

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

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

**Efeito da suplementação de Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato (HMB) na
regeneração muscular após criolesão associada a diferentes
modalidades terapêuticas**

Luana Gomes de Oliveira

2016

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUANA GOMES DE OLIVEIRA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-HIDROXI-BETA-METILBUTIRATO (HMB) NA RÉGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS CRIOLÉSÃO ASSOCIADA A DIFERENTES MODALIDADES TERAPÉUTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do título de Mestre em Ciências do Movimento Humano.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille

PIRACICABA

2016

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP
Bibliotecária: Marjory Harumi Barbosa Hito CRB-8/9128

O48e	<p>Oliveira, Luana Gomes de</p> <p>Efeito da suplementação de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (hmb) na regeneração muscular após criolesão associada a diferentes modalidades terapêuticas / Luana Gomes de Oliveira. – 2016. 62 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pertille Dissertação (mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2016.</p> <p>1. Suplementação. 2. Regeneração. I. Pertille, Adriana. II. Título.</p> <p>CDU – 612.748.5</p>
------	---

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-HIDROXI-BETA-METIL-BUTIRATO (HMB)
NA REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS CRIOLIZAÇÃO ASSOCIADO A DIFERENTES
MODALIDADES TERAPÊUTICAS**

LUANA GOMES DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 24 de fevereiro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:



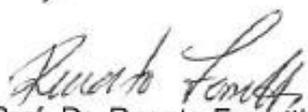
Profa. Adriana Pertille

Presidente e Orientadora - UNIMEP



Profa. Dra. Marlene Aparecida Moreno

UNIMEP



Prof. Dr. Renato Ferretti

UNESP

Por todo amor e esforços sem medida para a conclusão deste trabalho, dedico-o aos meus pais Idalina e Nivaldo, minha base, e à minha tia Ieda, pelo exemplo de fé e por ter me ensinado a ser forte em todo tempo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ter me abençoado em toda a caminhada até aqui, por ter sido Fiel em todas as minhas necessidades e por ter me proporcionado experiências que ajudaram em minha construção profissional e pessoal.

Aos meus pais, Idalina e Nivaldo, pelo amor incondicional, pelo total apoio e por terem sacrificados seus sonhos para que o meu pudesse ser concretizado. Minha gratidão eterna a vocês! Os amo infinitamente! E à minha tia Ieda, por ter me ensinado tanto no último ano, por te me levantado em todas as dificuldades e pelo amor dedicado a nós desde sempre.

Ao meu companheiro de todas as horas e melhor amigo, Eduardo. Obrigada pela força, compreensão, conselhos, apoio, por todas as palavras de ânimo e por tudo que construímos juntos, que se resume em uma palavra: amor.

À Profa. Dra. Adriana Pertille, pela disposição em orientar este trabalho, por toda ajuda sem medida para que pudéssemos realizá-lo, por todos os ensinamentos e pela paciência constante. Obrigada pelo exemplo de dedicação e amor pelo que faz e pela leveza e descontração com que encara os imprevistos e problemas.

A todos os amigos e colegas do PPG-CMH que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído, em especial à Audrei Fortunato Miquelote, Ana Cláudia Petrini e Douglas Massoni Ramos.

Aos docentes do PPG-CMH que me proporcionaram muitos conhecimentos, tanto acadêmicos quanto pessoais, e pela oportunidade de vivenciar as reuniões de Conselho e entender melhor sobre a gestão de um programa de pós-graduação.

A CAPES-PROSUP pelo apoio em concluir mais uma etapa importante em minha vida.

Aos componentes da banca examinadora, por aceitarem prontamente o convite e contribuírem para o enriquecimento deste trabalho. Muito obrigada!

À Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) abriu portas para a minha vida profissional, me proporcionando uma formação de qualidade, que há sete anos têm sido meu ambiente diário, onde vivi grandes experiências, fiz grandes amizades, onde pude realizar sonhos e construir meu caminho (nunca terminado). A todos que passaram por ele e acreditaram em meu potencial, muito obrigada!!!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) é um metabólito derivado do aminoácido leucina (aminoácido essencial de cadeia ramificada) que tem demonstrado propriedades anabólicas, anti-catabólicas, anti-inflamatórias e miogênicas. O tecido músculo esquelético é caracterizado por notável plasticidade e, mesmo após lesão, possui extraordinária capacidade regenerativa e a incidência de lesões na prática clínica tem suscitado o aumento de estudos que observem o processo de regeneração muscular. Outras terapias também têm sido utilizadas na reabilitação de disfunções musculoesqueléticas, como a natação, pois promove o reparo tecidual devido ao aumento da circulação periférica, entre outros benefícios, e, a terapia por laser de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* – LLLT), que tem demonstrado efeitos positivos sobre o reparo muscular, em diferentes intensidades de energia aplicadas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de HMB associada ou não ao exercício físico de natação e à LLLT na capacidade regenerativa do músculo esquelético de ratas. Foram estudadas 44 ratas da linhagem *Wistar* divididas em 10 grupos: Controle (CT), não submetido à lesão muscular; Sedentário (S), submetido à lesão muscular e mantido no biotério; Laser (La), submetido à lesão muscular e à LLLT 3 vezes por semana; Natação (N), submetido à lesão muscular e ao exercício de natação 3 vezes por semana; Natação+Laser (NLa), submetido à lesão muscular e à natação associada à LLLT 3 vezes por semana; e todos estes grupos repetidos, com o acréscimo da suplementação de HMB (CTH, SH, LaH, NH e NLaH). A análise da recuperação muscular foi realizada pela Microscopia de Luz. Para análise estatística foram utilizados os testes *ANOVA-F* para dados paramétricos e o teste *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos, sendo considerado um valor de $p < 0,05$ significativo. O peso corporal médio dos animais, bem como o peso isolado do músculo tibial anterior não obtiveram diferenças significativas entre os grupos. O mesmo aconteceu com as medidas de AST, MyoD e Miogenina. Foi observado que a suplementação com HMB favoreceu o aumento significativo ($p < 0,05$) de tecido conjuntivo nos grupos que receberam as intervenções isoladas ou associada (LaH, NH, NLaH), comparados ao controle (CTH), bem como aumentou as concentrações da citocina TGF- β 1 nos grupos LaH e NLaH comparados ao CTH. A suplementação com HMB também reduziu a área de inflamação no grupo NH quando comparado ao N, e os conteúdos da citocina TNF- α nos grupos CTH, LaH e NH quando comparados ao SH. Conclui-se que a suplementação com HMB por 21 dias não foi suficiente para estimular a hipertrofia no grupo controle ou acelerar a recuperação da AST após a lesão, e, ainda aumentou a quantidade de tecido conjuntivo no local da lesão, sugerindo que o HMB não favoreceu a regeneração muscular. Destaca-se ainda que as terapias isoladas foram mais eficazes na redução do conteúdo de TNF- α , quando associadas à suplementação com HMB.

Palavras-chave: músculo esquelético, regeneração, suplementação alimentar, terapia por luz de baixa intensidade, natação.

ABSTRACT

The β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) is a metabolite derived from the amino acid leucine (branched-chain essential amino acid) that have demonstrated anabolic, anti-catabolic, anti-inflammatory and myogenic properties. Skeletal muscle tissue is characterized by remarkable plasticity and even injury, has extraordinary regenerative capacity. The incidence of injury in clinical practice has sparked increased when observed the muscle regeneration process. Other therapies have also been used in the rehabilitation of musculoskeletal disorders, such as swimming, it promotes tissue repair due to increased peripheral circulation, among other benefits, and, low intensity laser therapy (Low-Level Laser Therapy - LLLT), which has been shown positive effects on muscle repair, in different energy intensities applied. The objective of this study was to evaluate the effects of HMB supplementation associated or not to exercise swimming and LLLT in regenerative capacity of skeletal muscle of rats. Forty-four *Wistar* rats were studied divided into 10 groups: control (CT), not subjected to muscle injury; Sedentary (S), submitted to muscular injury and kept in a vivarium; Laser (La), submitted to muscular injury and LLLT 3 times a week; Swimming (N), submitted to muscular injury and swimming exercise 3 times a week; Swimming + Laser (NLA), submitted to muscular injury and swimming associated with LLLT 3 times a week; and all these repeated groups with HMB supplementation of increase (CTH, SH, LaH, NH and NLaH). The analysis of muscle recovery was performed by light microscopy. Statistical analyzes were performed using ANOVA *F*-test for parametric data and *Kruskal-Wallis* test for nonparametric data, and it was considered a value of $p < 0.05$ significant. The average of body weight, as well as isolated tibialis anterior muscle weight did not obtain significant differences between groups. The same happened with the AST measures, MyoD and Myogenin. It was observed that HMB supplementation promoted a significant increase ($p < 0.05$) connective tissue in groups that received the interventions alone or associated (LaH, NH and NLaH) compared to control (CT) as well as increased concentrations TGF- β 1 cytokine in LaH and NLaH groups compared to the CTH. HMB supplementation also reduced the NH group area of inflammation when compared to N, and the contents of the cytokine TNF- α in the CTH, NH and LaH groups when compared to SH. It is concluded that HMB supplementation for 21 days was not sufficient to stimulate hypertrophy in the control group or accelerating the recovery of AST after injury, and also increased the amount of connective tissue at the lesion site, suggesting that HMB does not promote muscle regeneration. We note also that the isolated therapies were more effective in reducing TNF- α content when associated with supplementation with HMB.

Keywords: skeletal muscle, regeneration, supplementary feeding, low-level light therapy, swimming.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 O TECIDO MUSCULOESQUELÉTICO	10
1.2 O β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO (HMB)	12
1.3 A NATAÇÃO	15
1.4 A TERAPIA POR LASER DE BAIXA INTENSIDADE	16
1.5 HIPÓTESE DO ESTUDO	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	20
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	20
3.3 PROCEDIMENTO DE LESÃO MUSCULAR - CRIOLESÃO	22
3.4 SUPLEMENTAÇÃO COM β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO (HMB)	23
3.5 PROTOCOLO DE NATAÇÃO	23
3.6 PROTOCOLO DE LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE (LLLT)	24
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	25
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA	25
3.9 ANÁLISES DOS RESULTADOS - MORFOMETRIA	26
3.10 TÉCNICA DE IMMUNOBLOTTING	29
3.10.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO TOTAL	29
3.10.2 ELETROFORESE	30
3.10.3 ANTICORPOS	31
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32

SUMÁRIO (continuação)

4. RESULTADOS	33
4.1 MASSA CORPORAL E PESO MUSCULAR	33
4.2 QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO TECIDO CONJUNTIVO (DRTC) E ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA (AST)	33
4.3 QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA DE INFLAMAÇÃO/REGENERAÇÃO (AI/R)	38
4.4 QUANTIFICAÇÃO DO IMMUNOBLOTTING	38
5. DISCUSSÃO	42
5.1 MASSA CORPORAL E PESO MUSCULAR	43
5.2 DRTC E TGF- β 1	44
5.3 AST, MyoD E MIOGENINA	46
5.4 AI/R E TNF- α	47
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO I	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido Musculoesquelético

O tecido musculoesquelético é caracterizado por notável plasticidade em resposta a estímulos como nutrientes, exercício físico e lesão, pois possui células especializadas com grande capacidade mitogênica, chamadas células satélites, que quando ativadas são capazes de gerar novas células, os mioblastos, reparando danos causados ao tecido muscular. Assim, um tecido adulto e saudável, mesmo após lesão, possui extraordinária capacidade regenerativa (LIEBER, 2002; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; BLAAUW; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2013).

A lesão muscular é um trauma comum no meio esportivo, sendo a maior responsável por incapacidade física na prática esportiva (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011); e além de comprometer as atividades laborais devido à dor e limitação, compromete também as atividades de lazer (DAWOOD; AL-SALIHI; QASIM, 2013). As lesões musculares podem ser provocadas por contusões, estiramentos ou lacerações. Mais de 90% das lesões no meio esportivo estão relacionadas à contusões ou estiramentos (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011).

O sucesso da regeneração de uma lesão muscular é dependente do indivíduo que sofreu a lesão, da extensão e natureza da mesma e que este processo envolve três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelação. A fase da inflamação (fase 1) é a fase caracterizada pelo processo inflamatório e a proliferação de células inflamatórias; a fase da proliferação (fase

2) é onde ocorre o reparo tecidual com a fagocitose do tecido necrótico, a regeneração das miofibrilas, produção de tecido cicatricial conectivo, neoformação vascular e crescimento neural. A fase de remodelação (fase 3) é responsável pela maturação das miofibrilas regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatricial, permitindo a recuperação funcional do músculo (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011).

O tempo de regeneração de uma lesão pode variar, e isto, depende da extensão e do grau da lesão, pois quando a lâmina basal permanece intacta, a regeneração completa pode ocorrer em sete dias; já, quando há rompimento da lâmina basal, destruindo-a extensivamente, o processo de regeneração pode se estender até 21 dias (SVERZUT; CHIMELLI, 1999).

