**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

MIZAEL PEREIRA

**Efeitos da suplementação com HMB sobre a musculatura
esquelética de ratos submetidos ao tratamento com dexametasona.**

**BAURU
2016**

MIZUEL PEREIRA

**Efeitos da suplementação com HMB sobre a musculatura
esquelética de ratos submetidos ao tratamento com dexametasona.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo.

Versão Corrigida

BAURU
2016

Pereira, Mizael

P414e Efeitos da suplementação com HMB sobre a musculatura esquelética de ratos submetidos ao tratamento com dexametasona/ Mizael Pereira. – Bauru, 2016.

103p.: il.; 31 cm

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, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em 17 de junho de 2013.

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 018/2013

Data 17/06/2013

Dedicação

Gostaria de dedicar este trabalho à meus pais, **Nilda Genoveva da Silva Pereira** e **Dionísio Aparecido Pereira**, que por toda a minha vida estiveram ao meu lado incondicionalmente, me incentivando, corrigindo e acima de tudo me guiando nos caminhos de Deus, ensinando além das palavras, pelo exemplo. À vocês meu muito obrigado pelo Amor, carinho e afeto com que fui criado, amo vocês eternamente!

Dedico este trabalho também à minha querida e amada esposa **Jéssica Hertel Pereira** e minhas filhas **Ana Júlia da Silva Pereira** e **Lívia Hertel Pereira**, as quais são a minha base e o motivo de levantar-me todos os dias com a vontade de viver a vida. Família é o melhor presente que Deus nos dá, e eu não tenho palavras que pudessem agradecer a felicidade que sinto por vocês serem a minha família! Amo vocês incondicionalmente!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à **Deus** pois caso não fosse de sua vontade nada disto seria possível, *“Porque Dele e por Ele, para ele são todas as coisas” (Rm. 11:36a)*, **Deus** sempre foi o começo e o fim de todas as coisas em minha vida. Obrigado **Senhor**, por cada dia vivido, obrigado por cada gesto de amor que se revela em cada pequeno cuidado, obrigado por ter colocado em meu caminho e em minha vida a minha família, meus amigos e cada oportunidade ao seu tempo, hoje sei que posso confiar que *“Aquilo que os olhos não viram, nem os ouvidos ouviram, nem subiu ao coração do homem, é o que o Senhor tem preparado para aqueles que o amam (1 Co 2:9)”*, ao olhar para trás, ao vislumbrar o futuro só posso dizer uma coisa: Obrigado **Pai!**

À meus pais, **Nilda Genoveva da Silva Pereira e Dionísio Aparecido Pereira**, vocês são a razão de hoje eu ser quem sou, só tenho a agradecer, o amor de vocês por mim, hoje olhando para trás posso perceber que até mesmo os puxões de orelha, broncas, castigos eram por amor. Obrigado por sempre lutar por mim, me apoiar, lutar, sofrer e vencer comigo à cada etapa e cada novo sonho em minha vida, vocês são um presente que não tenho como pagar a não ser expressar minha gratidão eterna, Amo vocês!

Ao meu irmão **Daniel Pereira** pelo companheirismo, e por me mostrar que a palavra irmandade é realmente muito mais do que uma simple palavra pode esprestar! Irmão, brother, companheiro e amigo!

À minha esposa **Jéssica Hertel Pereira**, amor da minha vida, muito obrigado por todo o apoio, companheirismo, amizade, amor e principalmente por sonhar junto comigo, já não consigo imaginar um futuro sem você ao meu lado, agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho, amo você.

À mulher que deu à luz a mulher da minha vida, minha sogra **Viviane Hertel de Paula**, que nos apoiou em momentos difíceis, que confiou em minhas mãos um de seus bens mais preciosos, sua filha. Que mesmo eu sendo genro, acolhereu como filho e me aceitou de braços abertos em sua casa, mesmo diante de tantas dificuldades pelas quais todos passávamos. Agradeço a você e também à seus filhos, meus cunhados, **Jhennyfer Hertel Costa, Ricardo Junior Hertel Costa e Joyce Hertel Costa** pelo amor com que fui recebido por esta família, hoje posso dizer que esta família é minha também, amo cada um de vocês!

