UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

IDVALDO APARECIDO FAVARETTO JUNIOR

**Influência do β -hidroxi- β -metilbutirato na musculatura esquelética
em ratos submetidos ao alcoolismo**

BAURU
2016

IDVALDO APARECIDO FAVARETTO JUNIOR

**Influência do β -hidroxi- β -metilbutirato na musculatura esquelética
em ratos submetidos ao alcoolismo**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr..Jesus Carlos Andreo.

Versão Corrigida

BAURU
2016

F277i Favaretto Junior, Idvaldo Aparecido
Influência do β -hidroxi- β -metilbutirato na
musculatura esquelética em ratos submetidos ao
alcoolismo / Idvaldo Aparecido Favaretto Junior. –
Bauru, 2016.
87 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 024/2013
Data: 19/08/2013

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a meus pais **Idvaldo e Elizete**, exemplos de pessoas humildes, honestas e ao qual me orgulho em ser filho. Obrigado mãe por todos os ensinamentos e dedicação, devo a senhora o homem que sou hoje. Obrigado por tudo pai, mesmo que a distância sempre me apoiou em minhas decisões. Serei eternamente grato a vocês.

Ao meu irmão **Juliano**, que acompanhou toda essa trajetória, sempre me motivando e empurrando para encarar todos as dificuldades. Obrigado também por esse anjinho que é minha sobrinha **Isabella**, que você e a **Rosa** nos trouxe com toda essa alegria. Obrigado meu irmão **Giovani** por todo o apoio nessa jornada.

A minha noiva **Francine**, quem participou diretamente, sempre apoiou e incentivou a realização desse sonho. Sempre ao meu lado nos momentos felizes e nas dificuldades, me ajudando a escolher o melhor caminho. Muito obrigado pelo companheirismo, paciência, amizade, carinho e pela ajuda direta nesse trabalho. Sou o homem mais feliz ao seu lado. Eu Te Amo!

Aos meus avós **Antônia, Jorge, Nanci e José Arlindo** (*in memorian*), que deram origem a essa família maravilhosa que tenho hoje. Obrigado por tudo família!

Amo muito todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e guiar sempre os caminhos por mim escolhido.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, agradeço pelo voto de confiança, dedicação e paciência. Obrigado pelos ensinamentos, pelo profissionalismo e principalmente pela amizade. Sou grato pelas oportunidades e portas que me abriu.

Ao **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, por sempre apoiar e incentivar a pesquisa e claro também pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Antônio de Castro Rodrigues**, pelas dicas e ensinamentos de anatomia.

Ao **Prof. Dr. Daniel Ventura Dias**, orientador de minha primeira pesquisa científica. Sempre com palavras de incentivo e ajuda nos momentos decisivos de minha carreira. Muito obrigado pelo amigo que é você.

Ao **Prof. Dr. André Luis Shinohara**, pelo auxílio nesse trabalho.

Ao **Prof. José Roberto Lauris**, pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos meus amigos, **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, Ms. Letícia Rossi Daré, Cleuber Rodrigo de Souza e Mizael Pereira**, palavras não são suficientes para descrever o quão importante é a amizade de vocês. Sempre presentes nos momentos mais complicados. Esse trabalho não seria realizado sem a ajuda de vocês. Levarei para sempre essa amizade. Obrigado!

Ao meu amigo **Marcos Vinícius Miranda**, mesmo de longe sempre apoiando e incentivando a realização do trabalho.

Aos amigos e mestrandas **Karina, Marcelie e Íris**, muito obrigado pelo companheirismo, horas de estudos e risadas compartilhadas com vocês.

Aos funcionários **Ovídio, Romário, Daniela e Lourisvalda**, muito obrigado por toda ajuda para que esse trabalho fosse concluído.

Aos funcionários do Biotério da Fob-USP **Richard, Luiz, Erasmo e Elias**, que não mediam esforços para auxiliar e orientar com os cuidados com os animais. Muito obrigado.

Aos amigos companheiros de pós graduação, **Daniele, Paulinha, Fátima, Alessandra, Ever, Khanxada Xuveb, Rafael (Poma) e David, Marimarcio e Isabela** pelas horas de risadas no bandeirão e por todo incentivo para realização desse trabalho.

A secretária de pós graduação **Vera Rufino**, por toda paciência e auxílio desse trabalho.

Ao **Geraldo, Vera Lúcia e Sr. Júlio**, por me acolher na família e pelo incentivo.

A minha companheira de pós graduação e irmã **Janine Ramos**, por toda ajuda, conselhos e risadas compartilhadas.

Aos **professores, funcionários e alunos da Faculdade Anhanguera de Bauru** por todo apoio e torcida por mim.

A **Giovana Paiva, Gabriela, Claudinha, Rafaela e Rodnaldo**, pela motivação e companheirismo.

Aos **amigos e colegas de trabalho do Hospital Estadual de Bauru** pelo incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão desse trabalho. Deixo aqui o meu muito obrigado!

“ Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas. ”

Ayrton Senna

RESUMO

Sabe-se que a cada ano cerca de dois bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas, e no Brasil há uma estimativa de que aproximadamente 11,2% da população é dependente de álcool, o que representa mais de cinco milhões de pessoas. Basicamente se pode dizer que todos os órgãos são afetados pela exposição crônica e aguda, mas as miopatias alcoólicas atingem de 1/3 a 2/3 dos alcoólatras e são as das doenças musculares mais frequentes. A literatura apresenta vários suplementos nutricionais que prometem melhora na performance de atividade físicas promovendo conservação ou hipertrofia das fibras musculares, mas estudos mais profundos tem demonstrado que apenas as suplementações de creatina e β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) demonstraram efeitos sobre a otimização dos ganhos de força e massa muscular. Os trabalhos com HMB afirmam que esta substância diminui a degradação proteica muscular e estimula a síntese proteica, entre outras atividades. Considerando os prejuízos causados pelo álcool no tecido muscular e os benefícios produzidos pelo HMB no mesmo tecido pensou-se na realização de um trabalho associando as duas substâncias para responder as seguintes perguntas: a-) o álcool e o HMB alteram o peso dos animais, atuando individualmente e em conjunto? b-) o álcool e o HMB alteram a área das fibras musculares do EDL e do sóleo, atuando individualmente e em conjunto? c-) se as alterações ocorrerem elas são semelhantes nos músculos EDL e sóleo? Para isso foram utilizados 25 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, adultos (com aproximadamente 90 dias de idade (407 g) divididos em 4 grupos: Grupo Controle Placebo, Grupo Experimental Álcool (25%), Grupo β -Hidroxi β -Metilbutirato (0,3g/Kg) e Grupo Álcool + β -Hidroxi β -Metilbutirato. Foram retiradas amostras dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos e submetidas a coloração de HE. Foi realizado a morfometria de duzentas fibras de cada músculo de cada animal. Estas fibras tiveram as suas áreas calculadas. Os dados obtidos foram submetidos ao tratamento estatístico. Os dados encontrados nesta pesquisa permitiram concluir que: : a-) o álcool alterou, de maneira negativa o peso dos animais, mas o HMB não, mesmo quando atuou em conjunto com o álcool, ou seja, o HMB não conseguiu anular o efeito negativo do álcool; b-) o álcool alterou, de maneira negativa a área das fibras dos músculos EDL e sóleo, e o HMB não, mas quando ele atuou em conjunto, conseguiu anular o efeito

negativo do álcool; c-) as alterações produzidas pela ação do álcool e HMB, individualmente ou em conjunto foram semelhantes nos músculos EDL e sóleo.

Palavras-chave: miopatias, β -hidroxi- β -metilbutirato, alcoolismo, extensor longo dos dedos, sóleos, suplementos nutricionais.

ABSTRACT

influence of β -hydroxy- β -methyl butyrate in skeletal muscle in rats submitted to alcoholism

It is known that every year about two billion people consume alcoholic beverages, and in Brazil there is an estimate that approximately 11.2% of the population is dependent on alcohol, which is more than five million people. Basically you can say that all organs are affected by chronic and acute exposure, but alcoholic myopathy reach 1/3 to 2/3 of alcoholics, and are the most frequent muscular diseases. The literature contains several nutritional supplements that promise improvement in physical activity performance promoting conservation or hypertrophy of muscle fibers, but further study has shown that only creatine supplementation and β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) have shown effects on optimization the strength gains and muscle mass, works with HMB claim that this substance decreases muscle protein degradation and stimulates protein synthesis, among other activities. Considering the damage caused by alcohol in muscle tissue and the benefits produced by the HMB in the same fabric was thought in achieving a work combining the two substances to answer the following questions: a-) alcohol and HMB alter the weight of the animals, acting individually and together? b-) alcohol and HMB alter the area of the muscle fibers of the soleus and EDL individually and jointly acting? c) if changes occur they are similar in EDL and soleus muscles? For this we used 25 rats (*Rattus norvegicus*), adult male (approximately 90 days old (407 g) divided in 4 groups: Control Group Placebo Experiment Group Alcohol (25%), Group β -hydroxy β -methylbutyrate (0.3g / kg), and Group Alcohol + β -hydroxy β -methylbutyrate. soleus and samples were taken long extensor muscles of the fingers and subjected to HE staining. morphometry was performed two hundred fibers of each muscle of each animal. These fibers had calculated their areas the data were subjected to statistical analysis the data found in this study showed that: a-) alcohol changed in a negative way the weight of the animals, but the HMB not even when he served in together with the alcohol, i.e., HMB could not nullify the negative effects of alcohol; b) alcohol changed in a negative way the area of the fibers of the EDL and soleus

muscles, and HMB not, but when he acted together, could nullify the negative effect of alcohol; c) the changes produced by the action of alcohol and HMB, individually or together were similar in EDL and soleus muscles.