Muito se discute sobre a necessidade de imobilização ou não do músculo lesionado logo após o trauma. A imobilização do tecido na fase aguda da lesão o protege de uma recidiva promovendo um tecido cicatricial mais resistente às forças de contração, porém traz consigo efeitos deletérios indesejáveis ao tecido. Assim, quando indicada, a imobilização não deve ser prolongada, limitando-se aos primeiros dias logo após a lesão (JÄRVINEN et al., 2005).

Alguns estudos indicam que quando imobilizado, o tecido musculoesquelético atrofia após 48 horas de imobilização e a partir do quarto dia, perdas estruturais podem ser encontradas (VAZEILLE; CODRAN, 2008; CARVALHO et al., 2009; KODAMA et al., 2012) uma vez que a imobilização traz consigo alterações como a hipotrofia muscular e a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular (CHINGUI et al., 2008).

Assim, algumas modalidades terapêuticas emergem como importantes agentes durante a reabilitação do tecido musculoesquelético que sofre uma lesão.

1.2 β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)

Existem hoje, várias categorias de suplementos nutricionais sendo comercializadas para diversas finalidades, como ganho de massa muscular, perdas de gordura corporal ou como suplemento energético (KREIDER et al., 2004).

A ingestão de uma dieta contendo proteínas promove aumento na taxa de síntese proteica corpórea total. Aminoácidos específicos podem funcionar como moléculas sinalizadoras, interferindo no *turnover* proteico e o aminoácido de cadeia ramificada leucina, possui a habilidade de estimular, independentemente, a síntese proteica *in vitro* (NUNES; FERNANDES, 2008).

Os efeitos anti-proteolíticos da suplementação com leucina tem sido relatado há tempos (BUSE; REID, 1975) e no geral, esta suplementação diminui a proteólise muscular esquelética, quando infundida intravenosamente, quando células musculares são incubadas na presença de leucina, ou quando há sua ingestão oralmente (LOUARD; BARRETT; GELFAND, 1995; COMBARET et al., 2005; NAKASHIMA et al., 2005).

O β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) é um metabólito derivado do aminoácido leucina (aminoácido essencial de cadeia ramificada) que tem sido utilizado na pesquisa clínica, esportiva e experimentação animal (ZANCHI et al., 2011). Ostaszewski et al. (2000) encontraram em seu estudo, aumento de 20% da síntese proteica e redução de 80% do catabolismo proteico em músculos de aves e ratos incubados na presença de HMB. O HMB também se tem mostrado capaz

de inibir a degradação e estimular a síntese proteica em ratos em estado de caquexia (SMITH et al., 2005).

O HMB tem sido apontado como um dos suplementos comercializados com eficácia evidenciada por diversos estudos, em condições de estresse patológico, mostrando ser capaz de atenuar a perda de massa muscular no câncer (MAY et al., 2002), na síndrome de imunodeficiência adquirida (CLARK et al., 2000) e na idade avançada (VUKOVICH; STUBBS; BOHLKEN, 2001), como também em condições de exercício ou de mudanças fisiológicas decorrentes do envelhecimento (NISSEN; SHARP, 2003).

Wilson et al. (2013) investigaram os efeitos da administração de HMB durante 16 semanas nas alterações funcionais relacionadas ao envelhecimento e nas dimensões das fibras musculares de ratos Fisher-344 com diferentes faixas etárias e observaram que a força muscular aumentou com a suplementação de HMB em animais idosos (de 86 à 102 semanas), e o HMB preveniu perdas de força em ratos jovens (de 44 à 60 semanas), e de massa muscular no músculo gastrocnêmio de ratos idosos.

As células satélites exercem papel determinante na regeneração muscular (GOPINATH et al., 2014). Alway et al. (2013) testaram a hipótese de que o HMB poderia aumentar a proliferação de células satélites durante recuperação muscular após período de desuso em animais senescentes (protocolo de 28 dias) e observaram que a suplementação de HMB preveniu o declínio funcional da produção de força isométrica máxima da flexão plantar e aumentou a proliferação de células satélites, acelerando o processo de regeneração.

Townsend et al. (2013) investigaram a eficácia da suplementação de HMB nos níveis circulantes do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), assim como a expressão do seu receptor nas células imunes em resposta ao dano muscular induzido por exercício. A suplementação atenuou os níveis de TNF- α e a expressão do seu receptor quando comparada ao placebo, o que significa que a suplementação de HMB deve atenuar a resposta imune inicial ao exercício intenso, reduzindo o tempo de recuperação. Hsieh et al. (2006) observaram em seu estudo que a suplementação de HMB (3g/dia) durante 7 dias promoveu efeitos anti-inflamatórios (diminuição de leucócitos, proteína C-reativa e creatinina) e melhorou a função pulmonar em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.

Park et al. (2013) verificaram que a suplementação de HMB durante condição catabólica de treinamento físico de longa duração atenuou a perda de força, a massa muscular do gastrocnêmio e a área de secção transversa do músculo. Desta forma a suplementação pode inibir o catabolismo de um programa de treinamento físico durante a reabilitação, promovendo elemento contrátil mais eficiente para o músculo esquelético.

Em relação às doses administradas, os estudos, em sua maioria, utilizam doses entre 1 e 3 g/indivíduo/dia (NISSEN; SHARP, 2003), porém há estudos com doses de 6 g/dia ou ainda, as doses podem ser ministradas de acordo com o peso dos indivíduos, podendo variar de 38 mg/kg/dia a 76 mg/kg/dia (VAN KOEVERING; NISSEN, 1992; PETERSON et al., 1999; GALLAGHER et al., 2000a).

Estudos em modelos animais não demonstraram efeito tóxico com doses maiores que 100g/dia, sendo utilizadas doses de 250 mg/kg, 340 mg/kg e até

480g/dia, (SMITH; MUKERJI; TISDALE, 2005; HAO et al., 2011; KIM et al., 2012). Foi demonstrado em um estudo de Baxter et al. (2005) que dietas com até 5% de HMB por 91 dias não provocaram mudança em parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados em ratos.

Diante de todos os benefícios do HMB mencionados na literatura, é possível que este seja capaz de contribuir positivamente para o tecido musculoesquelético em processo de regeneração após uma lesão.

1.3 A Natação

Alguns modelos de lesão experimental têm sido utilizados para examinar os mecanismos envolvidos na regeneração muscular, entre eles podem ser encontrados contusão, uso de substâncias químicas, venenos e criolesão. Esta última é capaz de produzir uma lesão em uma área delimitada do ventre muscular, é fácil de reproduzir e proporciona regeneração no tecido muscular (MIYABARA et al., 2006). A criolesão tem sido realizada em músculos superficiais, sendo o mais utilizado o músculo tibial anterior (TA).

A natação tem sido uma modalidade terapêutica muito utilizada na reabilitação de disfunções musculoesqueléticas (DEGANI, 1998; BRANCACCIO et al., 2005; PESTANA et al., 2011; PESTANA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014) e o exercício de natação para roedores é uma modalidade que recruta um grande volume de massa muscular e ao mesmo tempo é adequada aos animais, uma vez que a espécie possui a inata capacidade de adaptação rápida ao meio aquático (SEO et al., 2014).

O exercício aquático tem mostrado benefícios ao sistema musculoesquelético como a promoção do reparo tecidual devido ao aumento da circulação periférica, aumento no suprimento de oxigênio e nutrientes ao tecido muscular, redução de edemas e da sensibilidade dos terminais nervosos (MEDEIROS et al., 2004). A natação impõe carga ao aparelho locomotor devido às propriedades da água, e o músculo esquelético amplia a tensão máxima mediante hipertrofia através do aumento da área de secção transversa das fibras musculares (CAMPION, 1990; GONYEA, 1980; GOLLNICK et al., 1981).

Desta forma, o exercício de natação é uma forma terapêutica de atuar em lesões experimentais induzidas através da criolesão, uma vez que Roy et al. (1985) demonstram que o músculo tibial anterior, o mais utilizado em criolesões, é amplamente solicitado durante este exercício.

1.4 A Terapia por Laser de Baixa Intensidade (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT)

Também, com o objetivo de acelerar o processo de reparo do tecido muscular lesado e restabelecer sua função, outro recurso terapêutico tem sido bastante utilizado. A terapia por laser de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* - LLLT) proporciona melhora no reparo tecidual, na resposta inflamatória e no alívio da dor por meio dos efeitos bioquímicos e fisiológicos que atuam nos tecidos (ORTIZ et al., 2001). A LLLT tem demonstrado, mesmo em diferentes intensidades (3, 4, 10, 20, 50 J/cm²), efeitos positivos sobre o reparo muscular (COSTARDI et al., 2008; BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES, 2010; BRUNELLI et

al., 2014), favorecendo também o aumento da angiogênese e a formação de miotubos (JÄRVINEN et al., 2005).

Estudos tem sugerido que nos tecidos irradiados acontecem eventos fotoquímicos e fotofísicos, como o aumento da formação de mitocôndrias, levando a um aumento do nível de troca de energia celular (BAKEEVA et al., 1993; BARATTO et al., 2011).

Os efeitos do laser podem ser classificados em diretos e indiretos. Os diretos englobam os efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioestimulantes, e, os indiretos englobam aumento do trofismo local, efeito anti-inflamatório e analgesia, sendo estes promovidos através da estimulação da circulação. O LLLT também promove aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) mitocondrial e da síntese proteica, resultando em uma série de eventos como proliferação de fibroblastos, aumento da síntese de colágeno, da angiogênese e da formação de miotubos (CRUÃNES, 1984; AMARAL; PARIZOTTO; SALVINI, 2001; CRESSONI et al., 2008), além de inibir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, reduzir prostaglandinas e o estresse oxidativo no tecido muscular (FILLIPIN et al., 2005; GAVISH; PEREZ; GERTZ, 2006; ASSIS et al., 2012).

A terapia por LLLT tem demonstrado melhores resultados na redução da resposta inflamatória em relação a outros recursos, como o ultrassom (RENNÓ et al., 2011) e modulação a curto prazo na expressão de citocinas pró-inflamatórias como a redução dos níveis de TNF- α e do fator de transformação do crescimento (TGF- β), potentes fatores de crescimento envolvidos na resposta inflamatória, em modelo experimental após criolesão (MESQUITA-FERRARI et al., 2011).

1.5 Hipótese do Estudo

Diante da literatura pesquisada, não foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos da suplementação de HMB na regeneração muscular associados a diferentes modalidades terapêuticas como a natação e a LLLT. Assim sendo, seria uma estratégia promissora combinar a suplementação de HMB às terapias propostas, uma vez que a ocorrência de lesões musculares na prática clínica é importante e que o profissional atuante precisa ter cada vez mais conhecimento sobre os recursos disponíveis e eficazes para a reabilitação do tecido musculoesquelético e os mecanismos que envolvem a regeneração do mesmo.

Sendo assim, devido às propriedades anabólicas, anti-catabólicas, anti-inflamatórias e miogênicas do HMB mencionadas, a hipótese do presente estudo é de que a suplementação de HMB poderia contribuir para a capacidade de regeneração do tecido músculo esquelético, atuando em associação à diferentes modalidades terapêuticas - o exercício físico de natação e a LLLT.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da suplementação de HMB associada ou não ao exercício físico de natação e à LLLT na capacidade regenerativa do músculo tibial anterior de ratas adultas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a área de secção transversa, área de inflamação e regeneração, assim como a densidade do tecido conjuntivo intramuscular;
- Avaliar o comportamento das proteínas/citocinas: MyoD, miogenina, TNF- α e TGF- β na regeneração muscular;
- Avaliar os efeitos da suplementação de HMB isolado na regeneração muscular;
- Avaliar os efeitos das terapias de forma isolada ou associada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba (CEUA-UNIMEP), sob o protocolo nº 01/15 (ANEXO I).