Um agradecimento especial ao meu Orientador **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, que mesmo contrariando indicações (fato que só vim a saber muito tempo depois) aceitou me conhecer pessoalmente, e que por palavra de um amigo (**Prof. Dr. Jorge Antonio de Almeida**) decidiu dar-me um voto de confiança, sou grato por todo o crescimento proporcionado, sou grato por ser uma boa pessoa como você que Deus escolheu para ser meu orientador e me orientar neste caminho. Obrigado pelas conversas, pela amizade, por ser uma ótima pessoa e professor exemplar, Muito Obrigado!

Aos professores do Departamento de Anatomia **Prof. Dr. Rogerio Leone Buchaim** pela amizade e por suas palavras e posturas, tenho-o como um exemplo a ser seguido, não o considero mais apenas meu professor mas também como meu amigo pessoal, saiba que tenho-o em grande estima e consideração! e também ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues** e ao **Prof. Dr. André Luiz Shinohara**, obrigado por pelo apoio em minha formação e no desenvolvimento desta pesquisa, muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Jorge Antonio de Almeida**, você foi a chave para que eu pudesse conhecer meu futuro orientador e também para que eu pudesse chegar mais perto do sonho de entrar no mestrado. Agora isso se concretizou e caminho hoje para a concretização deste sonho, obrigado pelo incentivo, pelo voto de confiança, obrigada pelo apoio. Eterna gratidão!

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, a secretária **Daniela Ariane Alves**, pela atenção e dedicação em nos atender tão bem sempre, e também à **Lourisvalda de Jesus Celetino**, pelo carinho e amor que deposita em tudo que faz, seja um café, uma conversa, agradeço a Deus por pessoas como você! Aos técnicos **Romário Moises de Arruda** e **Ovídio dos Santos Sobrinho**, que sempre me receberam muito bem, sempre dispostos a auxiliar no que fosse necessário, por tantas conversas dentro e fora do ambiente de trabalho, o tempo em que convivemos jamais será esquecidos, são amigos pra uma vida toda!

Às funcionárias da Pós-Graduação **Leila**, **Letícia** e **Fátima**, sempre nos auxiliando nas dúvidas, aguentando nossos desesperos, obrigada.

Às amigas de pós-graduação **Jéssica Barbosa de Oliveira Gonçalves**, **Iris Jasmin Santos German**, **Karina Torres Pomini Puzipe**, **Marcelie Priscila de Oliveira Rosso** e **Dayane Maria Braz Nogueira**, grandes mulheres que guardadarei eternamente em minha memória, não apenas que me auxiliaram nas etapas desta pesquisa, mas as quais também aprendemos juntos, que aprendi a admirar cada uma individualmente por suas características, Amo cada uma de vocês!

Em especial aos meus amigos **Cleuber Rodrigo de Souza Bueno** e **Idvaldo Aparecido Favaretto Junior**, começamos juntos e caminhamos juntos ainda hoje, ainda que por caminhos diferentes, vejo que nossa amizade será para o resto da vida, são tantos momentos, alegrias e tristezas divididas que o laço que criamos sempre venceu a distancia, a ausência e ate mesmo os desencontros! São meus companheiros de estudo, de buteco, de festas e tantos outros momentos. São meus irmãos de coração, obrigada por tudo!
#TamojuntoSempre!

Aos meus amigos, aos quais também considero-os meus mentores na vida acadêmica, **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Júnior**, **Prof. Dr. Daniel Ventura Dias** e à **Me. Leticia Rossi Daré Dias**, pelos ensinamentos, pelo aprendizado e companheirismo nas longas horas de laboratório, o empenho e exemplo de vocês me ensina e me inspira até hoje, mesmo depois de anos de convivência. Vocês são uma referencia para mim, pessoas à quem recorro nos momentos de duvidas e incertezas, espero um dia poder retribuir à altura a importância que vocês tiveram em minha formação, muito obrigado! Forte Abraço!

Aos Professores membros da Banca de defesa, por aceitarem o convite. Sou grata por sua dedicação e consideração que com certeza contribuirão para o enriquecimento deste trabalho.

A ex-secretária do Departamento e Pós-Graduação em Biologia Oral **Vera Lúcia Rufino Rosa**, que sempre nos recebeu com ética nos auxiliando no que era necessário com carinho e simpatia.

Aos dirigentes (diretoria, vice-diretores, colegiados e comissões assessoras) da Faculdade de Odontologia de Bauru e a atual diretora **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP)**, todos os funcionários da do Biotério, Biblioteca e Pós-graduação, que participaram e contribuíram de certa forma para que esta pesquisa se concretizasse.

