

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO
MOVIMENTO HUMANO**

Efeitos da suplementação com beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) associado ao treinamento físico aeróbio em diferentes intensidades e frequências na plasticidade do músculo esquelético de ratos

André Katayama Yamada

2017

TESE DE DOUTORADO

ANDRÉ KATAYAMA YAMADA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM BETA-
HIDROXI-BETA-METILBUTIRATO
ASSOCIADO AO TREINAMENTO FÍSICO
AERÓBIO EM DIFERENTES INTENSIDADES E
FREQUÊNCIAS NA PLASTICIDADE DO
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Doutor em Ciências do Movimento Humano.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille

PIRACICABA
2017

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Joyce Rodrigues de Freitas CRB-8/10115

Y19e Yamada, André Katayama
Efeitos da suplementação com Beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) associado ao treinamento físico aeróbio em diferentes intensidades e frequências na plasticidade do músculo esquelético de ratos / André Katayama Yamada.
104 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille.
Tese (Doutorado em Ciências do Movimento Humano) –
Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2017.

1. Plasticidade muscular. 2. Regeneração. 3. Metabólito. I.
Yamada, André Katayama. II. Título.

CDU – 613.2.038

Dedico este trabalho:

Aos meus pais e irmão, exemplos de perseverança e fé, além de serem minha base de sustentação de amor, carinho e inspiração. Espero algum dia conseguir retribuir o que tanto fizeram por mim ao longo destes anos, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meus pais e irmão pelo caloroso apoio nesta longa jornada, pelo carinho, amor e compreensão nas escolhas que fiz. Obrigado por tudo!

A Deus por estar comigo em todos os momentos, mesmo em situações muito difíceis, mas ele me mostrou que é possível superar cada obstáculo.

À minha orientadora Adriana Pertille pela excepcional orientação, por ter me dado esta oportunidade, além de entender minhas limitações. Me ajudou muito nos experimentos e direcionamentos deste projeto. Obrigado por compartilhar sua experiência e ensinamentos. Aprendi muito ao longo destes anos, sou eternamente grato.

Aos meus colegas do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular e do curso de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano. Em especial à Larissa Antunes, Luana Gomes de Oliveira, Douglas Massoni Ramos, Ana Claudia Petrini, Maisa Cardoso da Silva, Luis Felipe Sílio, Anna Flavia Salomão Reis, Fernando Alipio e Rafael Schimith da Silveira pelo auxílio nos experimentos.

À professora Rosana Macher Teodori por disponibilizar à vontade e em um ambiente familiar o Laboratório de Plasticidade Neuromuscular para as pesquisas e experimentos, e a sua participação enriquecedora como membro da banca examinadora.

Ao professor Carlos Alberto da Silva e ao André Lico Mascarin pelo auxílio nos experimentos com as análises de glicogênio muscular. Agradeço também ao Carlos pela aquisição dos suplementos nutricionais utilizados nas pesquisas e pelas sugestões na banca.

À professora Delaine Rodrigues Bigaton pela preocupação com os alunos e a brilhante coordenação do curso.

Aos professores colaboradores Cintia Yuri Matsumura e Renato Ferretti da UNESP-Botucatu, pela ajuda na dosagem do conteúdo de proteínas.

Aos membros da banca: Carlos Roberto Bueno Junior, Fulvia de Barros Manchado Gobatto pelas valiosas sugestões.

Aos demais professores do curso pelas interessantes e animadas aulas ministradas.

À secretária Ariane do PPGCMH e aos funcionários do PPG geral pelo ótimo atendimento.

À Patrícia e a Darci pelo profissionalismo e atendimento na Fisiologia e no biotério respectivamente.

À CAPES pela concessão da bolsa.

“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin

RESUMO

OBJETIVO: investigar os efeitos da suplementação (S) com beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) associado a diferentes intensidades e frequências de treinamento físico aeróbio (TFA) no músculo tibial anterior (TA) em condição normal e lesão. **MÉTODOS:** Foram utilizados 36 ratos Wistar jovens. A pata esquerda foi considerada como o controle de cada grupo e a pata direita foi submetida à lesão (L). Dessa forma os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=6): sedentário controle (CT/CL), sedentário suplementado com HMB (H/HL), HMB com treinamento três vezes na semana, sem carga (T3/L3) e com carga (T3C/L3C); HMB com treinamento cinco vezes na semana, sem carga (T5/L5) e com carga (T5C/L5C). Os animais nadaram durante 60 minutos com ou sem carga de 5% da massa corporal, e receberam suplementação de HMB por gavagem diariamente, na dose de 320 mg/kg de massa corporal durante 14 dias. No décimo quinto dia foi realizado o procedimento de criolesão no músculo tibial anterior (TA), e 48 horas após o repouso, as intervenções tiveram prosseguimento por mais 14 dias. Vinte e quatro horas após a última sessão (31^o dia), ambos TA direito e esquerdo foram retirados e pesados para análises morfométricas: área de secção transversa (AST) das fibras musculares normais e em regeneração e densidade de área do tecido conjuntivo na lesão (DATC), conteúdo de glicogênio e análises moleculares: conteúdo de miogenina, mTOR, miostatina, e TGF- β 1. Foi utilizado o BioEstat e aplicado o teste de variância (ANOVA) *one way*, seguido do teste de Tukey. Para todas as análises foi adotado um valor de $p \leq 0,05$. **RESULTADOS:** O grupo T5C apresentou hipertrofia muscular, ao passo que o T3 apresentou inibição da hipertrofia. Todas as intervenções (S e exercício) aumentaram o glicogênio muscular quando comparado ao CT ($p < 0,05$). A intensidade apresentou maior sensibilidade ao aumento do glicogênio. O grupo T5C apresentou redução significativa da miogenina em comparação ao CT ($p < 0,05$), em contrapartida apresentou aumento significativo no conteúdo de miostatina e da mTOR em comparação ao CT ($p < 0,05$). O TGF- β 1 foi significativamente maior no grupo T5C quando comparado ao CT ($p < 0,05$). Já na condição de lesão foi observado aumento da AST em todas as intervenções quando comparado ao grupo controle, sendo que o grupo L3 apresentou a maior hipertrofia muscular e menor DATC quando comparado CL ($p < 0,05$). No grupo L5C houve aumento da DATC quando comparado aos exercícios com menor intensidade e frequência ($p < 0,05$). Todas intervenções promoveram um aumento do conteúdo de miogenina quando comparado ao controle. O grupo L5 apresentou menor conteúdo de miostatina quando comparado ao L3 ($p < 0,05$). Já para a mTOR o L5 apresentou maior conteúdo de mTOR quando comparado ao L3 ($p < 0,05$). O grupo L3 apresentou menor TGF- β 1 quando comparado ao CL ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** No músculo sem lesão o HMB induziu hipertrofia, no entanto foi necessário uma maior intensidade e frequência do treinamento para manter a massa muscular. Na regeneração muscular, o treinamento físico de baixa intensidade e frequência associado à suplementação apresentou hipertrofia e redução da fibrose.

PALAVRAS-CHAVE: plasticidade muscular, metabólito, exercício físico; regeneração, modelo animal.

ABSTRACT

OBJECTIVE: investigate the effects of beta-hidroxi-beta-methylbutyrate supplementation (S) associated with different intensities and frequencies of aerobic exercise training (AET) on tibialis anterior muscle (TA) in normal condition and injury. **METHODS:** Thirty six young Wistar rats were utilized. The left limb was considered as control of each group and the right limb was submitted to injury (I). In this way, the animals were randomly distributed in six groups (n=6): sedentary control (CT/CI), sedentary supplemented with HMB (H/HI), HMB with exercise training three days per week, without load (T5/I3) and with load (T3C/I3C); HMB with exercise training five days per week, without load (T5/I5) and with load (T5C/I5C). The animals swam during 60 minutes with or without 5% load of body mass, and received daily HMB supplementation by oral gavage, in a dose of 320 mg/kg of body mass during 14 days. In the 15^o day, the cryoinjury procedure was realized in tibialis anterior muscle (TA), and 48 hours after rest, the interventions had prosecution for more 14 days. Twenty four hours after the last session (31^o day), both right TA and left were removed and weighted for morphometric analysis: cross sectional area (CSA) of normal muscle fibers and in regeneration and density area of the connective tissue (DACT), and molecular analysis: myogenin content, mTOR, myostatin and TGF- β 1. BioEstat program was utilized, and one way ANOVA variation test was applied, followed by Tukey-HSD. For all analysis a value of $p \leq 0,05$ was established. **RESULTS:** The T5C group presented muscle hypertrophy. In contrast, an inhibition of muscle hypertrophy caused by HMB was observed in T3 group. All interventions (S and exercise) increased muscle glycogen when compared to CT ($p < 0,05$). The increase in glycogen demonstrated to be dependent of volume and intensity, however the intensity presented more sensibility to the increased glycogen. The T5C group presented significant reduction in myogenin compared to CT ($p < 0,05$), in contrast presented significant increase in myostatin and mTOR content when compared to CT ($p < 0,05$). TGF- β 1 was significantly greater in T5C quen compared to CT ($p < 0,05$). In the condition of injury an increase in CSA was observed in all interventions when compared to CL, considering that L3 presented the most robust hypertrophy and less DATC when compared to CL ($p < 0,05$). In L5C group there was an increase in DATC when compared with exercises of minor intensity and frequency ($p < 0,05$). All interventions promoted an increase in myogenin content when compared to CL. L5 presented smaller myostatin content when compared to L3 ($p < 0,05$). For mTOR L5 presented higher mTOR content when compared to L3 ($p < 0,05$). L3 group presented smaller TGF- β 1 when compared to CL ($p < 0,05$). **CONCLUSION:** In the muscle without injury HMB induced hypertrophy, however was necessary a greater intensity and frequency of training to maintain muscle mass. In muscle regeneration, exercise training of low intensity and frequency associated with supplementation presented hypertrophy and reductions of fibrosis.

KEY-WORDS: muscle plasticity, metabolite, physical exercise, regeneration, animal model.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	- Análise de variância
ADP	- Adenosina difosfato
AKT	- Proteína quinase B
AST	- Área de secção transversa
ATP	- Adenosina trifosfato
Atrogin-1	- Atrogina-1
BCAA	- Aminoácido de cadeia ramificada
BCKD	- α -ceto-ácidos de cadeia ramificada
DATC	- Densidade de area de tecido conjuntivo
EDL	- Extensor longo dos dedos
GH	- Hormônio do crescimento
4EB-P1	- Fator 4E de ligação de iniciação de eucarioto
GAPDH	- Gliceraldeído 3-fosfato de hidrogenase
GSK3	- Glicogênio quinase 3 sintase
HMB	- Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato
HMG-CoA	- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
HSP70	- proteína de choque térmico 70 induzível
IGF-1	- Fator de crescimento semelhante à insulina 1
KIC	- α -ceto-isocaproato
mTOR	- Alvo da rapamicina em mamíferos
MuRF1	- Fator muscular <i>RING finger</i> 1
MyoD	- Fator de diferenciação miogênica
P70S6K1	- Proteína quinase ribossomal de 70 quilodaltons
RNA_m	- Ácido ribonucleico mensageiro
TβR-I	- Receptor do fator de transformação do crescimento beta tipo 1
TGF-β1	- Fator de transformação de crescimento beta 1
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. PRIMEIRO ARTIGO	19
3.1 Introdução	19
3.2 Metodologia	22
3.2.1 Grupos Experimentais	22
3.2.2 Tratamento com Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato (HMB).....	22
3.2.3 Treinamento físico dos animais	23
3.2.4 Avaliação da massa corporal.....	24
3.2.5 Eutanásia dos animais.....	24
3.2.6 Massa muscular e massa do tecido adiposo	25
3.2.7 Análises Histológicas	25
3.2.8 Immunoblot	26
3.2.9 Glicogênio Muscular	28
3.2.10 Análise Estatística.....	28
3.3 Resultados	29
3.3.1 Massa corporal	29
3.3.2 Massa muscular absoluta e relativa do tibial anterior	30
3.3.3 Massa absoluta e relativa do tecido adiposo.	31
3.3.4 Área secção transversa (AST) das fibras musculares	33
3.3.5 Cortes histológicos TA	34
3.3.6 Glicogênio Muscular do TA.....	35
3.3.7 Conteúdo de Miogenina.....	36
3.3.8 Conteúdo de Miostatina e TGF- β 1.....	37
3.3.9 Conteúdo de mTOR.....	39
3.4 Discussão	39
3.5 Limitações.....	47
3.6 Conclusão	47
4. SEGUNDO ARTIGO	48
4.1 Introdução	48
4.2 Metodologia	52
4.2.1 Grupos Experimentais	52
4.2.2 Suplementação com Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato (HMB)	52
4.2.3 Treinamento físico dos animais	53
4.2.4 Procedimento de Lesão Muscular.....	54
4.2.5 Desenho Experimental.....	55
4.2.6 Avaliação da massa corporal.....	55
4.2.7 Eutanásia dos animais.....	56
4.2.8 Massa muscular.....	56
4.2.9 Análises Histológicas	56

4.2.10	Immunoblot	58
4.2.11	Análise estatística	59
4.3	Resultados	60
4.3.1	Massa corporal	60
4.3.2	Massa muscular absoluta e relativa do tibial anterior	61
4.3.3	Área secção transversa (AST) das fibras musculares em regeneração	62
4.3.4	Cortes histológicos do TA lesionado	63
4.3.5	Densidade de Área do Tecido Conjuntivo (DATC).....	64
4.3.6	Conteúdo de miogenina.....	65
4.3.7	Conteúdo de miostatina	66
4.3.8	Conteúdo de mTOR.....	67
4.3.9	Conteúdo de TGF- β 1	68
4.4	Discussão	69
4.5	Limitações.....	76
4.6	Aplicação prática.....	77
4.7	Conclusão	78
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS.....	80
	Anexo 1	104

1 INTRODUÇÃO

Suplementos nutricionais são extensamente utilizados por praticantes de exercícios físicos e esportes, principalmente para fins estéticos e/ou aumento do desempenho, sendo que somente alguns suplementos realmente promovem efeitos significativos (BEAUMONT; JAMES, 2017; BIANCO et al., 2011; CLOSE et al., 2016; HELMS et al., 2014; MORRISON et al., 2004; NYAKAYIRU et al., 2017; SCHOENFELD et al., 2017; WALDRON et al., 2017). No entanto os efeitos dos suplementos para fins terapêutico/clínico e na reabilitação do músculo esquelético são menos conhecidos e conseqüentemente menos discutidos na ciência (AGUILANI et al., 2014; CHOLEWA et al., 2017; CLARK et al., 2000; FARUP et al., 2014; NISHIZAKI et al., 2015; PERRY et al., 2016). Evidências demonstram que a suplementação nutricional associada ao treinamento físico regular podem induzir alterações morfológicas, funcionais, enzimáticas e moleculares na musculatura esquelética (AGUIAR et al., 2010; CRIBB et al., 2007; FARUP et al., 2014; RINGHOLM et al., 2013; SUZUKI, 2005).

Apesar de os suplementos serem componentes importantes na rotina diária de atletas existe uma crescente mudança de ideias, aonde estes atletas vêm priorizando a alimentação natural ao invés da utilização de suplementos (KNAPIK et al., 2014; KNAPIK et al., 2015). Sabe-se que existe o risco de contaminação por estes suplementos e o risco dos indivíduos serem flagrados em testes anti-doping (OUTRAM; STEWART, 2013). Desta forma, a utilização dos suplementos só é justificável perante a real necessidade, tanto em atletas quanto em indivíduos não atletas ativos, uma vez que a alimentação por si só é suficiente em fornecer todos os nutrientes para uma vida saudável.

Um dos suplementos que vem sendo amplamente investigado pela ciência do exercício/esporte é o beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB). O HMB é um metabólito do aminoácido essencial leucina, uma importante molécula sinalizadora de gatilho da síntese proteica e ação anabólica (DE BRANDT, 2016; HOLECEK, 2017; MITCHELL et al., 2016; WILSON et al., 2013; WILKINSON et al., 2013; ZANCHI et al., 2011). A primeira reação na via da síntese de HMB no organismo é a transaminação reversível de leucina para α -ceto-isocaproato (KIC) pela aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada (BCAA) (NISSEN; ABUMRAD, 1997; VAN KOVERING; NISSEN, 1992). Uma vez que as reações dos seguintes passos do catabolismo da leucina são pequenas no músculo esquelético, a maior parte de KIC é liberada do músculo esquelético para o sangue e do sangue para outros tecidos (HOLECEK, 2017). A maioria do KIC é descarboxilada do complexo enzimático desidrogenase dos α -ceto-ácidos de cadeia ramificada (BCKD) para isovaleril-coA na mitocôndria hepática, a qual é convertida gradualmente em acetil-coA e corpos cetônicos (VAN KOVERING; NISSEN, 1992). Estima-se que apenas 5% de KIC é metabolizada pela enzima KIC deoxigenase para produção de HMB. Além disso, estima-se também que um ser humano com 70 quilos produziria 0,2 a 0,4 g de HMB por dia, dependendo do nível dietético de leucina (NISSEN et al., 1996).

Sendo assim, um indivíduo consumindo cerca de 60 gramas de L-leucina obteria 3 gramas de HMB (WILSON et al., 2008). Desta forma, a ingestão desta quantidade via alimentação convencional pode até ser viável, mas extrapolaria os princípios de uma dieta equilibrada, necessitando desta forma da suplementação (WILSON et al., 2008). Dados isotópicos demonstram que o destino primário do catabolismo do HMB é a conversão para 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase

(HMG-CoA), precursora direta do colesterol (NISSEN et al., 1997). Tal mecanismo estabiliza a membrana celular, podendo prevenir microlesões induzidas pelo exercício, mas a hipótese do papel do colesterol na proteção da membrana muscular necessita ser comprovada.

O HMB engatilha o aumento de síntese proteica e inibe a proteólise por meio da ativação de vias sinalizadoras anabólicas e diminuição de vias de degradação proteica muscular, respectivamente (ELEY et al., 2007; GIRÓN et al., 2016; WILKINSON et al., 2013; SMITH et al., 2004; SMITH et al., 2005). Várias evidências suportam o cenário de que o aumento na síntese proteica prediz hipertrofia muscular (MAYHEW et al., 2009; PHILLIPS, 2014; ZANCHI; LANCHI, 2008). No entanto, alguns estudos demonstraram que o HMB não promoveu efeito significativo (PADDON-JONES et al., 2001; KREIDER et al., 1999; HOFFMAN et al., 2004)

A hipertrofia muscular é definida como o aumento da área de secção transversa (AST) das miofibras ou do músculo inteiro (ADAMS; BAMMAN, 2012; DAMAS et al., 2016; GOODMAN et al., 2015; MARABITA et al., 2016; REIDY et al., 2017; WHITE et al., 2014). O alvo da rapamicina em mamíferos/alvo mecanístico de rapamicina (mTOR) é um regulador central da síntese de proteínas (FIGUEIREDO et al., 2017; GOODMAN, 2014; MARCOTTE et al., 2015) e possui correlação positiva para o aumento da massa muscular induzido pelo treinamento de força em animais e humanos (BAAR; ESSER, 1999; TERZIS et al., 2008). Além disso, esta quinase é sensível à sobrecarga de aminoácidos como a leucina (CHURCHWARD-VENNE et al., 2012; GRAN; CAMERON-SMITH, 2011; LYNCH et al., 2002;). Similar à leucina, o HMB induz aumento na síntese proteica em parte da via mTOR (GIRÓN et al., 2016; WILKINSON et al., 2013).

Adicionalmente, estudos demonstram que o HMB isolado ou em conjunto com o exercício aumenta a massa muscular (GALLAGHER et al., 2000; JÓWKO et al., 2001; NISSEN et al., 1996; PIMENTEL et al., 2011), no entanto a relação da hipertrofia com mTOR perante a suplementação de HMB necessita ser melhor investigada (HOLECEK, 2017).

A regeneração muscular é um processo sincronizado e governado por inúmeros mediadores inflamatórios, celulares, moleculares e metabólicos (DUFRESNE et al., 2016; DUMONT et al., 2015; KARALIAKI et al., 2009; SCHIAFFINO et al., 2017; TIDBALL, 2010). É constituída por três fases bem definidas: degeneração, regeneração e remodelamento (CHARGÉ; RUDNICKI, 2014; GROUNDS, 2014; LAUMONIER; MENETREY, 2016). A fase de degeneração é caracterizada pela ruptura e necrose de miofibras, desenvolvimento de hematoma e a instalação de processo inflamatório (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; KARALAKI et al., 2009; MUSARÓ, 2014). Na fase de regeneração é evidente fagocitose de tecidos danificados, seguida de regeneração de miofibras e ativação de células tronco musculares denominadas de células satélites (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; KARALAKI et al., 2009; MUSARÓ, 2014). Por fim na fase de remodelamento se constata maturação de miofibras regeneradas com recuperação da capacidade funcional do músculo, assim como formação de fibrose e cicatrização tecidual (CHARGÉ, RUDNICKI, 2004; KARALAKI et al., 2009; MUSARÓ, 2014).

Existe uma gama de citocinas, fatores de crescimento/transcrição e moléculas que exercem papel fundamental na regulação da regeneração muscular. O fator de diferenciação miogênica (MyoD) exerce papel importante na diferenciação de células satélites durante a regeneração muscular (CHARGÉ;

RUDNICKI, 2004). Especificamente, a fase inicial de ativação e proliferação das células musculares é caracterizada pela expressão de MyoD, a qual exhibe aumento três horas após a lesão, atingindo seu pico em 12 horas, normalizado após este período (SRIKUEA et al., 2010; CORBU et al., 2010). A Miogenina (MYOG) é um fator de transcrição expresso tardiamente em células satélites, durante a fase de diferenciação terminal, indicando reparo e formação de mioblastos (HASTY et al., 1993; FUCHTBAUER et al., 1992; GROUNDS et al., 1992).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória (CLARK, 2007; GOETZ et al., 2004), no entanto, apesar do aclamado papel como molécula inflamatória os estudos de fato demonstram que ele possui um papel dinâmico no músculo esquelético. Mais recentemente tem sido proposto que o TNF- α contribui para processos degenerativos e regenerativos após lesão muscular (KARALAKI et al., 2009). Além disso, tem sido proposto que o TNF- α engatilha o catabolismo muscular e promove a ativação e proliferação de células satélites (KARALAKI et al., 2009). O TNF α é liberado pela fibra muscular após lesão e sua expressão aumenta durante o reparo retornando aos valores basais 13 dias após a lesão (COLLINS; GROUNDS, 2001; WARREN et al., 2002).

O fator de transformação de crescimento β 1 (TGF- β 1) é uma citocina que promove a formação de tecido conjuntivo na área regenerada (DELANEY et al., 2017). Esta citocina é um dos mais potentes fatores fibrogênicos e regula a síntese de matriz extracelular (DELANEY et al., 2017). Durante o reparo muscular o TGF- β 1 é capaz de ativar a expressão de genes que codificam proteínas da matriz extracelular como colágeno e fibronectina (DELANEY et al., 2017).

HMB tem demonstrado induzir ativação e proliferação de células satélites tanto *in vivo* como *in vitro* (ALWAY et al., 2013; KORNASIO et al., 2009). Além disso, o HMB tem demonstrado reduzir eventos de apoptose e servir como agente anti-inflamatório (HAO et al., 2011; HOFFMAN et al., 2016; NUNES et al., 2011). Tais mecanismos em conjunto podem sugerir um papel importante do HMB na regeneração muscular.

Apesar de o treinamento de força (TF) ser considerado o método de treinamento mais efetivo para induzir hipertrofia, recentemente tem se demonstrado que o treinamento aeróbio, com maior volume e intensidade, também é capaz de promover hipertrofia (KONOPKA; HARBER, 2014). Adicionalmente, o treinamento físico aeróbio (TA) é uma estratégia efetiva para acelerar o processo de regeneração muscular (JOANISSE et al., 2016; KIM et al., 2013; RICHARD-BUTEAU et al., 2008; SMITH et al., 2001). Os mecanismos envolvem a ativação da via mTOR, recrutamento de células satélites, diminuição da fibrose e do processo inflamatório (JOANISSE et al., 2016; KIM et al., 2013; RICHARD-BULTEAU et al., 2008; SMITH et al., 2001).

