de glicose no músculo esquelético na presença do HMB (Bruckbauer et al., 2012).

A captação de 2-deoxiglicose em fatias de músculo esquelético *in vitro* mostra elevação na captação deste agente nos músculos provenientes de animais suplementados com HMB, fato que reitera a ação sensibilizadora em tecidos periféricos (Bruckbauer et al., 2012).

Sequencialmente após verificar a intensa captação da 2-deoxiglicose foi observado um percentual extremamente baixo no que se refere à oxidação o

que indica que na presença do HMB, a via glicolítica pode não ser preferencialmente ativada. Merece destacar que na análise da formação de glicogênio a expressão foi maior se comparado à oxidação e pode indicar que há uma hierarquia na ação do HMB no músculo esquelético potencializando inicialmente a captação da hexose e sequencialmente favorecendo a formação de reservas glicogênicas. Este dado corrobora com recente publicação onde foi demonstrado que o HMB dobra a atividade da enzima glicogênio sintetase, além de quadruplicar a formação de glicogênio (Pinheiro et al., 2012).

Na fase experimental *in vivo* onde foi avaliado o conteúdo muscular de glicogênio também foi observada a ação potencializadora do HMB na formação destas reservas, merecendo destacar que a maior intensidade foi observada no músculo sóleo (fibras vermelhas) se comparado ao gastrocnêmio (fibras brancas) (Pinheiro et al., 2012; Wilkinson et al., 2013).

A dinâmica contrátil da musculatura esquelética decorre da atividade de fibras nervosas motoras que entram em contato com a membrana da fibra muscular esquelética através de placas motoras. A perda desta integridade promove a perda imediata da atividade voluntária e reflexa, seguida de atrofia muscular, estes fenômenos se caracterizam por expressivas mudanças bioquímicas, mecânicas, elétricas e morfológicas (Magnusson et al., 2005; Rüegg e Glass, 2011).

Dentre as alterações na homeostasia metabólica destaca-se a redução na atividade das vias insulínicas comprometendo a dinâmica de captação e metabolização da glicose, redução na expressão gênica dos transportadores GLUT 1 e GLUT 4 comprometendo o suprimento energético e desencadeando o

processo de atrofia (Magnusson et al., 2005; Dow et al., 2006).

Os resultados mostraram que concomitante a desnervação as reservas glicogênicas foram expressivamente baixas, se comparado ao músculo inervado, o que indica comprometimento na formação destas reservas. Estes dados acompanham publicações que demonstraram redução na atividade da enzima glicogênio sintetase, no sistema PKC-epsilon e teta, bem como no controle das vias responsáveis pela formação das reservas glicogênicas (Smith, Lawrence, 1985; Jiaxu et al., 2002; Norrby et al., 2012; Bongers et al., 2013)

Estudos morfométricos realizados com músculo esquelético de rato descreveram os 3 tipos distintos de fibras que exibem diferentes sensibilidade e responsividade a insulina, a saber: tipo I caracterizado por fibras lentas vermelhas; tipo IIa caracterizado por fibras vermelhas rápidas e tipo IIb caracterizado por fibras brancas rápidas. Em condição de repouso a captação de glicose estimulada pela insulina é maior nas fibras tipo I e IIa, que expressam um maior número de transportadores de glicose que as fibras brancas (James, Jenkins e Kraegen, 1985; Mcdermott et al, 1991).

Neste sentido, foi observado que tanto o sóleo quanto o gastrocnêmio porção vermelha foram os músculos que apresentaram as menores reservas glicogênicas provocados pela desnervação. Este comprometimento pode ter relação com a população de receptores de insulina onde já foi descrito que músculos vermelhos apresentam uma população 30 % maior de receptores insulínicos (James et al., 1985; Hirose et al., 2001).