3.2 Grupos Experimentais

Foram utilizadas 44 ratas da linhagem Wistar, com idade de 2 meses. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNIMEP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde (FACIS-UNIMEP), sob temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h, com água e ração *ad libitum* e alocados em gaiolas de polietileno, sendo estes divididos aleatoriamente em 10 grupos, conforme fluxograma abaixo (figura 1):

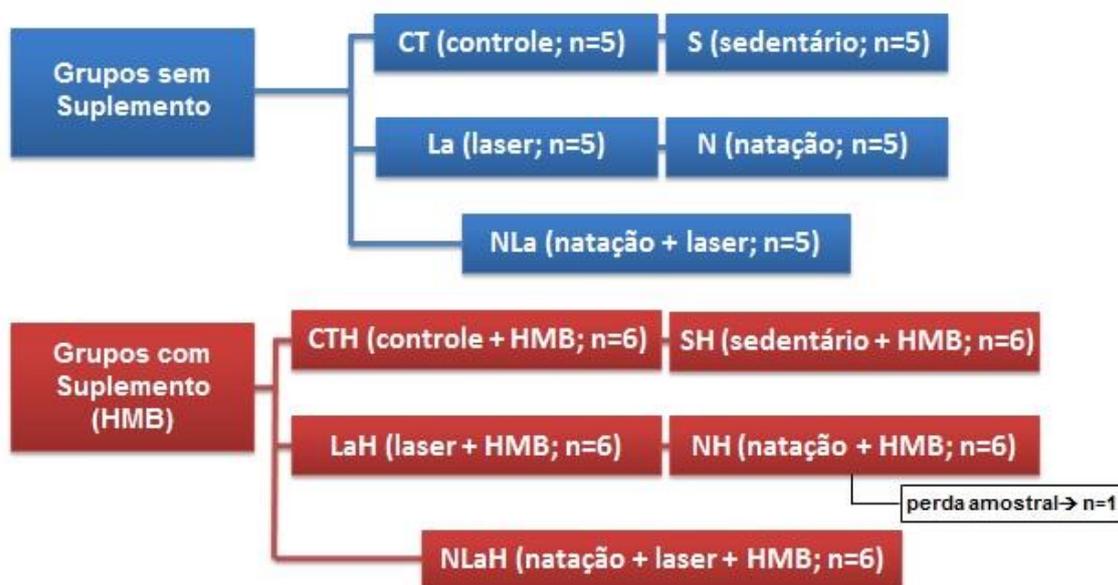


Figura 1 - Fluxograma de distribuição dos grupos experimentais.

Depois de divididos os grupos experimentais, os protocolos aplicados em cada um foram:

- **CT:** foi considerado grupo controle a pata contralateral à lesão (pata esquerda - não lesionada) dos animais pertencentes ao grupo sedentário;
- **S:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e mantidos no biotério, por um período de 21 dias;
- **La:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e à laserterapia de baixa intensidade em dias intercalados, por um período de 21 dias;
- **N:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e ao exercício de natação em dias intercalados, por um período de 21 dias;
- **NLa:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e à laserterapia de baixa intensidade associada ao exercício de natação em dias intercalados, por um período de 21 dias;
- **CTH:** foi considerado grupo CTH a pata contralateral à lesão (pata esquerda - não lesionada) dos animais pertencentes ao grupo sedentário (SH);
- **SH:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e mantidos no biotério, suplementados com HMB, por um período de 21 dias;
- **LaH:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e à laserterapia de baixa intensidade em dias intercalados, suplementados com HMB, por um período de 21 dias;

- **NH:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e ao exercício de natação em dias intercalados, suplementados com HMB, por um período de 21 dias;
- **NLaH:** animais submetidos à lesão do músculo tibial anterior direito e à laserterapia de baixa intensidade associada ao exercício de natação em dias intercalados, suplementados com HMB, por um período de 21 dias.

3.3 Procedimento de Lesão Muscular - Criolesão

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2 e aplicado em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após apresentar sinais de anestesia, a região a ser lesada foi tricotomizada e o músculo tibial anterior 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 muscular do músculo tibial anterior por 10 segundos; em seguida, foi imersa novamente em nitrogênio líquido por 30 segundos, e pressionada novamente no músculo no mesmo lugar anteriormente pressionado 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, alocados individualmente em gaiolas com ração e água *ad libitum* até sua recuperação.

3.4 Suplementação com β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB)

Os animais foram suplementados com β -Hidroxi- β -Metilbutirato diariamente a partir do dia do procedimento de criolesão até o 21º dia após a lesão. Foram preparadas doses de HMB na concentração de 320mg/kg de peso corporal, diluídos em 1,0 ml de água deionizada, administradas pela via orogástrica do animal (gavagem) de acordo com Pimentel et al. (2011).

A suplementação foi realizada sempre no mesmo período do dia, pela manhã, e pelo mesmo pesquisador, a fim de minimizar situações de estresse para o animal.

3.5 Protocolo de Natação

Os animais foram submetidos ao exercício de natação três vezes por semana, em dias intercalados. Inicialmente os animais foram submetidos a um protocolo de adaptação ao meio aquático, sendo colocados para nadar durante cinco minutos, acrescentando-se 10 minutos por semana, até completarem 60 minutos de natação, sendo este protocolo adaptado de um estudo de Nascimento et al. (2008).

O treinamento foi realizado em um aquário, de forma retangular, com um metro de comprimento, 40 cm de largura e 50 cm de altura, alocado no laboratório de pesquisa do Mestrado em Ciências do Movimento Humano (Figura 2), com sistema de aquecimento térmico e de drenagem de água, para troca da mesma conforme necessário. A temperatura da água foi controlada por meio de um

termômetro, a fim de mantê-la em $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a profundidade da água durante os treinamentos variou de 35 a 40 cm.

As sessões de treinamento foram realizadas sempre no período da tarde e depois de terminadas os animais foram secados com jato de ar quente e recolocados em suas respectivas gaiolas.

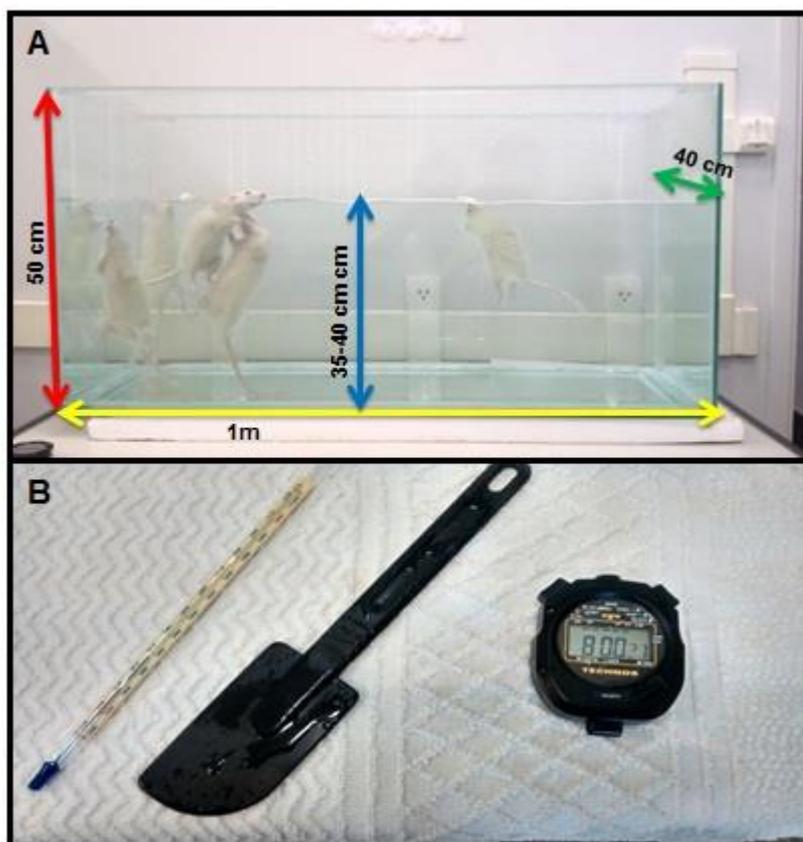


Figura 2 - Aquário utilizado nas sessões de natação (A). Termômetro, bastão para agitação da água e cronômetro para controle do tempo das sessões (B).

3.6 Protocolo de Laserterapia de Baixa Intensidade (LLLT)

Foi utilizado o laser de baixa intensidade de diodo AsGaAl com comprimento de onda de 830nm, potência de 30mW e densidade de energia de

20J/cm² (Pertille et al., 2012). Os animais foram submetidos às aplicações realizadas através da técnica pontual (em um único ponto) acima da área lesada, sendo os animais contidos manualmente por um pesquisador enquanto a aplicação do laser na área lesada foi realizada por outro pesquisador. Quando associado ao treinamento de natação, o laser foi aplicado anteriormente ao protocolo de natação, para que a pele úmida do animal não influenciasse na irradiação do mesmo.

O tratamento começou 24 horas após a lesão e foi realizado três vezes na semana, no período da tarde, em dias intercalados, durante 21 dias. Os animais receberam nove aplicações ao final do protocolo.

3.7 Eutanásia dos Animais

Ao término dos protocolos experimentais (21 dias), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cloridrato de cetamina (1,16 g/10 mL) e cloridrato de xilazina (2 g/100 mL), na proporção de 3:2, aplicado em dose de 0,09 e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente. Após sinais de anestesia geral, os animais foram perfundidos com PBS (perfusão cardíaca) e o músculo tibial anterior direito retirado, pesado e dividido em duas partes iguais, sendo uma parte destinada à técnica de microscopia de luz e a outra parte destinada à técnica de immunoblotting.

3.8 Análise Histológica

Parte do músculo tibial anterior direito de cada animal foi fixada em suporte de madeira com tragacanth 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, os músculos foram descongelados por aproximadamente 30 minutos até que chegaram à temperatura de -23° C. Então, foram seccionados transversalmente através de um micrótomo criostato (modelo HYRAX C 25 - Zeiss). Cortes transversais seriados com espessura de 10 μ m foram coletados para a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), que possibilita a análise da área de secção transversa (AST) das fibras musculares, da quantificação de fibras musculares e tecido conjuntivo (TC) e da presença de áreas de inflamação/regeneração (AI/R).

3.9 Análises dos Resultados - Morfometria

Para a análise da área de secção transversa (AST) das fibras musculares e densidade relativa de área do tecido conjuntivo (DRTC) foi utilizado o *software* de análise de imagens *Image Pró-Plus 6.2 (Media Cybernetics®)*, que capturou 8 fotos por animal de um corte histológico, em uma objetiva de 20x. Para a análise da porcentagem de infiltrado inflamatório e área de inflamação/regeneração (AI/R) foi utilizado o *software* de análise de imagens *Image J® (The National Institute of Health, EUA)*, em que um corte por animal foi escolhido para ser fotografado em uma objetiva de 4x.

Para todas as variáveis medidas foi utilizado um microscópio de luz (*Nikon®*) que possibilitou a escolha dos cortes histológicos e captura das fotos para a análise.

Para a análise da medida de AST, foi utilizada uma grade com 70 intersecções sobreposta às fotos e as fibras musculares selecionadas pelos pontos de intersecção foram escolhidas para mensuração, até que se completassem 250 fibras por animal. Para a análise da DRTC foi utilizada uma grade com 88 intersecções sobreposta às fotos e todos os pontos de intersecção que caíram sobre o tecido conjuntivo foram contados. Estes pontos de intersecção foram calculados em relação ao número total de intersecções, e, expressos em percentagem.

As imagens permaneceram cegadas até que todas as medidas de AST e DRTC fossem concluídas.

A figura 3 ilustra as análises das medidas da AST e DRTC.