Key words: Myopathies, β -hydroxy- β -methylbutyrate, alcoholism, long extensor digitorum, soleus, nutritional supplements.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Esquematização da estrutura musculatura esquelética	24
Figura 2	- Classificação das fibras musculares do tipo rápida e lenta	25
Figura 3	- Representação sarcômero estirado e contraído	25
Figura 4	- Representação molécula de miosina e suas cadeias	26
Figura 5	- Fotomicrografia fibras musculares EDL coradas com HE: A) GCI; B) GCP; C) GA; D) GHMB; E) GAHMB.(Aumento 200x)	51
Figura 6	- Fotomicrografia fibras musculares sóleo coradas com HE: A) GCI; B) GCP; C) GA; D) GHMB; E) GAHMB. (Aumento 200x)	55

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação peso inicial e final do estudo	47
Gráfico 2 - Representação ganho de peso em porcentagem	48
Gráfico 3 - Representação consumo de ração e líquidos diários.....	49
Gráfico 4 - Área, em μm^2 , das fibras do músculo EDL	53
Gráfico 5 - Aumento área em % da área das fibras do músculo EDL.....	54
Gráfico 6 - Área, em μm^2 , das fibras do músculo sóleo	57
Gráfico 7 - Aumento área das fibras, em %, no músculo sóleo	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média peso inicial e final e ganho em % dos grupos no período do estudo	47
Tabela 2 - Média diária de consumo de ração e líquido (álcool e água)	49
Tabela 3 - Área média em μm^2 e desvio padrão das fibras do músculo EDL e percentagem de crescimento	53
Tabela 4 - Área média em μm^2 e desvio padrão das fibras do músculo sóleo e percentagem de crescimento.....	57

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
ADH	Álcool desidrogenase
AIDS	Imunodeficiência adquirida
ALDH	Aldeído desidrogenase
CA	Câncer
EDL	Extensor longo dos dedos
G	Gramas
GA	Grupo experimental alcoolismo
GCI	Grupo controle inicial
GCP	Grupo controle placebo
GHMB	Grupo experimental HMB
GAHMB	Grupo experimental alcoolismo + HMB
HE	Hematoxilina-Eosina
HMB	β -hidroxi- β -metilbutirato
IMC	Índice de massa corpórea
Kg	Quilogramas
M	Músculo
Mm	Músculos
RNA	Ácido ribonucléico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Músculo estriado esquelético.....	23
2.2	Álcool	28
2.3	β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB).....	32
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Adaptação ao álcool	42
4.2	Eutanásia e retirada das amostras	42
4.3	Morfometria.....	43
4.4	Análise Estatística e Testes.....	43
5	RESULTADOS	47
5.1	Peso dos animais	47
5.2	Consumo de ração e líquidos (água ou álcool).....	49
5.3	Análise morfométrica das fibras musculares coloração de HE.....	51
5.3.1	Músculo EDL.	51
5.3.2	Músculo sóleo.....	55
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO	87

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O álcool por ser considerado como uma droga lícita (MARTINS et al., 2009) e assim o seu consumo acaba sendo um fato cultural aceito por todas as sociedades do mundo (Ministério da Saúde – Br, 2004). Nesse contexto, sabe-se que a cada ano cerca de dois bilhões de pessoas consomem bebidas alcoólicas, o que corresponde a aproximadamente 40% da população mundial acima de 15 anos (WHO, 2004). Isso torna o álcool a terceira principal causa de incapacidades, gerando um custo médio de aproximadamente 15 milhões de dólares por ano (SUTHERLAND, 2013).

Nos EUA cerca de 88% população bebeu algum tipo de álcool durante a vida (IWAMOTO et al., 2011).

No Brasil, há uma estimativa de que aproximadamente 11,2% da população é dependente de álcool, o que representa mais de cinco milhões de pessoas (CARLINI et al., 2001), lembrando que existem muitos indivíduos que omitem o uso desta substância, portanto o número real de alcoólatras deve ser bem maior.

Homens tendem a beber mais que as mulheres, porém os efeitos nas mulheres são mais graves e elas iniciam esta atividade mais cedo que os homens. Estudos indicam que 60% das mulheres nos EUA bebem álcool ao menos uma vez no ano. (HU et al., 2016).

Em pesquisa realizada com estudantes universitários observou-se que o consumo e uso do álcool estão crescendo cada vez mais, tanto entre homens como mulheres, e iniciando cada vez mais cedo (PALFAI, ZISSERSON and SAITZ, 2011).

Em outro estudo, com jovens com média de 18 anos, observou-se que o consumo de álcool pode ter relação com maior uso de maconha (YEOMANS-MALDONADO e MEGAN, 2015), ou seja, o consumo de álcool pode ser considerado também como uma porta de entrada para novas drogas.

O alcoolismo é frequentemente causa de fracasso nos tratamentos de saúde. Ele tem causas variadas: genética, biológica, sócio-cultural, comportamental, estresse e por desinibir o indivíduo. O alcoolismo não é uma doença única, mas sim um grupo heterogêneo de doenças que varia de grau de severidade, duração e consequência.

Basicamente, se pode dizer que todos os órgãos são afetados pela exposição crônica e aguda ao etanol e inúmeras vias metabólicas são alteradas (PREEDY, 1997; ROMERO et al., 1994).

O uso prolongado do álcool em excesso causa multiplicidade de anormalidades clínicas, bioquímicas e eletrofisiológicas, que estão associadas à doenças do fígado, coração, sistemas nervoso e muscular (SPENCER, 1986).

As miopatias alcoólicas são as doenças musculares mais frequentes (REILLY et al., 2000; PREEDY et al., 2002), inclusive mais do que as cirroses (ESTRUCH et al., 1993).

Desde os tempos remotos, os antigos soldados e atletas possuíam, de maneira intuitiva, o hábito e a orientação para com o consumo de alimentos específicos, partes específicas de alimentos e animais e preparações que pudessem de alguma forma demonstrar certo valor nutricional capaz de torná-los mais fortes. Com o evoluir das pesquisas pode-se cada vez mais desenvolver não só métodos, mas combinações de substâncias naturais e ou sintéticas capaz de nutrir e ou desenvolver um aumento na performance dos usuários, que passaram a ser chamadas de ergogênicas.

A indústria de suplemento ergogênico ganha enormes somas de dinheiro anualmente com a venda de suplementos nutricionais que supostamente promovem a melhora do desempenho físico, adia a fadiga e melhorar a composição corporal e aparência (PORTAL et al., 2010).

Fitschen et al., 2013 - realizaram uma pesquisa de levantamento bibliográfico utilizando os termos tais como HMB, beta-hidroxi-beta-metil-butyrate de HMB muscular, a suplementação de HMB, e exercício HMB no banco de dados PubMed, e os temas abordados foram estudos primários sobre HMB, suplementação com HMB em populações clínicas e idosas, e suplementação de doenças em modelos animais. Entre os pacientes das clínicas estavam os portadores, de câncer, AIDS, artrite reumatoide, doenças pulmonares obstrutivas crônicas e submetidos a laparoscopias gástricas. Nos modelos animais, baixa carga muscular, sepsis e distrofia muscular.

Na pesquisa citada anteriormente Fitschen et al., 2013 observaram que a perda de massa muscular é comum em todo o processo de envelhecimento e pode começar nos indivíduos com idade de 30 anos; uma relação similar existe em muitas populações clínicas, tais como pacientes com câncer ou síndrome de

imunodeficiência adquirida (AIDS), em que a perda muscular é comum; certamente que, os baixos níveis de massa magra na população das clínicas têm sido correlacionadas com a diminuição da função física, da qualidade de vida, dificultando as resposta ao tratamento, e aumentando a mortalidade. Portanto, as intervenções para manter ou potencialmente aumentar a massa magra em idosos e em populações das clínicas são necessários. Segundo estes autores recentemente, o HMB tem sido pesquisado por suas propriedades de preservação musculares nessas populações.

O HMB é um metabólito da Leucina produzido endogenamente e também é encontrado no leite materno e alguns outros alimentos como o peixe bagre e a toranja, além de ser comercializado em forma de suplemento alimentar (ALVAREZ e MEIRELLES, 2008).

Nos últimos anos o HMB tem se tornado um dos suplementos ergogênicos mais populares entre os frequentadores de academia (CHLOPICKA et al., 2007), apesar destas substâncias apresentarem dados clínicos limitados (PORTAL et al., 2011).

Outro aspecto que tem aumentado o consumo do HMB é o fato dele não ser considera como substância ilegal pelo Comitê Olímpico (ALVARES e MEIRELES, 2008).

Vários estudos investigaram os efeitos do HMB sobre o balanço proteico e atrofia muscular (SMITH et al., 2005; HSIEH et al., 2006; ELEY et al., 2007; WILSON et al., 2008; HOLECEK et al., 2009; HAO et al., 2011; NUNES et al., 2011).

Pesquisa tem observado efeito do HMB em algumas das doenças mais frequentes (câncer, AIDS, caquexias), mas a literatura não apresenta estudos da ação deste suplemento em miopatias, apesar da sua alta frequência nas doenças causadas pelo álcool.

Considerando a perda de massa muscular causada pelo alcoolismo, e pensando nos efeitos positivos do HMB sobre este tecido, pensou-se na realização de um trabalho associando as duas substâncias para ver se seria possível diminuir ou anular o efeito negativo causado pelo álcool nas miopatias, por meio dos benefícios produzidos pelo HMB no tecido muscular.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo estriado esquelético

O sistema muscular esquelético é o maior sistema orgânico do corpo humano, correspondendo a cerca de 40% do peso do seu corpo. Este sistema origina-se do mesoderma (DANGELO E FATTINI, 2007).

Didaticamente os músculos são subdivididos em três tipos:

- Músculo liso que também é chamado de involuntário, encontrado nas vísceras;
- Músculo estriado cardíaco que como o próprio nome diz, exclusivo do coração e;
- Músculo estriado esquelético ou também chamado de músculo voluntário (DANGELO E FATTINI, 2007).

Neste trabalho o interesse é sobre os músculos estriados esqueléticos que nos humanos é construído por mais de 400 unidades individuais, chamadas de músculos, os quais produzem movimentos, de maneiras e direções específicas (STAL, 1994).

O tecido muscular estriado esquelético, é formado por dois componentes histológicamente distintos: a-) as células musculares, também chamadas de fibras musculares, as quais produzem as contrações; b-) o tecido conjuntivo (endomísio, perimísio e epimísio), que aproveita a tração produzida pelas contrações das fibras musculares para produzir os movimentos, e conduz as fibras nervosas, além dos vasos sanguíneos e linfáticos, necessários para as fibras musculares. (CORMACK, 2003).

As fibras musculares estriadas esqueléticas são cilíndricas, longas e multinucleadas. Possuem estrias transversais e seus núcleos se localizam na periferia próxima ao sarcolema, dados que as diferenciam das fibras do músculo estriado cardíaco, que possui núcleos no centro da célula.(JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

O diagrama abaixo representa o tecido muscular estriado esquelético com as fibras musculares e seus tecidos conjuntivos. Eles são divididos seguindo a ordem de interno para externo como:

- Endomísio: que envolve cada fibra muscular;
- Perimísio: que envolve grupos de fibras musculares, também chamados de fascículos
- Epimísio: que envolve o músculo.

Fonte: Baechle e Earle, 2008

Figura 1. Esquemática da estrutura musculatura esquelética.

Sabe-se hoje, que o músculo estriado esquelético não é um tecido uniforme, e que ele é formado por vários tipos de fibras musculares, que podem ser delineadas com base nas suas propriedades histoquímicas, bioquímicas, morfológicas e fisiológicas. Estas propriedades são usadas para classificar as fibras como de contração lenta (chamadas de slow ou vermelhas) e de contração rápida (chamadas de fast ou brancas), este último apresenta subtipos (MYRHAGE, 1977).

Estas propriedades histoquímicas, bioquímicas, morfológicas e fisiológicas das fibras musculares estriadas esqueléticas deram origem a várias nomenclaturas, que MYRHAGE em 1977 resumiu da seguinte maneira:

CLASSIFICATION OF MUSCLE FIBRES			
	Fast twitching		Slow twitching
Dubowitz & Pearse (1960)	II	(II)	I
Brooke & Kaiser (1970)	IIB	IIA	I
Henneman & Olson (1965)	A	B	C
Burke <i>et al.</i> (1971)	FF	FR	S ¹
Peter <i>et al.</i> (1972)	FG	FOG	SO ²
	(white)	(red)	(red/intermediate)

¹ FF = fast-fatigable; FR = fast-resistant to fatigue;
S = slow-very resistant to fatigue.

² FG = fast-glycolytic; FOG = fast-oxidative-glycolytic;
SO = slow-oxidative.