No que se refere às alterações na via insulínica geradas pela secção completa da inervação motora, destaca-se a diminuição na concentração e

atividade da enzima fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) e da enzima AKT, diminuição na expressão gênica do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) e na população do transportador de glicose GLUT 4, gerando comprometimento energético e de forma associada, predispondo a atrofia (Henriksen et al., 1997).

Alterações morfométricas ligadas à atrofia incluem a diminuição na área de secção transversa das fibras musculares, concomitante redução do volume e da massa muscular (Brooks e Myburgh, 2014). Na análise morfométrica foi observado redução na área da fibra nos grupos desnervados e desnervado suplementado com HMB, acompanhando estudos que descreveram redução na área de secção transversa em condições que promovem o desuso (Ahtikoski et al. 2003; Fusatto, 2012).

A redução na área das fibras, bem como da massa muscular decorre de modificações no balanço síntese/degradação proteica o que leva para o quadro de atrofia muscular enquanto resultante de redução da síntese, sem descompensar a degradação, acompanhando sugestões propostas na literatura (Taillandier et al., 2003; Gomes et al., 2004).

A literatura retrata que a suplementação com HMB exerce efeitos positivos em diferentes condições patológicas e ainda atua no sentido de melhorar a performance e prevenir contra lesões no esporte. Esta ação está fundamentada na capacidade do HMB em promover redução na proteólise e ativar a síntese proteica (Zanchi et al., 2011).

No que se refere à interação do HMB com as vias enzimáticas responsáveis pela síntese proteica, sabe-se que este metabólito ativa a mTOR bem como seus efetores denominados 4EBP-1 e p70S6k. Essas vias atuam

diretamente no controle do crescimento celular, promovendo aumento de proteínas miofibrilares e elevando a expressão dos processos de tradução de RNAm, sugerindo ação direta do HMB sobre a proliferação e a diferenciação dos mioblastos (Eley et al., 2007; Zanchi e Lancha-Junior, 2008). No contexto da reabilitação, este efeito pode em situações catabólicas, contribuir para a preservação da massa muscular.

Na avaliação morfométrica do grupo desnervado suplementado com HMB, não foi verificada diferença quando comparado ao grupo somente desnervado. Isto indica que concomitante a perda da inervação motora há redução na expressão da mTOR e seus efetores, assim, estas alterações produzem um ambiente citosólico com baixa eficiência no processo de manutenção da síntese proteica, considerando que a via PI3K/Akt e mTOR é a reguladora do tamanho das fibras musculares (Bodine et al., 2001).

Assim, com base nos resultados obtidos neste estudo, foi observado que a suplementação com HMB no tempo e na dose utilizada não causou efeitos tóxicos e foi eficaz na melhora da via metabólica do músculo desnervado, porém, não foi capaz de expressar ação no restabelecimento da fibra do músculo que teve sua desconexão nervosa.

É sugestivo que os efeitos da suplementação com HMB durante 7 dias no músculo desnervado tenha uma sequência funcional, inicialmente priorizando a via metabólica com a melhora da sensibilidade periférica à insulina e com o aumento da formação das reservas energéticas de glicogênio, para sequencialmente, em um período maior, expressar ação na estrutura da fibra muscular.

Durante a realização deste estudo constatou-se como limitação a necessidade de avaliar os efeitos do HMB a longo prazo, com grupos suplementados por 14 e 28 dias, além de ter um grupo imobilizado para analisar a ação do HMB em diferentes condições de desuso muscular. Outro fator relevante é a escassez de literatura sobre os efeitos deste metabólito na via insulínica.

Dessa forma, sugere-se que sejam realizadas novas pesquisas sobre o HMB como um coadjuvante dos tratamentos fisioterapêuticos.

## 6. CONCLUSÕES

A suplementação com HMB na concentração de 320 mg/Kg não apresentou efeito tóxico que influenciasse a dinâmica elétrica cardíaca.

Não houve toxicidade quando analisadas as principais enzimas hepáticas e de função renal.