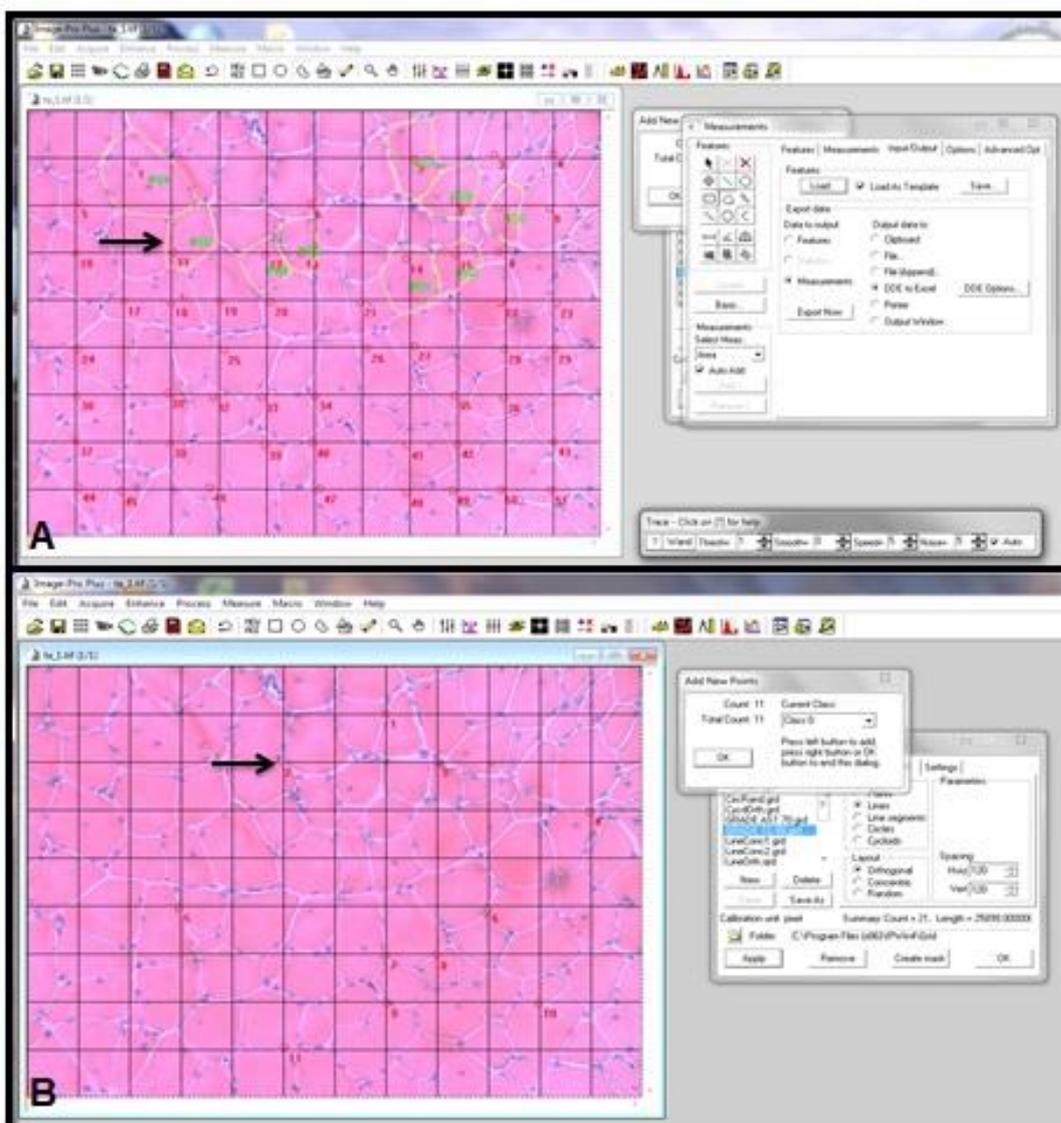


Figura 3 - Procedimento de análise das medidas da AST das fibras musculares (A) e da DRTC (B) do músculo tibial anterior através do software *Image Pro-Plus 6.2* (Media Cybernetics®). → = medidas de AST e DRTC.

Para a medida da AI/R, após capturada a foto do corte inteiro do músculo tibial anterior por animal, na objetiva de 4x, foi realizada uma medida do tamanho total do corte e em seguida da área de inflamação/regeneração, sendo esta expressa em porcentagem em relação à área total (Figura 4).

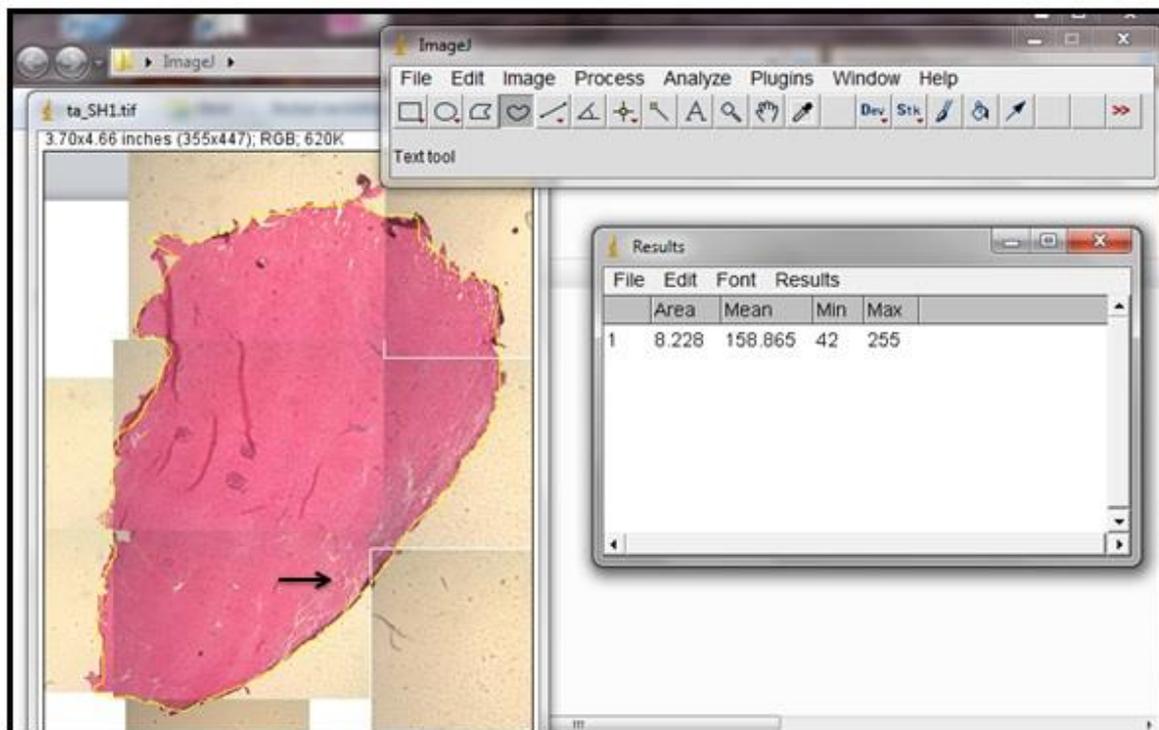


Figura 4 - Procedimento de análise das medidas da AI/R dos cortes histológicos do músculo tibial anterior através do software *Image J*® (*The National Institute of Health, EUA*). → = área de inflamação.

Todos os valores coletados foram organizados em um documento de banco de dados no Excel, de forma a possibilitar a quantificação dos dados e realização da análise estatística.

3.10 Técnica de Immunoblotting

3.10.1 Preparação do Extrato Total

O músculo tibial anterior foi cortado em pequenos pedaços e homogeneizado em tampão específico, com volume variando entre 600 a 1000 uL, a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total.

3.10.2 Eletroforese

As amostras dos extratos proteicos foram tratadas com tampão Laemmli, acrescido de ditioneitol 100 mM e aquecidas banho seco por cinco minutos. Em seguida, 50 µg de proteína foram aplicadas em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean). Foram obtidos três extratos protéicos por grupo, resultando em 12 géis. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizado em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal contendo 5% de leite desnatado, por uma hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10 µg de anticorpo primário 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 por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de

quimioluminescência (Pierce) por cinco minutos e, em seguida, o sinal fluorescente foi captado no equipamento G-Box (GeneSys).

Após obtenção de bandas, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com 10mL de *Stripping Buffer* (10mM Tris-HCl pH 7,5; β -*Mercaptoethanol* 0,1M; Uréia 8M) durante uma hora, à 60° C. Posteriormente as membranas foram incubadas em Tris-HCl 1M pH 7,5 por 30 min para neutralizar o *stripping*, lavadas com solução basal e processadas conforme descrito previamente para marcação da proteína gliceraldeído 3-fosfato de hidrogenase (GAPDH). Esta é uma proteína de controle interno, pois a quantidade desta proteína não se altera em diferentes condições fisiológicas.

3.10.3 Anticorpos

Anticorpos Primários

- MyoD (m-318), rabbit policlonal, Santa Cruz: sc-760;
- Miogenina, mouse monoclonal, Sigma, M5815;
- TNF- α (Tumor Necrosis Factor alfa), mouse monoclonal, Sigma, T0157;
- TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta), mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, T7039;
- GAPDH (Glicealdeido 3-fosfato dehidrogenase), mouse monoclonal, Santa Cruz, SC-59540.

Anticorpos Secundários

- Goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2004;

- Goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz: sc-2005.

As bandas observadas na técnica de immunoblotting foram captadas no sistema G-Box (GeneSys), salvas como imagem e a quantificação da densitometria óptica foi realizada pelo programa *Image J*[®]. Os dados foram apresentados como unidades arbitrárias, obtidos pelos valores da proteína estudada dividido pelo GAPDH.

3.11 Análise Estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Para as variáveis que apresentaram normalidade foi realizado o teste *ANOVA-F* para análise de variância, seguida dos testes de *Tukey-HSD* para variáveis com homocedasticidade e *Tamhane* para as variáveis não-homocedásticas; para as variáveis que não apresentaram normalidade foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para todos os testes foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$. Os aplicativos utilizados foram o *BioEstat* versão 5.0 e o *IBM[®]SPSS[®] STATISTICS (software statistical package for the social sciences) for windows* versão 20.

4. RESULTADOS

4.1 Massa Corporal e Peso Muscular

A massa corporal dos animais e o peso do músculo tibial anterior (TA) foram similares entre os grupos avaliados, como observado na tabela 1.

Tabela 1: Média e desvio padrão da massa corporal e do peso do músculo tibial anterior (TA) em gramas (g) dos animais dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH.

Grupos	Massa Corporal (g)	Peso TA (g)
CT	256,26 ±34,83	0,480 ±0,04
CTH	257,50 ±24,81	0,487 ±0,03
S	256,26 ±34,83	0,450 ±0,03
SH	257,50 ±24,81	0,466 ±0,04
La	262,24 ±25,21	0,482 ±0,03
LaH	288,0 ±38,53	0,551 ±0,10
N	263,50 ±18,41	0,477 ±0,04
NH	275,62 ±27,05	0,513 ±0,04
NLa	272,56 ±25,29	0,505 ±0,04
NLaH	261,93 ±30,61	0,566 ±0,05

4.2 Quantificação da densidade relativa do tecido conjuntivo (DRTC) e área de secção transversa (AST)

Os dados referentes à DRTC demonstram que a suplementação com HMB favoreceu o aumento significativo ($p < 0,05$) de tecido conjuntivo nos grupos que receberam as intervenções isoladas ou associada (LaH, NH, NLaH) quando comparado ao controle (CTH). Além disso, os grupos S e N também apresentaram

aumento significativo ($p < 0,05$) da DRTC quando comparados ao controle (CT), como observado na tabela 2.

Quando comparado os grupos CT e CTH não foi observado diferença significativa.

Tabela 2: Análise comparativa da densidade relativa do tecido conjuntivo (% DRTC) do músculo tibial anterior (TA) dos animais dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH. Valores expressos em porcentagem.

Grupos	% DRTC - Mediana	Q1-Q3	Intervalo Interquartílico
CT	14,5	11,9 - 15,6	5
CTH	18,1	18 - 18,7	2,1
S	22,7 * †	22,3 - 28,9	7,7
SH	24,3 *	19,5 - 28,3	12,9
La	19,2	18,2 - 24,6	7,9
LaH	24,5 * †	22,6 - 28,6	10,6
N	20,2 *	20 - 20,3	5,9
NH	25,3 * †	20,8 - 29,8	11,2
NLa	18,8	16,2 - 22	7,1
NLaH	25,1 * †	21,3 - 31,6	14,8

* difere de CT ($p < 0,05$); † difere de CTH ($p < 0,05$); Q1= primeiro quartil; Q3= terceiro quartil.

Na tabela 3, pode-se observar que em relação às medidas da AST não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3: Análise comparativa da área de secção transversa (AST) do músculo tibial anterior (TA) dos animais dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH. Valores expressos em μm^2 .

Grupos	AST (μm^2) - Mediana	Q1-Q3	Intervalo Interquartilico
CT	2709,6	2418,9 - 2752,5	536,1
CTH	2289,9	1841,8 - 2488,2	822,6
S	1805	1757,8 - 2637,6	966,9
SH	1912,1	1790,1 - 2136,8	684,1
La	1553	1513,5 - 2131,6	1007,4
LaH	1890,9	1724,4 - 2304,2	810,6
N	1981,3	1530,2 - 2069,1	573,7
NH	1721,4	1691,2 - 2021	533,3
NLa	2007,1	1918 - 2588,7	2211,8
NLaH	2144,9	1666 - 2582	1100,1

Q1= primeiro quartil; Q3= terceiro quartil.

Na figura 5 é possível visualizar os cortes histológicos do músculo tibial anterior de todos os grupos. Nos grupos controle (CT e CTH) pode-se notar que as fibras musculares apresentam um formato poligonal, com núcleos periféricos caracterizando um tecido íntegro, sem lesão. Nos demais grupos, pode-se observar a presença de fibras musculares com tamanhos diversificados, em processo de regeneração, pois apresentam núcleos centralizados, aumento de tecido conjuntivo intramuscular e presença de infiltrados inflamatórios no tecido, o que evidencia um processo de lesão em fase de recuperação.