Somente um estudo investigou o efeito combinado da suplementação (leucina) com treinamento físico aeróbio na massa muscular, hipertrofia e síntese proteica (XIA et al., 2016). Desta forma, destaca-se a necessidade de investigar os efeitos de HMB concomitante a diferentes intensidades e frequências de TFA na hipertrofia muscular. Não foram encontrados estudos que investigaram os efeitos de HMB combinado ao TFA na regeneração muscular.

As hipóteses do trabalho são: 1) a suplementação com HMB associada ao treinamento físico aeróbio de maior intensidade e frequência induz hipertrofia

muscular; 2) a suplementação com HMB associada ao treinamento físico aeróbio de menor intensidade e frequência favorece a regeneração muscular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação com HMB associada ao treinamento físico aeróbio em diferentes intensidades e frequências na plasticidade do músculo tibial anterior de ratos, em condição normal e na lesão.

2.2. Objetivos Específicos

- avaliar a massa corporal, massa muscular, massa adiposa e glicogênio muscular em diferentes tipos de intensidades e frequências do treinamento aeróbio;
- avaliar o trofismo muscular e o conteúdo de Miogenina, Miostatina, mTOR, TGF- β 1 em ratos jovens saudáveis, submetidos ao treinamento aeróbio;
- avaliar a regeneração muscular de ratos submetidos à criolesão, submetidos ao treinamento aeróbio
- analisar a área de secção transversa da fibra muscular, densidade da área de tecido conjuntivo (DATC), conteúdo de Miogenina, Miostatina, mTOR e TGF- β 1 na condição de lesão muscular.

3. PRIMEIRO ARTIGO

Efeitos da suplementação de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) associado ao treinamento físico aeróbio com diferentes intensidades e frequências no trofismo do músculo esquelético de ratos.

3.1 Introdução

A suplementação nutricional associada ao treinamento físico regular pode em algumas situações estimular ajustes morfológicos e funcionais no músculo esquelético (CLOSE et al., 2016; HULMI et al., 2015; PELLEGRINO et al., 2009; VOLEK et al., 1999). O beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) é um metabólito do aminoácido leucina e possui importantes propriedades anabólicas, anti-catabólicas e ergogênicas (AVERSA et al., 2012;; GIRÓN et al., 2015; HOLECEK, 2017; KOVARIK et al., 2010; PORTAL et al., 2011; WILKINSON et al., 2013; VUKOVICH; DREIFORT, 2001). A suplementação com (HMB) associada ao treinamento de força é capaz de aumentar a força e massa muscular (GALLAGHER et al., 2000; NISSEN et al., 1996; SLATER; JENKINS, 2000).

Os efeitos da suplementação com HMB combinado ao treinamento de *endurance* na síntese proteica ou no trofismo muscular são desconhecidos, pois geralmente estes estudos avaliaram os efeitos da suplementação na capacidade aeróbia (DURKALEC-MICHALSKI; JESZKA, 2016; LAMBOLEY et al., 2007; VUKOVICH, DREIFORT, 2001).

O treinamento físico aeróbio (TFA) aumenta a capacidade aeróbia, função cardiovascular e regulação metabólica (HELLSTEN; NYBERG, 2015; HOPPELER et al., 1985; SANDBAKK; HOLMBERG, 2017; TONKONOGLI et al., 2000). Mais recentemente, os efeitos do TFA sobre o trofismo muscular tem sido investigado (KONOPKA; HARBER, 2014). Um acumulado corpo de evidência demonstra que o TFA induz hipertrofia muscular (HARBER et al., 2009; HARBER et al., 2012; KONOPKA et al., 2010; OZAKI et al., 2015).

Em humanos estudos demonstraram aumento de 7% a 11% da massa muscular em um programa de treinamento físico aeróbio durante 12 semanas (KONOPKA et al., 2010; HARBER et al., 2012), que é comparável ao treinamento de força ao longo do mesmo período de tempo (MITCHELL et al., 2012). Esse aumento da massa muscular tem sido predominantemente observado no músculo quadríceps (desde que a frequência e a intensidade do treinamento são suficientemente altas), de indivíduos submetidos ao treinamento de ciclismo, que apresentavam limitada experiência com exercício e/ou estilo de vida sedentário (HARBER et al., 2009; HARBER et al., 2012; KONOPKA et al., 2010).

A Miostatina é um regulador negativo da massa muscular e a inibição desta proteína é capaz de promover aumento significativo da massa muscular (LEE et al., 2012). Matsakas et al. (2005) demonstraram que o treinamento físico aeróbio por três dias resultou na diminuição de RNAm da miostatina, sugerindo um possível papel da miostatina no remodelamento muscular esquelético. Matsakas et al. (2006), interessante, demonstraram que o RNAm da miostatina estava reduzido no treinamento físico crônico e intenso, mas sem alteração no exercício agudo.

O alvo mecanístico de rapamicina (mTOR) é uma quinase que regula a síntese proteica no treinamento de força, porém de acordo com Philp et al. (2015) o aumento da síntese proteica no exercício aeróbio aparenta não ser engatilhado pelo mTOR. Já outros estudos reportaram ativação do mTOR e aumento da síntese proteica via exercício aeróbio (DI DONATO et al., 2014; EDGETT et al., 2013; MASCHER et al., 2011).

Apenas um estudo em modelo animal avaliou os efeitos da suplementação associado ao treinamento físico aeróbio na síntese proteica e massa muscular de animais. Xia et al. (2016) demonstraram que o treinamento físico aeróbio moderado combinado com 5% de suplementação com leucina foi capaz de aumentar o tamanho do músculo de camundongos idosos via ativação da mTOR, sugerindo a existência de uma resposta sinérgica de alguns suplementos com treinamento físico aeróbio moderado na plasticidade muscular.

No entanto, a maior parte dos estudos investigou os efeitos do treinamento aeróbio no envelhecimento e em populações clínicas, e são necessários mais estudos em organismos jovens e saudáveis em modelo animal. Uma vez que o HMB estimula o aumento da síntese proteica, seria interessante investigar se o HMB potencializaria os efeitos anabólicos quando associado a um treinamento diferente ao de força. Além disso, a maioria dos estudos avaliou a expressão de proteínas musculares em um contexto agudo de exercício, e poucos são os estudos que avaliaram os efeitos de suplementos com treinamento físico crônico.

Assim, a hipótese do estudo é de que a suplementação associada a um treinamento físico mais intenso e com maior frequência maximize as respostas hipertroóficas do músculo. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de HMB associado ao treinamento físico aeróbio

com diferentes intensidades e frequências na massa muscular, trofismo muscular esquelético e nos conteúdos das proteínas miogenina, mTOR, miostatina e TGF- β 1.

3.2 Metodologia

3.2.1 Grupos Experimentais

Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar, com idade de dois meses e aproximadamente 200 gramas adquiridos na Anilab Paulínia/SP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas, não invertido, com ração e água *ad libitum*. Em média foram alocados quatro animais em caixas de polietileno de tamanho médio. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da UNIMEP, sob protocolo n^o1/2015 (Anexo 1). Os ratos foram separados aleatoriamente nos seis grupos (n=6) a seguir: Controle (CT): sem nenhuma intervenção; HMB (H): suplementados com HMB, sem treinamento; T3: suplementados e treinados três vezes na semana; T3C: suplementados e treinados três vezes na semana com carga; T5: suplementados e treinados cinco vezes na semana; T5C: suplementados e treinados cinco vezes na semana com carga.

3.2.2 Tratamento com Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato (HMB)

Os animais foram diariamente suplementados com cálcio-HMB (marca Arnold Nutrition©, composição por porção: Cálcio 500 mg e Fósforo 175 mg) durante 29 dias. A suplementação foi realizada sempre aproximadamente no mesmo horário (tanto para os animais que treinaram assim como para os animais

que não treinaram) para evitar variações fisiológicas e de estresse. Nos dias de treinamento físico, foi administrada uma hora antes da sessão, segundo protocolo estabelecido por Wilson et al. (2009), os quais sugerem uma maior proteção contra dano muscular durante o exercício físico. Foram preparadas doses de 320 mg/kg de HMB em pó, diluídas em 1 ml de água destilada e administrada via orogástrica (gavagem) de acordo com protocolo de Pimentel et al. (2011).

3.2.3 Treinamento físico dos animais

O treinamento físico foi realizado em um aquário de vidro retangular, com um metro de comprimento, 40 cm de largura e 50 cm de altura. Foi utilizado um sistema de aquecimento térmico e de drenagem de água, para a troca da mesma conforme necessário. A temperatura da água foi controlada por meio de um termômetro com a finalidade de manter uma temperatura $30^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e uma profundidade de água de aproximadamente 40 cm. Previamente ao treinamento físico, os animais foram adaptados ao meio líquido; primeiro dia: foram colocados em água rasa durante 30 minutos para familiarização; segundo dia: os animais realizaram 10 minutos de natação; terceiro: os animais realizaram natação durante 20 minutos; quarto: os animais realizaram 20 minutos de natação com ou sem carga dependendo do grupo de intervenção a qual pertenciam; quinto: os animais realizaram 30 minutos de natação com ou sem carga dependendo do grupo de intervenção a qual pertenciam.

A utilização ou não da carga (5% da massa corporal do animal) foi considerada como indicador da intensidade do esforço no treinamento físico dos animais. De acordo com Gobatto et al. (2001) esta intensidade é aonde o lactato estabiliza, ou seja, existe um equilíbrio nas taxas de acúmulo e remoção do

metabólito. A carga era ajustada semanalmente de acordo com alterações na massa corporal. Foi considerada como frequência o número de sessões de exercício físico na semana. Após o período de adaptação os animais realizaram treinamento físico durante uma hora por sessão. Todos os animais realizaram o treinamento físico em conjunto com a suplementação. Os grupos T3 e T3c realizaram 12 sessões de treinamento e os grupos T5 e T5c realizaram 20 sessões de treinamento. Não calculamos a carga total semanal do treinamento físico. Após o treinamento na água, os animais foram secos com toalha e jato de ar quente.

3.2.4 Avaliação da massa corporal

A massa corporal (MC) dos animais foi mensurada semanalmente utilizando uma balança digital calibrada (GEHAKA, BG 1000), para ajuste das cargas com 5% e para avaliar os possíveis efeitos da suplementação e treinamento físico sobre a massa corporal. Para comparação dos grupos e análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva.

3.2.5 Eutanásia dos animais

Ao fim do período experimental, no 31º dia, 24 horas após a última intervenção os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal. Após apresentarem sinais de anestesia geral, o músculo tibial anterior esquerdo foi removido, pesado e dividido em duas partes transversais proporcionais, sendo uma parte destinada à técnica de

microscopia de luz e a outra parte subdividida para imunobloting e glicogênio. O tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e retroperitoneal também foi retirado.

3.2.6 Massa muscular e massa do tecido adiposo

Durante a eutanásia o músculo tibial anterior foi pesado na forma úmida, sendo calculada a massa muscular absoluta e relativa. A massa absoluta era a massa do músculo *per se*, enquanto que a massa relativa dividiu-se a massa do músculo pela massa corporal de cada animal com seu respectivo músculo. A massa do tecido adiposo foi mensurada com uma balança analítica, sendo também calculada a massa absoluta e relativa.

3.2.7 Análises Histológicas

Parte do músculo tibial anterior esquerdo de cada animal foi fixada em suporte de madeira com tracacanth gum, imerso em isopentano à -80° C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -196° C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em tambores de nitrogênio. Para obtenção dos cortes histológicos e confecção das lâminas, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23° C, e seccionados transversalmente com espessura de 8 μ m, utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 – Zeiss).

Os cortes foram fixados em Bouin por 30 minutos, e posteriormente lavados em álcool 70% por 12 horas. No dia seguinte foram lavados em água

corrente por 10 minutos e corados com hematoxilina de Harris e novamente lavados em água corrente por 10 minutos. Em seguida os cortes foram corados com eosina e as lâminas foram lavadas em água destilada. Após a lavagem foi iniciada a desidratação em álcool e a diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan e os cortes utilizados utilizadas para mensuração da área de secção transversa (AST), sendo utilizados aproximadamente 6 cortes aleatórios por lâmina, sendo uma lâmina para cada animal, onde foram analisadas 250 fibras no total para cada lâmina utilizando microscópio óptico com câmera acoplada com objetiva de 20 x e conectada a um computador com software Image Pro-Plus® 6.0 (Media Cybernetics).

3.2.8 Immunoblot

O músculo TA foi homogeneizado em Triton X-100 1%, tris-HCL 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina, com volume variando 600 a 1000 uL, a 4° C usando homogeneizador tipo Polytron PTA20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11.000 rpm a 4° C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford e a leitura por leitor de microplaca Epoch (Biotek). As amostras dos extratos proteicos foram tratadas com tampão Laemlli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotreitól 100 mM e aquecidas banho seco por 5 minutos. Em seguida, 60 µg se proteína

foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida, com porcentagem de 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean), Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA).

A eletrotransferência do gel para membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram lavadas com solução basal (trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e tween) e incubadas com 10µg de anticorpo primário para miogenina (mouse monoclonal, Sigma, M5815), mTOR (rabbit policlonal, Cell Signaling, 2972-S), miostatina (rabbit policlonal, GDF8/MSTN, Bioss Antibodies, bs-1288R), TGF-β1 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039) e GAPDH (mouse monoclonal, Santa Cruz, SC-59540), diluído em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4° C durante a noite. No dia seguinte as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5 µg de anticorpo secundário (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz : sc-2004 ou Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para determinar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce por 5 minutos e, em seguida o sinal fluorescente capturado no equipamento G-box (GeneSys). Os valores foram expressos em unidades arbitrárias, que é o resultado da divisão do conteúdo da proteína estudada pelo conteúdo de GAPDH (proteína de controle interno).

3.2.9 Glicogênio Muscular

Para a determinação do glicogênio do músculo tibial anterior, as amostras foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol conforme método do fenol sulfúrico descrito por Lo, Russeau e Taylor (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

3.2.10 Análise Estatística

A análise dos dados foi feita utilizando-se o software Bioestat versão 5.0. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e comparação entre os grupos avaliados foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) *one way* e pós teste Tukey. Para todos os testes foi considerado valor significativo de $p \leq 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.1 Massa corporal

A massa corporal foi similar entre os grupos estudados, como mostra a Tabela 1, considerando o cálculo da área sob a curva.

Tabela 1. Massa corporal dos animais em gramas (g). Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo.

Semanas	CT	H	T3	T3C	T5	T5C
	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)
1	270,2 \pm 22	278,0 \pm 15	246,3 \pm 28	265,0 \pm 44	270,9 \pm 20	250,9 \pm 21
2	303,1 \pm 23	308,5 \pm 14	267,5 \pm 28	287,6 \pm 44	292,2 \pm 18	269,6 \pm 24
3	311,2 \pm 19	323,2 \pm 13	280,2 \pm 28	299,1 \pm 46	301,7 \pm 17	286,2 \pm 29
4	335,9 \pm 16	340,5 \pm 13	296,2 \pm 27	297,5 \pm 68	321,5 \pm 17	303,3 \pm 32
Área sob a curva	917,4 \pm 58	941,1 \pm 41	819,0 \pm 83	868,1 \pm 139	892,6 \pm 52	832,9 \pm 78

CT: controle; H: suplementado com HMB; T3: suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, $p > 0,05$.

3.3.2 Massa muscular absoluta e relativa do tibial anterior

Não houve diferenças significativas na massa muscular entre os grupos, tanto em termos absolutos (Figura 1) como relativos (Figura 2).

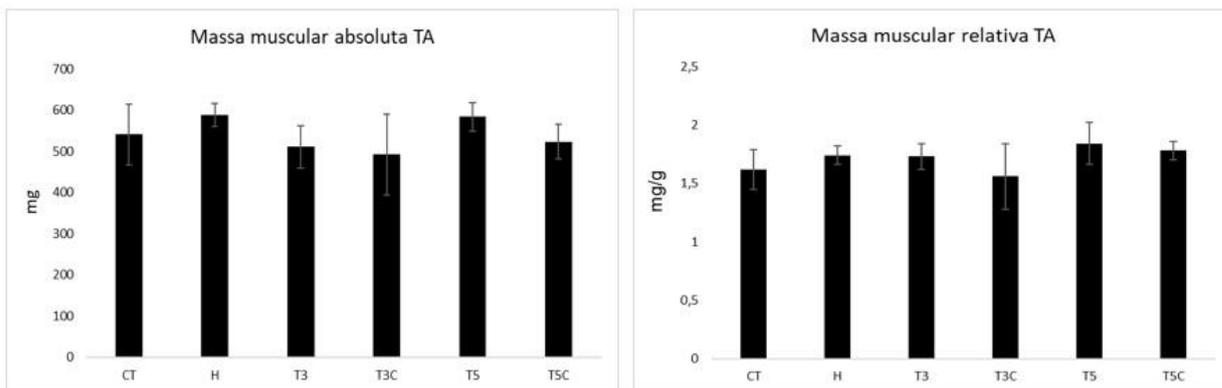


Figura 1. Peso absoluto e relativo do tibial anterior em miligramas (mg) e em miligramas/grama (mg/g). Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, $p > 0,05$.

3.3.3 Massa absoluta e relativa do tecido adiposo.

A quantidade de tecido adiposo nas regiões mesentérica e retroperitoneal foi similar entre os grupos, tanto absoluto como relativo. Para o tecido adiposo epididimal absoluto, foi observada redução significativa dos grupos T3 (46,6%), T3C (48,1%) e T5C (47,8%) quando comparados ao CT ($p < 0,01$; Tabela 2). Para o tecido adiposo epididimal relativo foi observada redução significativa dos grupos T3 (40%), T3C (43,7%) e T5C (41,2%) em comparação ao CT ($p < 0,01$; Tabela 3).

Tabela 2: Massa absoluta e relativa do tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e retroperitoneal em miligramas (mg). Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo.

	EPIDIDIMAL	MESENTÉRICA	RETROPERITONEAL
CT	5.652 \pm 1.782,2	1.315 \pm 272,4	5.742 \pm 1.027,9
H	4.628 \pm 936,1	1.263 \pm 191,8	5.950 \pm 1.086,9
T3	3.013 \pm 1.137,3*	1.137 \pm 274,1	4.750 \pm 1.836,5
T3C	2.932 \pm 992,7*	1.090 \pm 399,2	5.395 \pm 2.821,4
T5	3.711 \pm 821,8	1.012 \pm 148,3	5.307 \pm 879,2
T5C	2.949 \pm 870,7*	1.107 \pm 157,2	4.563 \pm 1502,8

CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$. * difere do controle.

Tabela 3. Massa absoluta e relativa do tecido adiposo das regiões epididimal, mesentérica e retroperitoneal em miligramas (mg)/ grama (g). Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo.

	EPIDIDIMAL	MESENTÉRICA	RETROPERITONEAL
CT	16,66 \pm 4,64	3,90 \pm 0,74	16,94 \pm 2,32
H	13,61 \pm 2,50	3,71 \pm 0,47	17,56 \pm 2,88
T3	9,98 \pm 3,17*	3,79 \pm 0,68	15,64 \pm 5,27
T3C	9,37 \pm 2,44*	3,59 \pm 0,91	17,00 \pm 7,48
T5	11,50 \pm 2,23	3,16 \pm 0,59	16,50 \pm 2,58
T5C	9,78 \pm 1,81*	3,69 \pm 0,35	14,89 \pm 3,68

CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, ($p < 0,05$). * difere do controle.

3.3.4 Área secção transversa (AST) das fibras musculares

Os grupos H (67,9%; $p < 0,01$) e T5C (47,9%; $p < 0,05$) apresentaram AST significativamente maior quando comparados ao grupo CT. Foi observado redução da AST dos grupos T3 (36,2%), T3C (33,6%) e T5 (33,3%) em comparação ao grupo H ($p < 0,05$). O grupo T5C apresentou maior AST (38,1%) quando comparado ao grupo T3 ($p < 0,05$), como demonstrado na figura 3.

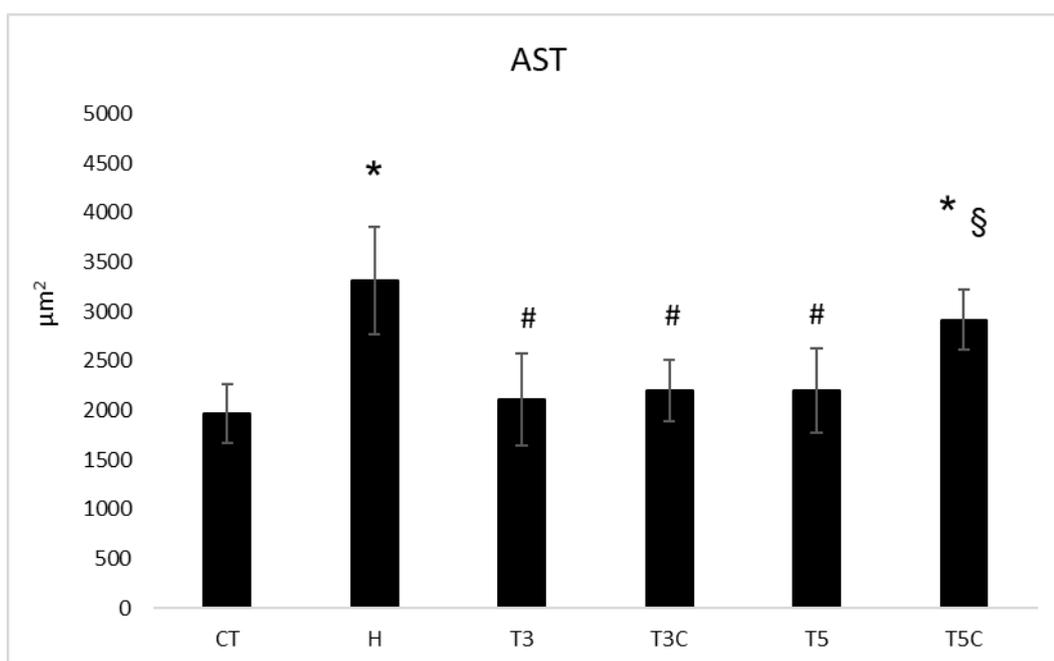


Figura 2. Área de secção transversa (AST) das fibras do músculo tibial anterior (TA) em μm^2 . Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 músculos por grupo. C: controle; H: HMB; T3: HMB treinamento três vezes na semana; T3C: HMB treinamento com carga três vezes na semana; T5: HMB treinamento cinco vezes na semana; T5C: HMB treinamento com carga cinco vezes na semana. Símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes segundo ANOVA one way, $p < 0,05$. * Difere do grupo CT; # difere do grupo H; § difere do grupo T3.

3.3.5 Cortes histológicos TA

Na figura 4 são apresentados cortes histológicos do músculo tibial anterior normal (fibras com núcleos na periferia), com representação da AST. O grupo H apresenta maior AST em comparação aos grupos CT, T3, T3C e T5 e uma AST semelhante ao T5C.