O HMB apresentou ação potencializadora na sensibilidade periférica a insulina, uma vez que promoveu elevação na velocidade de decaimento da glicemia, como descrito no ITT.

Preferencialmente a ação do HMB se refere à elevação na captação de hexose seguida da formação de reservas glicogênicas, que sugere melhora nas condições energéticas, como expresso na avaliação com 2-deoxi-glicose.

A ação glicogênica do HMB foi mais expressiva em músculos vermelhos controle e desnervados.

O HMB não modificou a área de secção transversa das fibras musculares desnervadas, o que sugere que possivelmente haja uma hierarquia funcional, onde o restabelecimento das condições energéticas venha a preceder o comprometimento estrutural das fibras.

## 7. REFERÊNCIAS\*

Abrams RA, Tsai AM, Watson B, Jamali A, Lieber RL. Skeletal muscle recovery after tenotomy and 7- days delayed muscle length restoration. *Muscle Nerve*. 2000; 23(5): 707-714.

Alvares TS, Meirelles CM. Efeitos da suplementação de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato sobre a força e a hipertrofia. *Revista de Nutrição*. 2008; 21(1): 49-61.

Andersen ML, Almeida VD, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, et al. Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação. 1ª ed. São Paulo: UNIFESP- Escola Paulista de Medicina; 2004. 48p.

Andersen PH, Lund S, Schmitz O, Junker S, Kahn BB, Edersen O. Increased insulin-stimulated glucose uptake in athletes: the importance of GLUT4 mRNA, GLUT4 protein and fibre type composition of skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1993; 149: 393-404.

Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization. *Sports Med*. 1990; 7:42-58.

Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. 1984; 312: 446-448.

Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 2003; 177(4): 473-81.

Aversa Z, Alamdaria N, Castellero E, Muscaritoli M, Fanelli FR, Hasselgren PO.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012; 423 (4): 739–743.

Aversa Z, Bonetto A, Costelli P, Minero VG, Penna F, Baccino FM, et al.  $\beta$  -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. *Int J Oncol*. 2011; 38: 713–720.

\*Baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Mediline.

Baar K, Nader G, Bodine S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Essays in Biochemistry* England. 2006; 42: 42-61-74.

Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve*. 2010; 41(6): 800-8.

Baxter JH, Carlos JL, Thurmond J, Rehanib RN, Bultmanb J, Frostb D. Dietary toxicity of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (CaHMB). *Food Chem Toxicol*. 2005; 43 (12): 1731-1741.

Bell GI, Kayano T, Buse JB, Buran TCF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporter. *Diabetes Care*. 1990; 13: 198-208.

Bernal-Mizrachi E, Wen W, Stahlhut S, Welling CM, Permutt MA. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1631-8.

Berne M, Levy M N. *Fisiologia*. 5<sup>o</sup> ed: Elsevier; 2003.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 2001; 3(11): 1014-9.

Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm. Metab Research*. 1984; 13(9): 531-532.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991; 65: 663-75.

Bongers KS, Fox DK, Ebert SM, Kunkel SD, Dyle MC, Bullard SA, et al. Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305:907-15.

Brooks NE, Myburgh KH. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front Physiol*. 2014; 5: 99.

Bruckbauer A, Zemel MB, Thorpe T, Akula MR, Stuckey AC, Osborne D, et al. Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. *Nutr Metab*. 2012; 9(1): 77.

Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, et al. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc Natl Acad Sci.USA*. 2006; 103 (1): 87-92.

Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan FA, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Parenter Enteral Nutr*. 2000; 24: 133–139.

Clarkson PM, Rawson ES. Nutritional supplements to increase muscle mass. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1999; 39(4): 317-28.

Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and Messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol*. 1992; 131(4): 1821-1825.

Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature*. 1984; 311: 271-273.

Costa ECS. Os Efeitos da Metformina sobre a Dispersão do Intervalo QT e QTc de Ratos Diabéticos. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 90(4): 254-260.