Fonte: Myrhae, 1977

Figura 2. Classificação fibras musculares com metabolismo glicolítico e oxidativo.

Com o desenvolvimento da biologia molecular descobriu-se que as diferenças dos tipos de fibras musculares deviam-se à presença de várias isoformas de miosina e somente a um tipo de actina, na molécula de miosina. A molécula de miosina é um formada por duas cadeias pesadas de miosina e dois pares de cadeias leves, considerados regulatórios por determinarem a velocidade e a força das fibras musculares, conforme mostram as figuras abaixo.

Fonte: funcionaltotal.wordpress.com

Figura 3. Representação sarcômero estirado e contraído.

THE CELL, Third Edition, Figure 11.23 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.
© 2003 All rights reserved.

Fonte: The Cytoskeleton (imagem traduzida)
Figura 4. Representação molécula de miosina e suas cadeias.

Segundo Pette e Staro 2001, existem fibras musculares “puras” (quando as duas cadeias pesadas e miosina são do mesmo tipo) e “híbridas” (quando as cadeias pesadas de miosina não são do mesmo tipo), o que aumenta muito os tipos de fibras musculares existente, podendo ser: I, I/IIA, IIA/IIA, IIA//D, IID/A, IID, IID/B, IIB/D e IIB.

Embora um tipo de fibra possa predominar em certos músculos estriados esqueléticos, a maioria deles contém uma mistura destes tipos de fibras, que varia muito entre os músculos, e entre os indivíduos (STARON, 1997). Essa heterogeneidade proporciona aos músculos uma ampla extensão de capacidade funcional, o que representa um importante papel na sua performance (GOLLNICK E MATOBA, 1984 – STARON, 1997).

Os músculos usados nesta pesquisa, sóleo e EDL estão entre os músculos dos membros posteriores de ratos que são amplamente estudados em laboratórios, e definidos como músculos “típicos”, por serem representativo de todo o membro posterior (ENG et al., 2008).

Os músculos, ou grupos musculares, podem ser agrupados de várias maneiras para serem estudados, mas as mais comuns são com base na sua ação sobre cada articulação, (por exemplo, como flexores, extensores, adutores); ou como aqueles que têm principalmente uma função anti-gravitacional ou não. O sóleo é considerado como flexor plantar do tornozelo e como anti gravitacional, enquanto que o EDL é classificado como dorsiflexor do tornozelo e gravitacional (ENG et al., 2008).

O sóleo é um músculo composto por uma grande maioria de fibras do tipo I tipo, de contração lenta e de um número variável, mas geralmente baixo de fibras do tipo II 2A de contração rápida, conforme o quadro abaixo.

Como mostra o quadro abaixo, a frequências dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo de rato encontradas na literatura consultada é variável.

Autores	Metodologia	Tipos de fibras ou MHC
Soukup et al., 2009	m-ATPase	I = 98,4 (2,6) , IIA = 1,6 (2,8)
Soukup et al., 2002	m-ATPase	I = 96,1 e IIA = 3,9
Armstrong e Phelps (1984)	m-ATPase	SO = 87% - FOG =13 %
Narusawa (1985)	m-ATPase	I = 80,7% - II= 19,3%
Chien e Chu (1995)	m-ATPase	I = 75,1%, - IIA = 13,3%, IIB = 1,4% e IIC = 10,3%
Grossman et al., 1998	Eletroforese	MHC I = 93% e MHC IIA 7%
Grossman et al., 1998	Imuno	MHC I = 90%, MHC IIA = 6% , híbridas MHC I e IIA = 4%
Talmadge, Roy, Edgerton (1999)	eletroforese	MHC-I = 88 a 95%, MHC Iia 5 a 12% e MHCx = 0 a 1%
Talmadge, Roy, Edgerton (1999)	Imuno	MHC I = 90 e MHC II (a>x>b) =10%
Sakakima e Yoshida (2002)	m-ATPase	I = 88,3 - II = 11,7%
Eng et al., 2008	eletroforese	I = 80,19 - IIA = 19,81
Mizunoya et al., 2014	eletroforese	I = 93,7 - IIA = 6,3%
Yamaguchi <i>et al.</i> (1996)*	m-ATPase	I + IC = 85.6±7.3, IIA+IIC 8.7±5.7 (5.7±4.2)
Canon <i>et al.</i> (1995)*	m-ATPase	I = 85±2.4 (IC = 4.2±0.7) – IIA = 10.8±1.8
Bigard <i>et al.</i> (1994)*		I~91 - IIA ~9
Lewis <i>et al.</i> (1994)*		I = 93.1 – IIA = 6.9
Sakuma <i>et al.</i> (1995)*		I ~ 87 - IIA ~13
Oishi <i>et al.</i> (1996)*		I = 88.2±5.9 - IIA ~11.8
Nakano <i>et al.</i> (1995)*		I = 91.7±6.1 – IIA = 8.3
Narusawa (1985)*		I ~ 92.3 - IIA - 7.7±1.4

* Citados por Novák et al., 2010

O EDL é um músculo de contração rápida, composto por um número baixo de fibras de contração lenta e variável proporção de fibras de contração rápida, principalmente IIB e IIA e IIX.

Como mostra o quadro abaixo, a frequências dos diferentes tipos de fibras no músculo EDL de rato encontradas na literatura consultada também é variável.

Autores	Metodologia	% Tipos de fibras ou MHC
Armstrong e Phelps (1984)	m-ATPase	FOG 42% - FG 56% e SO 2%
Bigard <i>et al.</i> (1994)*	m-ATPase	IIB = 76% - IIA(IIC) = 20% e I(IC) = 4%
Windisch et al., 1998	imuno	IIB = 45 - IIA = 23 - IIX = 29 - I = 3%
Bobinak et al 2000	imuno	IIB = 41, IIA = 32, IIX 23 e I = 4
Eng et al., 2008	eletroforese	IIB = 64,40 - IIA = 10,53 e IIX = 25,8
Soukup et al., 2002	m-ATPase	IIB = 75,7 - IIA = 18,8 - I = 5,5
Soukup et al., 2009	m-ATPase	IIB = 77,2 - IIA = 16,9 - I = 5,9
Mizunoya et al., 2014	eletroforese	IIB>IIX>IIA

* Citado por Novák et al., 2010

2.2 Álcool

O álcool é absorvido inicialmente no estômago, mais ou menos de 10 a 20% do total ingerido. Ela inicia-se pela ação da enzima produzida no estomago chamada de álcool desidrogenase (ADH), que quebra o álcool em metabólito acetaldeído que pode ser tóxico ao organismo mesmo em pequenas porções. Posteriormente o acetaldeído é convertido em acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e por ser solúvel a água pode chegar a todos órgãos pelo sangue. Essa absorção é mais rápida no indivíduo com estomago vazio do que quando comparada a outro que se alimentou. (JONES, 2016).

O álcool é metabolizado no fígado, e por essa razão as chances de doenças hepáticas são grandes.

Apesar de quando ingerido de maneira moderada, o álcool ser benéfico para o sistema cardiovascular e ósseo, o uso em grandes quantidades pode levar a diversas doenças hepáticas, câncer de mama, de próstata e acidentes como automobilísticos e quedas (JONES, 2016).

O uso prolongado do álcool em excesso causa multiplicidade de anormalidades clínicas, bioquímicas e eletrofisiológicas, que estão associadas às doenças do fígado, coração, sistemas nervoso e muscular (SPENCER, 1986).

Basicamente, se pode dizer que todos os órgãos são afetados pela exposição crônica e aguda ao etanol e inúmeras vias metabólicas são alteradas (PREEDY et al., 1997; ROMERO et al., 1994).

Deve ser lembrado que o álcool possui valor energético, e tem a habilidade de suprimir as necessidades calóricas diárias de um indivíduo e/ou levá-lo ao sobrepeso, dependendo da quantidade, frequência e modo de consumo (Kachani et al., 2008).

Os dados na literatura sobre a relação do consumo de álcool e peso corporal são conflitantes.

Em 2004 Breslow e Smothers, realizaram um estudo com 37.000 indivíduos para observar o consumo diário de álcool e o IMC (índice de massa corporal). Eles observaram que quando o consumo de álcool diário era menor, o IMC era também menor, e quando o consumo de álcool diário era maior, o IMC também era maior.

Em outro estudo foi observado, em homens e mulheres, que o consumo de álcool durante 20 semanas (2 taças de vinho/dia), não alterou o peso corporal, sugerindo que o consumo energético do álcool pode ter sido substituído por outro alimento (CORDAIN et al. 1997 e 2000 apud BRESLOW E SMOTHERS, 2004).

Andreo et al., (2005) realizaram um estudo para observar o efeito do álcool no músculo digástrico de ratos, e neste trabalho eles observaram que os animais alcoolizados apresentaram um ganho de peso menor do que os dos grupos controle (9,36% e 53,3%, respectivamente).

Em outra pesquisa realizada com jovens universitários foi notado que o uso de álcool interferiu sobre hábitos alimentares, sugerindo que após o consumo de álcool, houve o aumento na ingestão de junk foods e comidas mais gordurosas, logo, a tendência de ser maiores o consumo energético e consequentemente ao ganho de peso corporal (LLOYD-RICHARDSON et al., 2008; SELVAN et al. 2015).

Como foi dito anteriormente, basicamente, se pode dizer que todos os órgãos são afetados pela exposição crônica e aguda ao etanol, inclusive os músculos, e neste sentido as mulheres por possuírem massa muscular menor, a concentração de álcool fica maior no corpo quando comparado ao homem (FOGGER, 2016).

Em um estudo realizado com alcoólatras crônicos, foi identificado além de hipoestesia tátil dolorosa, hiporreflexia entre outras, a presença de câimbras, fraqueza e atrofia muscular (FERRAZ et al., 1989).

As miopatias alcoólicas atingem de 1/3 a 2/3 dos alcoólatras, e são as das doenças musculares mais frequentes (2.000 casos por 100.000 habitantes) (REILLY et al., 2000; PREEDY et al., 2002). Para se ter uma ideia da incidência deste tipo de doença, em um estudo detalhado, realizado com 250 alcoólatras, 20 deles (8%) apresentaram cirrose, enquanto 117 (47%) tinham miopatia alcoólica (ESTRUCH et al., 1993).

Em pacientes com miopatias alcoólicas o envolvimento de vários órgãos é frequente e a reversibilidade é alcançada apenas parcialmente por abstinência (FERNANDEZ-SOLA et al., 1996).

Os sintomas mais comuns dos portadores das miopatias alcoólicas são fraqueza muscular (FERRAZ et al. 1989; PREEDY et al., 2002), dificuldades para caminhar, força muscular reduzida, e perda da massa muscular total, que são as características comuns em alcoólatras crônicos (PREEDY et al., 2002).

O consumo de etanol pode produzir várias mudanças agudas ou crônicas nos músculos esqueléticos. O mecanismo fisiopatológico para tais mudanças está provavelmente relacionado às seguintes alterações: na fluidez das membranas; nas bombas iônicas; na depressão de contratibilidade; na síntese de proteínas e em problemas genéticos. (LANG et al., 2000).