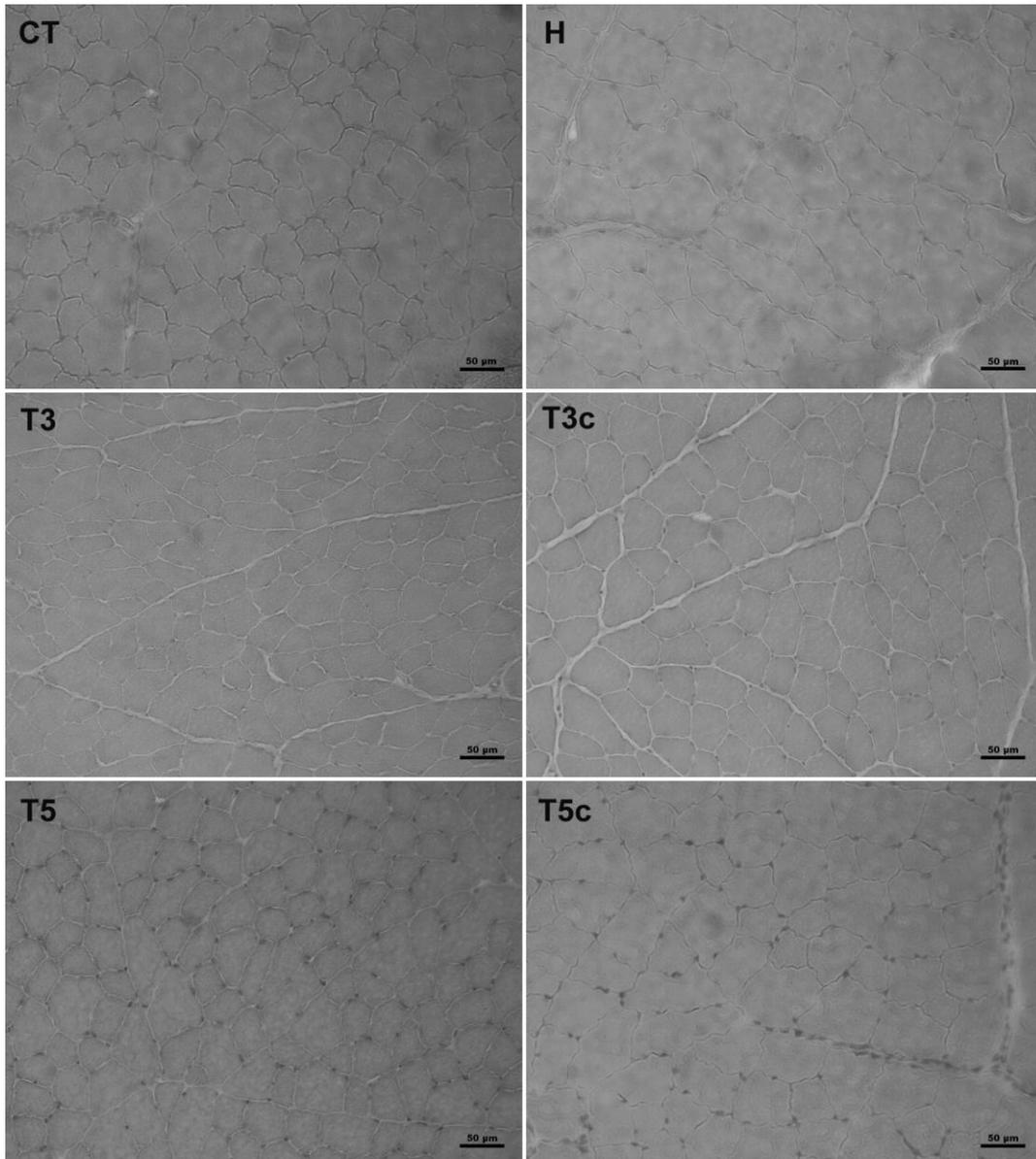


Figura 3. Cortes transversais histológicos corados com HE do músculo tibial anterior. Nota-se os núcleos periféricos e AST de tamanhos diferentes, com ênfase na maior AST no grupo H. Barra 50 µm.

3.3.6 Glicogênio Muscular do TA

Os grupos H (57,1%), T3 (61,9%), T3C (152%), T5 (119%) e T5C (152,3%) apresentaram maior quantidade de glicogênio em comparação ao grupo CT ($p < 0,01$). Os grupos T3C (60,6%), T5 (39,3%) e T5C (60,6%) apresentaram maior quantidade de glicogênio em comparação ao grupo H ($p < 0,01$). Os grupos T3C (55,8%), T5 (35,2%) e T5C (55,8%) apresentaram maior quantidade de glicogênio em comparação ao grupo T3 ($p < 0,01$). O grupo T3C (15,2%) apresentou maior quantidade de glicogênio em comparação ao grupo T5 ($p < 0,05$), como demonstrado na figura 5.

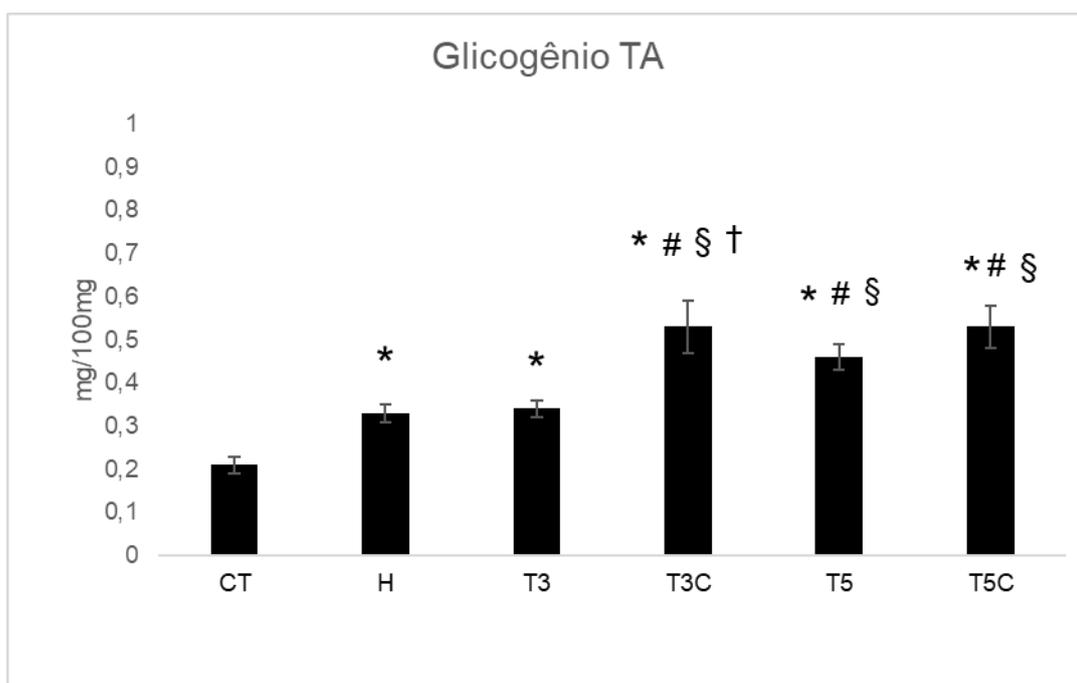


Figura 4. Concentração de glicogênio muscular do músculo TA em miligramas/100 miligramas (mg/100mg). Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 músculos por grupo. CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. Símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes segundo ANOVA one way, $p < 0,05$. * Difere do grupo CT; # difere do grupo H; § difere do grupo T3; † difere do grupo T5.

3.3.7 Conteúdo de Miogenina

O conteúdo de miogenina foi significativamente menor nos grupos T3C, T5 e T5C em comparação a CT ($p < 0,05$). O grupo T5 também apresentou menor conteúdo de miogenina em comparação ao grupo H ($p < 0,05$) (Figura 6). Entre os demais grupos o conteúdo de miogenina foi similar.

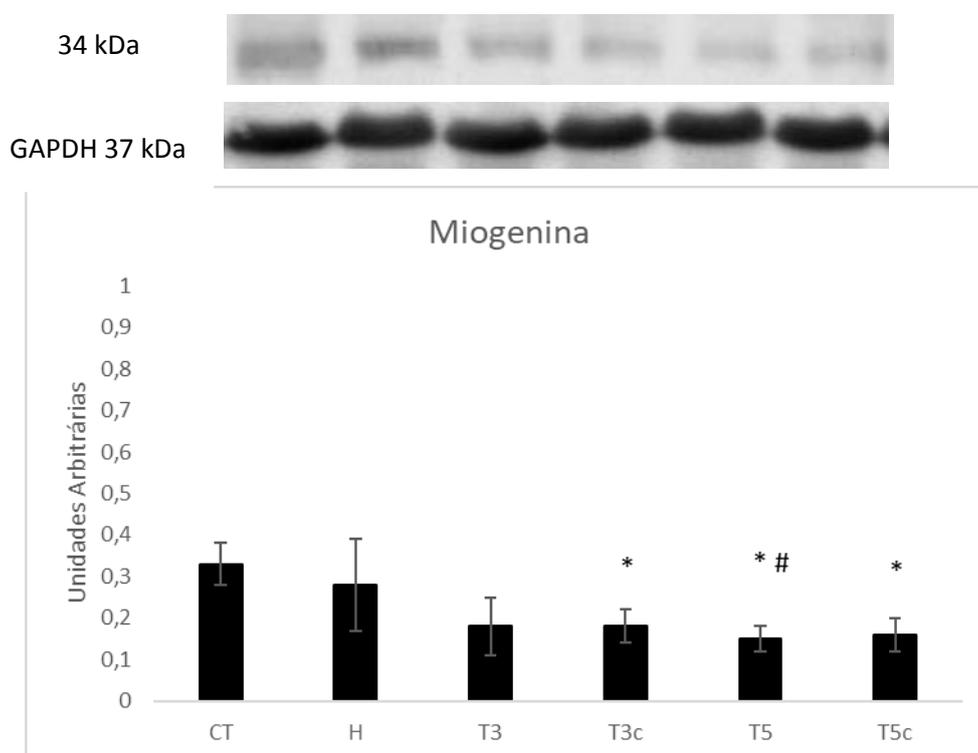


Figura 5. Conteúdo de miogenina, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 músculos por grupo. CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. Símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes segundo ANOVA one way, $p < 0,05$. * Difere do grupo CT; # difere do grupo H.

3.3.8 Conteúdo de Miostatina e TGF- β 1

O grupo T5C apresentou aumento significativo do conteúdo de miostatina quando comparado ao grupo CT ($p < 0,05$; Figura 7). No grupo T5C houve aumento significativo de TGF- β 1 quando comparado ao grupo H ($p < 0,05$), como observado na figura 8.

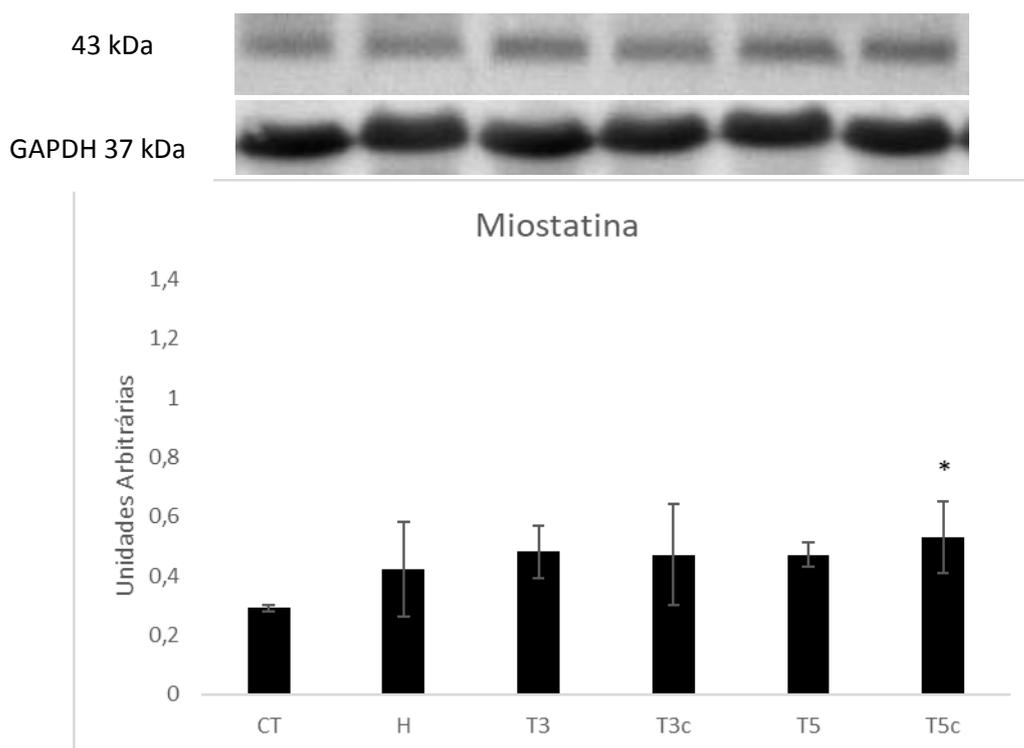


Figura 6. Conteúdo de miostatina, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 músculos por grupo. CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$. * Difere do grupo CT.

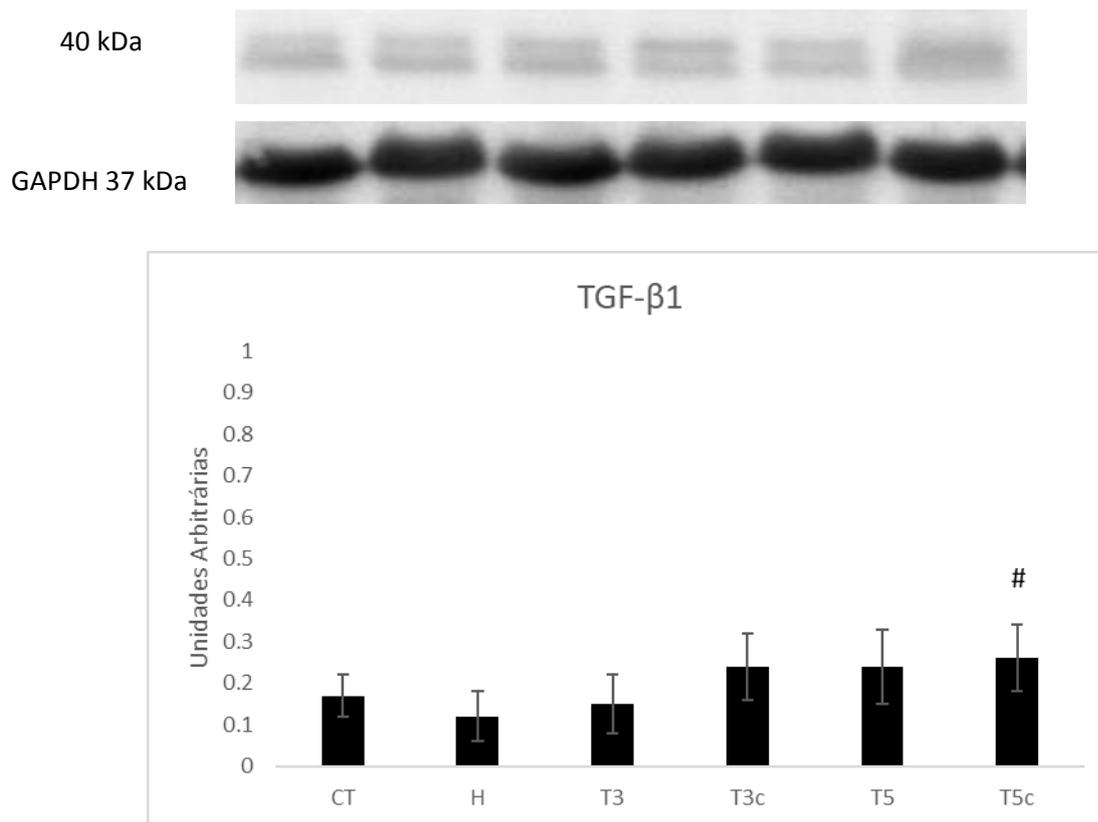


Figura 7. Conteúdo de *TGF-β1*, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 músculos por grupo. CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$. # Difere do grupo H.

3.3.9 Conteúdo de mTOR

O conteúdo de mTOR apresentou aumento significativo nos grupos T3C, T5 e T5C em comparação ao grupo CT ($p < 0,05$; Figura 9).

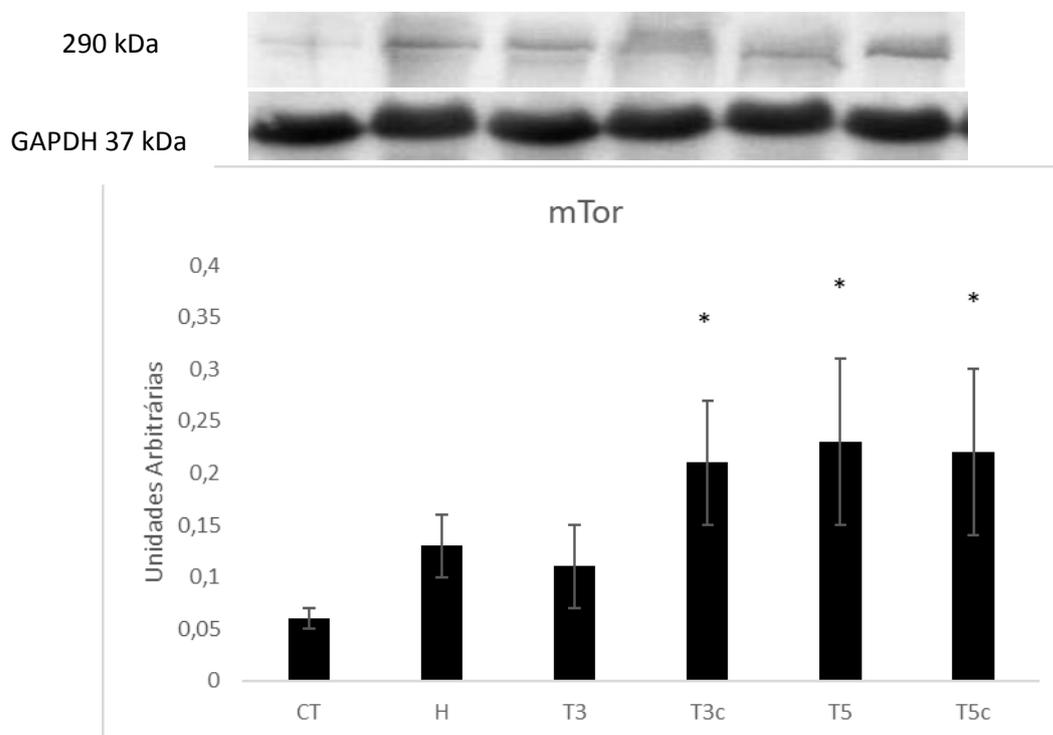


Figura 8. Conteúdo de mTOR, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 músculos por grupo. CT: controle; H: suplementado com HMB; suplementado com HMB e treinamento físico 3 x na semana; T3C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 3 x na semana; T5: suplementado com HMB e treinamento físico 5 x na semana; T5C: suplementado com HMB e treinamento físico com carga 5 x na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$. * Difere do grupo CT.

3.4 Discussão

Diversos trabalhos têm utilizado o método da AST para avaliar o tamanho da fibra muscular, indicando desta forma se ocorreu modulação do trofismo muscular a nível microscópico (EGNER et al., 2016; FRY et al., 2017; MENDIAS et al., 2017; XIA et al., 2016). A suplementação com HMB e o treinamento de maior intensidade e frequência (T5C) induziram significativa hipertrofia quando

comparada ao grupo controle, enquanto que o treinamento de menor intensidade e frequência (T3, T3C e T5) inibiram o processo de hipertrofia causada pela suplementação.

Grande parte dos estudos com animais investigaram os efeitos da suplementação de HMB na atrofia muscular em condições patológicas (envelhecimento, atrofia por desuso, por tratamento com glicocorticóides e câncer) (ALWAY et al. 2013; AVERSA et al., 2011; AVERSA et al., 2012; GIRÓN et al., 2015; HAO et al., 2011; NOH et al., 2014; SMITH et al., 2004; SMITH et al., 2005; WILSON et al., 2012), sendo que estes estudos de fato comprovaram a eficácia do metabólito na prevenção da atrofia muscular. Apesar de o HMB estimular o aumento da síntese proteica (GIRÓN et al., 2016; WILKINSON et al., 2013), os efeitos do HMB na hipertrofia muscular em animais saudáveis e sedentários ou até mesmo quando combinado com o exercício físico são pouco conhecidos.

A forma de cálcio HMB utilizada no estudo, tem uma baixa velocidade de aparecimento na corrente sanguínea, levando aproximadamente 60 a 120 minutos para alcançar o pico de concentração plasmática (FULLER et al., 2011). Um outro estudo demonstrou que o cálcio HMB na dosagem de 3 gramas resultou em um rápido e significativo pico (<60 min) na concentração plasmática de HMB (WILKINSON et al., 2017). O aumento no HMB plasmático foi acompanhado de aumentos na síntese proteica muscular e supressão na degradação proteica muscular (WILKINSON et al., 2017). Além disso, foi observado aumento na fosforilação de componentes da via mTOR (WILKINSON et al., 2017). Tais achados suportam as propriedades anabólicas do HMB de cálcio mesmo com a baixa biodisponibilidade. Desta forma a suplementação foi administrada uma hora

antes do exercício para maximizar os efeitos do HMB durante a prática da mesma.

Além disso, um trabalho investigou os efeitos isolados do HMB (PIMENTEL et al., 2011), pois grande parte das investigações avaliaram os efeitos do HMB concomitante à outras intervenções (ESCALANTE et al., 2016; RITTIG, et al., 2017; RUSS et al., 2015; RUSS et al., 2017), o que poderia confundir os resultados isolados promovidos pelo metabólito. Pimentel et al. (2011) avaliaram o impacto da suplementação de HMB (dose de 320 mg/kg de massa corporal) durante 21 dias na massa muscular esquelética de ratos saudáveis e sedentários. O tratamento com HMB induziu hipertrofia nos músculos extensor digital longo dos dedos (EDL) e sóleo, e aumentou a fosforilação de p70^{S6K1} no EDL.

Foram observadas diferenças significativas na AST das fibras musculares em resposta à suplementação de HMB, indicando alteração celular de hipertrofia. Teixeira et al. (2016) demonstraram que a suplementação com HMB (dose de 76 mg/kg/dia) administrada 30 minutos antes de um treinamento concorrente, durante dois meses, foi capaz de aumentar a dimensão da fibra muscular em ratos, avaliada por técnicas de estereologia.

A suplementação isolada não foi capaz de aumentar o conteúdo de TGF- β 1, no entanto foi observado aumento significativo quando a suplementação foi associada ao treinamento físico com intensidade de 5% da massa corporal e frequência cinco vezes. O TGF- β 1 atua como “freio” da atividade de células satélites, por inibir a atividade de quinases dependentes de ciclinas, reduzindo assim a expressão de MyoD (MCCROSKERY et al., 2003). Este fator de crescimento limita a diferenciação e fusão de células satélites por meio do *downregulation* da expressão de miogenina (MCCROSKERY et al., 2003). Apesar

de a literatura frequentemente descrever o efeito negativo do TGF- β 1 na regeneração muscular, Gumucio et al. (2015) sugere que este efeito tem mais a ver com otimização das ações de células satélites. A proliferação prematura, diferenciação e fusão de células satélites resulta em defeitos na regeneração (MURPHY et al., 2011), desta forma o TGF- β 1 agiria temporalmente para regular a atividade de células satélites para garantir que as fibras musculares tenham terminado de quebrar as proteínas sarcoméricas danificadas no intuito de remodelar a fibra e induzir hipertrofia. Assim, sugere-se que no grupo T5C houve maior estímulo das células satélites, uma vez que o exercício físico de maior intensidade é capaz de ativar tais células (KUROSAKA et al., 2012).

Os estudos sugerem que o HMB é mais efetivo em indivíduos destreinados e treinados que são submetidos a exercícios extenuantes (ALBERT et al., 2015; ROWLAND; THOMPSON, 2009). No entanto, os dados deste estudo apontam para a efetividade do HMB no trofismo muscular mesmo sem o emprego do exercício físico, porém os mecanismos biológicos necessitam ser futuramente elucidados. Diferente de alguns estudos aonde associam alterações do mTOR ou miostatina na hipertrofia (PIMENTEL et al., 2011; MOORE et al., 2017; OISHI et al., 2015), neste estudo não foram observados aumentos de mTOR ou diminuição da miostatina, mesmo com a hipertrofia observada no grupo suplementado.