Coutinho EL, Gomes AR, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res*. 2002; (35): 1329-1332.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378: 785-9.

Curi R, Lagranha CJ, Rodrigues JR, Pithon CTC, Lancha JRAH, Pellegrinotti IL, et al. The Krebs cycle as limiting factor for fatty acids utilization during aerobic exercise. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(2):135-143.

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 1999; 274(4): 1865-8.

De Fronzo RA. The triumvirate: B-Cell, muscle,liver. *Diabetes*. 1988; 37: 667-687.

Deutz NEP, Pereira SL, Haysa NP, Oliver JS, Edens NK., et al. Effect of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on lean body mass during 10 days of bed rest in older adults.*Clinical Nutrition*. 2013; 32 (5): 704–712.

Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscle of rats maintains mass and force, but not. *Restor Neurol Neurosci*. 2006; 24 (1): 41-54.

Dow DE, Cederna PS, Hassett CA, Kostrominova TY, Faulkner JA, Dennis RG. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30(1): 77-86.

Driskell, JA. *Sports Nutrition: Fats and Proteins*: Taylor & Francis Group. New York; 2007.

Durigan JLQ , Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ e Polacow MLO. Efeitos da estimulação elétrica neuromuscular sobre o Membro posterior imobilizado de ratos durante 15 dias: Análises metabólicas e morfométricas. *Rev. bras. fisioter*. 2006; 10 (3): 297-302.

Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile. *Med Sci Sports Exerc*. 1996; 28 (12): 1463-1469.

Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*. 2007; 293 (4): 923-31.

Fernandes KC, Fuentes CB, Campos GE, Somazz MC, Polacow ML, Guirro RR, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot*. 2005; 9(2): 235-241.

Fitschen PJ, Wilson GJ, Wilson JM, Wilund KR. Efficacy of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation in elderly and clinical populations. *Nutrition*. 2013; 29(1): 29-36.

Forti F, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*. 2004; 18(3): 273-281.

Fuller JC Jr, Arp LH, Diehl LM, Landin KL, Baier SM, Rathmacher JA. Subchronic toxicity study of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyric free acid in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2014; 67:145-153.

Fusatto EL. Análise da influência da administração da melatonina no sistema cardiovascular e muscular de ratos desnervados. [Dissertação]. Piracicaba: Unimep; 2012.

Gallagher PM, Carrithers JA, Godard MP, Schulze KE, Trappe SW.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate ingestion, Part I: effects on strength and fat free mass. *Med Sci Sports Exerc*. 2000a; 32(12): 2109-15.

Gallagher PM, Carrithers JA, Godard MP, Schulze KE, Trappe SW.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate ingestion, Part II: effects on hematology, hepatic and renal function. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2000b; 32:216–219.

Gartner R, Leslie P, James L H. *Histologia Essencial*. 1º ed: Elsevier; 2013.

Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, Giannocco G, Nunes MT. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMBeta) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. *Growth Horm IGF Res*. 2011; 21(2): 57-62.

Giannini, E.G.; Testa, R.; Savarino, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can.Med.Ass.J*. 2005; 172(3): 367-379.

Gonçalves LA. A suplementação de leucina com relação à massa muscular em humanos. *Brasileira de Nutrição Esportiva*. 2013; 7(4): 212-223.

Goodyear LJ, Hirshman MF, Valyou PM, Horton ES. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes*. 1992; 41(9): 1091-1099.

Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37: 1473-1480.

Hasselgren PO, Wray C, Mammen J. Molecular regulation of muscle cachexia: It may be more than the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002; 290(1): 1-10.

Henriksen EJ, Bourney RE, Rodnick KJ, Koranyi L, Permutt MA, Holloszy JO. Glucose transport protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1990; 259: 593-598.

Henriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol*. 1997; 70: 2322-2327.