Com relação à síntese proteica, estudos clínicos em animais tem demonstrado que o conteúdo de RNA dos músculos esqueléticos é reduzido em resposta à exposição ao etanol, levando a uma redução na síntese de proteínas (REILLY, et al., 1998), e conseqüentemente atrofia muscular, assim, até 20% da musculatura esquelética inteira pode ser perdida (PREEDY et al., 1994).

A atrofia muscular na miopatia alcóolica caracteriza-se por atrofia seletiva das fibras do tipo II, enquanto que as fibras do tipo I não são afetadas (REILLY et al., 1998). Vale a pena lembrar que esta atrofia das fibras do tipo II não é específica para doenças musculares induzidas pelo alcoolismo, uma vez que pode ser encontrada em pacientes com má nutrição calórica (FERNANDEZ - SOLA et al., 1995).

A atrofia seletiva das fibras do tipo II, produzida pelo uso do etanol, foi identificada por vários pesquisadores (FERRAZ et al., 1989; TROUNCE et al., 1990; SALISBURY et al., 1992; WASSIF et al., 1993; WASSIF et al., 1994; PREEDY, et al., 1994; FERNANDEZ - SOLA et al., 1995;), em vários músculos, como tibial anterior (SHARMA et al., 1990), sóleo (PREEDY et al., 1989; PREEDY et al., 1990), plantar (PREEDY, 1989; PREEDY et al., 1990), gastrocnêmio (PREEDY et al., 1990). As pesquisas foram feitas na maioria das vezes em seres humanos (FERRAZ et al., 1989; SHARMA et al., 1990; CHEN et al., 1991; WASSIF, et al., 1993; PREEDY et al., 1994; SESTOFT et al., 1994; FERNANDEZ - SOLA et al., 1995) e ratos (PREEDY et al., 1989 e 1990; TROUNCE, et al., 1990; SALISBURY et al., 1992).

Os pesquisadores notaram também, que na atrofia das fibras do tipo II, que ocorre nos indivíduos alcoólatras, as do tipo IIB (FG) são as mais afetadas (CHEN et al., 1991; FERNANDEZ - SOLA et al., 1995).

Andreo et al., (2005) realizaram um estudo para observar se a atrofia muscular ocorria de maneira semelhante entre os músculos braquioméricos (elevadores da mandíbula) e somáticos (reto abdominal) e notaram que nos primeiros o efeito da atrofia não ocorreu.

Outras alterações celulares causadas pelo alcoolismo na musculatura esquelética têm sido descritas, como por exemplo, a falta de padrão em mosaico na distribuição dos tipos de fibras nos fascículos (FERRAZ et al., 1989; CHEN et al., 1991), importante proliferação mitocondrial, acúmulo de lipídeos intrasarcoplasmáticos (FERRAZ et al., 1989) e células atroficas sofrendo fagocitose (SALISBURY et al., 1992).

A literatura mostra também notáveis alterações ultraestruturais no músculo esquelético, incluindo edema intracelular, aumento e distorção de mitocôndrias,

dilatação do retículo sarcoplasmático e quantidade aumentada de gordura e glicogênio, de indivíduos com ingestão crônica de álcool (RUBIN et al., 1976).

2.3 β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)

Sabe-se que a massa de tecido muscular representa o saldo líquido entre a síntese e a degradação das proteínas do músculo. O processo contínuo de construção e substituição proteica permite ao músculo se reparar e adaptar às condições ambientais. O balanço líquido da proteína é positivo durante o crescimento, quando a síntese de proteína excede a degradação, ao passo que o saldo líquido é negativo durante a perda de peso, envelhecimento e em população clínica (doentes hospitalares) quando a degradação excede a síntese (FITSCHEN et al., 2013).

Como foi dito anteriormente desde os tempos remotos, nos soldados e atletas possuíam, o hábito e a orientação para com o consumo de alimentos específicos, que pudessem de alguma forma demonstrar certo valor nutricional capaz de torna-los mais fortes. As pesquisas têm procurado desenvolver substância naturais e ou sintéticas capazes de nutrir ou desenvolver aumento na performance dos usuários, ou recuperar o saldo líquido negativo de proteínas durante o envelhecimento ou doentes hospitalares, os chamados suplemento ergogênico.

Em um estudo usando meta-análise, Nissen e Sharp (2003) encontraram na literatura registro de mais de 200 suplementos alimentares que prometiam aumento da massa livre de gordura e ganhos de força durante o treinamento contra-resistência. Daqueles, apenas seis (β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), creatina, proteína, cromo, dehidroepiandrosterona e androstenediona), atenderam aos critérios de inclusão. Os autores concluíram que apenas as suplementações de creatina e HMB demonstraram efeitos sobre a otimização dos ganhos de força e massa muscular em indivíduos praticantes de treinamento contra resistência.

O HMB tem sido usado em pacientes com doenças tais como imunodeficiência auto adquirida (AIDS) (CLARK et al., 2000; MAY et al., 2002)

cancerosas, e condições caquéticas (BAXTER et al., 2006), sempre com o objetivo de reduzir a perda de massa muscular.

Outros estudos têm demonstrado ainda que a suplementação de HMB diminui os danos em músculos esqueléticos de animais que sofreram imobilização (SOARES et al., 2001) e em pacientes que ficaram em repouso na cama (RATHMACHER, 1999; RATHMACHER et al., 1999; DEUTZ et al. 2013).

São vários os trabalhos que mostram os benefícios causados pelo HMB como a diminuição da perda de massa muscular, o envelhecimento e estímulo da síntese proteica (AVERSA et al., 2012).

Inúmeros estudos investigaram os efeitos do HMB sobre o balanço proteico e atrofia muscular e eles demonstraram que esta substância:

- a) diminui a degradação proteica muscular por meio da inibição de múltiplas vias metabólicas (SMITH et al., 2005; ELEY et al., 2007);
- b) diminui a proteólise de todos os tecidos do corpo in vivo (HOLECEK et al., 2009);
- c) pode estimular a síntese de proteína (SMITH et al., 2005; ELEY et al., 2007; WILSON et al., 2008)
- d) atenuar os aumentos nas atividades caspases em estado catabólico diminuindo as apoptoses (HAO et al., 2011; ELEY et al., 2008)
- e) diminuir inflamação sistêmica em população clínica (internados) (HSIEH et al., 2006; NUNES et al., 2011).

O HMB é descrito por seus efeitos anti-catabólicos sobre o musculo esquelético, diminuindo a degradação de proteínas, ou elevando as taxas de síntese proteica (ZANCHI et al., 2011; GERLINGER-ROMERO et al. 2011; PINHEIRO et al., 2011; HASSELGREEN, P., 2014).

A literatura consultada apresenta vários artigos relacionando HMB e massa corporal magra e quase sempre em indivíduos ou animais que realizam esforço físico, mas relacionando o uso deste suplemento com peso corporal, em animais que não realizam exercício físico, foi encontrado apenas o trabalho de Dare (2013)

que observou, em ratos, que nestas condições o HMB não alterou o peso dos animais, em nenhum dos gêneros.

Vários estudos têm mostrado que o uso do HMB combinado com treinamento físico leva a um aumento da massa muscular e força (DI LUIGI, 2008; PORTAL et al., 2010) mas, no entanto, estas vantagens são alcançadas principalmente por indivíduos sedentários que passaram praticar exercícios físicos (PORTAL et al., 2010).

A quantidade de dados sobre a ação do HMB em indivíduos sedentário e que não participaram da prática de exercício, mesmo durante o uso desta substância é pequena.

Daré et al., (2014) estudaram a ação do HMB em mm. da mastigação de ratos em ambos gêneros. No masseter eles observaram que o uso deste suplemento alterou a frequência dos subtipos de fibras do tipo II em ambos os gêneros, mas não alterou a área das fibras em nenhum dos gêneros; no músculo digástrico esta substância não alterou a áreas de nenhum dos tipos de fibras e que os resultados foram semelhantes em ambos os gêneros.

Pereira et al. (2015) estudaram o efeito do HMB em músculos branco (EDL) e vermelhos (sóleo) de ratos que não foram submetidos ao esforço físico e observaram que o uso deste suplemento não alterou a área de nenhum dos músculos estudados.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Considerando as informações apresentadas sobre os efeitos do álcool e do HMB no tecido muscular esse trabalho teve por objetivo responder as seguintes perguntas:

- 1) o álcool e o HMB alteram o peso dos animais, atuando individualmente e em conjunto?
- 2) o álcool e o HMB alteram a área das fibras musculares do EDL e do sóleo, atuando individualmente e em conjunto?
- 3) se as alterações ocorrerem elas são semelhantes nos músculos EDL (branco - contração rápida) e sóleo (vermelho – de contração lenta)?

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 25 ratos (*Rattus norvegicus*), machos, adultos (com aproximadamente 90 dias de idade, da linhagem Wistar, com peso médio de 408g fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Maringá - Campus de Maringá – PR.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com comedouros e bebedouros individuais, para melhor controlar o consumo do sólido e líquido.

A sala possuía iluminação artificial comandada por “timer”, que controlava o ciclo claro/escuro de 12 horas, exaustor e ar condicionado, com temperatura média de 21o C, observada por um termômetro de temperatura ambiente da marca Incoterm.

Os ratos foram separados em cinco grupos de cinco animais cada um, distribuídos da seguinte maneira:

Grupo Controle inicial (**GCI**) – Os animais foram eutanasiados no início do experimento com intuito de obter a referência de início dos animais.

Grupo Controle Placebo (**GCP**) – os animais deste grupo receberam água e ração “ad libitum” e gavagem de solução salina.

Grupo Experimental Alcoolismo (**GA**) – os animais foram submetidos diariamente ao alcoolismo crônico com álcool etílico 25% diluído em água potável, durante 135 dias.

Grupo β -Hidroxi β -Metilbutirato (**GHMB**) – os animais foram submetidos diariamente a gavagem de HMB com dose de 0,3g/kg, diluído em solução fisiológica pelo mesmo tempo da alcoolização.

Grupo Alcoolismo + β -Hidroxi β -Metilbutirato (**GAHMB**) – os animais foram submetidos diariamente ao alcoolismo e a gavagem de HMB com dose de 0,3g/kg diluído em solução fisiológica por meio de sonda intragástrica por 135 dias.

Os animais dos quatro grupos receberam sempre a mesma dieta sólida (ração Nuvilab CR 1, da NUVITAL), durante todo o experimento.

4.1 Adaptação ao álcool

O modelo de alcoolismo usado foi o “semi-voluntário”, onde a administração de álcool diluído foi feita como único alimento líquido disponível ao animal.

Os grupos experimentais GA e GAHMB foram submetidos a um período de adaptação gradativa ao álcool, para que os animais pudessem ser considerados alcoólatras crônicos e, também evitar a morte dos mesmos (CAGNON, 1993).

Esta adaptação foi feita fornecendo uma dieta líquida de álcool etílico diluído a 6% na primeira semana aos animais. Na segunda semana, os animais destes grupos experimentais receberam uma dieta líquida de álcool etílico diluído a 15%. Na terceira semana, os animais do grupo experimental receberam uma dieta líquida de álcool etílico a 25%, e continuaram recebendo esta solução por 135 dias.

O álcool utilizado nesta pesquisa foi o etílico absoluto, do laboratório MERCK ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$; PM46.07).