Especula-se então, por vias das hipóteses, que a fibra muscular possa ter atingido seu nível máximo de hipertrofia perante à suplementação. Por exemplo, o músculo pode ter se adaptado ao estímulo (suplementação) após 30 dias e não mais requer a amplificação pela proteína específica, tornando assim sua expressão inalterada.

Em humanos, a efetividade do treinamento aeróbio na indução da hipertrofia muscular depende da suficiente intensidade de exercício (70-80% da frequência cardíaca de reserva), duração (30-45 minutos) e frequência (4-5 dias semanal) com a finalidade de recrutar ao máximo as fibras musculares (KONOPKA; HARBER, 2014). Por exemplo, em um dos estudos os participantes realizaram 118.000 a 145.000 contrações musculares por membro inferior (HARBER et al., 2009; HARBER et al., 2010). Isto demonstra que uma prolongada atividade contrátil promove um elevado estresse metabólico, resultando em hipertrofia mesmo sem cargas elevadas, durante o treinamento de força (MITCHELL et al., 2012).

No nosso estudo foi utilizado um modelo de natação que mimetiza um treinamento físico aeróbio com o objetivo de investigar se diferentes intensidades e frequências deste exercício exerceriam respostas diferentes no trofismo muscular, e se estes protocolos seriam suficientes para induzir hipertrofia, uma vez que a literatura clássica sugere que somente o treinamento de força induz hipertrofia muscular.

Xia et al. (2016) investigaram o papel da suplementação com leucina e treinamento físico aeróbio nas vias de sinalização do músculo esquelético, no controle do balanço proteico muscular e no remodelamento muscular em camundongos idosos. Foi administrada uma dieta contendo 5% de leucina e o protocolo de treinamento físico consistiu em sessões de natação de 45 minutos diários, seis vezes na semana, durante dois meses. A intensidade do esforço foi fixada em 3% da massa corporal dos animais. A combinação de leucina e treinamento físico promoveu aumento da AST do gastrocnêmio branco em comparação ao controle, e também não foram observadas diferenças dos grupos

exercitados e suplementados isoladamente. Ocorreu aumento da expressão de proteínas envolvidas na síntese proteica como mTOR e seus efetores p70^{S6K1} e 4EB-P1 nos grupos exercitados, suplementados e combinados em relação ao controle. O estudo mostra que o treinamento físico aeróbio de moderada intensidade em conjunto com a suplementação de leucina resulta em hipertrofia muscular.

Corroborando com os dados de Xia et al. (2016), no nosso estudo foi observado aumento da AST no grupo T5C, o grupo no qual realizou exercício em maior intensidade e frequência, além disso, intensidades e frequências menores promoveram resistência à hipertrofia. A elevação do gasto energético pode ter aumentado o processo catabólico (não avaliamos proteínas envolvidas na proteólise ex: MuRF1 e Atrogin-1). Este gasto energético é baseado na observação da diminuição do peso do tecido adiposo aonde foi constatado neste estudo diminuição do tecido adiposo epididimal. Foi utilizada uma intensidade maior (5% da massa corporal) quando comparada ao estudo de Xia et al. (2016) (3% da massa corporal), intensidade esta próxima do limiar anaeróbio. Esta intensidade de 5% foi estabelecida uma vez que os ratos eram mais jovens quando comparado ao estudo de Xia et al. (2016). A duração do treinamento físico no presente estudo também foi menor (28 dias), e mesmo nestas condições o grupo T5C apresentou hipertrofia muscular.

Philp et al. (2015) demonstraram que o exercício de endurance estimula síntese proteica miofibrilar e mitocondrial no músculo esquelético independente de mTOR. Este estudo sugere não existência de uma relação entre hipertrofia e mTOR em resposta ao treinamento aeróbio crônico. No nosso estudo, foi constatado aumento da AST no grupo suplementado associado ao treinamento

físico sem carga com frequência de três vezes, no entanto, sem significativo aumento de mTOR. Por outro lado, os protocolos com maior frequência e maior intensidade promoveram aumento do conteúdo de mTOR quando comparados ao controle, sugerindo maior estresse metabólico. Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (maior estresse metabólico) sinalizam a ativação de mTOR. No entanto entre os grupos exercitados com diferentes intensidades e frequências, não foram observadas diferenças no conteúdo de mTOR. Em homens treinados, o treinamento de força de alta intensidade e alto volume induzem ativação similar de mTOR (GONZALEZ et al., 2015).

Dois estudos demonstraram que os níveis de RNAm de miostatina diminuem enquanto que a quantidade de proteína miostatina não altera com o treinamento físico aeróbio (MATSAKAS et al., 2006; MATSAKAS et al., 2005). O comportamento do conteúdo da miostatina do grupo T5C não era esperado, uma vez que estudos demonstram que o bloqueio e a diminuição da miostatina está relacionada com hipertrofia muscular (LATRES et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2014). No entanto, existe a possibilidade de que este protocolo intenso tenha favorecido a hipertrofia muscular pela ocorrência de microlesões musculares (não foi avaliada), que está relacionada com o aumento de miostatina (LEE et al., 2015; SONG et al., 2012). Também existe a possibilidade de que a hipertrofia muscular neste grupo (T5C) tenha atingido seu limite de adaptação e que a miostatina tenha aumentado no sentido de frear a adaptação hipertrófica.

A suplementação favoreceu o aumento de glicogênio, sendo potencializado quando combinado com exercício físico. Manabe et al. (2013) demonstraram que o glicogênio muscular não alterou após uma semana de treinamento físico, no entanto aumentou significativamente após quatro e sete semanas de treino.

Pinheiro et al. (2012) observaram aumento de conteúdo de glicogênio nas porções branca (aumento de cinco vezes) e vermelha (aumento de duas vezes) do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar machos suplementados com HMB, aumento também encontrado no nosso estudo. Mecanismos que induzem aumento do conteúdo de glicogênio: aumento das concentrações de hormônio do crescimento/fator de crescimento semelhante à insulina (GH/IGF-1), inativação de glicogênio quinase 3 sintase (GSK3) por meio da via fosfatidil-inositol-3-quinase (PI-3K), aumento do conteúdo de citrato, razão ATP/ADP e glicose-6-fosfato (PINHEIRO et al., 2012). O T3 não apresentou um efeito sinérgico do glicogênio perante a suplementação de HMB. Treinamentos com maiores intensidades apresentaram maior sensibilidade do glicogênio.

Algumas evidências apontam para o aumento da miogenina no estabelecimento da hipertrofia muscular (ISHIDO et al., 2004; OISHI et al., 2015). No entanto, neste estudo os resultados referentes à miogenina não apresentaram relação com a hipertrofia muscular. Flynn et al. (2010) demonstraram que camundongos adultos com deleção da miogenina apresentaram melhor desempenho em corrida de esteira tanto em baixa como alta intensidade. Estes animais são capazes de utilizar com maior eficiência o metabolismo oxidativo e glicolítico. É possível que tenha ocorrido incremento do metabolismo muscular nos grupos suplementados e exercitados em comparação ao controle. Os grupos suplementados e treinamento sem carga com frequência de três vezes na semana não apresentaram diminuição da miogenina possivelmente pela baixa intensidade e frequência de esforço e a inatividade no grupo suplementado. Porém, no nosso estudo não avaliamos o desempenho físico dos animais. Assim nas análises de glicogênio muscular todas intervenções foram capazes de

aumentar o conteúdo deste substrato quando comparado ao CT o que pode sugerir uma possível relação com o conteúdo de miogenina.

3.5 Limitações

Neste estudo foram selecionados apenas algumas proteínas envolvidas no remodelamento do músculo esquelético, e atualmente sabe-se que outras proteínas devem estar envolvidas no processo de hipertrofia muscular (ex: fosforilação de proteínas quinases), e ainda outros que provavelmente exercem papéis putativos em um determinado fenótipo. Os resultados encontrados aqui neste estudo refletem um cenário adaptativo muscular destas proteínas e que devem ser exploradas futuramente.

3.6 Conclusão

Os dados do presente estudo demonstraram que a suplementação isolada com HMB foi suficiente em induzir hipertrofia muscular. O treinamento físico aeróbio associado à suplementação também foi capaz de induzir hipertrofia muscular, desde que realizado em uma suficiente intensidade e frequência.

4. SEGUNDO ARTIGO

Suplementação com beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) associada ao treinamento aeróbio de baixa intensidade e frequência favorece a regeneração do músculo esquelético.

4.1 Introdução

O músculo esquelético é um tecido extremamente plástico, com amplo potencial de regeneração após lesão (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; DUMONT et al., 2015; TIDBALL, 2017). O processo de regeneração muscular é um fenômeno biológico complexo caracterizado por cinco fases tempo-dependentes e inter-relacionadas: degeneração, inflamação, regeneração, remodelamento e maturação (MUSARÒ, 2014). A resposta inflamatória e o recrutamento de células tronco musculares (células satélites) são processos importantes da regeneração muscular (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é um dos mediadores chave da inflamação e exerce uma miríade de mecanismos na inflamação e reparo do músculo esquelético (TIDBALL; VILLALTA, 2010).

Após a lesão muscular, populações invasores de neutrófilos e macrófagos expressam TNF- α , sugerindo que esta citocina pode contribuir para o prematuro estágio inflamatório que precede a regeneração muscular (COLLINS; GROUNDS, 2001; ZÁDOR et al., 2001). Após a ativação, as células satélites sofrem uma série de etapas que envolvem a proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos nas

fibras musculares com o intuito de reparar o dano ou constituir uma nova fibra (GROUNDS et al., 2002; HAWKE; GARRY, 2001). Em resposta a estímulos como lesão ou exercício, as células são ativadas e expressam distintos fatores regulatórios miogênicos envolvidos neste processo regenerativo, como MyoD e miogenina (ZANOU; GAILLY, 2013). Enquanto a MyoD está diretamente relacionada com a ativação, proliferação e diferenciação de células satélites, a expressão de miogenina está relacionada com diferenciação terminal (SHI; GARRY, 2006; ZAMMIT, 2008).

Desta forma, diversas estratégias vêm sendo investigadas com o intuito de acelerar/otimizar o processo regenerativo, e assim, favorecer o retorno do paciente ou atleta o mais rápido possível às suas atividades cotidianas (LAUMONIER; MENETREY, 2016).

Nos últimos tempos a comunidade científica tem dado maior atenção às investigações com os efeitos dos suplementos nutricionais sobre a regeneração muscular (CAROTENUTO et al., 2016; CRASSOUS et al., 2009; KRUGER, SMITH, 2012; MYBURGH et al., 2015; PERRY et al., 2016; TIPTON, 2015). Pereira et al. (2014a, 2014b, 2015) em uma sequência de estudos, demonstraram que a suplementação com o aminoácido essencial leucina foi capaz de estimular a regeneração muscular de ratos jovens e idosos após criolesão, e que o aminoácido também foi capaz de acelerar o reparo do tecido conjuntivo de ratos jovens.

O beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) é um metabólito derivado da leucina e possui ação anabólica e anti-catabólica no tecido muscular esquelético (WILSON et al., 2008; WILSON et al., 2013; ZANCHI et al., 2011). Estudos demonstram que o HMB aumenta a síntese proteica pela via molecular do alvo da

rapamicina em mamíferos (mTOR) e inibe o aumento da degradação proteica atenuando a via do sistema ubiquitina-proteassomo (ELEY et al., 2007; PIMENTEL et al., 2011; SMITH et al., 2004; SMITH et al., 2005; WILSON et al., 2012; WILKINSON et al., 2013). Adicionalmente, o HMB tem demonstrado outros seguintes efeitos no músculo esquelético: redução dos microdanos musculares induzidos pelos exercícios físicos (KNITTER et al., 2000; KRAEMER et al., 2015; VAN SOMEREN et al., 2005;); proliferação e ativação de células satélites (ALWAY et al., 2013; SZCZÉSNIAK et al., 2016); e redução do processo inflamatório (HOFFMAN et al., 2016; KRAEMER et al., 2014). Um estudo demonstrou que o HMB influencia positivamente a proliferação e diferenciação, aceleração da fusão e a redução da apoptose em cultura de mioblastos adultos (KORNASIO et al., 2009). Com base nas propriedades e observações descritas nos estudos acima, é plausível sugerir que o HMB exerça importante função na regeneração do músculo esquelético frente à uma lesão.

O exercício físico é sabidamente uma efetiva estratégia na prevenção e tratamento de diversas co-morbidades (BOOTH, HAWLEY, 2015; HAWLEY, 2014), mas seu papel durante a reabilitação muscular pós-lesão é menos conhecido (SHERRY et al., 2015). São evidenciados alguns efeitos positivos do exercício físico aeróbio sobre a regeneração muscular (JOANISSE et al., 2016; KIM et al., 2013; RICHARD-BULTEAU et al., 2008). Por exemplo, Joannis et al. (2016) observaram que o pré-condicionamento com exercício físico em esteira maximizou a regeneração do músculo esquelético de camundongos senis. Richard-Bulteau et al. (2008) submeteram ratos ao aumento de atividade contrátil durante regeneração muscular e verificaram recuperação da massa muscular, sugerindo participação da via mTOR e sustentada ação de células miogênicas.

Kim et al. (2013) também demonstraram que exercício em esteira com baixa intensidade promoveu regeneração muscular após lesão induzida por bipuvacaína no gastrocnêmio, e tal recuperação envolve aumento de HSP70.

Apesar dos efeitos positivos observados da suplementação individual de HMB e treinamento físico na capacidade regenerativa, não foi observado até o momento nenhum estudo que investigou a combinação destes recursos em um modelo *in vivo* de lesão muscular. Poucos estudos investigaram os efeitos de diferentes intensidades e frequências de treinamento aeróbio na regeneração muscular. Por exemplo, Pestana et al. (2011) investigaram os efeitos da natação sobre alterações morfológicas do músculo esquelético em processo de reparo após criolesão. As sessões de exercício foram realizadas 6 vezes na semana com duração de 90 minutos. A natação não causou alterações morfológicas durante o reparo muscular após criolesão. Importante destacar que os autores não utilizaram nenhum suplemento nutricional.

Tal pesquisa é de suma importância, uma vez que os dados do presente estudo poderão fornecer alguma compreensão dos efeitos de suplementos nutricionais e exercício físico na regeneração muscular, contribuindo assim para delinear e testar futuros estudos com humanos. A hipótese do estudo é de que a suplementação com HMB associado a treinamento físico de baixa intensidade e frequência maximize a regeneração muscular.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de HMB associada a diferentes intensidades e frequências do treinamento físico aeróbio na regeneração do músculo esquelético em ratos submetidos à criolesão.

4.2 Metodologia

4.2.1 Grupos Experimentais

Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar, com idade de dois meses e aproximadamente 200 gramas, sob temperatura ambiente de $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas, não invertido, com ração e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela comissão de Ética sobre o Uso de Animais (CEUA) da UNIMEP, sob protocolo n^o1/2015 (Anexo 1).

Em média foram alocados quatro animais em caixas de polietileno de tamanho médio. O músculo tibial anterior direito de todos os animais sofreu criolesão. Os ratos foram separados aleatoriamente em seis grupos (n=6): Controle (CL): animais não receberam nenhum tipo de intervenção; HMB (HL): animais receberam suplementação de HMB; L3: animais suplementados com HMB associado ao treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais suplementados com HMB associado ao treinamento físico três vezes na semana com carga; L5: animais suplementados com HMB associado ao treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais suplementados com HMB associado ao treinamento físico cinco vezes na semana com carga.

4.2.2 Suplementação com Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato (HMB)

Os animais foram diariamente suplementados com cálcio-HMB (marca Arnold Nutrition©, composição por porção: Cálcio 500 mg e Fósforo 175 mg) durante 29 dias. A suplementação foi realizada sempre aproximadamente no mesmo horário para evitar variações fisiológicas e de estresse, sendo administrada uma hora antes do treinamento físico, de acordo com Pimentel et al.

(2011) os quais sugerem maior efeito ergogênico. Foram preparadas doses de 320 mg/kg de HMB em pó, diluídas em 1 ml de água destilada e administrada via orogástrica (gavagem) de acordo com protocolo de Pimentel et al. (2011).

4.2.3 Treinamento físico dos animais

O treinamento físico foi realizado em um aquário de vidro retangular, com um metro de comprimento, 40 cm de largura e 50 cm de altura. Foi utilizado um sistema de aquecimento térmico e de drenagem de água, para a troca da mesma conforme necessário. A temperatura da água foi controlada por meio de um termômetro com a finalidade de manter uma temperatura $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e uma profundidade de água de aproximadamente 40 cm. Previamente ao treinamento físico, os animais foram adaptados ao meio líquido (adaptado de Freitas et al. (2010)) ; primeiro dia: foram colocados em água rasa durante 30 minutos para familiarização; segundo dia: os animais realizaram 10 minutos de natação; terceiro: os animais realizaram natação durante 20 minutos; quarto: os animais realizaram 20 minutos de natação com ou sem carga dependendo do grupo de intervenção a qual pertenciam; quinto: os animais realizaram 30 minutos de natação com ou sem carga dependendo do grupo de intervenção a qual pertenciam.

A utilização ou não da carga (5% da massa corporal do animal) foi considerada como indicador da intensidade do esforço no treinamento físico dos animais. De acordo com Gobatto et al. (2001) esta intensidade é aonde o lactato estabiliza, ou seja, existe um equilíbrio nas taxas de acúmulo e remoção do metabólito. A carga era ajustada semanalmente de acordo com alterações na

massa corporal. Foi considerada como frequência o número de sessões de exercício físico na semana (3 ou 5). Após o período de adaptação os animais realizaram treinamento físico durante 1 hora por sessão. Vale ressaltar que o treinamento físico foi realizado durante 14 dias antes da criolesão, como forma de pré-condicionamento muscular e após 48 horas da criolesão os animais continuaram o treinamento por mais 14 dias completando 28 dias do protocolo. Todos os animais realizaram o treinamento físico em conjunto com a suplementação. Os grupos L3 e L3c realizaram 12 sessões de treinamento e os grupos L5 e L5c realizaram 20 sessões de treinamento. Após o treinamento na água, os animais foram secos com toalha e jato de ar quente.

4.2.4 Procedimento de Lesão Muscular

No 15º dia do protocolo, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2 g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal. Após apresentar sinais de anestesia, a região lesada foi tricotomizada e o músculo tibial anterior (TA) direito exposto. Para a lesão foi utilizada uma barra metálica de 1cm x 0,5cm resfriada em nitrogênio líquido por 30 segundos. A haste metálica resfriada foi pressionada sobre o ventre do músculo tibial anterior direito por 10 segundos; em seguida, foi imersa novamente em nitrogênio líquido por 30 segundos, e pressionada novamente no músculo no mesmo lugar por mais 10 segundos, segundo o protocolo de Miyabara et al. (2006).

Após o procedimento de lesão a fáscia muscular e a pele foram suturadas e os animais foram alocados individualmente em gaiolas com ração e água *ad*

libitum até sua recuperação. Posteriormente foram alocados em gaiolas coletivas com no máximo quatro animais por gaiola.

4.2.5 Desenho Experimental

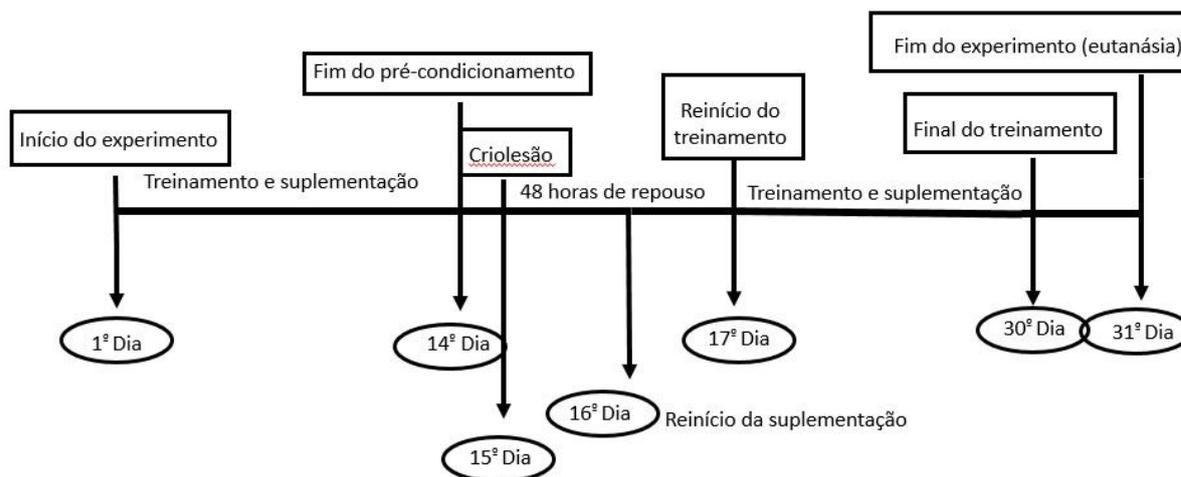


Figura 1. Desenho experimental do estudo. Os animais foram suplementados e treinados 14 dias previamente à lesão de acordo com o grupo pertencente. No 15º dia os animais foram submetidos à criolesão. No 17º dia os ratos tiveram o reinício da suplementação e 48 horas após lesão os ratos continuaram o treinamento físico por mais 14 dias até o final do experimento (eutanásia e 31º dia).

4.2.6 Avaliação da massa corporal

A massa corporal (MC) dos animais foi mensurada semanalmente utilizando uma balança digital calibrada (GEHAKA, BG 1000), para ajuste das cargas com 5% e para avaliar os possíveis efeitos da suplementação e treinamento físico sobre a massa corporal. Para comparação dos grupos e análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva.

4.2.7 Eutanásia dos animais

Ao fim do período experimental (31 dias), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketalar® (50 mg/mL) e Rompun® (2g/100mL), na proporção 1:1, na dose de 0,3 mL/100 g de massa corporal. Após apresentarem sinais de anestesia geral, o músculo TA direito foi removido, pesado e dividido em duas partes transversais proporcionais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz e outra parte para immunobloting.

4.2.8 Massa muscular

Após remoção, o músculo tibial anterior foi pesado em uma balança na forma úmida, sendo calculada a massa muscular absoluta e relativa. O peso absoluto era a massa do músculo, enquanto que o relativo dividiu-se a massa muscular pela massa corporal de cada animal com seu respectivo músculo.

4.2.9 Análises Histológicas

Parte do músculo tibial anterior direito de cada animal foi fixada em suporte de madeira com tracacanth gum, imerso em isopentano à -80° C por 40 segundos e imediatamente colocado em nitrogênio líquido à -196° C. Os músculos foram retirados do nitrogênio e mantidos em Biofreezer à -70° C ou em tambores de nitrogênio. Para obtenção dos cortes histológicos e confecção das lâminas, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até atingirem a temperatura de -23° C, seccionados transversalmente com espessura de 8 µm, utilizando um criostato (modelo HYRAX C 25 – Zeiss). Os cortes foram fixados em

Bouin por 30 minutos, e posteriormente lavados em álcool 70% por 12 horas. No dia seguinte foram lavados em água corrente por 10 minutos e corados com hematoxilina de Harris e novamente lavados em água corrente por 10 minutos. Em seguida os cortes foram corados com eosina e as lâminas foram lavadas em água destilada. Após a lavagem foi iniciada a desidratação em álcool e a diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entellan e os cortes utilizados para mensuração da área de secção transversa (AST) e da densidade da área de tecido conjuntivo (DATC).