Herrera NMJ, Zimmerman AN, Dykstra DD, Thompson LV. Clenbuterol in the prevention of muscle atrophy: a study of hindlimb-unweighted rats. *Arch Phys Med Rehabil*. 2001; 82: 930-934.

Heslinga HJ, Kronnie G, Huijling PA. Growth and immobilization affects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscle of the adult rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995; (70): 49-57.

Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009; 47: 255-259.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; (279): 1235-1241.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Ibebunjo C, Martyn JAJ. Long-term denervation impairs insulin receptor substrate (IRS)-1 mediated insulin signaling in skeletal muscle. *Metabolism*. 2001; 50:216-222.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of eripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004; 25(9): 1583-1592.

Jackman RW, SC Kandarian. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287(4): C834-43.

Jakubiec-Puka A, Catani C, Carraro U. Myosin heavy-chain composition in striated muscle after tenotomy. *Biochem J.* 1992; 15(282): 237-242.

James DE, Jenkins AB, Kraegen EW. Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.* 1985; 248: 567-574.

Jiaxu L, Toshinori K, Sona P, Carl KY, Steven P. Gygi KI, et. al. Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature.* 2002; 418: 793-797.

Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2006; 33(2): 155-65.

Kitamura JH, Silva CA, Watanabe RCT, Chaves TP, Arruda EJ. Perfil Energético do Músculo Esquelético de Ratos Suplementados com BCAA na Fase Aguda da Imobilização. *Saúde em Revista.* 2012; 12(30): 35-42.

Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care.* 1990; 13: 228 - 243.

Koeppen BM, Stanton BA. Berne & Levy: Fisiologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Kovarik M, Muthny T, Sispera L, Holecek M. Effects of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate treatment in different types of skeletal muscle of intact and septic rats. *Journal of physiology and biochemistry.* 2010; 66(4): 311-9.

Kovering MV, Nissen SL. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy beta-methylbutyrate in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1992; 262: 27-31.

Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6(3): 271-5.

Li YP, Chen YL, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2003; 285(4): C806-C12.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. 2. ed. San Diego: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Lim JY, Han TR. Effect of electromyostimulation on a apoptosis-related factors in denervation and reinnervation of rat skeletal muscles. *Muscle Nerve*. 2010; 42(3): 422-30.

Macdonald EM, Andres-Mateos E, Mejias R, Simmers JL, Mi R, Park JS, et al. Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition. *Dis Model Mech*. 2014; 7(4): 471-8.

McDermott JC, Geoffrey CB, Elder, Bonen A. Non-exercising muscle metabolism during exercise. *Pflügers Archiv*. 1991; 418 (4): 301-307.

Machado J. Efeitos da suplementação com  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato sobre parâmetros envolvidos na atrofia muscular esquelética induzida pela imobilização em ratos [Dissertação]. Curitiba: Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná; 2010.

Magnusson C, Svensson A, Christerson U, Tagerud S. Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *Eur J Neurosci*. 2005; 21: 577–580.

Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol.Biol*. 2010; 611:211-25.

Marques MJ. Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1992.

Michel RN, Gardiner PF. Influence of overload on recovery of rat plantaris from partial denervation. *News Physiol Sci*. 1989; 66(2): 732-40.

Molfino A, Gioia G, Rossi FF, Muscaritoli M. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation in health and disease: a systematic review of randomized trials. *Amino Acids*. 2013; 45(6): 1273-92.

Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ. A new rat model simulation some aspects of space flight. *Physiologist*. 1979; (22): 523-524.

Neufer PD, Shinebarger MH, Dohm GL. Effect of training and detraining on skeletal muscle glucose transporter (GLUT4) content in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1992; 70 (9): 1286-1290.

Nissen SL, Sharp RL. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *Journal of applied physiology*. 2003; 94(2): 651-9.

Nissen SL, Sharp RL, Ray M, Rathmacher JA, Rice D, Fuller JCJr, et al. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol*. 1996; 81(5): 2095-104.