Ao **PAE – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino**, fornecido pela Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo apoio financeiro durante um semestre, fazendo parte do programa de Mestrado.

À **CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pelo apoio financeiro durante um período do Mestrado.

Epígrafe

*Se o Senhor não edificar a casa, em vão
trabalham os que a edificam; se o Senhor não
guardar a cidade, em vão vigia a sentinela.*

*Inútil vos será levantar de madrugada,
repousar tarde, comer o pão de dores, pois é ele quem
dá aos seus amados o sono.*

Salmos 127: 1, 2

RESUMO

O músculo estriado esquelético é uma entidade extremamente versátil, capaz de alterar seus padrões e características fenotípicas sob diversas condições, tais como, atividade neuromuscular, estimulação elétrica, idade, atividade hormonal e exercício físico. Sabe-se também que o balanço entre estímulos atróficos e hipertróficos controlam diretamente a massa muscular do indivíduo e estas variações implicam diretamente não apenas sobre o volume muscular, mas também conteúdo de proteínas e produção de força. Neste sentido, a atrofia muscular (perda de massa muscular) é caracterizada tanto pela diminuição na área de secção transversa das fibras musculares, como também pelo decréscimo no conteúdo de proteínas miofibrilares e consequente redução do volume muscular. Esta atrofia muscular pode ocorrer sob diversas condições clínicas e/ou patológicas, acarretando na diminuição ou perda da massa magra levando à uma consequente diminuição da atividade física, da qualidade de vida e inclusive pior resposta ao tratamento, ocasionando consequentemente aumento da mortalidade. Fica claro desta maneira, que, os métodos que visam a prevenção ou tratamento à atrofia muscular tem importante relevância clínica em muitos grupos de pacientes, além de ser um importante fator contribuinte na qualidade de vida e autonomia destes indivíduos. Com isso o estudo de determinados tratamentos que combatam a atrofia muscular torna-se de vital importância, dentre os quais, vem ganhando destaque o β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB). Deste modo teve-se como objetivo neste trabalho verificar a efetividade do HMB em prevenir a atrofia muscular induzida por dexametasona (DEXA). Para isto, foram utilizados 32 animais da linhagem Wistar com idade de 60 dias, distribuídos nos seguintes grupos: Grupo Experimental Placebo (GEP), n=8, tratados por 10 dias consecutivos com gavagem e injeção intraperitoneal, ambas contendo apenas solução salina; Grupo Experimental Dexametasona (GED), n=8, tratados por 10 dias consecutivos com gavagem contendo solução salina e injeção intraperitoneal contendo dexametasona; Grupo Experimental HMB (GEH), n=8, tratados por 10 dias consecutivos com gavagem contendo HMB e injeção intraperitoneal contendo solução salina; e Grupo Experimental Dexametasona + HMB (GEDH), n=8, tratados por 10 dias consecutivos com gavagem contendo HMB

e injeção intraperitoneal contendo DEXA. Os animais foram acondicionados em caixas coletivas com 4 animais por caixa, com comida e água à vontade em sala climatizada com temperatura de 22° e respeitando o ciclo de 12 horas claro/escuro. Finalizados os dez dias de tratamento, os animais foram eutanasiados para a coleta do material. Após as análises, as médias dos grupos para peso corpóreo dos animais, peso muscular e os valores da morfometria foram todos submetidos ao teste One-Way ANOVA, seguidos do Teste de Tukey, sendo o valor considerado estatisticamente significativo de $p < 0,05$. Ao final pôde-se concluir que, no delineamento experimental aqui aplicado, o HMB não foi capaz de atenuar ou prevenir a perda de peso corporal induzida pela DEXA, sendo que o efeito anticatabólico esperado pelo HMB não repercutiu no músculo EDL, contudo foi capaz de prevenir a atrofia no músculo sóleo.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Atrofia muscular. Dexametasona. Leucina.

ABSTRACT

Effects of supplementation with HMB on the skeletal muscle of rats subjected to treatment with dexamethasone.