Para a mensuração da área de secção transversa (AST), foram utilizadas aproximadamente 12 cortes aleatórios por lâmina, sendo uma lâmina para cada animal, onde foram analisadas 250 fibras no total para cada lâmina utilizando microscópio óptico com câmera acoplada com objetiva de 20 x e conectada a um computador com software Image Pro-Plus® 6.0 (Media Cybernetics).

As áreas de inflamação/regeneração foram caracterizadas por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração, sendo utilizado microscópio óptico com câmera acoplada, com objetiva de 4 x para realização das fotos de todo o corte transversal. Posteriormente as imagens foram montadas no Power Point® e analisadas no programa Image J®, calculando a área total do músculo (corte transversal) e as áreas com infiltrado inflamatório e com fibras em processo inicial de regeneração.

A mensuração da DACT foi realizada por meio de software Image Pro Express com imagens adquiridas por meio de vídeo de câmera (Nikon Express Series), acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400), com objetiva de 20 vezes, onde foram analisadas seis imagens por animal, e sobre as imagens foi sobreposta uma grade contendo 140 intersecções de retas, onde foram

contabilizadas quais estavam sobre o tecido conjuntivo, e posteriormente o resultado foi transformado em porcentagem.

4.2.10 Immunoblot

Os músculos foram homogeneizados em Triton X-100 1%, tris-HCL 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1 mg/ml de aprotinina, com volume variando 600 a 1000 uL, a 4° C usando homogeneizador tipo Polytron PTA20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11.000 rpm a 4° C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford e a leitura por leitor de microplaca Epoch (Biotek). As amostras dos extratos proteicos foram tratadas com tampão Laemlli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotreitól 100 mM e aquecidas banho seco por 5 minutos. Em seguida, 60 µg se proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida, com porcentagem de 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean), Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA).

A eletrotransferência do gel para membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram lavadas com solução basal (trisma base 10 mM, cloreto de sódio 150 mM e tween) e incubadas com 10µg de anticorpo primário para miogenina (mouse monoclonal, Sigma, M5815), mTOR (rabbit policlonal, Cell Signaling, 2972-S), miostatina (rabbit policlonal, GDF8/MSTN, Bioss Antibodies,

bs-1288R), TGF- β 1 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039) e GAPDH (mouse monoclonal, Santa Cruz, SC-59540), diluído em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4° C durante a noite. No dia seguinte as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10 mL de solução basal contendo 3% de leite desnatado e 2,5 μ g de anticorpo secundário (Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz : sc-2004 ou Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para determinar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescente, Pierce por 5 minutos e, em seguida o sinal fluorescente capturado no equipamento G-box (GeneSys). Os valores foram expressos em unidades arbitrárias, que é o resultado da divisão do conteúdo da proteína estudada pelo conteúdo de GAPDH (proteína de controle interno).

4.2.11 Análise estatística

A análise dos dados foi feita utilizando-se o software Bioestat versão 5.0. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e comparação entre os grupos avaliados foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) *one way* e pós teste Tukey. Para todos os testes foi considerado valor significativo de $p \leq 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Massa corporal

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, considerando o cálculo da área sob a curva (Tabela 1).

Tabela 1. Massa corporal dos animais expressos em gramas ao longo de experimento. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo.

Semanas	CL (g)	HL (g)	L3 (g)	L3C (g)	L5 (g)	L5C (g)
1	270,2 \pm 22	278,0 \pm 15	246,3 \pm 28	265,0 \pm 44	270,9 \pm 20	250,9 \pm 21
2	303,1 \pm 23	308,5 \pm 14	267,5 \pm 28	287,6 \pm 44	292,2 \pm 18	269,6 \pm 24
3	311,2 \pm 19	323,2 \pm 13	280,2 \pm 28	299,1 \pm 46	301,7 \pm 17	286,2 \pm 29
4	335,9 \pm 16	340,5 \pm 13	296,2 \pm 27	297,5 \pm 68	321,5 \pm 17	303,3 \pm 32
Área sob a curva	917,4 \pm 58	941,1 \pm 41	819,0 \pm 83	868,1 \pm 139	892,6 \pm 52	832,9 \pm 78

CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. ANOVA one way ($p > 0,05$).

4.3.2 Massa muscular absoluta e relativa do tibial anterior

Não foram encontradas diferenças significativas na massa muscular entre os grupos, tanto em termos absolutos como relativos (Figura 2 e 3).

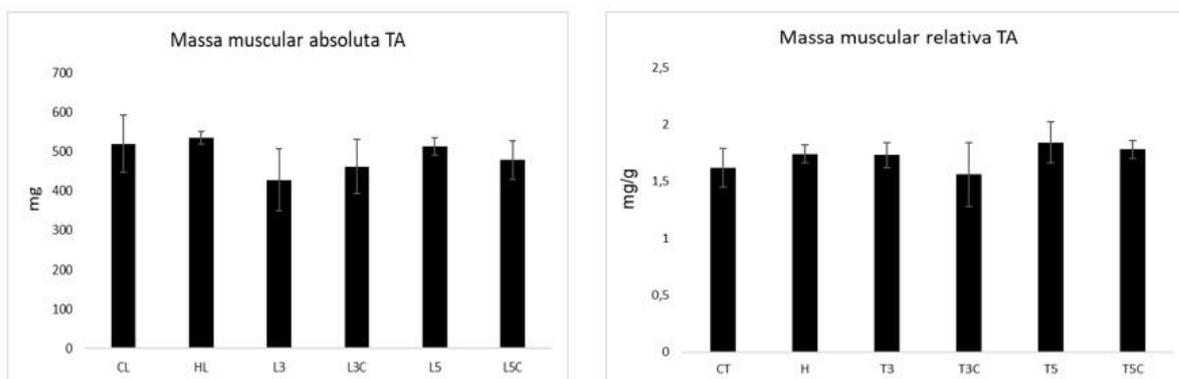


Figura 2. Massa absoluta e relativa do músculo TA expresso em miligramas (mg) e em mg/g respectivamente. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. ANOVA one way ($p > 0,05$).

4.3.3 Área secção transversa (AST) das fibras musculares em regeneração

A AST apresentou aumento significativo nos grupos HL (79,9%), L3 (87,2%), L3C (49,1%), L5 (49,5%), L5C (61,1%) quando comparados ao grupo CL ($p < 0,01$). Os grupos L3C (20,3%) e L5 (20 %) apresentaram redução da AST em comparação ao L3 ($p < 0,05$), como observado na figura 4.

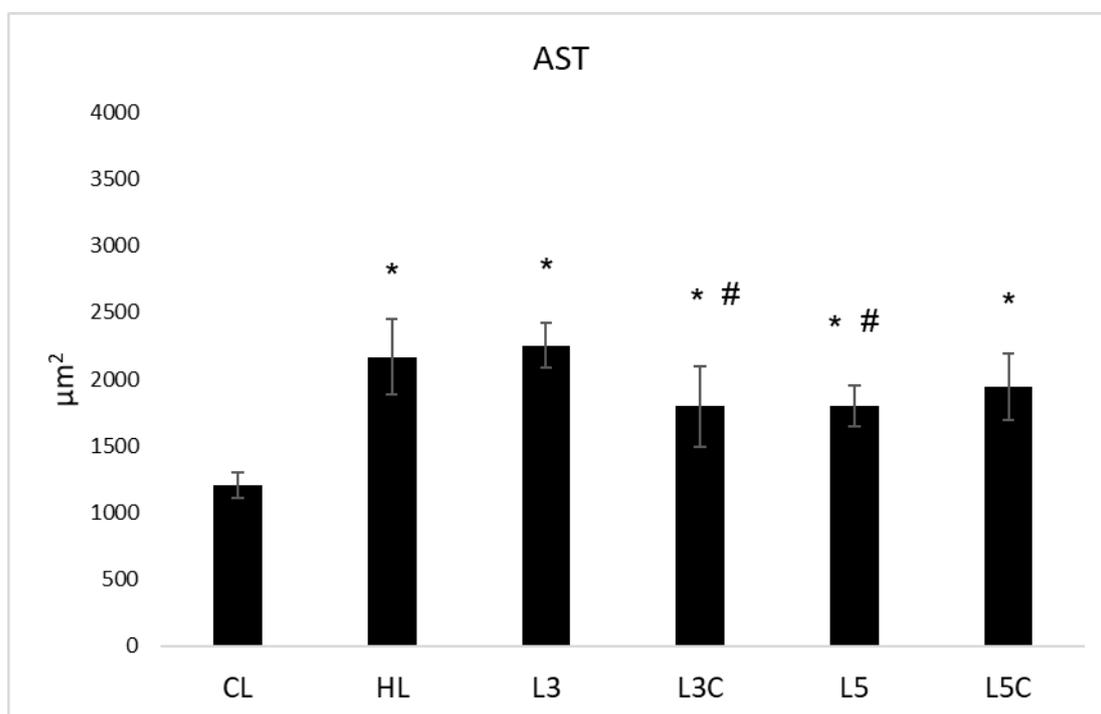


Figura 4. Área de secção transversa (AST) das fibras em regeneração do músculo tibial anterior (TA) em μm^2 . Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. Símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes segundo ANOVA one way, $p < 0,05$. * Difere do grupo CL; # difere do grupo L3.

4.3.4 Cortes histológicos do TA lesionado

A figura 5 apresenta os cortes histológicos do músculo tibial anterior lesionado. Nos grupos L5C e CL observa-se grande infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo. Os cortes demonstram imagens com núcleos centralizados em processo de regeneração. É possível notar uma maior AST das fibras em regeneração no grupo L3 em comparação aos grupos CL e L3C e L5.

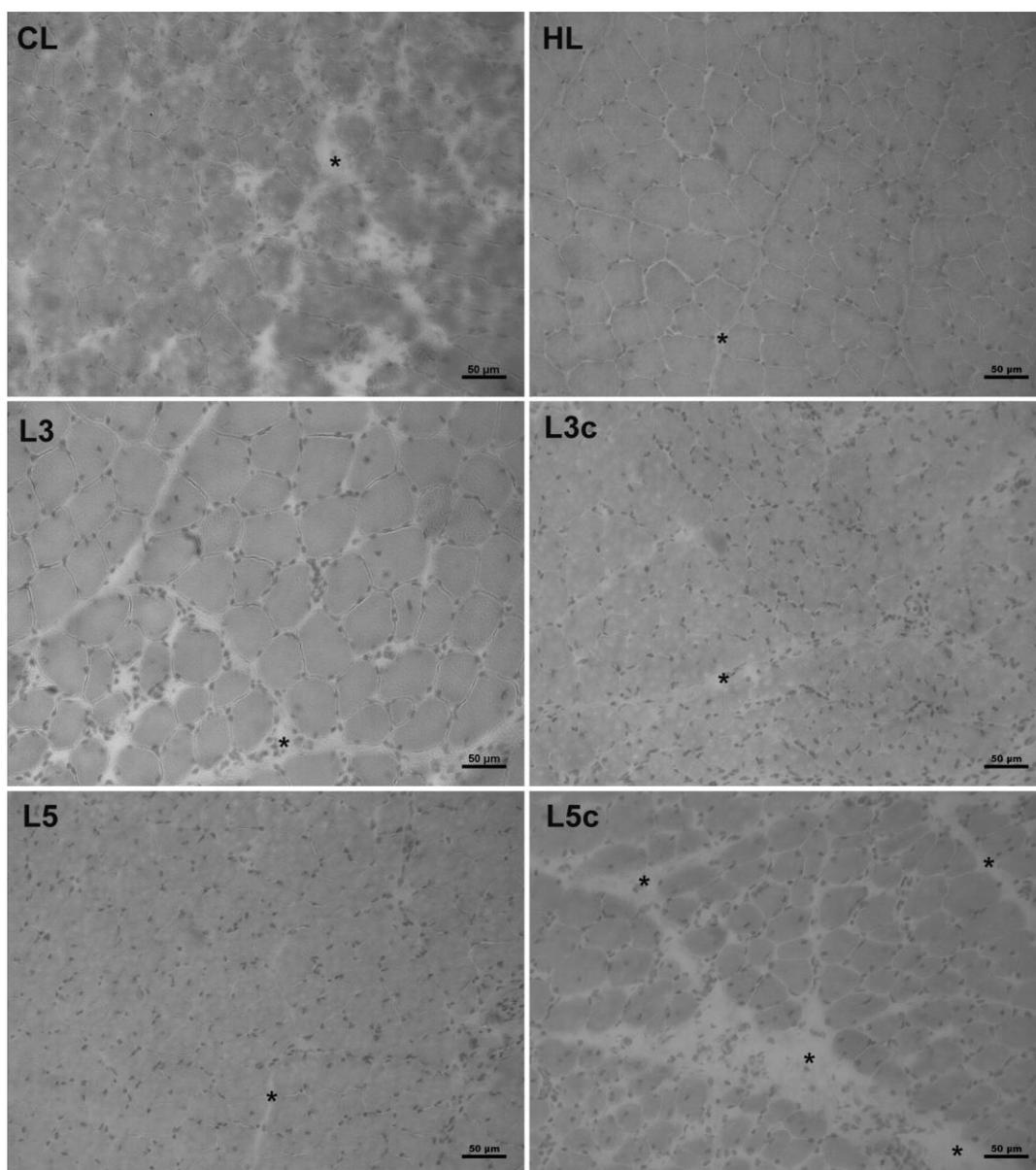


Figura 5. Cortes transversais histológicos corados com HE do músculo tibial anterior lesionado. Notar o infiltrado inflamatório e aumento do tecido conjuntivo no L5C e CL. Aumento da AST nas fibras com núcleo centralizado no L3. * infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo. Barra 50 µm.

4.3.5 Densidade de Área do Tecido Conjuntivo (DATC)

O grupo L3 demonstrou redução da DATC (48,1%) em comparação ao grupo CL ($p < 0,05$). L3 e L3C demonstraram menor DATC (58,5% e $p < 0,01$ e 39,5% respectivamente ($p < 0,05$) em comparação a L5C (Figura 6).

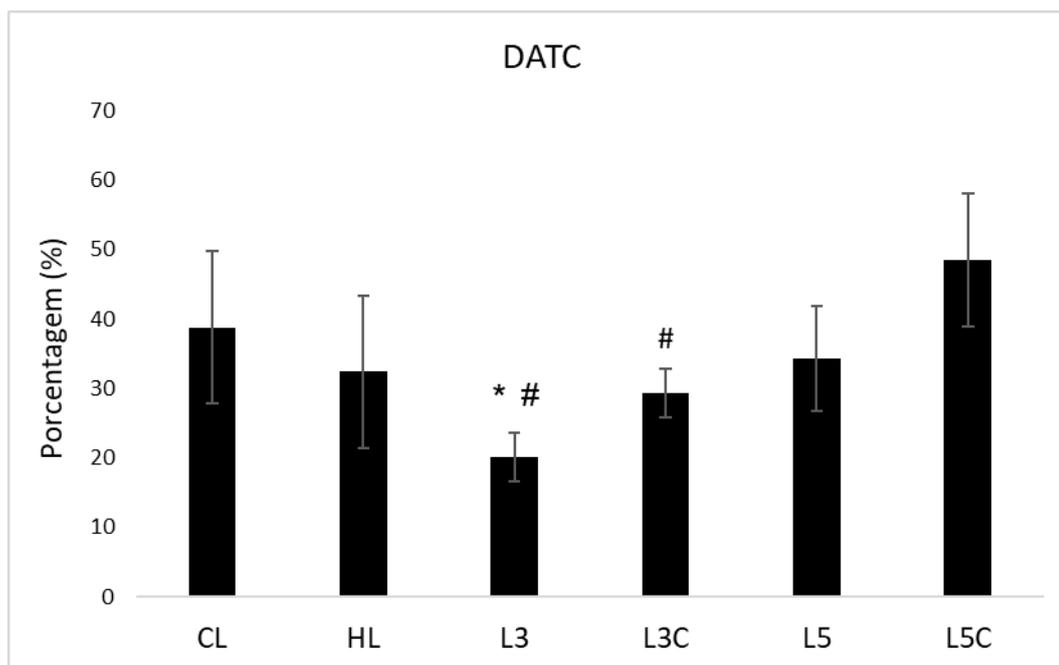


Figura 6. Densidade da área de tecido conjuntivo do músculo TA em porcentagem (%). Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. Símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes segundo ANOVA one way, $p < 0,05$. * difere do grupo CL; # diferem do grupo L5C.

4.3.6 Conteúdo de miogenina

Todos os grupos suplementados mostram redução significativa no conteúdo de miogenina quando comparado ao grupo CL ($p < 0,05$), como observado na figura 7.

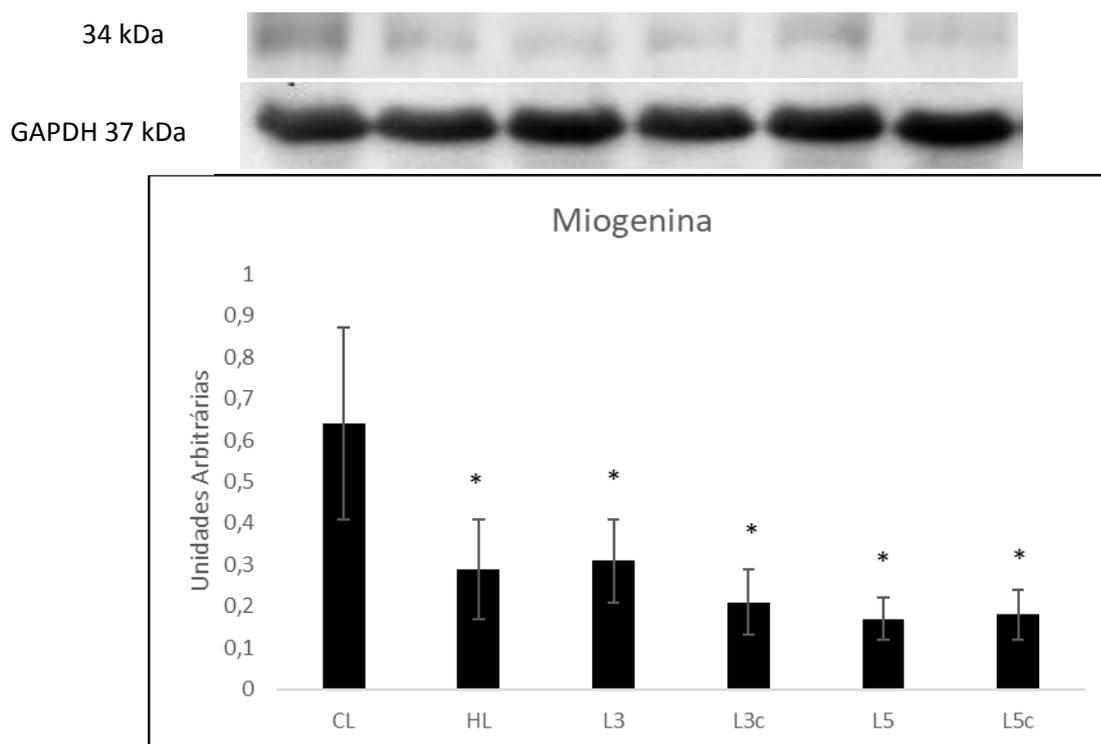


Figura 7. Conteúdo de miogenina, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$.

* Difere do grupo CL.

4.3.7 Conteúdo de miostatina

Em relação ao conteúdo da miostatina, observou-se redução significativa no grupo L5 quando comparado ao L3 ($p < 0,05$), como observado na figura 8.

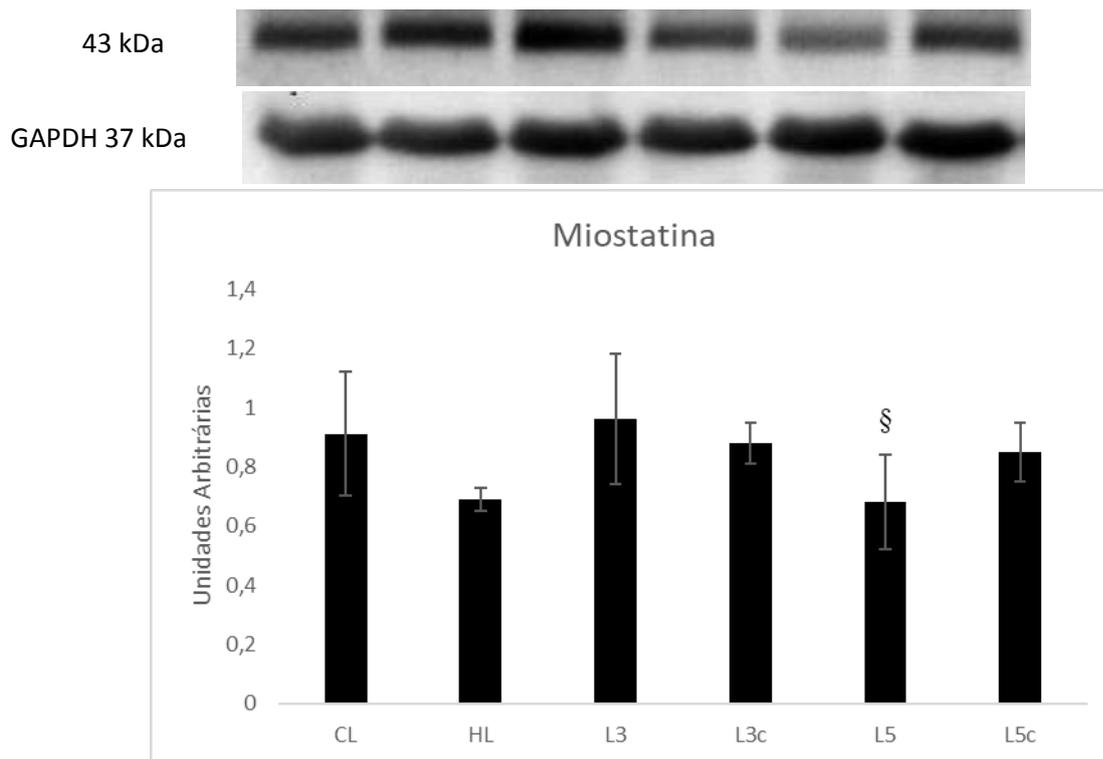


Figura 8. Conteúdo de miostatina, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$.

§ Difere do grupo L3.

4.3.8 Conteúdo de mTOR

Na análise da mTOR foi observado aumento significativo do grupo L5 em comparação aos grupos CL e L3 ($p < 0,05$), como observado na figura 9.

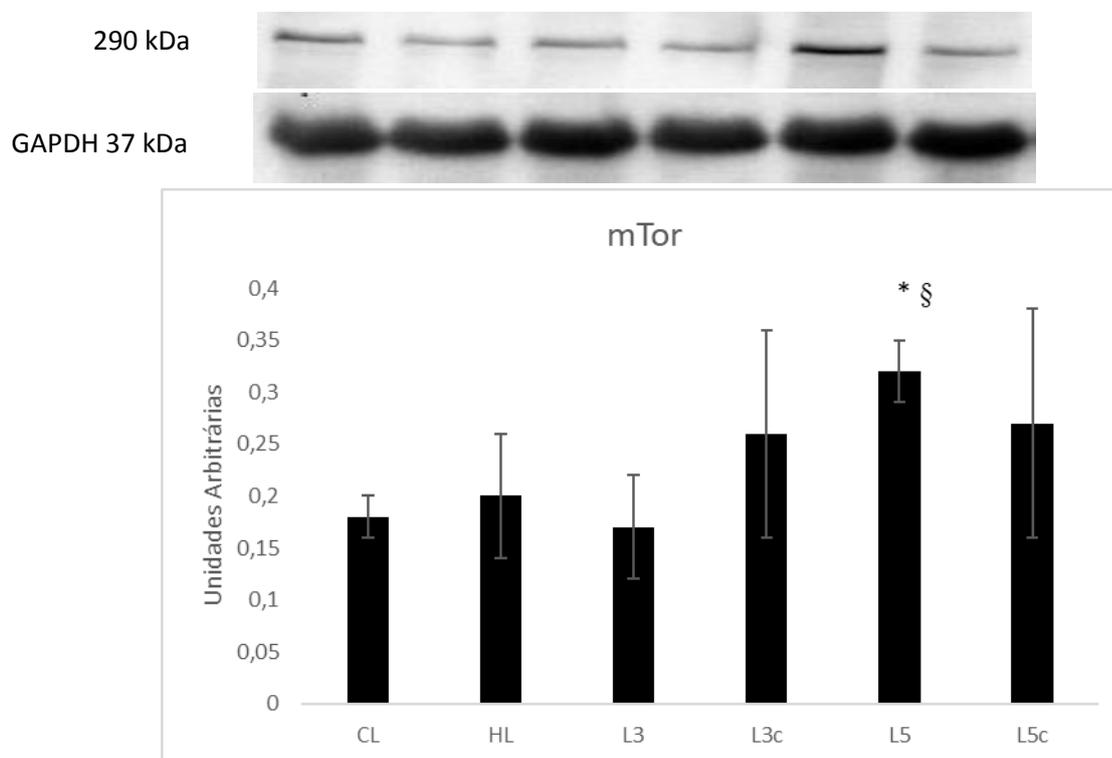


Figura 9. Conteúdo de mTOR, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. Símbolos diferentes indicam valores significativamente diferentes segundo ANOVA one way, $p < 0,05$. * difere do grupo CL. § difere do grupo L3.