Nissen SL, Sharp RL, Panton L, Vukovich M, Trappe S, Fuller JCJr. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr*. 2000; 130(8): 1937-45.

Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB). *Nutr Biochem*. 1997; 8: 300-311.

Nonnecke BJ, Franklin ST, Nissen SL. Leucine and its catabolites alter mitogen-stimulated DNA synthesis by bovine lymphocytes. *J Nutr*. 1991; 121(10): 1665-1672.

Norrby M, Evertsson K, Fjällström AK, Svensson A, Tågerud S. Akt (protein kinase B) isoform phosphorylation and signaling downstream of mTOR (mammalian target of rapamycin) in denervated atrophic and hypertrophic mouse skeletal muscle. *J Mol Signal*. 2012; 7(1):7.

Paez-Espinosa EV, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC, Saad MJ. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. *Mol Cell Endocrinol*. 1999; 156:121-9.

Palisin T, Stacy J.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylbutyrate and its use in athletics. *Current Sports Medicine Reports*. 2005; 4(4): 220-223.

Panton LB, Rathmacher JA, Baier S, Nissen SL. Nutritional Supplementation of the Metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) during resistance training. *Nutrition*. 2000; 16(9): 734-739.

Pardi ACR. Ação da Nandrolona no padrão energético do músculo esquelético imobilizado: estudo em ratos. [Dissertação]. Piracicaba: UNIMEP; 2010.

Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 1998; 9(2-4): 89-109.

Peterson AL, Qureshi MA, Ferket PR, Fuller JCJr. In vitro exposure with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate enhances chicken macrophage growth and function. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999; 67: 67-78.

Pimentel GD, Rosa JC, Lira FS, Zanchi NE, Ropelle ER, Oyama LM, et al. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMBeta) supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway *Nutr Metab*. 2011; 8(1): 11.

Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, de Souza-Jr AL, Vitzel KF, Nachbar RT, et al. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 112(7): 2531-7.

Powers SK, Kavazis AN, Deruisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(2): R337-44.

Prentki M, Corkey BE. Is the beta cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM. *Diabetes*. 1996; 45: 273-83.

Rafacho A, Roma LP, Tabaga SR. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007; 85: 536-45.

Ribeiro C, Borin S, Silva C. Efeito de diferentes doses de leucina sobre as reservas glicogênicas da musculatura esquelética desnervada de ratos. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*. 2012; 45(1): 58-65.

Richarson JM, Balon TW, Treadway JL, Pessin JF. Differential regulation of glucose transporter activity in red and white skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1991; 266: 12690 - 12694.

Rodnick KJ, Henriksen EJ, James DE, Holloszy JO. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. *American Journal of Physiology*. 1992; 262: C9-C14.

Rose SJ, Rothstein JM. Muscle biology in the physical therapy. *Phys Ther*. 1982; 62: 1754-1756.

Ross MH, Pawlina W. *Histologia: Texto e Atlas - Em Correlação com Biologia Celular e Molecular*. 6ª ed: Guanabara Koogan; 2012.

Rüegg MA, Glass DJ. Molecular mechanisms and treatment options for muscle wasting diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011; 51: 373-395.

Sabourin PJ, Bieber LL. Purification and characterization of an alphaketoisocaproate oxygenase of rat liver. *The Journal of biological chemistry*. United States. 1982; 257(13): 7460-7467.

Sabourin PJ, Bieber LL. Subcellular distribution and partial characterization of an alpha-ketoisocaproate oxidase of rat liver: formation of beta Hydroxyisovaleric acid. *Arch Biochem Biophys*. 1981; 206(1): 132-44.

Salvini TF. Plasticidade e adaptação postural dos músculos esqueléticos. In: Marques AP. *Cadeias Musculares: Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global*. São Paulo: Manole; 2000. 3-14p.

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology*. 2008; 23: 160-70.

Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981; 21: 470-475.