Todos animais eram pesados semanalmente.

4.2 Eutanásia e retirada das amostras

Após o período de 135 dias de alcoolização e de gavagem, todos os animais foram eutanasiados com uma dose excessiva de anestésico - uma combinação de cloridrato de Xilasina (10mg/kg – Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e cloridrato de Ketamina (50mg/kg – Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) - na região posterior da coxa esquerda do animal.

Para retirada das amostras musculares foi feita a tricotomia da coxa direita do animal, em seguida foi feita uma incisão no sentido longitudinal de aproximadamente de dois centímetros de comprimento e realizada a divulsão do tecido subcutâneo

para exposição, dissecação e coleta dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL), que foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos (KHAN, 1977) e em seguida reduzidos a cilindros com oito mm de comprimento e três mm de espessura.

As amostras dos músculos foram envoltas em talco neutro, em seguida embebido em meio para congelamento Tissue-Tek® (O.C.T., Sakura Finetek, Torrance, USA) no interior de um blister (material de armazenamento de cápsulas de remédios), e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido até cessar a efervescência (WERNECK, 1981).

Para os tratamentos histoenzimológicos as amostras congeladas foram mantidas por uma hora na câmara de um criostato a -20°C (PULLEN, 1977), e após esse tempo elas foram fixadas aos suportes metálicos, por meio de adesivos especiais chamados de O.C.T.). (“Optimal Critical Temperature”). Dos blocos musculares fixados foram obtidas várias séries de cortes de 10 μm de espessura no criostato marca Leica – Modelo CM 1850, que foram submetidos à coloração (HE).

Coloração de Hematoxilina e Eosina (BEHMER et al., 1976), para observação da qualidade do congelamento e análise morfológica das fibras musculares.

4.3 Morfometria

A morfometria das amostras de 220 fibras de músculo, de cada animal foi realizada manualmente com auxílio do software Image PróPlus 6.5, acoplado ao microscópio Olympus BX 50.

4.4 Análise Estatística e Testes

Os dados obtidos com cada músculo, em cada grupo foram submetidos ao teste ANOVA (Análise de Variância), quando houve significância ($p < 0,05$), foi realizado o teste de Tukey para verificar entre quais grupos houve a diferença.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Os dados relativos ao peso dos animais estão representados na Tabela 1 e Gráficos 1 e 2.

Tabela 1. Média peso inicial e final e ganho em % dos grupos no período do estudo.

Grupos	Peso inicial (g)		Peso Final (g)		Ganho Peso %
	Média	DP	Média	DP	Média
GCI	407,80	22,34			
GCP	411,60	15,63	581,80 ^a	22,32	41,49 ^a
GA	403,20	25,89	483,40 ^b	31,52	19,99 ^b
GHMB	408,00	17,67	561,20 ^a	30,58	37,64 ^a
GAHMB	409,00	21,79	494,60 ^b	46,74	20,87 ^b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 1. Representa peso inicial e final do estudo.

Gráfico 2. Representa ganho de peso em %.

Observando-se os dados da Tabela 1 e dos Gráficos 1 e 2 nota-se:

- a) que a média do peso inicial dos animais de todos os grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa no início do experimento;
- b) que o peso dos animais dos grupos GCP, GA, GHMB e GAHMB foram maiores do que o dos animais do GI;
- c) que não houve diferença entre as médias dos pesos dos animais dos grupos alcoolizados (GA e GAHMB), e que a média do peso dos animais destes grupos foi menor do que a dos animais que não foram alcoolizados (GCP e GHMB);
- d) que não houve diferença na média do peso dos animais que não foram alcoolizados (GCP e GHMB);
- e) que os resultados estatísticos sobre o ganho de peso em percentagem dos animais foram semelhantes aos dos seus pesos.

5.2 Consumo de ração e líquidos (água ou álcool).

Os dados sobre o consumo de ração e de líquidos estão representados na Tabela 2 e Gráfico 3.

Tabela 2. Média diária de consumo de ração e líquido (álcool e água).

Grupos	Ração (g)		Líquido (ml)	
	Média	DP	Média	DP
GCI				
GCP	28,86 ^a	1,95	47,60 ^a	22,32
GA	17,50 ^b	1,19	28,39 ^b	31,52
GHMB	25,34 ^a	0,40	39,87 ^a	30,58
GAHMB	15,47 ^b	0,91	24,87 ^b	46,74

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 3. Consumo de ração e líquidos diários.

Todos os grupos receberam ração a vontade “*ad libitum*”, água para os grupos GCP e GHMB e álcool para os grupos GA e GAHMB.

Observando-se os dados da Tabela 2 e Gráfico 3 nota-se que a sequência crescente do consumo de ração e líquido pelos animais foi GA=GAHMB<GHMB<GCP, ou seja, os animais dos grupos alcoolizados foram os que consumiram menor quantidade de ração e de líquido.

Os dados ainda mostraram uma correlação positiva (significância $p < 0,0500$) entre o consumo de ração e peso final dos animais (correlação de Pearson - $p = 0,8441$ e $r = 0,000$);

5.3 Análise morfométrica das fibras musculares coloração de HE

5.3.1 Músculo EDL.

Figura 5. Fotomicrografia fibras musculares EDL coradas com HE: A) GCI; B) GCP; C) GA; D) GHMB; E) GAHMB. (Aumento 200x).

Os dados sobre a área média das fibras do músculo EDL e a percentagem de aumento das mesmas estão representados na Tabela 3 e Gráficos 4 e 5.

Tabela 3. Área média ($\bar{X}$) em μm^2 e desvio padrão (DP) das fibras do músculo EDL e percentagem (%) de crescimento das mesmas.

Grupos	Área EDL		EDL %	
	Média	DP	Média	DP
GCI	1.572,50 ^a	108,36		
GCP	3.184,43 ^b	134,16	92,49	8,53
GA	2.493,66 ^c	227,39	48,57	14,46
GHMB	3.569,54 ^b	447,27	116,98	28,44
GAHMB	3.556,41 ^b	331,46	116,15	21,07

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 4. Área, em μm^2 , das fibras do músculo EDL.

Gráfico 5. Aumento área em % da área das fibras do músculo EDL.

Observando-se os dados da Tabela 3 e Gráficos 4 e 5 nota-se que:

- a) a área e a percentagem de crescimento das fibras de todos os grupos foram maiores do que do GCI;
- b) a área e a percentagem de crescimento as fibras do GA foi menor do que dos demais grupos, exceto GCI;
- c) a área e a percentagem de crescimento das fibras dos grupos que usaram HMB (GHM e GAHMB) foi semelhante a do grupos usado como controle, o GCP.

5.3.2 Músculo sóleo.

Figura 6. . Fotomicrografia fibras musculares sóleo coradas com HE: A) GCI; B) GCP; C) GA; D) GHMB; E) GAHMB. (Aumento 200x).

Os dados sobre a área média das fibras do músculo sóleo e a percentagem de aumento das mesmas estão representados na Tabela 4 e Gráficos 6 e 7.

Tabela 4. Área média (X) em μm^2 e desvio padrão (DP) das fibras do músculo sóleo e percentagem (%) de crescimento das mesmas.

Grupos	Área sóleo		Sóleo %	
	Média	DP	Média	DP
GCI	1.872,30 ^a	109,88		
GCP	3.819,60 ^b	206,83	104,00	11,04
GA	3.354,57 ^c	218,54	79,16	11,67
GHMB	3.812,17 ^b	146,08	103,60	7,802
GAHMB	3.823,38 ^b	304,45	104,20	16,26

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 6. Área das fibras do músculo sóleo.

Gráfico 7. Aumento área das fibras, em %, no músculo sóleo.

Observando-se os dados da Tabela 4 e Gráficos 6 e 7 nota-se que

- a) a área e a percentagem de crescimento das fibras de todos os grupos foram maiores do que do GCI;
- b) a área e a percentagem de crescimento as fibras do GA foi menor do que dos demais grupos, exceto GCI;
- c) a área e a percentagem de crescimento das fibras dos grupos que usaram HMB (GHM e GAHMB) foi semelhante a do grupos usado como controle, o GCP;

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Atualmente 80% dos animais utilizados em pesquisas experimentais são roedores, os outros 20% são divididos entre peixes, répteis, cães, gatos, além de primatas, porcos entre outros. (ANDREOLLO et al. 2012).

Neste trabalho optou-se pelo uso do rato porque ele é o modelo de experimental é utilizado há muito tempo porque consegue traduzir de maneira considerável resultados para futuros estudos para animais maiores e posteriormente seres humanos. A facilidade em criação, reprodução e o baixo custo desses animais são algumas das justificativas para seu uso. (PEREIRA; SILVA; ROMEIRO, 1998).

No presente estudo, foi utilizado ratos Wistar machos e com 90 dias que representam animais na já na idade adulta. (ANDERSEN et al., 2004). A escolha de somente ratos machos em nosso experimento, foi devido a possível influência hormonal que é encontrada em alguns trabalhos realizados com ratas fêmeas. (FRAHER et al., 1990).

O modelo placebo é muito utilizado em pesquisas científicas, e existem dados históricos que ilustram seus efeitos, mesmo que contestados. (HYONG, 2005). Em nosso estudo foi acrescentado um grupo placebo GCP, no intuito de eliminar o fator de estresse causado pela manipulação diária dos animais.

O peso corpóreo é uma ferramenta que pode auxiliar na avaliação de efeitos de substâncias ou protocolos de tratamento. Vários trabalhos utilizam-no para saber se determinado medicamento ou tratamento foi eficaz (JÓWKO, et al., 2001).

Diversos autores utilizam protocolos de alcoolização de modo opcional, onde os animais possuem tanto bebedouros com água e outro com álcool, dando então a opção de escolha, (CHARLES et al., 2016; FAWAZ ALASMARI et al., 2016; MARIUSZ SACHARCZUK et al., 2010.). O modelo de alcoolização dos animais de nosso estudo foi o semi voluntário, onde os animais dos grupos GA e GAHMB possuíam somente o bebedouro com álcool para ingerir, assegurando o consumo do álcool, assim como os grupos GCP e GHMB possuíam os bebedouros somente com água.

No início do experimento todos os grupos possuíam médias de peso semelhantes e sem diferença significativa, o que mantém uma confiabilidade maior durante o tratamento e sugere que alterações ocorridas fossem decorrentes ao protocolo aplicado.

No presente estudo, os animais que ingeriam álcool (GA) tiveram ganho de peso menor do que o grupo placebo (GCP) (19,99 e 41,49, respectivamente), concordando com os dados de Andreo et al., (2005), e discordaram dos de Breslow e Smother (2004) Lloyd-Richardson et al., (2008) e Selvan et al., (2015), provavelmente porque o uso de álcool interferiu sobre hábitos alimentares, sugerindo que após o consumo de álcool, houve o aumento na ingestão de outros alimentos, como sugerido pelos autores da última pesquisa.

Não pode ser esquecido também que o álcool possui valor energético, e tem a habilidade de suprimir as necessidades calóricas diárias de um indivíduo e/ou levá-lo ao sobrepeso, dependendo da quantidade, frequência e modo de consumo e que no trabalho em questão apenas GA e GAHMB consumiram menos líquidos do que os demais grupos e que apenas eles ingeriram álcool. Fernandes et al., (2010) também observou a diferença estatisticamente significativa no consumo líquido entre os grupos alcoolizados e não alcoolizado, assim como encontrado em nosso estudo.