4.3.9 Conteúdo de TGF- β 1

Em relação do conteúdo do TGF-B1 foi observado redução significativa dos grupos HL e L3 em comparação ao grupo CL ($p < 0,05$), como observado na figura 10.

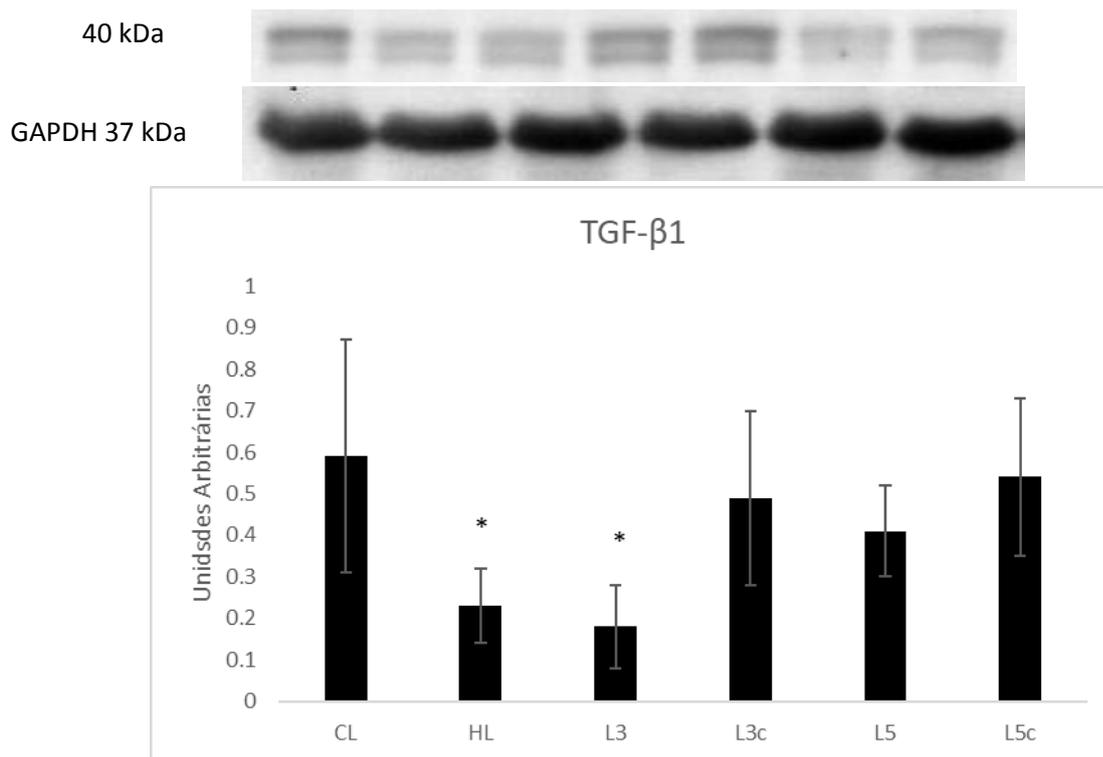


Figura 10. Conteúdo de TGF- β 1, em unidades arbitrárias. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média de 6 animais por grupo. CL: controle lesão; H: HMB lesão; L3: animais submetidos à criolesão e suplementação com HMB e treinamento físico três vezes na semana; L3C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga três vezes na semana; L5: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico cinco vezes na semana; L5C: animais submetidos à criolesão e suplementados com HMB e treinamento físico com carga cinco vezes na semana. ANOVA one way, $p < 0,05$.

* difere do grupo CL.

4.4 Discussão

Este estudo foi o primeiro a investigar os efeitos da suplementação com HMB associado ao treinamento físico aeróbio na regeneração muscular de ratos jovens e saudáveis após criolesão. Optou-se por avaliar os efeitos das intervenções 16 dias após a lesão, pois acreditamos que nesta fase o músculo ainda estaria em processo de regeneração. A regeneração muscular completa do TA tem sido reportada 21 dias após a lesão (LEE et al., 2013; JOHNSTON et al., 2011).

Alguns estudos sugerem que a hipertrofia muscular é um indicador celular de regeneração muscular (JOANISSE et al., 2016; ZANOU; GAILLY, 2013; PEREIRA et al., 2015; PERTILLE et al., 2016). No presente estudo foi avaliada a AST em processo de regeneração. Fibras musculares em processo de regeneração são caracterizadas por apresentar núcleos na região central da fibra muscular (FOLKER, BAYLIES, 2013).

No presente estudo todas as intervenções induziram hipertrofia muscular, sugerindo aumento da síntese proteica. O mTOR é um governador central na regulação da síntese de proteínas (GOODMAN, 2014). No entanto, não foi encontrado aumento de mTOR no grupo suplementado, mesmo com a maior AST deste grupo quando comparado ao controle. Diversos estudos demonstraram aumento de mTOR com a suplementação de HMB (WILKINSON et al., 2013; PIMENTEL et al., 2011; ELEY et al., 2007). A adaptação muscular causada pela suplementação pode ter estabilizado os níveis de mTOR. Outros componentes da via como a fosforilação de p70^{S6K1} e 4EB-P1 parecem ser mais sensíveis à suplementação (PIMENTEL et al., 2011; ELEY et al., 2007).

Com a finalidade do músculo aumentar seu tamanho, células tronco musculares (células satélites) são recrutadas e ativadas para se proliferarem e diferenciarem, reparando a miofibra ou formando outra após lesão (BAZGIR et al., 2017; SNIJDERS et al., 2015). Alguns estudos destacam a importância e a necessidade das células satélites para o processo de hipertrofia do músculo esquelético (BLAAUW; REGGIANI, 2014; EGNER et al., 2016; KIRBY et al., 2016; FRY et al., 2014).

Apesar de o papel das células satélites no remodelamento muscular ser contraditório, tais células são essenciais para a regeneração muscular, uma vez que células satélites depletadas de roedores são capazes de hipertrofiar na mesma extensão que os animais do tipo-selvagem. No entanto neste modelo, a habilidade do músculo esquelético em regenerar após lesão se apresenta comprometida (MCCARTHY et al., 2011; SAMBAVISAN et al., 2011). Apesar de não terem sido avaliadas a proliferação e diferenciação de células satélites com métodos de marcação e de imagem no nosso estudo, já foi demonstrado que o HMB é capaz de ativar e induzir proliferação de células satélites musculares (ALWAY et al., 2013; SZCZESNIAK et al., 2016).

A miogenina regula o desenvolvimento do músculo esquelético durante os estágios embrionário e fetal (MOLKETIN, OLSON, 1996). Camundongos para *knock-out* da miogenina exibe letalidade perinatal causada por perturbação severa de diferenciação de mioblasto e falha na formação de miofibras normais (HASTY et al., 1993). Ao contrário do papel na vida pré-natal, a função da miogenina durante a vida adulta é menos compreendida. Tem sido demonstrado que a miogenina possui associação com diferenciação e fusão terminal de células precursoras miogênicas para fibras novas ou existentes (KARALAKI et al., 2009).

Já, Meadows et al. (2008) demonstraram que imediatamente após nascimento, a ausência de miogenina não teve impacto substancial na morfologia ou no crescimento do músculo esquelético, ilustrando desta forma que a miogenina possui diferentes funções durante vida embrionária *versus* adulta.

Após desnervação, a miogenina induz atrofia muscular por meio da ativação da expressão de atrogenes (MuRF1 e Atrogina-1), responsáveis pela proteólise muscular. Camundongos com deleção de miogenina possuem resistência na ativação das E3 ubiquitinas ligases (MuRF1 e Atrogin-1) após desnervação e são resistentes à atrofia neurogênica. O grupo CL exibiu maior conteúdo de miogenina provavelmente pela hipotrofia muscular em comparação às outras intervenções. Todas as intervenções com a suplementação de HMB e treinamento físico induziram maior AST em comparação ao grupo controle.

Durante o curso de regeneração muscular o exercício físico *per se* é capaz de estimular aumento da AST de fibras musculares intactas/em regeneração e a extensão da regeneração (RICHARD-BULTEAU et al., 2008; JOANISSE et al., 2016). Richard-Bulteau et al. (2008) submeteram ratos a injeção de notexina e os ratos foram divididos em dois grupos: sedentários ou exercitados. O grupo exercitado realizou corrida na esteira e atividades voluntárias (roda de atividade). Os músculos em processo de regeneração e intactos foram removidos 5, 7, 14, 21, 28 e 42 dias após a lesão. Em 21 dias, o exercício físico foi capaz de recuperar a massa muscular e a AST. Além disso, os marcadores de proliferação e diferenciação (MyoD e Miogenina) estavam aumentados no grupo exercitado. A via Akt-mTOR e a fosforilação de seus efetores 4E-BP1 e p70^{S6K1} também estavam aumentados nos momentos 7-14 dias durante o curso de regeneração. Os resultados deste estudo indicam que o aumento da atividade contrátil

muscular *per se* promove a recuperação completa da massa em músculos lesionados. No presente estudo, houve aumento da AST em todos os grupos de treinamento físico e suplementação, durante o processo regenerativo. O maior aumento da AST ocorreu no grupo L3, onde a intensidade e a frequência do treinamento físico eram baixos.

Evidência demonstra que o exercício físico acelera o processo de regeneração muscular mesmo independente do aumento da AST e da dimensão da fibra muscular (JOANISSE et al., 2016; SMITH et al., 2001). Tais diferenças na AST podem ser decorrentes dos diferentes métodos e protocolos experimentais utilizados, como o tipo de lesão provocada, o tipo de treinamento físico, o momento de análise da regeneração e a linhagem dos animais. No nosso estudo os ratos foram suplementados duas semanas previamente à lesão muscular e o protocolo manteve-se por mais duas semanas, totalizando 30 dias. Sugere-se que os efeitos do HMB são notados a partir de duas semanas após um programa de treinamento físico e após período de um mês (WILSON et al., 2012). Esta duração pode explicar a efetividade do HMB concomitante ao exercício físico nos resultados do nosso estudo. É sabido que a mobilização inicial de exercício pós-lesão é mais efetiva do que a prorrogação da mobilização terapêutica (GREGORY et al., 1995), assim, no presente estudo optou-se por iniciar o treinamento físico 48 horas após a lesão.

Tem sido observado aumento no conteúdo de células satélites após treinamento de *endurance* em jovens roedores (KUROSAWA et al., 2009; KUROSAWA et al., 2012), sugerindo ser este um dos mecanismos responsáveis para a adaptação hipertrófica do músculo esquelético durante a regeneração muscular. De fato, algumas evidências recentes demonstraram aumento da

massa muscular mesmo com o treinamento físico aeróbio (XIA et al., 2016). Corroborando os dados deste trabalho, Contreras-Munoz et al. (2017) demonstraram que o treinamento físico aeróbio (duração e intensidade progressiva) em esteira por 14 dias promoveu aumento da AST em um modelo de lesão muscular. Previamente à lesão, os ratos também foram pré-condicionados na esteira, um desenho experimental semelhante ao do presente estudo.

Por outro lado, exercícios muito intensos podem promover degradação proteica (DOHM et al., 1987), miopatias (UCHIKAWA et al., 2008) e maior predisposição de lesões musculares (BECK et al., 2015), e este processo torna-se exacerbado em músculos lesionados. No entanto, alguns pesquisadores propõem que o HMB é particularmente efetivo em indivíduos destreinados que são submetidos ao exercício extenuante e em indivíduos treinados que são expostos a períodos intensos de estresse físico (ALBERT et al., 2015; PASIAKOS, CARBONE, 2014; ROWLANDS, THOMSON, 2009). Uchikawa et al. (2008) investigaram os efeitos da intensidade do treinamento na histopatologia muscular de ratos com miopatia por esteróide. O exercício intenso promoveu hipotrofia muscular neste modelo animal. Já o papel do volume ou frequência do treinamento físico na regeneração muscular é menos estabelecido.

Estudos demonstraram que o aumento da via mTOR (proteína quinase envolvida na síntese proteica) está associada à hipertrofia muscular (OGASAWARA et al., 2016; XIA et al., 2016; KAZIOR et al., 2016; BODINE et al., 2001). Neste estudo não foi possível obter uma relação entre mTOR e hipertrofia muscular, uma vez que a AST no grupo L3 estava maior que L5, no entanto o mTOR estava maior no L5. Além do trofismo muscular, alguns estudos

demonstram que o mTOR está envolvido na regeneração muscular (ZHANG et al., 2015; MIYABARA et al., 2010).

Como a AST nas fibras em regeneração reflete um estado regenerativo, no presente estudo não foi possível estabelecer uma relação entre maior regeneração (sugere-se que o grupo L3 tenha apresentado maior regeneração) e o conteúdo de mTOR. A rapamicina (inibidora parcial do mTOR) tem demonstrado previamente reduzir fibrose em múltiplos tecidos incluindo o músculo (HILLEL; GELBARD, 2015). Foi observado no grupo L3 menor conteúdo de mTOR, e simultaneamente menor fibrose e conteúdo de TGF- β 1, indicando uma possível interação entre tais fatores. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar o papel do mTOR na fibrose.

Conjunto de evidência demonstra que a supressão da miostatina aumenta a capacidade regenerativa do músculo esquelético, por meio da ativação de células satélites e inibição da fibrose (OHNO et al., 2016; WAGNER et al., 2005; MCCROSKERY et al., 2003). Além disso, diversos estudos demonstram que a inibição da miostatina promove aumento da massa muscular (LATRES et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2014). O treinamento com frequência cinco vezes na semana induziu aumento de miostatina quando comparado ao treinamento físico três vezes na semana, ambos sem carga. Foi observado maior AST no grupo L3 em comparação ao grupo L5, sugerindo a hipótese de que seria encontrado menor conteúdo de miostatina no grupo L3 em comparação a L5, o que não foi constatado. No entanto, Matsakas et al. (2010) demonstraram que camundongos com “falta” da miostatina apresentaram maior hipotrofia muscular em resposta ao exercício de natação. Por outro lado, a deleção da miostatina, aumenta a capacidade oxidativa (MATSAKAS et al., 2010). Como o grupo L5 realizou maior

volume de treinamento do que o grupo L3, existe a possibilidade de que o grupo L5 tenha atingido uma melhor capacidade oxidativa muscular. No entanto, estes parâmetros metabólicos não foram mensurados. Desta forma, a miostatina possui um papel diferenciado em resposta ao treinamento aeróbio, quando se compara estudos com treinamento de força.

O remodelamento do tecido conjuntivo é um importante passo no processo de regeneração muscular (LAUMONIER; MENETREY, 2016). Na fase inicial, a resposta fibrogênica é benéfica, estabilizando o tecido e agindo como andaime para a regeneração de miofibras. No entanto, um excesso de colágeno pós lesão resulta em um aumento na cicatrização tecidual ao longo do tempo, prejudicando a função muscular (MANN et al., 2011).

No presente estudo o HMB não foi capaz de minimizar significativamente o acúmulo de fibrose causada pela criolesão. Pereira et al. (2014) demonstraram que a leucina, um aminoácido precursor do HMB reduziu marcadores (colágeno, T β R-I, SMAD2/3) de fibrose e densidade de área de fibrose em ratos jovens 10 dias após criolesão. Apesar de não ter havido diferenças significativas, houve uma tendência à diminuição de fibrose no grupo suplementado com HMB, sugerindo que um maior tempo de intervenção pudesse minimizar os níveis de fibrose perante a suplementação.

Adicionalmente, observou-se redução do conteúdo de TGF- β 1 do grupo HL. No músculo esquelético, TGF- β 1 é reconhecido como um dos mais potentes fatores fibrogênicos, regulando o desenvolvimento da fibrose, uma vez que controla a síntese de matriz extracelular, remodelamento e degradação (DELANEY et al., 2017). Durante o reparo muscular, o TGF- β 1 é capaz de ativar a expressão de genes que codificam proteínas da matriz extracelular, como

fibronectina e colágeno (DELANEY et al., 2017). A inibição de TGF- β 1 utilizando anticorpos de neutralização contra TGF- β 1 e T β RI causa otimização significativa na regeneração muscular acompanhada de redução no desenvolvimento da fibrose (ZIMOWSKA et al., 2009).

O exercício físico minimiza o desenvolvimento de tecido conjuntivo dos músculos em regeneração (HWANG et al., 2006; RICHARD-BULTEAU et al., 2008). No presente estudo, o grupo L3 apresentou a menor DATC dentre os grupos. Adicionalmente, foi encontrado menor conteúdo TGF- β 1 no grupo L3. A menor intensidade e frequência do treinamento físico provavelmente reduziu a fibrose, uma vez que o L5C apresentou fibrose elevada, semelhante ao CL.

Diferentemente do que a literatura sugere, que a mobilização deve ser realizada três a sete dias após lesão (BAOGE et al., 2012), no presente estudo iniciou-se a mobilização via exercício físico no meio aquático 48 horas após a lesão. Contreras et al. (2017) observaram redução da expressão e deposição de colágeno I, indicando menor nível de fibrose em animais exercitados durante 14 dias previamente à lesão, e 14 dias pós lesão quando comparados aos animais controle. O treinamento físico aeróbio consistiu em um protocolo em esteira de intensidade e duração progressiva diária. São necessários mais estudos com exercício físico e fibrose durante o processo de regeneração muscular.

4.5 Limitações

O nível de expressão proteica depende não somente da transcrição, mas também de mecanismos de controle pós-transcricionais e pós-traducionais (CZARKOWSKA-PACZEK et al., 2009). Por exemplo, no presente estudo utilizou as proteínas totais, a utilização de anticorpos de proteínas fosforiladas poderiam

trazer resultados mais completos. No presente estudo o desempenho físico (por exemplo, força) dos animais também não foi avaliado, o que poderia trazer informações importantes de recuperação da massa muscular durante o período de remodelamento muscular. Os animais realizaram o treinamento físico baseado na intensidade do limiar anaeróbio proposto pela literatura (5% da massa corporal), sendo assim, não realizamos testes para avaliar a intensidade da carga individual dos animais de fato. Por fim, foi utilizado um modelo de regeneração que necessitaria de analisar as proteínas em diferentes tempos de coletas (curso temporal). Adicionalmente, futuros estudos com outras formas de lesão, treinamento físico, dosagem e análises moleculares são necessários.

4.6 Aplicação prática

É sabido que a ocorrência de lesões na prática esportiva é algo comum. No entanto, existem poucas informações de cunho científico visando a reabilitação muscular, ainda mais se tratando de novos recursos terapêuticos incluindo suplementos nutricionais e exercício físico. A partir deste estudo sugere-se a aplicação de um treinamento físico aeróbio leve (baixa intensidade e frequência) associado à suplementação com HMB para maximizar a regeneração muscular. No mundo real após uma lesão um indivíduo realizaria uma caminhada rápida três vezes na semana ou atividade em cicloergômetro sem carga em conjunto com a suplementação de HMB.

4.7 Conclusão

Os dados deste estudo demonstram que a suplementação com HMB pode auxiliar na regeneração muscular. Além disso, destaca-se os benefícios da reabilitação muscular com treinamento físico e suplementação durante a regeneração muscular, no entanto protocolos intensos e com elevada frequência não diminuem a fibrose. O treinamento físico de baixa intensidade e frequência associada à suplementação com HMB se mostrou como o protocolo mais efetivo para maximizar o processo de regeneração muscular neste modelo de lesão em ratos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados em geral demonstraram que existem diferenças dos efeitos do treinamento físico entre as condições normais e de lesão no músculo esquelético. Enquanto que na condição normal o treinamento físico de maior intensidade e frequência promove hipertrofia, na condição de lesão aumenta a fibrose. Já o treinamento físico de baixa intensidade e frequência induz hipertrofia muscular na condição de lesão e na condição normal inibe a hipertrofia muscular.

A adaptação muscular perante a cronicidade do treinamento pode ter causado as respostas apresentadas no conteúdo de proteíans, além de que a natureza do treinamento físico aeróbio (ao contrário do que é observado nos exercícios de força) pode ter contribuído para tais achados.

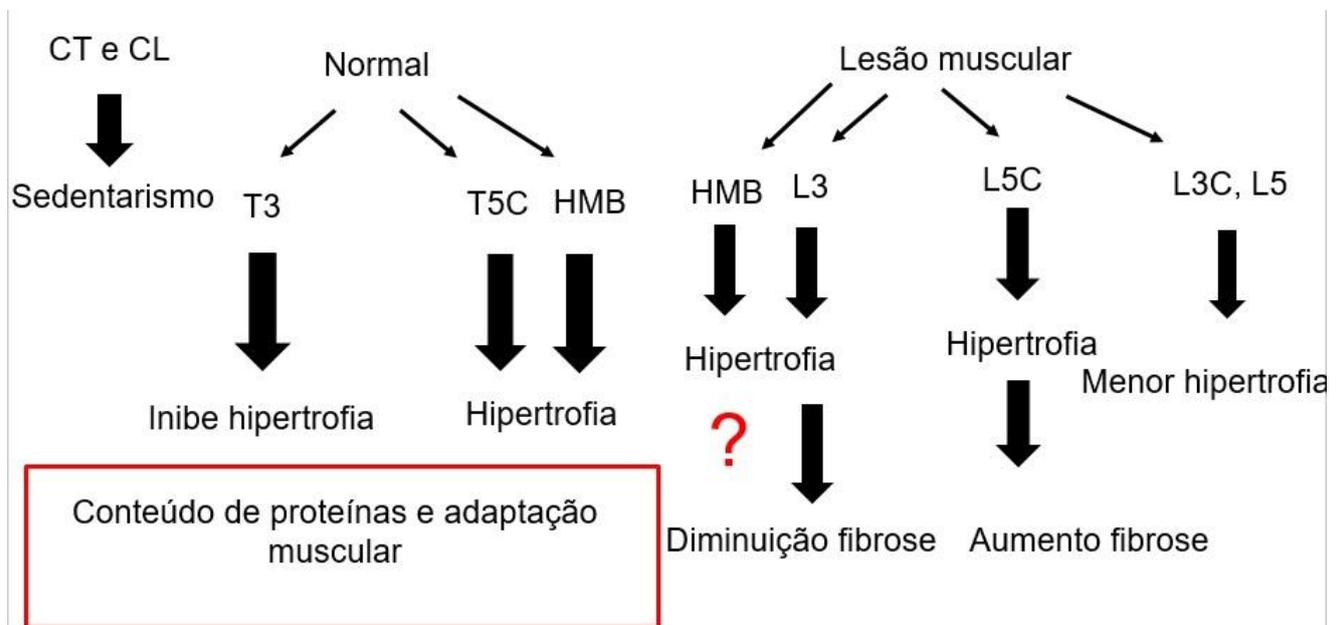


Figura 11. Esquema geral sintetizado dos resultados do trabalho.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G.R.; BAMMAN, M.M. Characterization and regulation of mechanical loading-induced compensatory muscle hypertrophy. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 4, p. 2829-2870, 2012.