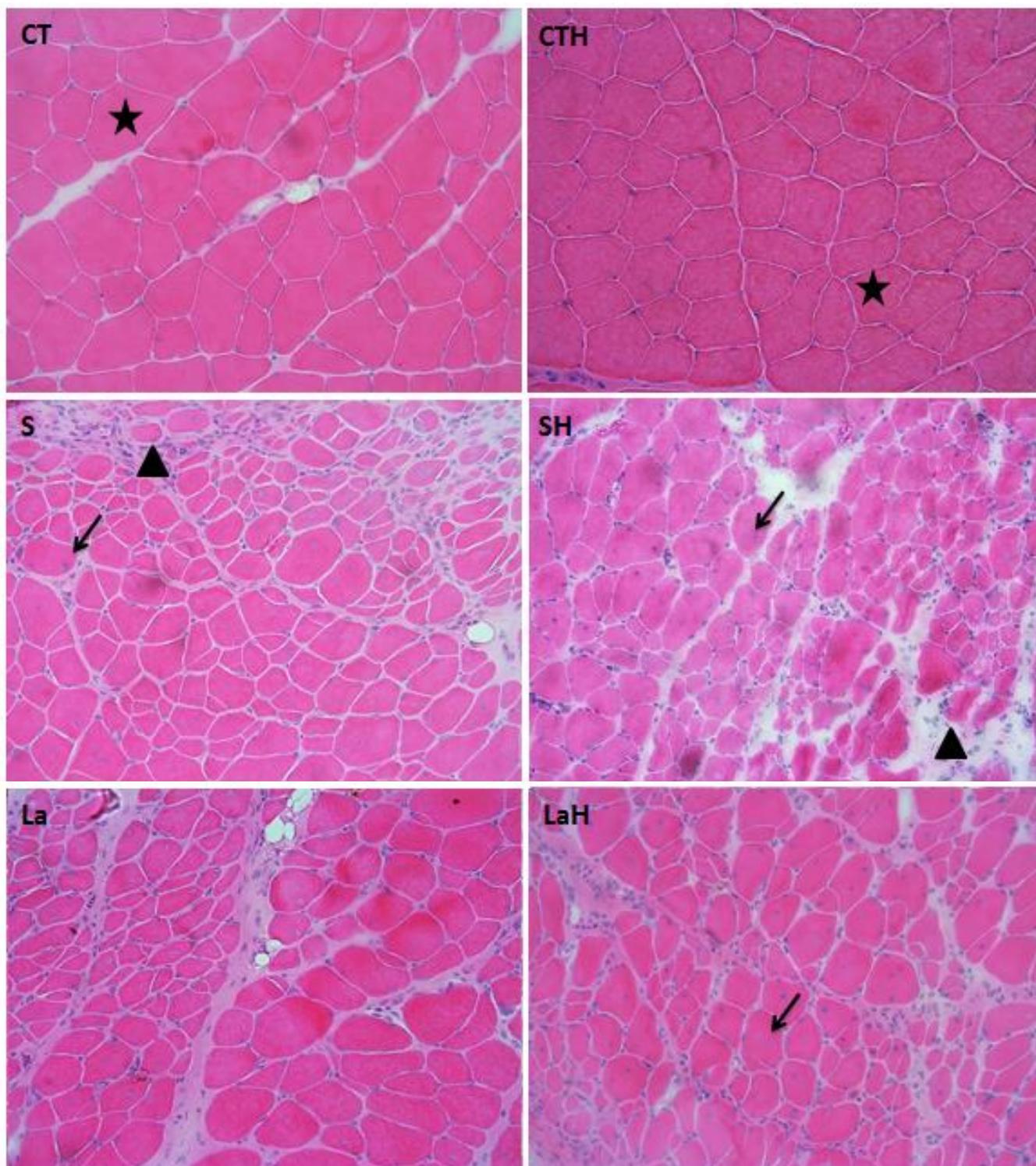


Figura 5 - Imagens dos cortes transversais histológicos do músculo tibial anterior dos grupos CT, CTH, S, SH, La e LaH. Imagens obtidas através do software *Image Pró-Plus 6.2* (*Media Cybernetics*®), com objetiva de 20x. ★ = fibra muscular íntegra com núcleos periféricos; ▲ = infiltrado inflamatório; → = fibra muscular em regeneração com núcleo centralizado.

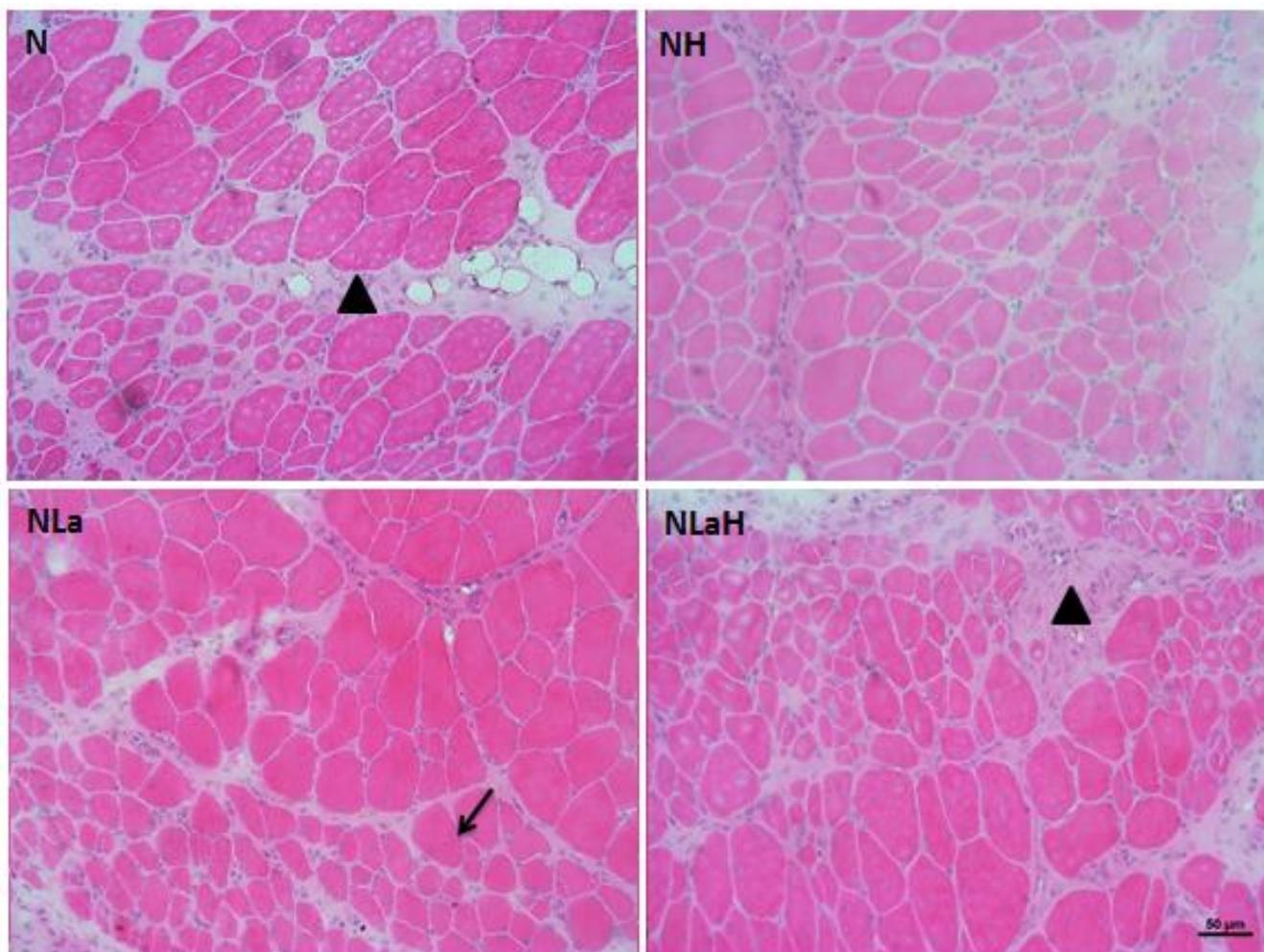


Figura 5 (continuação) - Imagens dos cortes transversais histológicos do músculo tibial anterior dos grupos N, NH, NLa e NLaH. Imagens obtidas através do software *Image Pró-Plus 6.2 (Media Cybernetics®)*, com objetiva de 20x. ▲ = infiltrado inflamatório; → = fibra muscular em regeneração com núcleo centralizado.

4.3 Quantificação da área de Inflamação/Regeneração (AI/R)

Os resultados mostram que a suplementação com HMB reduziu significativamente a AI/R ($p < 0,05$) no grupo NH quando comparado ao N. Ao avaliar o efeito entre as terapias na AI/R, observa-se que o grupo NLa apresentou redução significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao N (tabela 4).

Tabela 4: Análise comparativa da área de Inflamação/Regeneração (AI/R) do músculo tibial anterior (TA) dos animais dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH. Valores expressos em porcentagem.

Grupos	AI/R (%) - Mediana	Q1-Q3	Intervalo Interquartilico
S	8,8	8,4 - 12,6	8,2
SH	3,8 * †	0,008 - 7,6	9,4
La	12,0	10,3 - 15,9	9,8
LaH	9,5 *	7,5 - 12	7,2
N	16,8	16,3 - 23,7	17,2
NH	3,2 * †	0,007 - 9,4	10,8
NLa	7,1 *	0,007 - 9,1	14,2
NLaH	6,5 *	1,3 - 10,4	12

* difere de N ($p < 0,05$); † difere de La ($p < 0,05$); Q1= primeiro quartil; Q3= terceiro quartil.

4.4 Quantificação do Immunobloting

A figura 6 representa a quantificação da proteína MyoD em todos os grupos. Como pode ser observado não houve diferença entre os grupos em relação a esta variável. A figura 7 representa a quantificação da proteína Miogenina em todos os grupos. Nesta última, também não houve diferença entre os grupos.

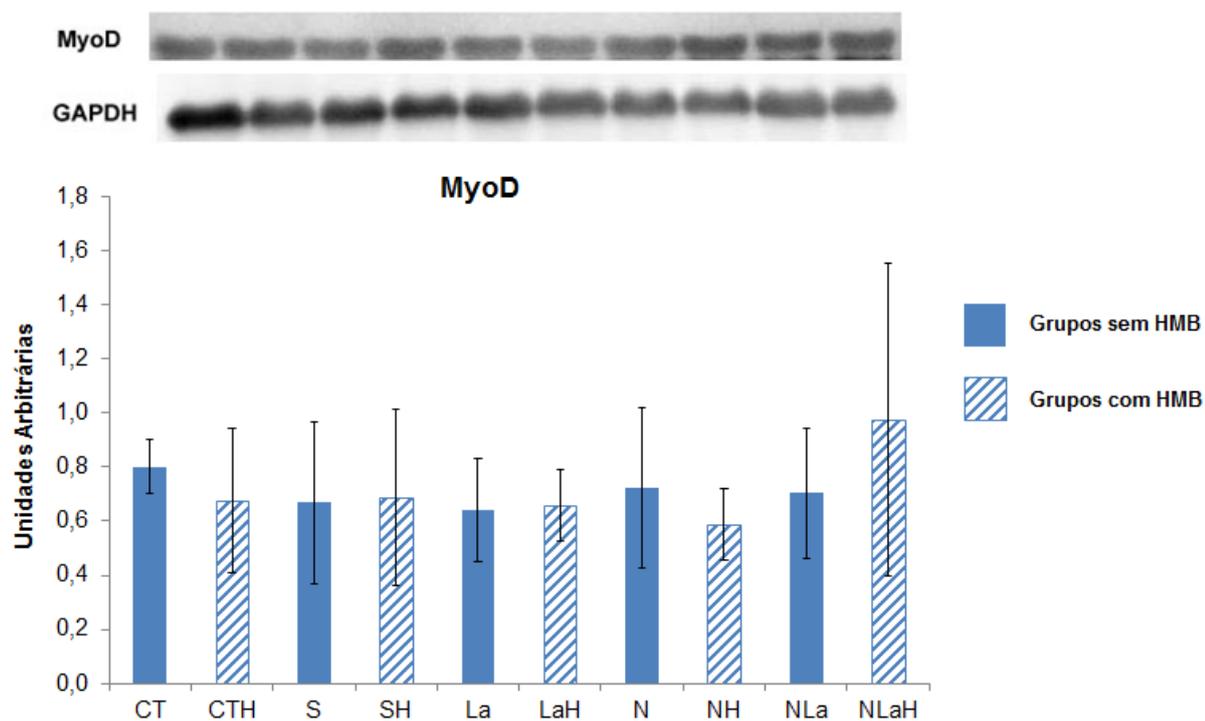


Figura 6 - Medidas do conteúdo de MyoD do músculo tibial anterior dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH.