Na atual pesquisa o peso dos animais dos grupos GCP e GHMB foi semelhante, indicando que o uso do HMB não aumentou o peso dos animais, como o observado por Daré (2013). Foi notado também que o peso dos animais do GAHMB foi menor do que do GCP, e que o HMB não conseguiu impedir a perda de peso observada nos animais alcoolizadas, ao contrário do que tem ocorrido com as outras doenças como a AIDS (Clark et al., 2000; May et al., 2002) e cancerosas, e condições caquéticas (Baxter et al., 2006).

Em nosso estudo os animais dos grupos que não ingeriram álcool, GCP e GHMB consumiram mais ração (28,86g/dia e 25,34g/dia, respectivamente) do que os animais dos grupos que ingeriram álcool GA e GAHMB (17,50g/dia e 15,47g/dia, respectivamente), coincidindo com o estudo realizado por Fernandes et al., (2010), com ratos alcoolizados e não alcoolizados, observaram que houve uma diminuição

de 35% no consumo de ração diário com os animais do grupo alcoolizados comparados ao grupo não alcoolizados.

Portanto, nossos dados sugerem a possível influência negativa da ingestão do álcool em relação ao consumo de alimento dos animais.

Em outro estudo Lloyd-Richardson et al., (2008) e Selvan et al. (2015) obtiveram resultados opostos, ou seja, quanto maior o consumo de álcool, maior também foi o consumo de alimento.

Na pesquisa atual ocorreu uma correlação positiva (significância $p < 0,0500$) entre o consumo de ração e peso final dos animais (correlação de Pearson - $p = 0,8441$ e $r = 0,000$);

O uso do álcool em grandes quantidades e suas consequências tem sido observado em todo o mundo e tem sido um problema de saúde pública, pois além dos danos como a violência doméstica e segurança pública (GRAHAM et al., 2011; WHO, 2014), também leva a danos a diversos órgãos como os rins, fígado, cérebro, assim como o músculo. (JONES, 2016). Em nosso estudo pode se observar que o álcool teve grande influência na área da fibra muscular dos músculos estudados, sóleo e EDL.

Neste trabalho os músculos EDL e sóleo foram os escolhidos músculos típicos por representarem todo o membro posterior do rato e antagônicos, ou seja, o EDL é chamado de branco, com predomínio de fibras do tipo II, flexor (dorsiflexor do tornozelo) e gravitacional, enquanto que o sóleo é conhecido como vermelho, com predomínio de fibras do tipo I, flexor e anti-gravitacional (ENG et al., 2008).

O consumo de álcool possui diversos danos ao organismo, uma das características dos danos é a atrofia e fraqueza muscular (CEDERBAUM, 2001). Estudos sugerem que no uso crônico do álcool ocorre o aumento da proteína Creatina Kinase (CK), que é um marcador indicativo de atrofia muscular, seja por desuso ou alguma lesão muscular (FERREIRA et al., 2004; PASNOOR, 2014).

A atrofia muscular nas miopatia alcóolica caracteriza-se por atrofia seletiva das fibras do tipo II, enquanto que as fibras do tipo I não são afetadas (REILLY et al., 1998).

A atrofia seletiva das fibras do tipo II, produzida pelo uso do etanol, foi identificada por vários pesquisadores (FERRAZ et al., 1989; TROUNCE et al., 1990; SALISBURY et al., 1992; WASSIF et al., 1993; WASSIF et al., 1994; PREEDY, et al., 1994; FERNANDEZ - SOLA et al., 1995), na maioria das vezes em seres humanos e em alguns casos em ratos (PREEDY et al., 1989 e 1990; TROUNCE, et al., 1990; SALISBURY et al., 1992).

Como a atrofia das fibras musculares ocorrem nas fibras do tipo II e na pesquisa em questão o EDL é considerado como composto predominantemente por este tipo de fibra, seria de se esperar que nele a atrofia ocorreria, e de fato isso aconteceu, pois a área das fibras do GA foi menor do que no GCP, concordando com as pesquisas citadas anteriormente, mas divergindo dos resultados de Andreo et al., (2005). Mas deve ser lembrado que nesta última pesquisa os músculos usados foram da mastigação, que são de origem embriologicamente dos arcos branquiais, diferentes do EDL, que são de origem embriológica somítica, e que aspecto tem mostrado algumas diferenças entre eles.

O sóleo é formado predominantemente por fibras do tipo I, e a literatura considera que este tipo de fibra não sofre atrofia, mas na atual pesquisa as fibras do GCP foram maiores do que as do GA mostrando que neste caso ela ocorreu, discordando dos dados da literatura. Uma explicação possível seria o longo período que os ratos foram submetidos ao alcoolismo.

Os resultados desta pesquisa mostram que a área das fibras dos GCP e GHMB foi igual em ambos os músculos (EDL e sóleo), mostrando que o HMB não aumenta a área das fibras dos músculos quando os animais não são submetidos a exercício físico, coincidindo com os dados de Daré et al., (2014) e Pereira et al. (2015).

Observando-se os dados da pesquisa atual nota-se nos resultados que a área das fibras dos GCP e GAHMB foi igual e maiores do que GA, em ambos os músculos, mostrando que o HMB conseguiu anular o efeito de atrofia produzido pelo álcool.

Trabalhos futuros devem ser realizados para complementar e elucidar estes resultados.

Pesquisas usando técnica de histoenzimologia e imunohistoquímica para observar se ocorrem alterações nas cadeias pesadas das miosinas das fibras do EDL e sóleo como as encontradas por CHEN et al., 1991; FERNANDEZ - SOLA et al., 1995 (as do tipo IIB (FG) são as mais afetadas); uso da biologia molecular para comparar os outros dados encontrados na literatura (redução do conteúdo de RNA dos músculos esqueléticos exposto ao etanol - REILLY, et al., 1998) (atividades das caspases em estado catabólico diminuindo as apoptoses - Hao et al., 2011; Eley et al., 2008) (ativação de células satélites e aumento da capacidade regenerativa muscular aumentando produção de MyoD e Miogenina - Kornasio et al., 2009) – mensuração de força muscular e balanço de nitrogênio.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseados nos dados deste trabalho julga-se poder concluir que o consumo diário de 0,3g/kg de HMB, e álcool a 25%, isoladamente ou em conjunto, por 135 dias, em ratos com 90 dias de idade:

1-) Peso dos animais

O álcool alterou, de maneira negativa o peso dos animais, mas o HMB não, mesmo quando atuou em conjunto com o álcool, ou seja, o HMB não conseguiu anular o efeito negativo do álcool.

2-) Área das fibras dos músculos EDL e sóleo

O álcool alterou, de maneira negativa a área das fibras dos músculos EDL e sóleo, e o HMB não, mas quando atuou em conjunto com o álcool conseguiu ele anular o efeito negativo do álcool.

3-) As alterações produzidas pela ação do álcool e HMB, individualmente ou em conjunto foram semelhantes nos músculos EDL e sóleo.

Referências

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, T.S. e MEIRELLES, C.M. Efeitos da suplementação de β -hidroxi- β -metilbutirato sobre a força e a hipertrofia. **Rv. Nutr.** 21(1): 49-61. Jan./fev. Campinas 2008.

ARMSTRONG R.B., PHELPS R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. **The American Journal of Anatomy** 171: 259-272, 1984

ANDERSEN M.L., D'ALMEIDA V., KO G.M., KAWAKAMI R., MARTINS P.J.F. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 166p. 2004.

ANDREO, J. C. **Histoenzimologia dos músculos da mastigação de ratos (*Rattus norvegicus*) alcoolizados**. 2001. Tese (Livre docência). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ANDREO J.C., SANTOS N.B., MORAES L.H., ANDREO M.B., ANDREO T.B., ANDREO C.B., RODRIGUES A. C. Is there morphological difference between branchiomic and somatic muscles submitted to alcohol consumption? An experimental study in rats (*Rattus norvegicus*). **J Appl Oral Sci.** Sep;13(3):296-304. 2005.

ANDREOLLO, N. A., ELISVÂNIA FREITAS DOS SANTOS, MARINA RACHEL ARAÚJO, LUIZ ROBERTO LOPES. Idade dos ratos versus idade humana: Qual a relação?. **ABCD Arq Bras Cir Dig.**25(1):49-51, 2012.

AVERSA, Z; ALAMDARI, N; CASTILLERO, E; MUSCARIOTOLI, M; FANELLI, F.S; HASSELGREN, PO. b-Hydroxy-b-methylbutyrate (HMB) prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 423, 739–743, 2012.

BAECHLE, T.R; EARLE, R.W. Essentials of strength training and conditioning. Champaign. **Human Kinetics**, 2008.

BAXTER, J. H., MUKERJI, PRADIP , VOSS , ANNE C , TISDALE , MICHAEL J , WHEELER , KEITH B: Attenuating Protein Degradation and Enhancing Protein Synthesis in Skeletal Muscle in Stressed Animal Model Systems. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 38(5 Supplement): S550-S551. 2006.

BEHMER AO. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica:** EDART/USP; 1976.

BIGARD A.X., LIENHARD F, MERINO D, SERRURIER B, GUEZENNEC CY: Effects of growth hormone on rat skeletal muscle after hindlimb suspension. **Eur J Appl Physiol** 69: 337-343, 1994.

BRESLOW R.A., SMOTHERS B. Drinking patterns of older Americans: National Health Interview Surveys, 1997-2001. **J Stud Alcohol**. Mar;65(2):232-40. 2004.

CAGNON, V.H.A. **Observações morfológicas da glândula de coagulação de ratos (Rattus norvegicus) submetidos ao alcoolismo crônico experimental.** Botucatu. Dissertação (Mestrado em Anatomia). Faculdade de Medicina, UNESP. 1993.

CANON F, BIGARD A.X., MERINO D, LIENHARD F, GUEZENNEC CY: Effects of chronic low frequency stimulation on structural and metabolic properties of hindlimb suspended rat soleus muscle. **Eur J Appl Physiol** 70: 528-535, 1995.

CARLINI E.A., GALDURÓZ J.C.F., NOTO A.R., NAPPO S.A. Levantamento domiciliar de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país – 2001. São Paulo: **CEBRID/ UNIFESP**: 2001.

CEDERBAUM, A I. Introduction—serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury1, **Free Radical Biology and Medicine**, Volume 31, Issue 12, 15 December 2001, Pages 1524-1526

CHARLES H.K. WEST, KATHERINE A. BOSS-WILLIAMS, JAMES C. RITCHIE, JAY M. WEISS, Reprint of: Locus coeruleus neuronal activity determines proclivity to consume alcohol in a selectively-bred line of rats that readily consumes alcohol, **Alcohol**, Volume 50. Pages 91-105. February 2016.

CHEN, S.S.; PENG, M.J.; CHEN, T.J. Study of myopathy in chronic alcoholics with neurological complication. **Kao Hsiung I Hsueh Tsa Chih**. V. 7 no 6:269-306, 1991.