The skeletal muscle is an extremely versatile entity, able to change their patterns and phenotypic characteristics under various conditions such as neuromuscular activity, electrical stimulation, age, hormonal activity and exercise. It is also known that the balance between atrophic and hypertrophic stimuli directly control the muscle mass of the individual and these changes directly affect not only on muscle volume, but also protein content and production strength. In this sense, muscle atrophy (loss of muscle mass) characterized by both, the decrease in cross-sectional area of muscle fibers, but also by decreasing the content of myofibrillar proteins and consequent reduction in muscle volume. This muscle atrophy may occur in various pathological conditions, resulting in decrease or loss of lean body mass leading to a consequent reduction in physical function, quality of life and even worse response to treatment, thus leading to increased mortality. It is clear in that way that the methods aimed at preventing or treating muscle atrophy has important clinical relevance in many groups of patients, as well as being a major contributing factor in the quality of life and autonomy of individuals. Thus, the study of certain treatments that combat muscle atrophy become of vital importance, among which highlight is winning the β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). Thus, it is aimed in this study to assess the effectiveness of HMB to prevent muscle atrophy induced by dexamethasone (DEXA). For this, we used 32 Wistar animals aged 60 days, distributed in the following groups: experimental group Placebo (GEP), n = 8, treated for 10 consecutive days with gavage and intraperitoneal injection, both containing only saline. Experimental group Dexamethasone (GED), n = 8, treated for 10 consecutive days with gavage containing saline and intraperitoneal injection containing dexamethasone. Experimental group HMB (GEH), n = 8, treated for 10 consecutive days with gavage containing HMB and intraperitoneal injection containing saline solution and Experimental Group Dexamethasone + HMB (GEDH), n = 8, treated for 10 consecutive days with gavage containing HMB and intraperitoneal injection

containing DEXA. The animals were placed in collective boxes with 4 animals per cage with food and water at will in a room with 22 ° temperature and respecting the light / dark 12-hour cycle. Completed the ten days of treatment, the animals were euthanized to collect the material. After the analysis, the mean body weight to groups of animals, muscle weight and values of morphometry were all subjected to one-way ANOVA followed by Tukey test, with the amount considered statistically significant at $p < 0.05$. At the end, it could be concluded that the experimental design applied here, the HMB was not able to mitigate or prevent the loss of body weight induced by DEXA, and the anti-catabolic effect expected by HMB not reflected in the EDL muscle, but was able to prevent atrophy in the soleus muscle.

Keywords: Skeletal Muscle. Muscle Atrophy. Dexamethasone. Leucine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da fibra muscular com ampliação do sarcômero e proteínas contráteis.	44
Figura 2. Criostato utilizado no corte dos músculos	63
Figura 3. Microscópio Óptico integrado ao computador	64
Figura 4. Grafico representando Média Inicial e Final de Peso Corpóreo dos grupos	67
Figura 5. Grafico das Médias de Peso Muscular dos grupos.....	68
Figura 6. Fotomicrografia do músculo sóleo dos grupos: (A) GEP, (B) GED, (C) GEH e (D) GEDH corados em HE (40x)	71
Figura 7. Fotomicrografia do músculo EDL dos grupos: (A) GEP, (B) GED, (C) GEH e (D) GEDH corados em HE (40x)	73
Figura 8. Gráficos dos valores de área da fibra e diâmetro mínimo dos grupo nos músculos EDL e sóleo.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média dos pesos Inicial e Final dos animais dos grupos estudados.....	67
Tabela 2. Média de peso muscular dos músculos sóleo e EDL	69
Tabela 3. Média dos valores de área da fibra dos músculos EDL e Sóleo.....	75
Tabela 4. Média dos valores de diâmetro mínimo da fibra dos músculos EDL e Sóleo	76