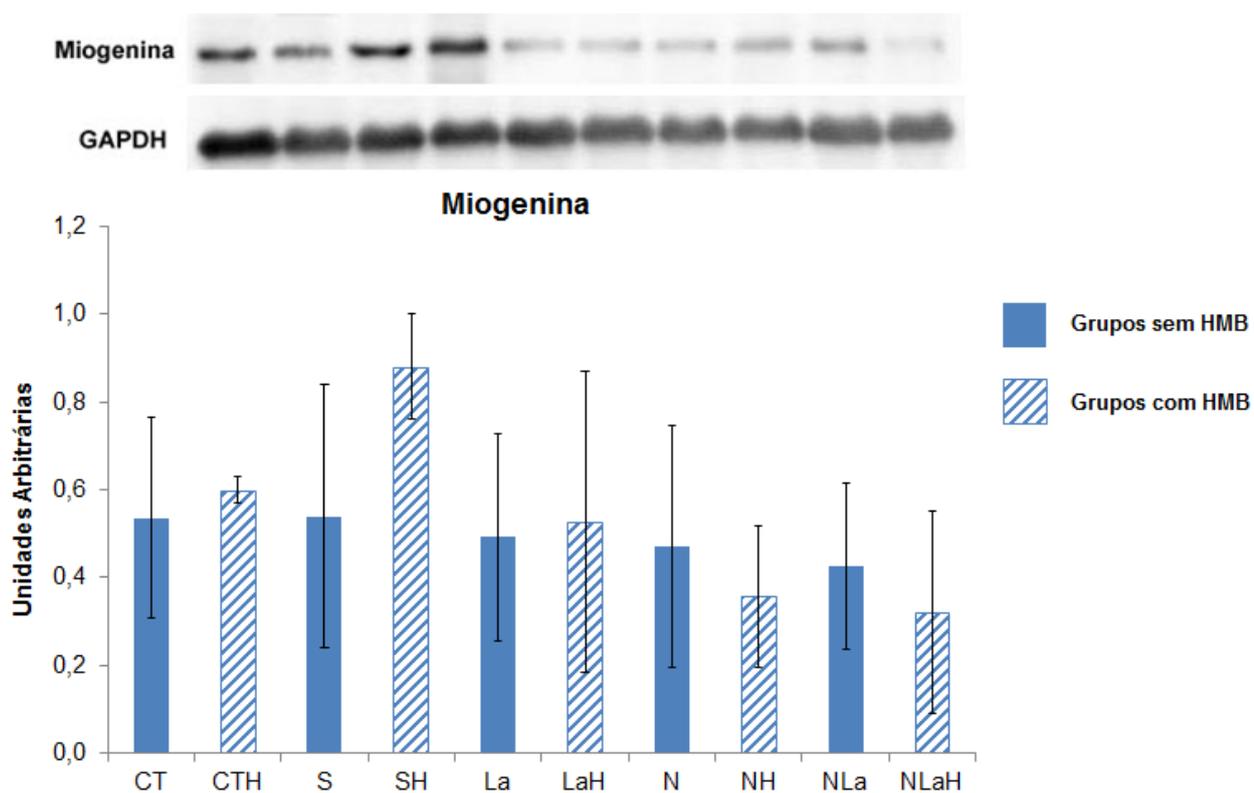


Figura 7 - Medidas do conteúdo de Miogenina do músculo tibial anterior dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH.

Na figura 8 observam-se os valores referentes ao TNF- α em todos os grupos avaliados. O grupo SH apresentou maior conteúdo de TNF- α quando comparado aos demais ($p < 0,05$), com exceção do NLaH, onde o conteúdo foi similar. O grupo NH apresentou redução significativa ($p < 0,05$) do conteúdo da citocina em relação ao grupo NLaH.

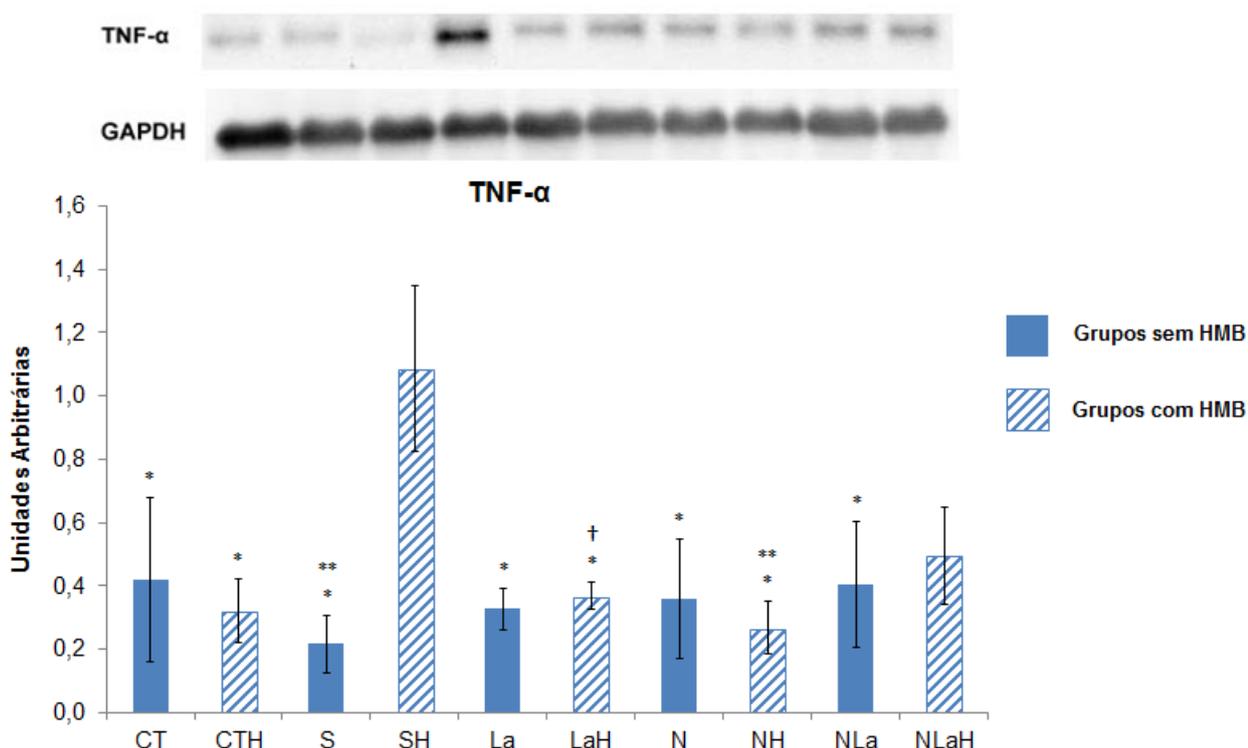


Figura 8 - Medidas do conteúdo de TNF- α do músculo tibial anterior dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH. * difere de SH ($p < 0,05$); ** difere de NLaH ($p < 0,05$); † difere de S ($p < 0,05$);

Em relação à quantificação do TGF- β 1, os resultados mostram que o grupo SH apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) do conteúdo da citocina quando comparado aos grupos CTH e NH, como também quando comparado ao grupo S. O grupo CTH apresentou redução significativa ($p < 0,05$) do TGF- β 1 quando comparado aos grupos SH, LaH e NLaH (figura 9).

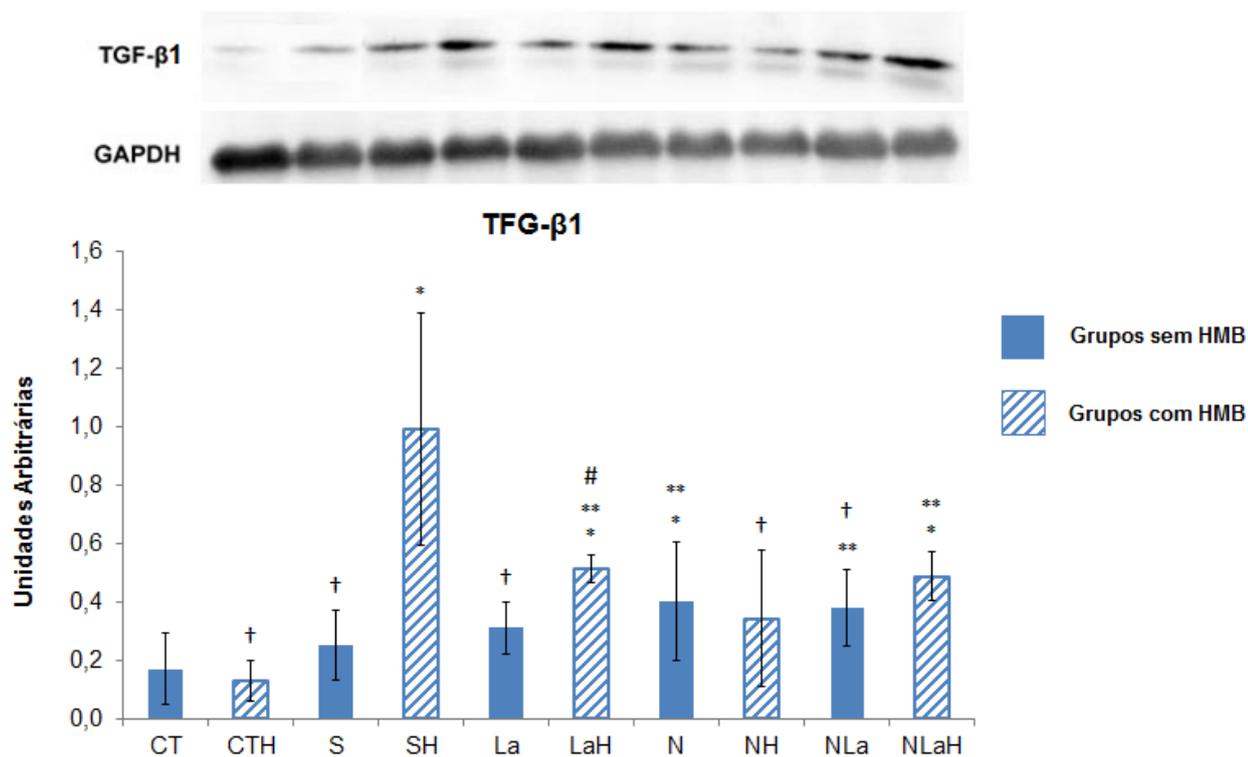


Figura 9 - Medidas do conteúdo de TGF-β1 do músculo tibial anterior dos grupos CT, CTH, S, SH, La, LaH, N, NH, NLa e NLaH. * difere de CT ($p < 0,05$); ** difere de CTH ($p < 0,05$); † difere de SH ($p < 0,05$); # difere de S ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a massa corporal dos animais, o peso muscular, a AST e o conteúdo das proteínas MyoD e Miogenina foram similares entre os grupos, indicando que a suplementação com o HMB não favoreceu a regeneração da fibra muscular.

Em relação ao tecido conjuntivo, os animais suplementados com HMB apresentaram maior porcentagem de tecido conjuntivo nos grupos que receberam as intervenções isoladas ou associadas, sugerindo maior tendência a formação de fibrose. O grupo sedentário suplementado (SH) apresentou maior conteúdo de TNF- α indicando a efetividade das intervenções na fase inicial da regeneração.

O protocolo escolhido para o presente estudo considerou que o tempo médio para a recuperação do músculo esquelético após lesão é de 21 dias, que corresponde à fase final de remodelação onde há a maturação das miofibrilas e organização da matriz extracelular, levando a restauração da capacidade funcional do músculo lesado (JÄRVINEN et al., 2005)

A frequência do exercício de natação buscou a proximidade com seres humanos, sendo realizado três vezes na semana, 60 minutos por sessão, sem carga e com um acúmulo de 180 minutos semanais, baseado nas recomendações da OMS para adultos entre 18-64 anos (WHO, 2011), caracterizando uma atividade de leve a moderada.

Estudos apontam que um protocolo de treinamento mais intenso, de 90 min/dia, 6 vezes por semana, não apresenta diferença significativa tanto nos

aspectos morfológicos, quanto na expressão de fatores miogênicos em animais jovens submetidos à criolesão (PESTANA et al., 2011; PESTANA et al., 2012).

Para seguir a mesma frequência de aplicação do exercício de natação e considerando os resultados positivos na regeneração muscular após criolesão no estudo de Mesquita-Ferrari et al. (2011), que utilizaram de laser de diodo de AsGaInP (660 nm), a frequência de 3 vezes na semana também foi estabelecida para os grupos LLLT.

5.1 Massa corporal e peso muscular

A suplementação com HMB é capaz de aumentar a massa magra e aumentar a massa corporal em humanos, no período de três semanas de suplementação (JÓWKO et al., 2001). O aumento da massa corporal também tem sido observado em estudos com animais submetidos à suplementação com HMB durante oito semanas, com uma dose de 76 mg/ kg de peso corporal por dia (NUNES et al., 2008).

Nissen et al. (1996) avaliaram os efeitos da suplementação com HMB sobre os parâmetros musculares em humanos e concluíram que sete semanas de suplementação com uma dose de 3 gramas diárias associado a treinamento de força durante seis vezes por semana proporcionou aumento significativo da massa magra. Panton et al. (2000) avaliaram homens e mulheres por quatro semanas que receberam suplementação de HMB na dose de 3 gramas diárias, submetidos ao treinamento de força três vezes na semana, e observaram em seu estudo um ganho significativo de massa magra independente do gênero ou do nível de treinamento.