CHIEN YY, CHU NS: Fiber type profile change after partial and total denervation in rat soleus muscles. **Act Histochem Cytochem** 28: 431-437, 1995.

CHLOPICKA J, WANDAS P, ZACHWIEJA Z. Dietary supplements selected by young people exercising in fitness rooms in Krakow and environs. **RoczPanstw Zakl Hig**. 58: 185-189. 2007.

CLARK R.H., FELEKE G, DIN M, YASMIN T, SINGH G, KHAN FA, RATHMACHER JA: Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, 24(3): 133-9. 2000.

“Como ocorre a contração muscular?”. Disponível em: <https://funcionaltotal.wordpress.com/musculacao/como-ocorre-a-contracao-muscular/>. Acesso em: 29.07.2016.

CORMACK, D. **Fundamentos de histologia**. 2 ed. RJ: Guanabara Koogan, 2003

DANGELO, J G e FATTINI, C A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007

DARÉ, L.R. **Influência do β -hidroxi- β -metilbutirato sobre os músculos da mastigação e desenvolvimento e crescimento craniofacial de ratos**. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2013.

Daré LR, Dias DV, Rosa Junior GM, Bueno CR, Buchaim RL, Rodrigues Ade C, Andreo JC. Effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate in masticatory muscles of rats. **J Anat**. 2015 Jan;226(1):40-6. Epub 2014 Nov 14.

DEUTZ, N.E.P; PEREIRA, S.L; HAYS, N.P; OLIVER, J.S; EDENS, N.K; EVANS, C.M; WOLFE, R.R. (in press) Effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on lean body mass during 10 days of bed rest in older adults. **Clinical Nutrition** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.02.011>.

DI LUIGI L. Supplements and the endocrine system in athletes. **Clin Sports Med**. 27(1):131-51. 2008 Jan.

ELEY H.L., RUSSELL S.T., BAXTER J.H., MUKERJI P, TISDALE M.J. Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 293:E923 – 231. 2007.

ELEY HL, RUSSELL ST, TISDALE MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 295:E1417 – 426. 2008.

ENG C.M., SMALLWOOD L.H., RAINIERO M.P., LAHEY M., SAMUEL R., WARD S.R., LIEBER, R.L. Scaling of muscle architecture and fiber types in the rat hindlimb. **The Journal of Experimental Biology** 211, 2336-2345, 2008.

ESTRUCH, R.; NICOLAS, J. M.; VILLEGAS, E.; JUNQUE, A.; URBANO-MARQUEZ, A. Relationship between ethanol-related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. **Alcohol Alcohol.** 28:543–550; 1993

FAWAZ ALASMARI, P.S.S. RAO, YOUSSEF SARI, Effects of cefazolin and cefoperazone on glutamate transporter 1 isoforms and cystine/glutamate exchanger as well as alcohol drinking behavior in male alcohol-preferring rats, **Brain Research**, Volume 1634, 1, Pages 150-157. March 2016

FERNANDES, EV; KF GOESSLER, S DE PAULA RAMOS, LR ALTIMARI, EJ VENANCIO, Efeitos da ingestão alcoólica crônica e do exercício físico na massa corporal, no consumo alimentar e na ingestão líquida de ratos Wistar. **Revista da Educação Física/UEM** 21 (3). 527-533. 2010.

FERNANDEZ - SOLA, J.; JUNYENT, J.M.; URBANO-MARQUEZ, A. Alcoholic myopathies. **Curr Opin Neurol.**, v. 9, n. 5, p. 400-5, 1996.

FERNANDEZ - SOLA, J.; SACANELLA, E.; ESTRUCH, R.; NICOLAS, J.M.; GRAU, J.M.; URBANO MARQUES, A. Significance of type II fiber atrophy in chronic alcoholic myopathy. **J Neurol Sci.**, v. 130, n.1, p. 69-76, 1995

FERRAZ, M.L.; GABBAI, A.A.; OLIVEIRA, A.S.; FERRARI, A.P.; MISZPUTEN, S.J.; FERREIRA NETO, A.; CASTELO FILHO, A.; SCHMIT, B. Histochemical study of the skeletal muscle in chronic alcoholism. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 47, n. 2, p. 139-49, 1989.

FERREIRA R, NEUPARTH MJ, ASCENSÃO A, MAGALHÃES J, DUARTE J, AMADO F. Atrofia muscular esquelética. Modelos experimentais, manifestações teciduais e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**; 4:94-111. 2004.

FITSCHEN, P.J; WILSON, G.J; WILSON, J.M; WILUND, K.R. Efficacy of b hydroxy-b-methylbutyrate supplementation in elderly and clinical populations. **Nutrition.** v.29, p. 29-36, 2013

FOGGER SA. Reducing the Risk of Alcohol Use Disorders in Women. **Nurs Womens Health.**19(6):537-41. 2015 Dec-2016 Jan

FRAHER, J.P. et al. Relative growth and maturation of axon size and myelin thickness in the tibial nerve of the rats. I. Normal animals. **Acta Neuropathol**, v. 79, p.364-374. 1990.

GERLINGER-ROMERO F, GUIMARÃES-FERREIRA L, GIANNOCO G, NUNES MT. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. **Growth Horm IGF Res**. Apr;21(2):57-62. 2011.

GOLLNICK, P.D; MATOBA, H. The muscle fiber composition of skeletal muscle as a predictor of athletic success : An overview. **The American Journal of Sports Medicine**. 12, 212-217, 1984.

GRAHAM K, S. BERNARDS, R. KNIBBE, S. KAIROUZ, S. KUNTSCHE, S.C. WILSNACK, G. GMEL. Alcohol-related negative consequences among drinkers around the world *Addiction*, 106, pp. 1391–1405. 2011.

GROSSMAN EJ, ROY RR, TALMADGE RJ, et al.: Effects of inactivity on myosin heavy chain composition and size of rat soleus fibers. **Muscle Nerve** 21: 375-389, 1998.

HAO Y, JACKSON JR, WANG Y, EDENS N, PEREIRA SL, ALWAY SE. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**;301:R701 – 715 . 2011.

HASSELGREN, P.O. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) and prevention of muscle wasting. **Metabolism**. 63(1): 5. 2014.

HOLECEK M, MUTHNY T, KOVARIK M, SISPERA L. Effect of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. **Food Chem Toxicol**;47:255 –259. 2009.

HSIEH LC, CHIEN SL, HUANG MS, TSENG HF, CHANG CK. Anti-inflammatory and anticatabolic effects of short-term beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. **Asia Pac J Clin Nutr**; 15:544– 550. 2006.

HU X, HARMAN, J, ALMUT G. W, ZHONG Y, AMBER L W, TONYA N T, PLANKEY M, RUBTSOVA A, CROPSEY C, MARDGE H. COHEN, ADAORA A. ADIMORA, MILAM J, ADEDMEJI A, COOK RL, Utilization of alcohol treatment among HIV-positive women with hazardous Drinking, **Journal of Substance Abuse Treatment**, Available online 15 February 2016.

HYONG, CHO, Jin. Revivendo o antigo sermão da medicina com o efeito placebo. **Rev. Bras. Psiquiatr.** [online], vol.27, n.4, pp. 336-340. 2005.

IWAMOTO DEREK KENJI, ALICE CHENG, CHRISTINA S. LEE, STEPHANIE TAKAMATSU, DERRICK GORDON, “Man-ing” up and getting drunk: The role of masculine norms, alcohol intoxication and alcohol-related problems among college men, **Addictive Behaviors**, Volume 36, Issue 9, Pages 906-91. September 2011

JONES, A.W. Alcohol: Acute and Chronic Use and Postmortem Findings, **In Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine (Second Edition)**, edited by Jason Payne-James and Roger W. Byard, Elsevier, Oxford, Pages 84-107. 2016.

JÓWKO E, OSTASZEWSKI P, JANK M, SACHARUK J, ZIENIEWICZ A, WILCZAK J, NISSEN S. Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. **Nutrition**. Jul-Aug;17(7-8):558-66, 2001.

JUNQUEIRA, L.C.U. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 524p. 2008.

KACHANI, T. A; BRASILIANO, S; HOCHGRAF, BRUFENTRINKER, P.. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. **Rev. psiquiatr. clín.**, São Paulo , v. 35, supl. 1, p. 21-24, 2008.

KHAN, M. The hisoenzymology of striated muscle fibers: an overview. **Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol**. 22(3-4) 383-93, 1977.

KORNASIO R, RIEDERER I, BUTLER-BROWNE G, MOULY V, UNI Z, HALEVY O. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. **Biochim Biophys Acta**;1793:755–763. 2009.

LANG CH, LIU X, NYSTROM G, WU D, COONEY RN, FROST RA. Acute effects of growth hormone in alcohol-fed rats. **Alcohol Alcohol**. Mar-Apr;35(2):148-58. 2000.

LEWIS DM, LEVI AJ, BROOKSBY P, JONES JV: A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fibre type composition. **Exp Physiol** 79: 377-386, 1994.

LLOYD-RICHARDSON EE, LUCERO ML, DIBELLO JR, JACOBSON AE, WING RR. The relationship between alcohol use, eating habits and weight change in college freshmen. **Eat Behav**. 2008.

MARIUSZ S, BOGDAN S, KAZIMIERZ J, ANDRZEJ W L, SWIERGIEL HA, Opposite effects of alcohol in regulating stress-induced changes in body weight between the two mouse lines with enhanced or low opioid system activity, **Physiology & Behavior**, Volume 99, Issue 5, 19, Pages 627-631. April 2010.

MARTINS ERC, ZEITOUNE RCG, FRANCISCO MTR, SPINDOLA T, MARTA CB. Concepções do trabalhador de enfermagem sobre drogas: a visibilidade dos riscos. **Rev enferm UERJ**. 17:368-72. 2009.

MAY PE, BARBER A, D'OLIMPIO JT, HOURIHANE A, ABUMRAD NN: Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. **Am J Surg**,183(4):471-9. 2002.

Ministério da Saúde (Br). Secretaria de Atenção à Saúde. **A política do Ministério da Saúde para atenção integral a usuários de álcool e outras drogas**. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004.

MIZUNOYA W., IWAMOTO,Y., SATO, Y., TATSUMI R., IKEUCHI, Y. Cold exposure increases slow-type myosin heavy chain 1 (MyHC1) composition of soleus muscle in rats. **Animal Science Journal** 85, 293–304, 2014.

MYRHAGE, R. Microvascular supply of skeletal muscle fibres: a microangiographic, histochemical and intravital microscopic study of hind limb muscles in the rat, rabbit and cat. **Goteborg**: [S.n.], 1977.

NAKANO H, HAYASHI K, SAITOH A, SAKUMA K, KATSUTAS: Oxidative enzyme activity in the rat soleus muscle and its motoneurons during postnatal maturation. **Brain Res Bull** 38: 235-238, 1995.

NARUSAWA M: Change in fiber type in partially-denervated soleus muscle of the rat. **Tokai J Exp Clin Med** 10: 499-507, 1985.

NISSEN SL, SHARP RL. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. **J Appl Physiol**; 94(2):651-9. 2003.

NUNES EA , LOMAX AR, NOAKES PS, MILES EA , FERNANDES LC, CALDER PC. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate modifies human peripheral blood mono-nuclear cell proliferation and cytokine production in vitro. **Nutrition**. 27:92– 99. 2011.