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

HMB	β -Hidroxi- β -Metilbutirato
DEXA	Dexametasona
BCAA	Branched Chain AminoAcid
ATP	Adenosina Tri Fosfato
EDL	Extensor Digitorum Longus
SO	Sóleo
CEEPA	Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
USP	Universidade de São Paulo
GEP	Grupo Experimental Placebo
GED	Grupo Experimental DEXA
GEH	Grupo Experimental HMB
GEDH	Grupo Experimental DEXA + HMB
HE	Hematoxilina e Eosina
ANOVA	Análise de Variância
DP	Desvio Padrão
μm^2	micrômetros quadrados
ml	mililitro
mg	miligrama
g	grama
Kg	Kilograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	39
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	43
2.1 O MÚSCULO ESQUELÉTICO	43
2.1.1 A FIBRA MUSCULAR	44
2.2 ATROFIA MUSCULAR	48
2.3 B-HIDROXI-B-METILBUTIRATO	50
3 PROPOSIÇÃO	55
3.1 OBJETIVO GERAL.....	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS E DIVISÃO DOS GRUPOS	59
4.2 PROTOCOLO DE ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	60
4.2.1 DEXAMETASONA	60
OS GRUPOS QUE NÃO RECEBERAM DEXAMETASONA FORAM SUBMETIDOS TAMBÉM À INJEÇÃO INTRAPERITONEAL, PORÉM CONTENDO APENAS DE SOLUÇÃO SALINA NO MESMO VOLUME DOS GRUPOS TRATADOS.	
60	
4.2.2 B-HIDROXI-B-METILBUTIRATO	60
4.3 TRATAMENTO DOS GRUPOS	60
4.3.1 GRUPO EXPERIMENTAL PLACEBO – GEP	60
OS ANIMAIS DESTES GRUPO FORAM TRATADOS POR 10 DIAS CONSECUTIVOS COM GAVAGEM E INJEÇÃO INTRAPERITONEAL, AMBAS CONTENDO APENAS SOLUÇÃO SALINA. ESTE PROCEDIMENTO FOI ADOPTADO PARA QUE O ESTRESSE DOS TRATAMENTOS FOSSE COMUM TAMBÉM A ESTES GRUPOS PORÉM SEM O EFEITO DE QUAISQUER DROGAS.	
60	
4.3.2 GRUPO EXPERIMENTAL DEXAMETASONA – GED.....	60
4.3.3 GRUPO EXPERIMENTAL HMB – GEH	61
4.3.4 GRUPO EXPERIMENTAL DEXAMETASONA + HMB – GEDH	61
4.4 COLETA DAS AMOSTRAS E ANÁLISES	61
4.4.1 ANESTESIA, PESAGEM E RETIRADA DAS AMOSTRAS	61
4.4.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS MÚSCULOS.....	62
4.4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	63
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5 RESULTADOS	67
5.1 PESO CORPORAL DOS ANIMAIS	67
5.2 PESO MUSCULAR	68
5.3 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DOS MÚSCULOS SÓLEO E EDL.....	69
6 DISCUSSÃO	79
6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	79
6.2 PERFIL DO ANIMAL UTILIZADO.....	80

6.3 PESO CORPORAL E PESO MUSCULAR	80
6.4 MORFOMETRIA	82
7 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS	91
ANEXO	103

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tecido musculo esquelético constitui cerca de 40% da massa do corpo humano, desempenhando diversas funções tais como locomoção e metabolismo (PETTE e STARON, 2000).

Dentre as principais características do músculo estriado esquelético, destaca-se a sua multiplicidade dos tipos de fibras que o compõe, fator este, determinante para variedade de suas capacidades funcionais (PETTE e STARON, 2000).

A composição das fibras de um musculo é determinada em parte por fatores genéticos, contudo os músculos não são unidades fixas, sendo assim capazes de adaptar-se alterando o perfil fenotípico de suas fibras conforme a demanda (CHEMELO et al., 2011). Essa alteração de suas características fenotípicas, proporcionam uma melhor adaptação funcional aos estímulos variados (CAPITANIO et al., 2006).

Por ser uma entidade extremamente versátil, o músculo esquelético é capaz de alterar seus padrões e características fenotípicas sob diversas condições, tais como atividade neuromuscular, estimulação elétrica, idade, atividade hormonal e exercício físico (BOFF, 2008).

Estas variações nas fibras musculares implicam diretamente também em seu volume muscular, conteúdo de proteínas e produção de força. Tais fenômenos podem ser caracterizados como hipertrofia e atrofia muscular. A hipertrofia pode ser caracterizada por um aumento no volume muscular, conteúdo de proteína e força (LI et al., 2008)

A hipertrofia musculo esquelética caracteriza-se por um aumento na área de secção transversa das células musculares. Este processo é primariamente dirigido pelo acréscimo de proteínas miofibrilares as quais são predominantemente compostas por actina e miosina (WEST e PHILLIPS, 2010).

Em contrapartida, a atrofia muscular (perda de massa muscular) é caracterizada pela diminuição na área de secção transversa das células musculares, no conteúdo de proteínas miofibrilares, redução no volume muscular e decréscimo na produção de força (GLASS, 2003a, b).