Seabra AD. O bloqueio da atividade nitrérgica no tendão de ratos submetidos à tenotomia com sutura acelera a regeneração muscular [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas; 2012.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(18): 979-985.

- Silveria MIA, Perot C, Goubel F. Plasticidade muscular. CCS, 1994; 13 (3): 23-32.
- Siu L, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. J Appl Physiol. 1970; 28: 234-236.
- Sjorgreem B, Nordenskjold DT, Holmgren H, Wollerstrom J. Bertrag zur kentnis des le berrhythmik. Pfluger. Arch Gesante Physiol Menschen Tiere. 1938; 240:47.
- Smith HJ, Mukeji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome induced proteolysis in skeletal muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss Cancer Res. 2005; 65: 277–283.
- Smith RL, Lawrence JC. Insulin action in denervated rat hemidiaphragms. J Biol Chem. 1984; 259: 2201-7.
- Smith RL, Lawrence JC. Insulin action in denervated skeletal muscle. Evidence that the reduced stimulation of glycogen synthesis does not involve decreased insulin binding. Journal of Biological Chemistry. 1985; 260: 273–278.
- Sowell MO, Dutton SL, Buse MG. Selective in vitro reversal of the insulin resistance of glucose transport in denervated rat skeletal muscle. Am J Physiol. 1989; 257: E418-E425.
- Stout JR, Smith-Ryan AE, Fukuda DH, Kendallc KL, Moon JR, Hoffman JR, et al. Effect of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (CaHMB) with and without resistance training in men and women 65+ yrs: A randomized, double-blind pilot trial. Experimental Gerontology. 2013; 48 (11): 1303–1310.
- Talleyrand V, Zhang Z, Rathmecher J, Nissen S. Uptake and output of leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) across the leg of pigs. FASEB J. 1993; 7(3): A71.
- Tanaka T, Kariya Y, Hoshin Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. J Orthop Sci. 2004; (9): 76-85.
- Taillandier D, Aurousseau E, Combaret L, Guezennec CY, Attaix D. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. Int J Biochem Cell Biol. 2003; 35: 665-675.

Taylor A, Thayer R, Rao S. Human skeletal glycogen synthetase activities water exercise and training. *Can J Physiol. Pharmacol.* 1972; 50: 411 – 412.

Turinsky J, Damrau-Abney A, Loegering DJ. Blood flow and glucose uptake in denervated, insulin- resistant muscles. *Am J Physiol.* 1998; 274: 311-7.

Van KM, Nissen SL. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *Am J Physiol.* 1992; 262(1 Pt 1): E27-31.

Vukovich MD, Slater G, Macchi MB, Turner MJ, Fallon KT. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans *J Nutr Biochem.* 2001; 12:631–639.

White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem.* 1998; 182: 3-11.

Wilson GJ, Wilson JM, Manninen AH. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of ge, sex, and training experience: A review. *Nutrition and Metabolism.* 2008; 5: 1.

Wilson JM, Lowery RP, Joy JM, Walters JA, Baier SM, Fulle JC, et al.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate free acid reduces markers of exercise-induced muscle damage and improves recovery in resistance-trained men. *Br J Nutr.* 2013; 110(3): 538.

Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, Phillips BE, Crossland H, Williams J, et al. Effects of leucine and its metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol.* 2013; 591(11): 2911-23.

Yonamine CY. A Suplementação crônica com beta hidroxí beta metilbutirato (HMB) reduz a sensibilidade à insulina de ratos de modo tecido-específico. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.

Zanchi NE, Gerlinger-Romero F, Guimarães-FL, de Siqueira Filho MA, Felitti V, Lira FS, et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. *Amino Acids.* 2011; 40(4): 1015-25.

Zanchi NE, Lancha-Junior AH. Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70s6k and protein synthesis. *European Journal of Applied Physiology.* 2008; 102: 253-63.

Zierath JA, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type: Influence on contractile and metabolic properties. *Plos Biology*. 2004; 10: 337-348.