AGARWAL, S.; CHOLOK, D.; LODER, S.; LI, J.; BREULER, C.; CHUNG, M.T.; SUNG, H.H. et al. mTOR inhibition and BMP signaling act synergistically to reduce muscle fibrosis and improve myofiber regeneration. **Journal of Clinical Investigation Insight**, v. 1, n. 20, p. e89805, 2016.

AGUIAR, A.F.; AGUIAR, D.H.; FELISBERTO, A.D.; CARANI, F.R.; MILANEZI, R.C.; PADOVANI, C.R.; DAL-PAI-SILVA, M. Effect of creatine supplementation during resistance training on myosin heavy chain (MHC) expression in rat skeletal muscle fibers. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 24, n. 1, p. 88-96, 2010.

AGUILANI, R.; D'ANTONA, G.; BAIARDI, P.; GAMBINO, A.; LADAROLA, P.; VIGLIO, S, *et al.* Essential amino acids and exercise tolerance in elderly muscle-depleted subjects with chronic diseases: a rehabilitation without rehabilitation? **Biomedicine Research International**, v. 2014:341603.

ALBDELMAGID, BARR, A.E.; RICO, M.; AMIN, M.; LITVIN, J.; POPOFF, S.N.; SAFADI, F.F.; BARBE, M.F. Performance of repetitive tasks induces decreased grip strength and increased fibrogenic proteins in skeletal muscle: role of force and inflammation. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e38359, 2012.

ALBERT, F.J.; MORENTE-SÁNCHEZ, J.; ORTEGA, F.B.; CASTILLO, M.J.; GUTIÉRREZ, Á. Usefulness of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) supplementation in different sports: na update and practical implications. **Nutrición Hospitalaria**, v. v. 32, p. 20-33, 2015.

ALWAY, S.E.; PEREIRA, S.L.; EDENS, N.K.; HAO, Y.; BENNETT, B.T. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) enhances the proliferation of satellite cells in fast muscles of aged rats during recovery from disuse atrophy. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 9, p. 973-984, 2013.

AVERSA, Z.; BONETTO, A.; COSTELLI, P.; MINERO, V.G.; PENNA, F.; BACCINO, F.M.; LUCIA, S.; ROSSI FANELLI, F.; MUSCARITOLI, M. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental

câncer cachexia. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 3, p. 713-720, 2011.

AVERSA, Z.; ALAMDARI, N.; CASTILLERO, E.; MUSCARITOLI, M.; ROSSI FANELLI, F.; HASSELGREN, P.O. β -Hydroxy- β -methylbutyrate prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 423, n. 4, p. 739-743, 2012.

BAAR, K.; ESSER, K.A. Phosphorylation of p70(S6K) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 1, p. C120-C127, 1999.

BAZGIR, B.; FATHI, R.; REZAZADEH VALOJERDI, M.; MOZDZIAK, P.; ASGARI, A. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. **Cell Journal**, v. 4, p. 473-484, 2017.

BEAUMONT, R.E.; JAMES, L.J. Effect of moderate caffeine dose on endurance cycle performance and thermoregulation during prolonged exercise in the heat. **Journal of Science and Medicine in Sports**, v. 17, p. 30358-4, 2017.

BECK, W.R.; BOTEZELLI, J.D.; PAULI, J.R.; ROPELLE, E.R.; GOBATTO, C.A. Melatonin has an ergogenic effect but does not prevent inflammation and damage in exhaustive exercise. **Scientific Reports**, v. 5, 18065, 2015.

BIANCO, A.; MAMMINA, C.; PAOLI, A.; BELLAFIORE, A.; BATTAGLIA, G.; CARAMAZZA, G, *et al.* Protein supplementation in strength and conditioning adepts: knowledge, dietary behavior and practice in Palermo, Italy. **Journal of the International Society for Sports Nutrition**, v. 8, n. 9, p. 25, 2011.

BODINE, SC.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W.O.; STOVER, G.L.; BAUERLEIN, R, *et al.* Akt/mTOR pathway is crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.

BOOTH, F.W.; HAWLEY, J.A. The erosion of physical activity in western societies: an economic death march. **Diabetologia**, v. 58, n. 8, p. 1730-1734, 2015.

CAROTENUTO, F.; COSTA, A.; ALBERTINI, M.C. *et al.* Dietary flaxseed mitigates impaired skeletal muscle regeneration: in vivo, in vitro and in silico studies. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 206-219, 2016.

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHOLEWA, J.M.; DARDEVET, D.; LIMA-SOARES, F.; DE ARAÚJO PÊSSOA, K.; OLIVEIRA, P.H.; DOS SANTOS PINHO, J.R, *et al.* Dietary proteins and amino acids in the control of the muscle mass during immobilization and aging: role of the MPS response. **Amino Acids**, v. 49, n. 5, p. 811-820, 2017.

CHURCHWARD-VENNE, T.A.; BURD, N.A.; MITCHELL, C.J.; WEST, D.W.; PHILP, A.; MARCOTTE, G.R.; BAKER, S.K.; BAAR, K.; PHILLIPS, S.M. Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 11, p. 2751-2765, 2012.

CLARK, R.H.; FELEKE, G.; DIN, M.; YASMIN, T.; SINGH, G.; KHAN, F.A, *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. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 133-139, 2000.

CLARK, I.A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 335-343, 2007.

CLOSE, G.L.; HAMILTON, D.L.; PHILP, A.; BURKE, L.M.; MORTON, J.P. New strategies in sport nutrition to increase exercise performance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 144-158, 2016.

COLLINS, R.A.; GROUNDS, M.D. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha (-/-) and TNF-alpha (-/-)/LT -alpha(-/-) mice. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 989-1001, 2001.

CONTRERAS-MUNOZ, P.; TORRELLA, J.R.; SERRES, X.; RIZO-ROCA, D.; DE LA VARGA, M.; VISCOR, G.; MARTÍNEZ-IBÁÑEZ, V.; PEIRÓ, J.L.; JARVINEN, T.H.; RODAS, G.; MAROTTA, M. Postinjury exercise and platelet-rich plasma therapies improve skeletal muscle healing in rats but are not synergistic when combined. **American Journal of Sports Medicine**, 2017.

CORBU, A.; SCARAMOZZA, A.; BADIALI-DEGIORGI, TARANTINI, L.; PAPA, V.; RINALDI, R. Satellite cell characterization from aging human muscle. **Neurological Research**, v. 32, n. 1, p. 63-72, 2010.

CRASSOUS, B.; RICHARD-BULTEAU, H.; DELDICQUE, L. et al. Lack of effects of creatine on the regeneration of soleus muscle after injury in rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 9, p. 1761-1769, 2009.

CRIBB, P.J.; WILLIAMS, A.D.; STATHIS, C.G.; CAREY, M.F.; HAYES, A. Effects of whey isolate, creatine, and resistance training on muscle hypertrophy. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n.2, p. 298-307, 2007.

CZARKOWSKA-PACZEK, B.; ZENDZIAN-PIOTROWSKA, M.; BATLOMIEJCZYK, I.; PRZYBYLSKI, I.; GORSKI, J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 157-162, 2009.

DAMAS, F.; PHILLIPS, S.M.; LIBARDI, C.A.; FECHIN, F.C.; LIXANDRÃO, M.E.; JANNIG, P.R.; COSTA, L.A.; BACURAU, A.V.; SNIJDERS, T.; PARISE, G.; TRICOLI, V.; HOSCHEL, H.; UGRINOWITSCH, C. Resistance training-induced changes in integrated myofibrillar protein synthesis are related to hypertrophy only after attenuation of muscle damage. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 18, p. 5209-5222, 2016.

DE BRANDT, J.P. Leucine and mammalian target of rapamycin-dependent activation of muscle protein synthesis in aging. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 12, p. 2616S-2624S, 2016.

DELANEY, K.; KASPRZYCKA, P.; CIEMERYCH, M.A.; ZIMOWSKA, M. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biology International**, v. 2017.

DI DONATO, D.M.; WEST, D.W.; CHURCHWARD-VENNE, T.A.; BREEN, L.; BAKER, S.K.; PHILLIPS, S.M. Influence of aerobic exercise intensity on myofibrillar and mitochondrial protein synthesis in young men during early and late postexercise recovery. **American Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 306, p. E1025-E1032, 2014.

DOHM, G.L.; TAPSCOTT, E.B.; KASPEREK, G.J. Protein degradation during endurance exercise and recovery. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 19, n. 5, p. S166-S171, 1987.

DUFRESNE, S.S.; FRENETTE, J.; DUMONT, N.A. Inflammation and muscle regeneration. A double-edged sword. **Médecine Sciences**, v. 32, n. 6-7, p. 591-597, 2016.

DUMONT, N.A.; BENTZINGER, C.F.; SINCENNES, M.C.; RUDNICKI, M.A. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1027-1059, 2015.

DURKALEC-MICHALSKI, K.; JESZKA, J. The effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate on aerobic capacity and body composition in trained athletes. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 30, n. 9, p. 2617-2626, 2016.

EDGEETT, B.A.; FORTNER, M.L.; BONEN, A.; GURD, B.J. Mammalian target of rapamycin pathway is up-regulated by both acute endurance exercise and chronic muscle contraction in rat skeletal muscle. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 38, p. 862-869, 2013.

EGNER, I.M.; BRUUSGAARD, J.C.; GUNDERSEN, K. Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. **Development**, v. 143, n. 16, p. 2898-2906, 2016.

ELEY, H.L.; RUSSELL, S.T.; BAXTER, J.H. et al. 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 and Metabolism**, v. 293, n. 4, p. E923-E931, 2007.

ESCALANTE, G.; ALENCAR, M.; HADDOCK, B.; HARVEY, P. The effects of phosphatidic acid supplementation on strength, body composition, muscular endurance, power, agility, and vertical jump in resistance trained men. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12:24., 2016.

FARUP, J.; RAHBK, S.K.; KNUDSEN, I.S.; DE PAOLI, F.; MACKEY, A.L.; VISSING, K. Whey protein supplementation accelerates satellite cell proliferation during recovery from eccentric exercise. **Amino Acids**, v. 46, n. 11, p. 2503-2516, 2014.

FARUP, J.; RAHBK, S.K.; RIIS, S.; VENDELBO, M.H.; PAOLI, F.D.; VISSING, K. Influence of exercise contraction mode and protein supplementation on human skeletal muscle satellite cell content and muscle fiber growth. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 8, p. 898-909, 2014.

FIGUEIREDO, V.C.; MARKWORTH, J.F.; CAMERON-SMITH, D. Considerations on mTOR regulation at serine 2448: implications for muscle metabolism studies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2017.

FLYNN, J.M.; MEADOWS, E.; FIOROTTO, M.; KLEIN, W.H. Myogenin regulates exercise capacity and skeletal muscle metabolism in the adult mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13535, 2010.

FOLKER, E.S.; BAYLIES, M.K. Nuclear positioning in muscle development and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 363, 2013.

FREITAS, J.S.; CARNEIRO-JUNIOR, M.A.; FRANCO, F.S.C.; REZENDE, L.S.; SANTOS, A.S.; MAIA, H.O.; MARINS, J.C.B.; NATALI, A.J. Treinamento aeróbico em natação melhora a resposta de parâmetros metabólicos de ratos durante teste de esforço. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 16, n. 2, p. 134-138, 2010.

FRY, C.S.; KIRBY, T.J.; KOSMAC, K.; MCCARTHY, J.J.; PETERSON, C.A. Myogenic progenitor cells control extracellular matrix production by fibroblasts during skeletal muscle hypertrophy. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 1, p. 56-69, 2017.

FUCHTBAUER, E.M.; WESTPHAL, H. Myod and myogenin are co-expressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. **Developmental Dynamics**, v. 193, p. 34-39, 1992.

FULLER, SHARP, R.L.; ANGUS, H.F.; BAIER, S.M.; RATHMACHER, J.A. Free acid gel form of β -hydroxy- β -methylbutyrate improves HMB clearance from plasma in human subjects compared with the calcium HMB salt. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 367-372, 2011.

GALLAGHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SCHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate ingestion, part I: effects on strength and fat free mass. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, p. 2109-2115, 2000.

GIRÓN, M.D.; VÍLCHEZ, J.D.; SHREERAM, S. et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117520, 2015.

GIRÓN, M.D.; VÍLCHEZ, J.D.; SALTO, R.; MANZANO, R.; SEVILLANO, N.; CAMPOS, N.; ÁRGILES, J.M.; RUEDA, R.; LÓPEZ-PEDROSA, J.M. Conversion of leucine to β -hydroxy- β -methylbutyrate by α -keto isocaproate dioxygenase is

required for a potente stimulation of protein synthesis in L6 rat myotubes. **Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle**, v. 7, n. 1, p. 68-78, 2016.

GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.; SIBUYA, C.Y.; DE ZEVEDO, J.R.; DOS SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemical Physiology A Molecular Integrative Physiology**, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.

GOETZ, F.W.; PLANAS, J.V.; MACKENZIE, S. Tumor necrosis factors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 28, p. 487-497, 2004.

GOODMAN, C.A. The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 166, p. 43-95, 2014.

GOODMAN, C.A.; DIETZ, J.M.; JACOBS, B.L.; MCNALLY, R.M.; YOU, J.S.; HORNBERGER, T.A. Yes-associated protein is up-regulated by mechanical overload and is suficiente to induce skeletal muscle hypertrophy. **FEBS Letters**, v. 589, n. 3, p. 1491-1497, 2015.

GONZALEZ, A.; HOFFMAN, J.R.; TOWNSEND, J.R.; JAJTNER, A.R.; BOONE, C.H.; BEYER, K.S. et al. Intramuscular anabolic signaling and endocrine response following high volume and high intensity resistance exercise protocols in trained men. **Physiological Reports**, v. 3, n. 7, p. e12466, 2015.

GRAN, P.; CAMERON-SMITH, D. The actions of exogenous leucine on mTOR signalling and amino acid transporters in human myotubes. **BMC Physiology**, v. 11, 2011.

GREGORY, T.M.; HECKMANN, R.A.; FRANCIS, R.S. The effect of exercise on the presence of leukocytes, erythrocytes and collagen fibers in skeletal muscle after contusion. **Journal of Manipulative Physiological Therapies**, v. 18, n. 2, p. 72-78, 1995.

GROUNDS, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E.; BEILHARZ, M.W. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. **Cell and Tissue Research**, v. 267, p. 99-104, 1992.

GROUNDS, M.D.; WHITE, J.D.; ROSENTHAL, N.; BOGOYEVITCH, M.A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, p. 589-610, 2002.

GROUNDS, M.D. The need to more precisely define aspects of skeletal muscle regeneration. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 56, p. 56-65, 2014.

GUMUCIO, J.P.; SUGG, K.B.; MENDIAS, C.L. TGF- β 1 superfamily signaling in muscle and tendon adaptation to resistance exercise. **Exercise Sports Science Reviews**, v. 43, n. 2, p. 93-99, 2015.

HAO, Y.; JACKSON, J.R.; WANG, Y.; EDENS, N.; PEREIRA, S.L.; ALWAY, S.E. β -hydroxy- β -methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats. **American Journal of Physiology Regulatory and Comparative Physiology**, v. 301, n. 3, p. R701-R715, 2011.

HARBER, M.P.; KONOPKA, A.R.; DOUGLAS, M.D.; MINCHEV, K.; KAMINSKY, L.A.; TRAPPE, T.A.; TRAPPE, S. Aerobic exercise training improves whole muscle and single myofiber size and function in older women. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 5, p. R1452-1459, 2009.

HARBER, M.P.; KONOPKA, A.R.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, S.W.; TRAPPE, T.A.; REIDY, P.T. Muscle protein synthesis and gene expression during recovery from aerobic exercise in the fasted and fed states. **American Journal of Physiology Regulatory and Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 5, p. R1254-R1262, 2010.

HARBER, M.P.; KONOPKA, A.R.; UNDEM, N.K.; HINKLEY, J.M.; MINCHEV, K.; KAMINSKY, L.A.; TRAPPE, T.A.; TRAPPE, S. Aerobic exercise training induces skeletal muscle hypertrophy and age-dependent adaptations in myofiber function in young and older men. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, p. 1495-1504, 2012.

HASTY, P.A.; BRADLEY, J.H.; MORRIS, D.G.; EDMONDSON, J.M.; VENUTI, E.N.; OLSON, E.N.; KLEIN, W.H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, v. 364, p. 501-506, 1993.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 2, p. 534-551, 2001.

HAWLEY, J.A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M.J.; ZIERATH, J.R. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738-749, 2014.

HELLSTEN, Y.; NYBERG, M. Cardiovascular adaptations to exercise training. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 1-32, 2015.

HELMS, E.R.; ARAGON, A.A.; FITSCHEN, P.J. Evidence-based recommendations for natural bodybuilding contest preparation: nutrition and supplementation. **Journal of the International Society for Sports Nutrition**, v. 11, n. 20, p. 11-20, 2014.

HILLEL, A.T.; GELBARD, A. Unleashing rapamycin in fibrosis. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15722-15723, 2015.

HOFFMAN, J.R.; COOPER, J.; WENDELL, M.; IM, J.; KANG, J. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on power performance and indices of muscle damage and stress during high-intensity training. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 18, p. 747-752, 2004.

HOFFMAN, J.R.; GEPNER, Y.; STOUT, J.R.; HOFFMAN, M.W.; BEM-DOV, D.; FUNK, S. et al. β -hydroxy- β -methylbutyrate attenuates cytokine response during sustained military training. **Nutrition Research**, v. 36, n. 6, p. 553-563, 2016.

HOLECEK, M. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation and skeletal muscle in healthy and muscle wasting conditions. **Journal of Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 8, n. 4, p. 529-541, 2017.

HOPPELER, H.; HOWALD, H.; CONLEY, K.; LINDSTEDT, S.L.; CLAASSEN, H.; VOCK, P, et al. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 2, p. 320-327, 1985.

HULMI, J.J.; LAAKSO, M.; MERO, A.A.; HAKKINEN, K.; AHTIAINEN, J.P.; PELTONEN, H. The effects of whey protein with or without carbohydrates on resistance training adaptations. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12, p. 48.

ISHIDO, M.; KAMI, K.; MASUHARA, M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. **Acta Physiologica Scandinava**, v. 180, n. 3, p. 281-289, 2004.

JOANISSE, S.; NEDERVEEN, J.P.; BAKER, J.M.; SNIJDERS, T.; IACONO, C.; PARISE, G. Exercise conditioning in old mice improves skeletal muscle regeneration. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 9, p. 3256-3268, 2016.

JOHNSTON, A.P.W.; BELLAMY, L.M.; LISIO, M.D.; PARISE, G. Captopril treatment induces hyperplasia but inhibits myonuclear accretion following severe myotrauma in murine skeletal muscle. **American Journal of Physiology Regulatory and Integrative Comparative Physiology**, v. 301, p. 363-369, 2011.

JÓWKO, E.; OSTASZEWSKI, P.; JANK, M.; SACHARUK, J.; ZIENIEWICZ, A.; WILCZAK, J. et al. Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. **Nutrition**, v. 17, p. 558-566, 2001.

KARALAKI, M.; FILI, S.; PHILLIPOU, A.; KOUTSILIERIS, M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. **In Vivo**, v. 23, n. 5, p. 779-796, 2009.

KAZIOR, Z.; WILLIS, S.J.; MOBERG, M.; APRÓ, W.; CALBET, J.A.; HOLMBERG, H.C.; BLOMSTRAND, E. Endurance Exercise Enhances the effect of strength training on muscle fiber size and protein expression of Akt and mTOR. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149082, 2016.

KIM, K.; JUN, T-W.; KIM, H.; KIM, C-J, SONG, W. Low-intensity treadmill exercise enhances fast recovery from bupivacaine-induced muscle injury in rats. **Integrative Medicine Research**, v. 2, n. 4, p. 157-165, 2013.

KNAPIK, J.J.; STEELMAN, R.A.; HOEDEBECKE, S.S. et al. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of dietary supplement use by military personnel. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 14, n. 143, 2014.

KNAPIK, STEELMAN, R.A.; HOEDEBECKE, S.S. et al. Prevalence of dietary supplement use by athletes: systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 46, n. 1, p. 103-123, 2016.

KNITTER, A.E.; PANTON, L.; RATHMACHER, J.A. et al. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 4, p. 1340-1344, 2000.

KONOPKA, A.R.; DOUGLASS, M.D.; KAMINSKY, L.A.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, T.A.; TRAPPE, S.; HARBER, M.P. Molecular adaptations to aerobic exercise

training in skeletal muscle of older women. **Journal of Gerontology A Biological Science Medicine and Sciences**, v. 65, p. 1201-1207, 2010.

KONOPKA, A.R.; HARBER, M.P. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. **Exercise Sport Sciences Reviews**, v. 42, n. 2, p. 53-61, 2014.

KORNASIO, R.; RIEDERER, I.; BUTLER-BROWNE, G.; MOULY, V.; UNI, Z.; HAVELY, A. β -hydroxy- β -methylbutyrate stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 755-763, 2009.

KOVARIK, M.; MUTHNY, T.; SISPERA, L.; HOLECEK. Effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate treatment in different types of skeletal muscle of intact and septic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 311-319, 2010.

KRAEMER, W.J.; HATFIELD, D.L.; COMSTOCK, B.A.; FRAGALA, M.S.; DAVITT, P.M.; CORTIS, C.; WILSON, J.M. et al. Influence of HMB supplementation and resistance training on cytokine response to resistance exercise. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 33, n. 4, p. 247-255, 2014.

KRAEMER, W.J.; HOOPER, D.R.; SZIVAK, T.K. et al. The addition of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate and isomaltulose to whey protein improves recovery from highly demanding resistance exercise. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n.2, p. 91-99, 2015.

KREIDER, R.B.; FERREIRA, M.; WILSON, M.; ALMADA, A.L. Effect of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. **International Journal of Sports Medicine**, v. 20, p. 503-509, 1999.

KRUGER, M.J.; SMITH, C. Postcontution poyphenol treatment alter inflammation and muscle regeneration. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 5, p. 872-880, 2012.

KUROSAKA, M.; NAITO, H.; OGURA, Y.; MACHIDA, S.; KATAMOTO, S. Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 1, p. 159-166, 2012.

KUROSAWA, M.; NAITO, H.; OGURA, Y.; KOJIMA, A.; GOTO, K.; KATAMOTO, S. Effects of voluntary wheel running on satellite cells in rat plantaris muscles. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 8, p. 51-51, 2009.

LAMBOLEY, C.R.; ROYER, D.; DIONNE, I.J. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on aerobic-performance components and body composition in college students. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 56-69, 2007.

LATRES, E.; PANGILINAN, J.; MILOSCIO, L.; BAUERLEIN, R.; NA, E.; POTOCKY, T.B. et al. Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice. **Skeletal Muscle**, v. 9, n 5, p. 34, 2015.

LAUMONIER, T.; MENETREY, J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 3, n. 1, p. 15, 2016.

LEE, S.J.; HUYNH, T.V.; LEE, Y.S.; SEBALD, S.M.; WILCOX-ADELMAN, S.A.; IWAMORI, M, et al. Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. **Proceedings national Academy of Sciences**, v. 109, n. 35, p. E2353-E2360, 2012.

LEE, A.S.J.; ANDERSON, J.E.; JOYA, J.E.; HEAD, S.I.; PATHER, N.; KEE, A.J.; GUNNING, P.W.; HARDEMAN, E.C. Aged skeletal muscle retains the ability to fully regenerate functional architecture. **BioArchitecture**, v. 3, p. 25-37, 2013.