Em outro estudo, foi avaliado o efeito de 30 dias de suplementação diária com HMB (320 mg/kg de peso corporal), na hipertrofia muscular e na expressão de proteínas envolvidas na sinalização insulínica em ratos saudáveis e sedentários e foi constatado que a suplementação induziu um aumento significativo no peso do músculo sóleo e extensor longo dos dedos (PIMENTEL et al., 2011).

O protocolo proposto no presente estudo suplementou os animais por 21 dias, tempo inferior aos estudos citados anteriormente. Além disso, o tipo de protocolo de recuperação utilizado (natação e LLLT) não caracterizam terapias que estimulam a hipertrofia muscular. Esses fatores podem explicar os resultados similares entre a massa corporal e peso do músculo tibial anterior nos grupos avaliados.

Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2014) que avaliaram os efeitos da suplementação de leucina em animais submetidos à criolesão e observaram, 10 dias após o protocolo de lesão, que o peso corporal manteve-se inalterado em todos os animais estudados.

5.2 DRTC e TGF- β 1

Os dados referentes à DRTC demonstram que a suplementação com HMB favoreceu o aumento do tecido conjuntivo nos grupos que receberam as intervenções isoladas ou associadas (LaH, NH, NLaH) quando comparado ao controle (CTH). Tal fato foi confirmado com o aumento do conteúdo da citocina TGF- β 1 nos grupos LaH e NLaH quando comparado ao controle (CTH).

Williams, Abumrad e Barbul (2002) analisaram o efeito da suplementação de aminoácidos especializados, com uma mistura de arginina, glutamina e HMB, sobre o acúmulo de colágeno em feridas de humanos com 70 anos ou mais e observaram um aumento significativo na deposição de colágeno nas feridas tratadas, após 2 semanas de suplementação.

O TGF- β 1 é uma importante citocina que atua na síntese e remodelação da matriz extracelular, sendo comumente utilizada para investigar a formação de fibrose (HELDIN; MIYAZONO; DIJKE, 1997).

O comportamento da citocina TGF- β 1 na regeneração de músculo gastrocnêmio de ratos foi avaliado nos períodos de 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias após contusão e tratamento com LLLT GaAIs (635 nm, 17,5 mW/cm², 20 minutos por sessão, por 10 dias consecutivos). Os resultados apontam redução no conteúdo da citocina no 3º e 28º dia e aumento do conteúdo no 7º e 14º dia, mostrando que o LLLT modulou o TGF- β 1 durante o período experimental (LUO et al., 2013)

Mesquita-Ferrari et al. (2011) analisaram o efeito da LLLT na expressão de TGF- β após criolesão no músculo tibial anterior de ratos e tratamento com laser 660 nm (20 mW, 5 J/cm², 10 segundos por sessão, três vezes por semana, durante 7 e 14 dias) e observaram que a LLLT modula a curto prazo a expressão de citocinas, com a redução TGF- β .

Os dados indicam que a lesão muscular associada à suplementação de HMB pode favorecer o aumento do tecido conjuntivo no local da lesão, não sendo revertido pela aplicação da LLLT.

5.3 AST, MyoD e Miogenina

Os dados obtidos no presente estudo não mostraram diferenças significativas na AST dos grupos estudados, fato confirmado pelo conteúdo similar das proteínas MyoD e Miogenina.

A ativação e proliferação das células satélites é caracterizada pela expressão de MyoD, que aumenta seu conteúdo na fase inicial do processo de regeneração, atingindo seu pico três dias após a lesão (TIDBALL; VILALTA, 2010). Os músculos do presente estudo foram coletados 21 dias após a lesão, e, talvez por isso, não foram observadas diferenças no conteúdo de MyoD nos grupos avaliados.

Com o avançar da regeneração é expressa Miogenina, uma proteína que marca a fase de diferenciação das células satélites para formação de novos mioblastos. Em animais jovens, seu conteúdo apresenta aumento por volta do terceiro dia após a lesão, atingindo seu pico no sétimo dia, e normalizando em seguida (CORBU et al., 2010; SRIKUEA et al., 2010).

Kornasio et al. (2009) estudaram culturas de células de mamíferos e não-mamíferos expostos ao HMB durante 17 horas, e observaram que a MyoD foi elevada em resposta à adição de HMB de uma forma dependente da dose. Também, a adição de várias concentrações de HMB para mioblastos primários de frango privadas de soro durante 24 h, reforça os níveis dos fatores de diferenciação muscular, como a miogenina, com níveis mais elevados observados a doses de 100 µg / ml HMB. Também neste estudo, observou-se que o HMB reduziu a apoptose celular em torno de 30%, prevenindo o aparecimento de núcleos apoptóticos, sendo estes quase três vezes inferiores aos seus

respectivos controles. Estes dados sugerem a influência positiva do HMB no músculo através da promoção da proliferação e diferenciação e a redução da apoptose em culturas de mioblastos adultos.

Os resultados do presente estudo não evidenciaram diferenças do conteúdo de Miogenina entre os grupos, e, mais uma vez, isso pode ser devido ao tempo do experimento (21 dias).

Entretanto, os dados da AST indicam que o HMB não interferiu na regeneração muscular, e as terapias propostas de forma isolada ou associada não aceleraram a recuperação da AST, pois todos os grupos, incluindo o S atingiram o valor do controle.

5.4 AI/R e TNF- α

A área de inflamação e regeneração é caracterizada por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração. Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central (MARQUES et al., 2008). Tais áreas são evidentes no início da regeneração e no transcorrer do processo ocorre a redução do infiltrado inflamatório e aumento da AST das fibras musculares com os núcleos centralizados.

Os resultados mostram que a suplementação com HMB reduziu a AI/R no grupo NH quando comparado ao N. Tal resultado pode ser confirmado pela redução no conteúdo de TNF- α nos grupos CTH, LaH e NH quando comparado ao SH.

Estes resultados corroboram com os achados de Pereira et al. (2014), que estudaram os efeitos da suplementação de leucina na lesão muscular em ratos Wistar, na dose de 1,35 g / kg de peso corporal, diariamente, durante 1, 3 e 10 dias após a lesão, e observaram que a suplementação resultou em uma infiltração inflamatória menor e miofibras musculares maiores (40%) quando comparadas com o grupo lesado sem suplemento. Houve também uma diminuição na densidade da área de colágeno do tipo III no grupo suplementado (60%) em relação ao grupo lesado.

O TNF- α está envolvido no processo de inflamação na fase aguda (FRANCISCO; HERNÁNDEZ; SIMÓ, 2006) e durante a atividade física mais intensa, que gera lesão muscular, observa-se o aumento dos níveis plasmáticos de citocinas como TNF- α e interleucinas (IL-6) (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Eley, Russell e Tisdale (2008) investigaram a capacidade do HMB em atenuar a degradação de proteínas em miotubos murinos induzidas por TNF- α como um modelo de vírus da imunodeficiência humana (HIV) e observaram que os níveis de TNF- α foram atenuados com a administração de HMB, sugerindo que o HMB atenua o caminho da degradação de proteínas.

Outro estudo, examinou o efeito do HMB e da imersão em água fria sobre as concentrações de TNF- α e a expressão de receptores de TNF- α 1 circulante após exercício intenso, em indivíduos treinados, e encontraram uma variação do percentual não significativa de TNF- α para os grupos HMB e HMB associado à imersão em água fria em relação ao grupo placebo e o grupo que realizou apenas a imersão, sugerindo que o HMB pode atenuar a resposta imune inicial ao

exercício intenso, podendo reduzir o tempo de recuperação após a atividade (TOWNSEND et al., 2013).

Mesquita-Ferrari et al. (2011) analisaram o efeito da LLLT na expressão de TNF- α , após criolesão no músculo tibial anterior de ratos e tratamento com laser 660 nm, e observaram que a LLLT reduziu a expressão de citocina sete dias após a lesão, mas no 14^o dia pós-lesão os valores foram similares entre grupos tratado e não tratado.

Os resultados indicam que as terapias aplicadas de forma isoladas mostraram maior eficácia na redução do conteúdo de TNF- α , pois o grupo NLaH apresentou conteúdo similar ao SH.

A literatura descreve os mais diversos efeitos da suplementação com HMB no tecido musculoesquelético, destacando seus benefícios em condições patológicas, na prevenção de lesões, melhora do desempenho no esporte, na redução da proteólise, na ativação da síntese proteica, na redução da perda de massa muscular e atrofia, na proliferação de células satélites e na hipertrofia muscular. (AVERSA et al., 2011; ZANCHI et al., 2011; AVERSA et al., 2012; ALWAY; MYERS; MOHAMED, 2014). Porém, não foram encontrados na literatura pesquisada, estudos que avaliassem a combinação da suplementação com HMB com as terapias propostas neste estudo (LLLT e natação) e seu uso concomitante ao início do processo de regeneração muscular.

Como a presença de algumas citocinas, bem como o efeito de algumas terapias como a LLLT são mais evidentes no período agudo após a lesão, como

discutido anteriormente, pode-se sugerir que os achados do presente estudo são referentes ao período crônico da lesão.

Assim sendo, provavelmente o tempo de suplementação (21 dias) e a falta de grupos intermediários, como sete dias pós-lesão (fase aguda), limitaram a melhor interpretação dos efeitos do HMB associado às terapias no processo de regeneração muscular após criolesão.

O uso das intervenções em fases distintas da regeneração muscular, como a LLLT na fase aguda e o exercício de natação na fase crônica deve ser investigado.

6. CONCLUSÃO

A suplementação com HMB por 21 dias não foi suficiente para estimular a hipertrofia no grupo controle ou acelerar a recuperação da AST nos grupos lesados nas condições experimentais propostas no estudo. O uso da suplementação de HMB durante o processo de regeneração muscular pode favorecer o aumento do tecido conjuntivo no local da lesão, não sendo revertido pela aplicação da LLLT.

Entretanto, destaca-se que as terapias aplicadas de forma isolada mostraram maior eficácia na redução do conteúdo de TNF- α , quando associada à suplementação de HMB, sugerindo um efeito positivo da suplementação durante a fase inflamatória.

REFERÊNCIAS*

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.

ALWAY, S.E.; MYERS, M.J.; MOHAMED, J.S. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 1-15, 2014.

AMARAL, C.A.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci**, v. 16, p. 44-51, 2001.

ASSIS, L.; MORETTI, A.I.S.; ABRAHAO, T.B.; CURY, V.; SOUZA, H.P.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v. 44, n. 9, p. 726-735, 2012.

ASSIS, L.; MORETTI, A.I.S.; ABRAHÃO, T.B.; DE SOUZA, H.P.; HAMBLIN, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v.28, p. 947-955, 2013.

AVERSA, Z.; BONETTO, A.; COSTELLI, P.; MINERO, V.G.; PENNA, F.; BACCINO, F.M. et al. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. **Int J Oncol**, v. 38, p. 713–720, 2011.

AVERSA, Z.; ALAMDARIA, N.; CASTILLERO, E.; MUSCARITOLI, M.; FANELLI, F.R.; HASSELGRENA, P.O. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, n. 4, p. 739–743, 2012.

BAKEEVA, L.E.; MANTEIFEL, V.M.; RODICHEV, E.B.; KARU, T.I. Formation of gigantic mitochondria in human blood lymphocytes under the effect of an He-Ne laser. **Mol Biol**, v. 27, n. 3, p. 608-617, 1993.

* Baseadas na norma NBR 6023, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BARATTO, L.; CALZÀ, L.; CAPRA, R.; GALLAMINI, M.; GIARDINO, L.; GIULIANI, A., et al. Ultra-low-level laser therapy. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 103-112, 2011.

BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. **Comprehensive Physiology**, v.3, p.1645-1687, 2013.

BRANCACCIO, N.; KLEIN, A.A.; BÖETTICHE, G.A.; COLLA, P.H.S.; MACHADO, D.M.; MOSER, G.R.; SILVA, E.R. Análise de lesão muscular em ratos treinados e sedentários submetidos a crioterapia. **Fisioterapia em Movimento**, v. 18, n. 1, p. 59-65, 2005.

BRUNELLI, R.M.; RODRIGUES, N.C.; RIBEIRO, D.A.; FERNANDES, K.; MAGRI, A.; ASSIS, L., et al. The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v. 29, p. 91-96, 2014.

BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas em ratos. **Rev Bras Fisiot**, v.14, n.1, p. 45-51, 2010.

CAMPION, M.R. Adult Hydrotherapy: a practical approach. Oxford: Heinemann medical Books, 1990.

CARVALHO, L.C.; POLIZELLO, J.C.; PADULA, N.; FREITAS, F.C.; SHIMANO, A.C.; MATIELLO-SVERZUT, A.C. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletro estimulado pós-imobilização, **Acta Ortop Bras**, v. 17, n. 5, p. 269-272, 2009.