OISHI Y, YAMAMOTO H, NAGANO M, MIYAMOTO E, FUTATSUKA M: The effects of 2,5-hexanedione and acrylamide on myosin heavy chain isoforms of slow and fast skeletal muscles of the rat. **Toxicol Appl Pharm** 139: 15-21, 1996.

PALFAI, T P., ZISSERSON R, SAITZ R, Using personalized feedback to reduce alcohol use among hazardous drinking college students: The moderating effect of alcohol-related negative consequences, **Addictive Behaviors**, Volume 36, Issue 5, Pages 539-542. May 2011.

PASNOOR, M; RICHARD J. BAROHN, MAZEN M. DIMACHKIE, Toxic Myopathies, **Neurologic Clinics**, Volume 32, Issue 3, Pages 647-670. August 2014.

PEREIRA, C.E.M; SILVA, J.D.M; ROMEIRO, V.R. Aspectos éticos da experimentação animal. **Acta Cir Bras**, v. 13, n. 2, 1998.

PETER B. TOMLINSON, COREY JOSEPH, MANUELA ANGIOI, Effects of vitamin D supplementation on upper and lower body muscle strength levels in healthy individuals. A systematic review with meta-analysis, **Journal of Science and Medicine in Sport**, Volume 18, Issue 5, Pages 575-580. September 2015.

PETTE, D., STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, 115, 5, 359-372, 2001.

PINHEIRO CH, GERLINGER-ROMERO F, GUIMARÃES-FERREIRA L, DE SOUZA-JR AL, VITZEL KF, NACHBAR RT, NUNES MT, CURI R. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**. 2012 Jul;112(7):2531-7. 2011

Portal S, Eliakim A, Nemet D, Halevy O, Zadik Z. Effect of HMB supplementation on body composition, fitness, hormonal profile and muscle damage indices. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 23, n. 7, p. 641-50, Jul 2010.

PREEDY VR, PETERS TJ, PATEL VB. Chronic alcoholic myopathy: transcription and translational alterations. **FASEBJ** 8:1146– 51. 1994.

PREEDY, V. R. Contractile protein synthesis rates in vivo in the rat jejunum: modulating role of adrenalectomy and thyroidectomy on ethanolinduced changes. **Addict. Biol.** 2: 67–79. 1997.

PREEDY, V.R.; ADACHI,J.; ASANO, M.; KOLL, M.; MANTLE, D.; NIEMELA, O.; PARKKILA, S.; PAICE, A. G.; PETERS, T.; RAJENDRAM, R.; SEITZ, H.; UENO, Y.; WORRALL, S. Free radicals in alcoholoc myopathy: índices of damage and preventive studies. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 32, No. 8, pp. 683– 687, 2002.

PREEDY, V.R.; BATEMAN, C.J.; SALISBURY, J.R.; PRICE, A.B.; PETER, T.J. Ethanol-induce skeletal muscle myopathy: biochemical and histochemical

measurements on type I and type II fibre-rich muscles in the young rat. **Alcohol** v. 24, n. 6, p. 533-9, 1989.

PREEDY, V.R.; GOVE, C.D.; PANOS, M.Z.; SHERWOOD, R.; PORTMANN, B.; WILLIAMS, R.; PETERS, T.J. Liver histology, blood biochemistry and RNA, DNA and subcellular protein composition of various skeletal muscle of rats with experimental cirrhosis: implications for alcoholic muscle disease. **Alcohol** v. 25, n. 6, p. 641-9, 1990.

PREEDY, V.R.; SALISBURY, J.R.; PETERS, T.J. Alcoholic muscle disease: features and mechanisms. **J. Pathol.**, v.173 , n.4, p. 309-15, 1994.

PULLEN A. The distribution and relative sized of fiber types in the extensor digitorum longus and soleus muscle of the adult rat. **J Anat.** 123(Pt2): 467. 1977

RATHMACHER JA, ZACHWIEJA JJ, SMITH SR, LOVEJOY JL, BRAY GA: The effect of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on lean body mass and muscle strength during prolonged bedrest. **FASEB J**, 13:A909. 1999.

RATHMACHER JA: Effect of the leucine metabolite β -hydroxy- β methylbutyrate on muscle protein synthesis during prolonged bedrest. **FASEB J** 13:A1025. 1999.

REILLY, M.E.; ERYLMAZ, E.I.; AMIR, A.; PETERS, T.J.; PREEDY, V.R. Skeletal muscle ribonuclease activities in chronically ethanol-treated rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 22, n. 4, p. 876-83, 1998.

REILLY, M.E.; MCKOY, G.; MANTLE, D.; PETERS, T.J.; GOLDSPINK, G. PREEDEY, V.R. Protein and mRNA levels of the myosin heavy chain isoforms IB, IIa, IIx and IIb in types and type II fibre-predominat rat skeletal muscle in response to chronic alcohol feeding. **J Muscle Research and Cell Motility** 21: 763-773, 2000.

ROMERO J C, SANTOLARI A F, GONZÁLEZ -REIMERS E. Chronic alcoholic myopathy and nutritional status. **Alcohol** 11 :549 –55. 1994.

RUBIN, E.; KATZ, A.M.; LIEBER, C.S.; STEIN, E.P.; PUSZKIN, S. Muscle damage produced by chronic alcohol consumptio. **Am J Pathol.**, v. 83, p. 499-516, 1976.

SAKAKIMA H, KAWAMATA S, KAI S, et al.: Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplate and the soleus muscle in the rat. **Arch Histol Cytol** 63: 495-506, 2000.

SALISBURY, J.R.; PREEDY, V.R.; ROSE, P.E.; DEVERELL, M.H.; PETTERS, T.J. Ethanol-induce chronic myopathy in the young rat: a light and electron microscopic study in type I or type II fibre-rich skeletal muscles. **Alcohol Alcohol**, v. 27, n. 5, p. 493-500, 1992.

SAKUMA K, YAMAGUCHI A, OHMORI H, KATSUTA S: Nonuni form changes in fibre types in the soleus muscle on the developing rat. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol** 70: 132-137, 1995

SELVAN, T, VETRI et al. "A Cross-Sectional Study on Pattern of Alcohol Consumption and Body Mass Index Among Health Institution Students in Bagalkot." **Journal of Clinical and Diagnostic Research** : JCDR 9.12 (2015).

SESTOFT, L.; IVERSEN, P.; NORDGAARD, I. AMRIS, S.; JOEN, T.; OVERGAARD, O. KLITGAARD, H. Working capacity and expression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle of chronic alcoholic men with liver disease after 1 day and 4 wee of alcohol abstinence. **Clin Scin Colch.**, v. 86, n. 4, p. 433-40, 1994.

SHARMA, S.C.; RAY, R.C.; BANERJEE, A.K.; LASKSHMANAN, C. Chronic muscle wasting in alcoholics a histochemical and biochemical study. **Indian J Pathol Microbiol.**, v. 33, n. 3, p. 244-9, 1990.

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 Res**; 65:277 – 83. 2005.

SOARES JMC, PÓVOAS S, NEUPARTH MJ, DUARTE JA: The effects of beta-hydroxy-beta-methylbuturate (HMB) on muscle atrophy induced by immobilization. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 33(5): 140. 2001.

SOUKUP,T; ZACHAŘOVÁ, G ., SMERDU, V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. **Acta Histochem.** 104(4), 399–405, 2002.

SOUKUP,T, SMERDU, V., ZACHAŘOVÁ, G. Fiber Type Composition of Unoperated Rat Soleus and Extensor Digitorum Longus Muscles after Unilateral Isotransplantation of a Foreign Muscle in Long-Term Experiments. **Physiol. Res.** 58: 253-262, 2009.

SPENCER, H. Chronic alcoholism-frequently overlooked cause of osteoporosis in men. **Am J Med.**, v. 80, p. 393-7, 1986.

STAL, P. Characterization on the human oro-facial and masticatory muscle with respect to fiber types, miosyn and capillaries. **Swed Dent J Suppl**, v.28, p. 7-45, 1994.

STARON, R. S. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. **Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne De Physiologie Appliquée**, 22, 4, 307-27, 1997.

SUTHERLAND, G.T.; SHEAHAN, P.J.; MATTHEWS, J.; DENNIS, C.V.P; SHEDDY, D.S.; MCCROSSIN, T. The effects of chronic alcoholism on cell proliferation in the human brain. **Experimental Neurology**, v 247, p. 9-18, 2013

TALMADGE RJ, ROY RR, EDGERTON VR: Persistence of hybrid fibers in rat soleus after spinal cord transection. **Anat Rec** 255: 188-201, 1999.

"The Cytoskeleton".(imagem traduzida) Disponível em: <http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/Fig-12-25.jpg>. Acesso em: 29.07.2016.

TROUNCE, I.; BYRNE, E.; DENNETT, X. Biochemical and morphological studies of skeletal muscle in experimental chronic alcoholic myopathy. **Acta Neurol Scand**, v. 82, n. 6, p. 386-91, 1990.

WASSIF, W.S.; PREEDY, V.R.; SUMMER, B.; DUANE, P.; LEIGH, N.; PETERS, T.J. The relationship between muscle fibre atrophy factor, plasma carnosinase activities and muscle RNA and protein composition in chronic alcoholic myopathy. **Alcohol Alcohol**, v. 28, n. 3, p. 325-31, 1993.

WASSIF, W.S.; SHERMAN, D.; SALISBURY, J.R.; PETERS, T.J. Use of dynamic tests of muscle function and histomorphometry of quadriceps muscle biopsies in the investigation of patients with chronic alcohol misuse and chronic fatigue syndrome. **Ann Clin Biochem**. v. 31, n. 5, p. 462-8, 1994.

WERNECK L. O valor da biópsia muscular na neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. **Ver Bras Clin Terap**; 10. 1981.

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 & Metabolism** 5 :1-17, 2008.

World Health Organization [Internet]. Global status report on alcohol and health. 2014.

World Health Organization. Global status report on alcohol 2004. Geneva (Swi): WHO; 2004.

YAMAGUCHI A, SAKUMA K, MORITA I, SOYA H, TAKEDA H, KATSUTA S: Changes in fibre types in rat soleus and plantaris muscles following hypophysectomy and compensatory overload. **Acta Physiol Scand** 158:89-95, 1996.

YEOMANS-M, MEGAN E.P, The effect of perceived risk on the combined used of alcohol and marijuana: Results from daily surveys, **Addictive Behaviors Reports**, Volume 2, December 2015, Pages 33-36, ISSN 2352-8532, <http://dx.doi.org/10.1016/j.abrep.2015.05.004>.

ZANCHI NE, GERLINGER-ROMERO F, GUIMARÃES-FERREIRA L, DE SIQUEIRA FILHO MA, FELITTI V, LIRA FS, SEELAENDER M, LANCHI AH JR. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. **Amino Acids**. Apr;40(4):1015-25. 2011.

Anexo

Anexo 1

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 024/2013

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Influência do β -hidroxi- β -metilbutirato em ratos submetidos ao alcoolismo**, de autoria de Idvaldo Aparecido Favaretto Junior, sob sua orientação, foi enviado a um relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão, realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
Docente do Departamento de Ciências Biológicas