LEE, K.; OCHI, E.; SONG, H.; NAKAZATO, K. Activation of AMPK-activated protein kinase induce expression of FOXO1, FOXO3a, and myostatin after exercise-induced muscle damage. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 466, n. 3, p. 289-294, 2015.

LO, S.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 234-236, 1970.

LYNCH, C.J.; HUTSON, S.M.; PATSON, B.J.; VAVAL, A.; VARY, T.C. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 4, p. E824-E835, 2002.

MCCROSKERY, S.; THOMAS, M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewel. **Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 6, p. 1135-1147, 2003.

MANABE, Y.; GOLLISCH, K.S.; HOLTON, L.; KIM, Y.B.; BRANDAUER, J.; FUJII, N.L.; HIRSHMAN, M.F.; GOODYEAR, L.J. Exercise training-induced adptations

associated with increases in skeletal muscle glycogen content. **FASEB Journal**, v. 280, n. 3, p. 916-926, 2013.

MANN, C.J.; PERDIGUERO, E.; KHARRAZ, Y.; AGUILAR, S.; PESSINA, P.; SERRANO, A.L.; MUNOZ-CANOVES, P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle Journal**, v. 1, n. 1, 2011.

MARABITA, M.; BARALDO, M.; SOLAGNA, F.; CELEN, J.J.; SARTORI, R.; NOLTE, H.; NEMAZANY, I.; PYRONNET, S.; KRUGER, M.; PENDE, M.; BLAAUW, B. S6K1 is required for increasing skeletal muscle force during hypertrophy. **Cell Reports**, v. 17, n. 2, p. 501-513, 2016.

MARCOTTE, G.R.; WEST, D.W.; BAAR, K. The molecular basis for load-induced skeletal muscle hypertrophy. **Calcified Tissue International**, v. 93, n. 3, p. 196-210, 2015.

MASCHER, H.; EKBLUM, B.; ROOYACKERS, O.; BLOMSTRAND, E. Enhanced rates of muscle protein synthesis and elevated mTOR signalling following endurance exercise in human subjects. **Acta Physiologica**, v. 202, p. 175-184, 2011.

MATSAKAS, A.; FRIEDEL, A.; HERTRAMPF, T.; DIEHL, P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in rat. **Acta Physiologica Scandinava**, v. 183, n. 3, p. 299-307, 2005.

MATSAKAS, A.; BOZZO, C.; CACCINANI, M.; CALIARO, F.; REGGIANI, C.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M. Effect of swimming in myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 6, p. 983-994, 2006.

MAYHEW, D.L.; KIM, J.S.; CROSS, J.M.; FERRANDO, A.A.; BAMMAN, M.M. Translational signaling responses preceding resistance training-mediated myofiber hypertrophy in young and old humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 5, p. 1655-1662, 2009.

MCCARTHY, J.J.; MULA, J.; MIYAZAKI, M.; ERFANI, R.; GARRISON, K.; FAROOQUI, A.B. et al. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. **Development**, v. 138, p. 3657-3666, 2011.

MCCROSKERY, S.; THOMAS, M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self renewal. **Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 6, p. 1135-1147, 2003.

MEADOWS, E.; CHO, J-H.; FLYNN, J.M.; KLEIN, W.H. Myogenin regulates distinct program in adult muscle stem cells. **Developmental Biology**, v. 322, p. 406-414, 2008.

MENDIAS, C.L.; GUMUCIO, J.P.; DAVIS, M.E.; BROMLEY, C.W.; DAVIS, C.S.; BROOKS, S.V. Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogen- 1 and scleraxis. **Muscle and Nerve**, v. 45, n. 1, p. 55-59, 2012.

MENDIAS, C.L.; SCHWARTZ, A.J.; GREKIN, J.A.; GUMUCIO, J.P.; SUGG, K.B. Changes in muscle fiber contractility and extracellular matrix production during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 3, p. 571-579, 2017.

MITCHELL, C.J.; CHURCHWARD-VENNE, T.A.; WEST, D.W.; BURD, N.A.; BREEN, L.; BAKER, S.K.; PHILLIPS, S.M. Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, p. 71-77, 2012.

MITCHELL, W.K.; WILKINSON, D.J.; PHILLIPS, B.E.; LUND, J.N.; SMITH, K.; ATHERTON, P.J. Human skeletal muscle protein metabolism responses to amino acid nutrition. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 828S-838S, 2016.

MOLKETIN, J.D.; OLSON, E.N. Defining the regulatory networks for muscle development. **Current Opinion Genetics and Development**, v. 6, p. 445-453, 1996.

MOORE, T.M.; MORTENSEN, X.M.; ASHBY, C.K.; HARRIS, A.M.; KUMP, K.J.; LAIRD, D.W.; ADAMS, A.J.; BRAY, A.K.; CHEN, T.; THOMSON, D.M. The effect of caffeine on skeletal muscle anabolic signaling and hypertrophy. **Applied, Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 42, n. 6, p. 621-629, 2017.

MORRISON, L.J.; GIZIS, F.; SHORTER, B. Prevalent use of dietary supplements among people who exercise at a commercial gym. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 481-492, 2004.

MURPHY, M.M.; LAWSON, J.A.; MATHEW, S.J.; HUTCHESON, D.A.; KARDON, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development**, v. 138, n. 17, p. 3625-3637, 2011.

MUSARÒ, A. The basis of muscle regeneration. **Advanced Biology**, p. 1-16, 2014.

MYBURGH, K.H.; KRUGER, M.J.; SMITH, C. Accelerated skeletal muscle recovery after in vivo polyphenol administration. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1072-1079, 2015.

NISHIZAKI, K.; IKEGAMI, H.; TANAKA, Y.; IMAI, R.; MATSUMURA, H. Effects of supplementation with a combination of β -hydroxy-beta-methylbutyrate, L-arginine, and L-glutamine on postoperative recovery of quadriceps muscle strength after total knee arthroplasty. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 412-420, 2015.

NISSEN, S.; SHARP, R.; RAY, M.; RATHMACHER, J.A.; RICE, D.; FULLER, C. et al. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, p. 2095-2104, 1996.

NISSEN, S.L.; ABUMRAD, N.N. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 300-311, 1997.

NYAKAYIRU, J.; JONVIK, K.L.; TROMMELEN, J.; PINCKAERS, P.J.; SENDEN, J.M, *et al.* Beetroot Juice Supplementation Improves High-Intensity Intermittent type Exercise performance in trained soccer players. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. E314, 2017.

NOH, K.K.; CHUNG, K.W.; CHOI, Y.J.; PARK, M.H.; JANG, E.J.; PARK, C.H.; YOON, K.; KIM, N.D.; KIM, M.K.; CHUNG, H.Y. β -Hydroxy- β -methylbutyrate improves dexamethasone-induced muscle atrophy by modulating the muscle degradation pathway in SD rat. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102947.

NUNES, E.A.; LOMAX, R.; NOAKES, P.S.; MILES, E.A.; FERNANDES, L.C.; CALDER, P.C. β -hydroxy- β -methylbutyrate modifies human peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in vitro. **Nutrition**, v. 27, n.1, p. 92-99, 2011.

MORRISON, L.J.; GIZIS, F.; SHORTER, B. Prevalent use of dietary supplements among people who exercise at a commercial gym. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 481-492, 2004.

OGASAWARA, R.; FUJITA, S.; HORNBERGER, T.A.; KITAOKA, Y.; MAKANAE, Y.; NAKAZATO, K.; NAKOKATA, I. The role of mTOR signalling in the regulation of skeletal muscle mass in a rodent model of resistance exercise. **Scientific Reports**, v. 6, p. 31142, 2016.

OHSAWA, Y.; OKADA, T.; SISHIMATSU, T.; ISHIZAKI, M.; SUGA, T.; FUJINO, M.; MURAKAMI, T.; UCHINO, M.; TSUCHIDA, K.; NOJI, S.; HINOHARA, A.; SHIMIZU, T.; SHIMIZU, K.; SUNADA, Y. Na inhibitor of transforming growth factor beta type 1 receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy. **Laboratory Investigation**, v. 92, n. 8, p. 1100-1114, 2012.

OHNO, Y.; MATSUBA, Y.; HASHIMOTO, N.; SUGIURA, T.; OHIRA, Y.; YOAHIOKA, T.; GOTO, K. Suppression of myostatin stimulates regenerative potential of injured antigravitational soleus muscle in mice under unloading control. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 9, p. 680-685, 2016.

OISHI, Y.; TSUKAMOTO, H.; YOKOKAWA, T.; HIROTSU, K.; SHIMAZU, M.; UCHIDA, K.; TOMI, H.; HIGASHIDA, K.; IWANAKA, N.; HASHIMOTO, T. Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 6, p. 742-749, 2015.

OUTRAM, S.; STEWART, B. Doping through supplement use: a review of the available empirical data. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 25, p. 54-59, 2015.

OZAKI, LOENNEKE, J.P.; THIEBAUD, R.S.; ABE, T. Cycle training induces muscle hypertrophy and strength gain: strategies and mechanisms. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 102, n. 1, p. 1-22, 2015.

PASIAKOS, S.M.; CARBONE, J.W.; Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. **IUBMB Life**, v. 66, p. 478-484, 2014.

PADDON-JONES, D.; KEECH, A.; JENKINS, D. Short-term beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation does not reduce symptoms of eccentric muscle

damage. **International Journal of Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 11, p. 442-450, 2001;

PELLEGRINO, M.A.; BROCCA, L.; DIOGUARDI, F.S.; BOTTINELLI, R.; D'ANTONA, G. Effects of voluntary wheel running and amino acid supplementation on skeletal muscle of mice. **European Journal of Applied Physiology**, v. 93, n.5-6, p. 655-664, 2009.

PEREIRA, M.G.; SILVA, M.T.; CARLASSARA, E.O. et al. Leucine supplementation accelerates connective tissue repair of injured tibialis anterior muscle. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 3981-4001, 2014a.

PEREIRA, M.G.; BAPTISTA, I.L.; CARLASSARA, E.O. et al. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85283.

PEREIRA, M.G.; SILVA, M.T.; DA CUNHA, F.M. et al. Leucine supplementation improves regeneration of skeletal muscles from old rats. **Experimental Gerontology**, v. 72, p. 269-277, 2015.

PERRY, R.A JR.; BROWN, L.A.; LEE, D.E.; BROWN, L.J.; BAUM, J.I.; GREENE, et al. Differential effects of leucine supplementation in young and aged mice at the onset of skeletal muscle regeneration. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 157, p. 7-16, 2016.

PERTILLE, A.; MOURA, K.F.; MATSUMURA, C.Y.; FERRETTI, R.; RAMOS, D.M.; PETRINI, A.C.; OLIVEIRA, P.C.; SILVA, C.A. Evaluation of skeletal muscle regeneration in experimental model after malnutrition. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 83-91, 2016.

PESTANA, P.R.D.; FERNANDES, K.P.S.; VALLIO, C.S.; ROCHA, D.A.M.; MARTINS, M.D.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Natação e aspectos morfológicos do músculo esquelético em processo de reparo após criolesão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 19, n. 3, p. 264-269, 2011.

PHILLIPS, S.M. A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy. **Sports Medicine**, v. 44, p. S71-S77, 2014.

PHILP, A.; SCHENK, S.; PEREZ-SCHINDLER, J.; HAMILTON, D.L.; BREEN, L.; LAVERONE, E.; JEROMSON, S.; PHILLIPS, S.M.; BAAR, K. Rapamycin does not

prevent increases in myofibrillar or mitochondrial protein synthesis following endurance exercise. **Journal of Physiology**, v. 593, p. 4275-4284, 2015.

PIMENTEL, G.D.; ROSA, J.C, LIRA, F.S. et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway. **Nutrition and Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 11doi: 10.1186/1743-7075-8-11, 2011.

PINHEIRO, C.H.; GERLINGER-ROMERO, F.; GUIMARÃES-FERREIRA, L.; DE SOUZA JR, A.L.; VITZEL, K.F.; NACHBAR, R.T.; NUNES, M.T.; CURI, R. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 7, p. 2531-1537, 2012.

PORTAL, S.; ZADIK, Z.; RABINOWITZ, J.; PILZ-BURSTEIN, R.; ADLER-PORTAL, D.; MECKEL, Y. et al. The effect of HMB supplementation on body composition , fitness, hormonal and inflammatory mediators in elite adolescent volleyball players: a prospective randomized, double-blind placebo-controlled study. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, p. 2261-2269, 2011.

REIDY, P.T.; BORACK, M.S.; MARKOFSKI, M.M.; DICKINSON, J.M.; FRY, C.S.; DEER, R.R.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Post-absorptive muscle protein turnover affects resistance training hypertrophy. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 5, p. 853-866, 2017.

RICHARD-BULTEAU, H.; SERRURIER, B.; CRASSOUS, B.; BANZET, S.; PEINNEQUIN, A.; BIGARD, X.; KOULMANN, N. Recovery of skeletal muscle mass after extensive injury: positive effects of increased contractile activity. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 294, n. 2, p. C467-C476, 2008.

RINGHOLM, S.; OLESEN, J.; PEDERSEN, J.T.; BRANDT, C.T.; HALLING, J.F.; HELLSTEN, Y, *et al.* Effect of lifelong resveratrol supplementation and exercise training on skeletal muscle oxidative capacity in aging mice: impact of PGC-1 α . **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 11, p. 1311-1318, 2013.

RITTIG, N.; BACH, E.; THOMSEN, H.H. et al. Anabolic effects of leucine-rich whey protein, carbohydrate, and soy protein with and without β -hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) during fasting-induced catabolism: a human randomized crossover trial. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 697-705, 2017.

RODRIGUEZ, J.; VERNUS, B.; CHELH, I.; CASSAR-MALEK, I.; HADJ-SASSI, A.; SEILIEZ, I.; PICARD, B.; BONNIEAU, A. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 22, p. 4361-4371, 2014.

ROWLANDS, D.S.; THOMSON, J.S. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation during resistance training on strength, body composition and muscle damage in trained and untrained young men: a meta-analysis. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 23, p. 836-846, 2009.

RUSS, D.W.; ACKSEL, C.; MCCORKLE, K.W.; EDENS, N.K.; GARVEY, S.M. Effects of running wheel activity and dietary HMB and β -alanine Co-supplementation on muscle quality in aged male rats. **Journal of Nutrition Health and Aging**, v. 21, n. 5, p. 554-561, 2017.

RUSS, D.W.; ACKSEL, C.; BOYD, I.M.; MAYNARD, J.; MCCORKLE, K.W.; EDENS, N.K.; GARVEY, S.M. Dietary HMB and β -alanine co-supplementation does not improve in situ muscle function in sedentary, aged male rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 40, n. 12, p. 1294-1301, 2015.

SAMBAVISAN, R.; YAO, R.; KISSENFENNIG, A.; VAN WITTENBERGHE, L.; PALDI, A. et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. **Development**, v. 138, p. 3647-3656, 2011.

SANDBAKK, O.; HOLMBERG, H.C. Physiological capacity and training routines of elite cross-country skiers: approaching the upper limits of human endurance. **International Journal of Sports Physiology and Performance**, v. 17, p. 1-26, 2017.

SCHERRY, M.A.; JOHNSTON, T.S.; HEIDERSCHEIT, B.C. Rehabilitation of acute hamstring strain injuries. **Clinical Sports Medicine**, v. 34, n. 2, p. 263-284, 2015.

SCHIAFFINO, S.; PEREIRA, M.G.; CICILIOT, S.; ROVERE-QUERINI, P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. **FEBS Journal**, v. 284, n. 4, p. 517-524, 2017.

SCHOENFELD, B.J.; ARAGON, A.; WILBORN, C.; URBINA, S.L.; HAYWARD, S.E.; KRIEGER, J. Pre-versus post-exercise protein intake has similar effects on muscular adaptations. **Peer Journal**, v. 5, e2825, 2017.

SLATER, G.J.; JENKINS, D. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation and the promotion of muscle growth and strength. **Sports Medicine**, v. 30, n. 2, p. 105-116, 2000.

SMITH, H.K.; MAXWELL, L.; RODGERS, C.D.; MCKEE, N.H.; PLYLEY, M.J. Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 1407-1414, 2001.

SMITH, H.J.; WYKE, S.M.; TISDALE, M.J. Mechanism of the attenuation proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Cancer Research**, v. 64, n. 23, p. 8731-8735, 2004.

SMITH, H.J.; MUKERJI, P.; TISDALE, M.J. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. **Cancer Research**, v. 65, n. 1, p. 277-283, 2005.

SNIJDERS, T.; NEDERVEEN, J.P.; MCKAY, B.R.; JOANISSE, S.; VERDIJK, L.B.; VAN LOON, L.J.; PARISE, G. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 283, 2015.

SONG, H.; OCHI, E.; LEE, K.; HIRANUMA, K.; NAKAZATO, K. Characteristics of myogenic response and ankle torque recovery after lengthening contraction-induced rat gastrocnemius injury. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13, n. 211, p. 2012.

SRIKUEA, R.; PHOLPRAMOOL, C.; KITIYANANT, Y.; YIMLAMAI, T. Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 11, p. 1078-1086, 2010.

SUZUKI, J. Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 5, p. 763-771, 2005.

SZCZESNIAK, K.A.; CIECIERSKA, A.; OSTASZEWSKI, P.; SADKOWSKI, T. Characterisation of equine satellite cell transcriptomic profile response to β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 8, p. 1315-1325, 2016.

TEIXEIRA, G.R.; GOBBO, L.A.; SANTOS, N.J.; ARAUJO, R.G.; SANTOS, C.C.; MALHEIRO, O.C.M.; CASTOLDI, R.C.; CAMARGO-FILHO, J.C.S. The effects of

β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on the morphology of skeletal muscle after concurrent training. **Motriz**, v. 22, n. 3, p. 190-197, 2016.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, p. R1173-R1187, 2010.

TIDBALL, J.G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 3, p. 165-178, 2017.

TIPTON, K.D. Nutritional support for exercise-induced injuries. **Sports Medicine**, v. 45, n. 1, p. S93-104, 2015.

TONKONOGI, M.; KROOK, A.; WALSH, B.; SAHLIN, K. Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling –protein-mediated effect? **Biochemical Journal**, v. 351, 805-810, 2000.

UCHIKAWA, K.; TAKAHASHI, H.; HASE, K.; MASAKADO, Y.; LIU, M. Strenuous exercise-induced alterations of muscle fiber cross-sectional area and fiber-type distribution in steroid myopathy rats. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 87, n. 2, p. 126-133, 2008.

VAN KOVERING, M.; NISSEN, S.L. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to β -hydroxy- β -methylbutyrate in vivo. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 262, p. 27, 1992.

VAN SOMEREN, K.A.; EDWARDS, A.J.; HOWATSON, G. Supplementation with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and alpha-ketoisocaproic acid (KIC) reduces signs and symptoms of exercise-induced muscle damage in man. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 413-424, 2005.

VOLEK, J.S.; DUNCAN, N.D.; MAZETTI, S.A.; STARON, R.S.; PUTUKIAN, M.; GÓMEZ, A.L.; PEARSON, D.R.; FINK, W.J.; KRAEMER, W.J. Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 8, p. 1147-1156, 1999.

VUKOVICH, M.D.; DREIFORT, G.D. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the onset of blood lactate accumulation and V(O)(2) peak in endurance-trained cyclists. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 15, p. 491-497, 2001.

WAGNER, K.R.; LIU, X.; CHANG, X.; ALLEN, R.E. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 7, p. 2519-1524, 2005.

WALDRON, M.; WHELAN, K.; JEFFRIES, O.; BURT, D.; HOWE, L.; PATTERSON, S.D. The effects of acute branched-chain amino acid supplementation on recovery from a single bout of hypertrophy exercise in resistance-trained athletes. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 42, n. 6, p. 630-636, 2017.

WARREN, G.L.; HULDERMAN, T.; JENSEN, N.; MCKINSTRY, M.; MISHRA, M.; LUSTER, M.I.; SIMEONOVA, P.P. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. **FASEB Journal**, v. 16, n. 12, p. 1630-1632, 2002.

WHITE, J.P.; WRANN, C.D.; RAO, R.R.; NAIR, S.K.; JEDRYCHOWSKI, M.P.; YOU, J.S.; MARTINEZ-REDONDO, V.; GYGI, S.P.; RUAS, J.L.; HORNBERGER, T.A.; WU, Z.; GLASS, D.J.; PIAO, X.; SPIEGELMAN, B.M. G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 15756-15761, 2014.

WILKINSON, D.J.; HOSSAIN, T.; HILL, D.S. et al. Effects of leucine and its metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. **Journal of Physiology**, v. 591, n. 11, p. 2911-2923, 2013.

WILKINSON, D.J.; HOSSAIN, T.; LIMB, M.C. et al. Impact of the calcium form of β -hydroxy- β -methylbutyrate upon human skeletal muscle protein metabolism. **Clinical Nutrition**, v. S0261-5614, 17, 31356-0, 2017.

WILSON, G.J.; WILSON, J.M.; MANNINEN, A.H. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex and training experience: a review. **Nutrition and Metabolism**, v. 5, p. 1, 2008.

WILSON, J.M.; KIM, J.S.; LEE, S.R.; RATHMACHER, J.A.; DALMAU, B.; KINGSLEY, J.D.; KOCH, H.; MANNINEN, A.H.; SAADAT, R.; PANTON, L.B.;

Acute and timing effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on indirect markers of skeletal muscle damage. **Nutrition and Metabolism**, v. 6, n. 6, 2009.

WILSON, J.M.; GRANT, S.C.; LEE, S.R. et al. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate blunts negative age-related changes in body composition, functionality and myofiber dimensions in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 9, n. 1, p. doi: 10.1186/1550-2783-9-18, 2012.

WILSON, J.M.; FITSCHEN, P.J.; CAMPBELL, B.; et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, n. 1, 2013.

XIA, Z.; CHOLEWA, J.; ZHAO, Y.; YANG, Y.Q.; SHANG, H.Y.; GUIMARÃES-FERREIRA, L. ET AL. Hypertrophy-promoting effects of leucine supplementation and moderate intensity aerobic exercise in pre-senescent mice. **Nutrients**. V. 8, n.5, p. E246, 2016.

ZÁDOR, E.; MENDELER, L.; TAKÁCS, V.; DE BLEECKER, J.; WUYTACK, F. Regenerating soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat show elevated levels of TNF- α and its receptors, TNFR-60 and TNFR-80. **Muscle and Nerve**, v. 24, p. 1058-1067, 2001.

ZANCHI, N.E.; GERLINGER-ROMERO, F.; GUIMARÃES-FERREIRA, L. et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1015-1025, 2011.

ZANCHI, N.E.; LANCHETA JR, A.H. Mechanical stimuli of skeletal muscle: implications on mTOR/p70S6K and protein synthesis. **European Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 3, p. 253-263, 2008.

ZANOUE, N.; GAILLY, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 21, p. 4117-4130, 2013.

ZHANG, P.; LIANG, X.; SHAN, T.; JIANG, Q.; DENG, C.; ZHENG, R.; KUANG, S. mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 102-108, 2015.

ZIMOWSKA, M.; DUCHESNAY, A.; DRAGUN, P.; OBERBEK, A.; MORACZEWSKI, J.; MARTELLY, I. Immunoneutralization of TGF-beta1 improves skeletal muscle regeneration: effects on myoblast differentiation and glycosaminoglycan content. **International Journal of Cell Biology**, v. 659372, 2009.

Anexo 1

Universidade Metodista de Piracicaba
Comissão de Ética no Uso de Animais



Piracicaba, 22 de abril de 2015

Para: Profa. Adriana Pertille
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 01/2015

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba **APROVOU** o protocolo de pesquisa nº 01/2015 intitulada **"EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-HIDROXI-BETA-METIL-BUTIRATO (HMB) E TREINAMENTO FÍSICO NA REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS CRIOLIZAÇÃO: COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS"** analisada por esta comissão.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Carlos Alberto da Silva", is written over a light green rectangular background.

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Presidente do CEUA-UNIMEP