CHARGÉ, S.B.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n.1, p. 209-238, 2004.

CHINGUI, L.J.; BRAQUINHO, R.P.; SEVERI, M.T.M.; SILVA, C.A. Comportamento quimiometabólico do músculo sóleo na fase aguda da imobilização articular. **Fisiot Pesq**, v. 15, n. 2, p. 194-199, 2008.

CORBU, A.; SCARAMOZZA, A.; BADIALI-DEGIORGI, L.; TARANTINO, L.; PAPA, V.; RINALDI, R.; et al. Satellite cell characterization from aging human muscle. **Neurol Res**, v.32, n.1, p.63-72, 2010.

COSTARDI, C.H.Z.; TAMACHIRO, C.; ESTEVES-JÚNIOR, I; GOMES, A.C. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. *Fisioter Mov*, v. 21, n. 2, p. 21-30, 2008.

CRESSONI, M.D.; DIB GIUSTI, H.H.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A. The effects of a 785 nm AlGaInP laser on the regeneration of rat anterior tibialis muscle after surgically-induced injury. *Photomed Laser Surg.*, v. 26, p. 461-466, 2008.

CRUÃNES, J.C. **La Terapia Laser Hoy**. Barcelona, Centro Documentation laser the Meditec. 1984, p.164.

DAWOOD, M.S.; AL-SALIHI, A.R.; QASIM, A.W. Laser therapy of muscle injuries. *Lasers Med Sci*, v. 28, n. 3, p. 735-742, 2013.

DEGANI, A.M. Hidroterapia: os efeitos físicos, fisiológicos e terapêuticos da água. *Fisioter Mov*, v. 11, n. 1, p.91-106, 1998.

ELEY, H.L.; RUSSELL, S.T.; TISDALE, M.J. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II by β -hydroxy- β -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 295, p. 1417-1426, 2008.

FILLIPIN, L.I.; MAURIZ, J.L.; VEDOVELLI, K.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; LECH, O.; MARRONI, N.P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Low-level laser therapy (LLL) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. *Lasers Surg Med*, v. 37, n. 4, p. 293-300, 2005.

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipidemia. *Clin Chim Acta*, v.369, p.1-16, 2006.

GOLLNICK, P.D.; TIMSON, B.F.; MOORE, R.L.; RIEDY, M. Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscles of rats. *J Appl Physiol*, v. 50, p. 936-943, 1981.

GONYEA, W.J. Role of exercise in inducing increases in skeletal muscle fiber number. *J Appl Physiol*, v. 48, p. 421-426, 1980.

GOPINATH, S.D.; WEBB, A.E.; BRUNET, A.; RANDO, T.A. FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 4, p. 414-426, 2014.

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. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, p. 701-715, 2011.

HELDIN, C.H.; MIYAZONO, K.; DIJKE, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v.390, p.465-471,1997.

HSIEH, L.C.; CHIEN, S.L.; HUANG, M.S.; TSENG, H.F.; CHANG, C.K. Anti-inflammatory and anti-catabolic effects of short-term beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. **Asian Pacific Journal Clinical Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 544-550, 2006.

JÄRVINEN, T.A.; JÄRVINEN, T.L.N.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: Biology and treatment. **Am J Sports Med**, v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

JÓWKO, E.; OSTASZEWSKI, P.; JANK, M.; SACHARUK, J.; ZIENIEWCZ, A.; WILCZAK, J.; NISSEN, S. Creatine and β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. **Nutrition**, v. 17, n. 7-8, p. 558-566, 2001.

KIM, J.; PARK, Y.; LEE, S.; MASAD, I.S.; KHAMOUI, A.V.; JO, E.; PARK, B.; ARJMANDI, B.H.; PANTON, L.B.; LEE, W.J.; GRANT, S.C. β -Hydroxy- β -Methylbutyrate Did Not Enhance High Intensity Resistance Training-Induced Improvements in Myofiber Dimensions and Myogenic Capacity in Aged Female Rats. **Mol Cells**, v. 34, p. 439-448, 2012.

KODAMA, F.Y.; CAMARGO, R.C.T.; JOB, A.E.; OZAKI, G.A.T.; KOIKE, T.E.; CAMARGO-FILHO, J.C.S. Propriedades mecânicas do músculo de ratos adultos e idosos, exercitado pós-imobilização. **Acta Ortop Bras**, v. 20, n 4, p. 218-222, 2012.

KORNASIO, R.; RIEDERER, I.; BLUTER-BROWNE, G.; MOULY, V.; UNI, Z.; HALEVY, O. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell

proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1973, n. 5, p.755-763, 2009.

KREIDER, R.B.; ALMADA, A.L.; ANTONIO, J.; BROEDER, C.; EARNEST, C.; GREENWOOD, M., et al. International society of sports nutrition exercise & sport nutrition review: research & recommendations. **Sports Nutr Rev J**, v. 1, n. 1, p. 1-44, 2004.

LIEBER, R.L. **Skeletal muscle structure, function & plasticity**: The physiological basis of rehabilitation, 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 448, 2002.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L.; LI, X.; DONG, Y.; LIU, T.C.Y. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**. v.28, p.725-734, 2013.

MARQUES, M.J.; VENTURA MACHADO, R.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness. **Muscle Nerve**, v. 37, n.1, p.61-7, 2008.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E.M.; GIANOLLA, R.; NEGRÃO, D.E., BRUM, P.C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Braz J Med Bio Res**, v. 37, n. 12, p. 1909-1917, 2004.

MESQUITA-FERRARI, R.A.; MARTINS, M.D.; SILVA Jr, J.A.; SILVA, T.D.; PIOVESAN, R.F.; PAVESI, V.C.S. et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 335-340, 2011.

MIYABARA, E.H.; MARTIN, J.L.; GRIFFIN, T.M.; MORISCOT, A.S.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70 kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.290, n.4, p. C1128-38, 2006.

NASCIMENTO, C.C.F.; PADULA, N.; MILANI, J.G.; SHIMANO, A.C.; MARTINEZ, E.Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A.C. Histomorphometric analysis of the response of rat skeletal muscle 63 to swimming, immobilization and rehabilitation. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 9, p. 818-824, 2008.

NISSEN, S.; SHARP, R.; RAY, M.; RATHMACHER, J.A.; RICE, D.; FULLER, J.C. Jr; CONNELLY, A.S.; ABUMRAD, N. Effect of leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v.81, n.5, p.2095-2114, 1996.

NISSEN, S.L.; SHARP, R.L. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. **J Appl Physiol**, v. 94, n. 2, p. 651-659, 2003.

NUNES, E.A.; FERNANDES, L.C. Atualizações sobre β -hidroxi- β -metilbutirato: suplementação e efeitos sobre o catabolismo de proteínas. **Rev Nutr**, v. 21, n. 2 p. 243-251, 2008.

NUNES, E. A.; KUCZERA, D.; BRITO, G. A.; BONATTO, S.J.; YAMAZAKI, R. K.; TANHOFFER, R.A.; MUND, R.C.; KRYCZYK, M.; FERNANDES, L.C. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-kappaB expression. **Nutrition Research**, v. 28, n. 7, p. 487-493, 2008.

OLIVEIRA, D.R.; PINHO, A.C.A.; DELISE, J.D.N.; NUNES, M.P.; DINIZ, L.B.M.P.V.; NETO, H.R.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, V.N.; RIBEIRO, R.I.M.A. Efeito da natação associada a diferentes tratamentos sobre o músculo sóleo de ratos: estudo histológico e morfométrico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 20, n. 1, p. 74-44, 2014.

ORTIZ, M.C.S; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S.; GONÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades - Parte 1. **Fisioter Bras**, v. 2, p. 221-240, 2001.

OSTASZEWSKI, P.; KOSTIUK, S.; BALASINSKA, M.; JANK, M.; PAPET, I.; GLOMOT, F. The leucine metabolite 3-hydroxy-3methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens *in vitro*. **J Anim Physiol Anim Nutr**, v. 84, p. 1-8, 2000.

PANTON, L.B.; RATHMACHER, J.A.; BAIER, S.; NISSEN, S. Nutritional supplementation of the leucine metabolite HMB during resistance training. **Nutrition**, v.16, n.9, p.734-739, 2000.

PARK, B-S.; HENNING, P.C.; GRANT, S.C.; LEE, W.J.; LEE, S-R.; ARJMANDI, B.H.; KIM, J-S. HMB attenuates muscle loss during sustained energy deficit

induced by calorie restriction and endurance exercise. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 62, p. 1718-1729, 2013.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**, v.80, p.1055-1081, 2000.

PEREIRA, M.G.; BAPTISTA, I.L.; CARLASSARA, E.O.C.; MORISCOT, A.S.; AOKI, M.S.; MIYABARA, E.H. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.

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. Swimming and morphology of skeletal muscle repair process after cryoinjury. **Fisioter Pesq**. v.18, n.3, p.264-269, 2011.

PESTANA, P.R.D.; ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S; SILVA JUNIOR, J.A.; FRANÇA, C.M.; MARTINS, M.D.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Swimming influence on the expression of myogenic regulatory factors during skeletal muscle repair of rats. **Rev Bras Med Esporte**. v.18, n.6, p.419-422, 2012.

PIMENTEL, G.D.; ROSA, J.C.; LIRA, F.S.; ZANCHI, N.E.; ROPELLE, E.R.; OYAMA, L.M. et al. Beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMBeta) supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway. **Nutr Metab**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2011.

RENNÓ, A.C.M.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.; BOSSINI, P.S.; DE OLIVEIRA, P., et al. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 1, p. 5-10, 2011.

ROY, R.R.; HIROTA, W.K.; KUEHL, M.; REGGIE EDGERTON, V. Recruitment patterns in the rat hindlimb muscle during swimming. **Brain Research**, v. 337, p. 175-178, 1985.

SEO, D.Y.; LEE, S.R.; KIM, N, KO, K.S.; RHEE, B.D.; HAN, J. Humanized animal model for clinical implication. **Pflugers Archives**, v.466, n.9, p.1673-87, 2014.
SRIKUEA, R.; PHOLPRAMOOL, C.; KITIANANT, Y.; YIMLAMAI, T. Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.37, n.11, p.1078-86, 2010.

SVERZUT, A.C.M.; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esqueléticos. **Rev Fisioter Univ São Paulo**, v. 6, n. 2, p. 132-139, 1999.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **AM J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.298, p.1173-1187, 2010.

TOWNSEND, J.R.; FRAGALA, M.S.; JAJTNER, A.R.; GONZALEZ, A.M.; WELLS, A.J.; MANGINE, G.T.; ROBINSON, E.H.^{4TH}; MCCORMACK, W.P.; BEYER, K.S.; PRUNA, G.J.; BOONE, C.H.; SCANLON, T.M.; BOHNER, J.D.; STOUT, J.R.; HOFFMAN, J.R. β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB)-free acid attenuates circulating TNF- α and TNFR1 expression postresistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 8, p. 1173-1182, 2013.

VAZEILLE, E.; CODRAN, A. The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially down regulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 5, p. 181-190, 2008.

WILLIAMS, J.Z.; ABUMRAD, N.; BARBUL, A. Effect of a Specialized Amino Acid Mixture on Human Collagen Deposition. **Annals of Surgery**, v. 236, n. 3, p. 369-375, 2002.

WILSON, J.M.; KIM, J.; LEE, S.; 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 & Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2009.

WILSON, J.M.; FITSCHEN, P.J.; CAMPBELL, B.; WILSON, G.J.; ZANCHI, N.; TAYLOR, L.; WILBORN, C.; KALMAN, D.S.; STOUT, J.R.; HOFFMAN, J.R.; ZIEGENFUSS, T.N.; LOPEZ, H.L.; KREIDER, R.B.; SMITH-RYAN, A.E.; ANTONIO, J. International Society of Sports Nutrition Position Stand: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, n.1, p. 6, 2013.

World Health Organization. **Global Recommendations on Physical Activity for Health**. Geneva: WHO; 2011.

ZANCHI, N.E.; GERLINGER-ROMERO, F.; GUIMARÃES-FERREIRA, L.; DE SIQUEIRA FILHO, M.A.; FELLITI, V.; LIRA, F.S.; SEELAENDER, M.; LANCH

JR, A.H.; HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanism of action. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1015-1025, 2011.

ANEXO I

Universidade Metodista de Piracicaba
Comissão de Ética no Uso de Animais



Piracicaba, 22 de abril de 2015

Para: Profa. Adriana Pertile
De: Comissão de Ética no Uso de Animais
Ref.: Aprovação do protocolo de aula prática 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 aula prática nº 01/2015 intitulada **"EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-HIDROXI-BETA-METIL-BUTIRATO (HMB) E TREINAMENTO FÍSICO NA REGENERAÇÃO MUSCULAR APÓS CRIOLÉSÃO: COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS JOVENS E IDOSOS"** analisada por esta comissão.

Atenciosamente,

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