A perda acentuada de massa muscular tem relevantes implicações clínicas e pode ocorrer como consequência de diversas doenças, tais como câncer, AIDS, ou

até mesmo em decorrência do envelhecimento (FITSCHEN et al., 2013). É conhecido também o fato de que a atrofia muscular pode ocorrer em resposta à tratamento com altas dosagens de glicocorticoides (HASSELGREN, 1999; 2014).

Esta perda de massa muscular nestes pacientes resulta principalmente em fraqueza muscular, fadiga, além do risco de complicações pulmonares quando músculos respiratórios estão envolvidos (HASSELGREN, 2014).

De fato, a diminuição ou perda da massa magra em populações patológicas têm sido correlacionadas com a perda da função física, perda da qualidade de vida e inclusive pior resposta ao tratamento, ocasionando consequentemente um aumento da mortalidade (ZEIDERMAN et al., 1989; ANDREYEV et al., 1998; DODSON et al., 2011).

Fica claro desta maneira, que, os métodos que visam a prevenção ou tratamento à atrofia muscular tem relevância clínica em muitos grupos de pacientes, além de ser um importante fator contribuinte na qualidade de vida e autonomia destes indivíduos (HASSELGREN, 2014).

Com isso o estudo de determinados tratamentos torna-se de vital importância dentre os quais, vem ganhando destaque o β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB), um suplemento conhecido por ser um metabolito do aminoácido leucina com reconhecido efeito anticatabólico em determinadas situações patológicas ou associado ao exercício para ganho de massa muscular (NISSEN et al., 1996; KNITTER et al., 2000; FITSCHEN et al., 2013; HASSELGREN, 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O MÚSCULO ESQUELÉTICO

O corpo humano possui aproximadamente 660 músculos com diferentes localizações e funções, sendo que o músculo estriado esquelético é de suma importância para locomoção além de ser um dos tecidos de mais alta atividade metabólica no corpo humano, e constituir entre 40 e 45% do peso corporal (JUNQUEIRA e CARNEIRO; 2004).

O processo de formação dos músculos esqueléticos depende diretamente da expressão e atividade de fatores de transcrição conhecidos como fatores de regulação miogênica. A regulação deste processo envolve a ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas (DAL-PAI SILVA e CARVALHO, 2007).

Diversos estímulos influenciam na expressão gênica do musculo esquelético, induzindo mudanças qualitativas e quantitativas na adaptação muscular durante o crescimento pós-natal. Esta adequação envolve seletivamente a indução ou repressão na expressão de subconjuntos de genes (PIOVESAN et al., 2009).

O músculo estriado esquelético é um órgão altamente complexo, versátil e heterogêneo, formado organizadamente a partir de células musculares e tecido conjuntivo, sendo que, suas células musculares são também chamadas fibras musculares (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Cada fibra muscular é individualmente envolvida por uma lâmina de tecido conjuntivo denominada endomísio. Estas fibras musculares são organizadas em diversos feixes denominados fascículos, que por sua vez são envolvidos por uma lâmina de tecido conjuntivo mais espesso chamado perimísio. E há ainda uma lâmina mais espessa denominada epimísio que envolve o músculo como um todo, bem como conecta-o aos tendões (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido conjuntivo mantém as fibras musculares unidas permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo como um todo, aprimorando atividade contrátil exercida pelo músculo. É ainda por intermédio do tecido conjuntivo que a força da contração do músculo é transmitida à outras estruturas como tendões e ossos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Neste sentido, diversos estímulos irão induzir a modificação da atividade contrátil do músculo ocasionando uma série de mudanças moleculares dentro da fibra muscular, que envolvem: número e tamanho de mitocôndrias, aumento da expressão e atividade de enzimas, tipo de miosinas, número de capilares e também a quantidade de núcleos. Estas alterações envolvem respostas da fibra e de estruturas associadas que ocorrem a partir da reorganização do conteúdo celular e eventos relacionados a fatores metabólicos e contráteis (PETTE, 2001; BOFF, 2008).

Os ajustes musculares podem ocorrer em resposta à função mecânica que o músculo realiza, convergindo sempre para a melhora da contração e da geração de força, permitindo assim que as fibras musculares se adaptem ao estímulo (BOFF, 2008).

2.1.1 A fibra muscular

Morfologicamente, as fibras musculares são constituídas por unidades contráteis que se repetem subsequentemente chamadas sarcômeros (HUXLEY, 1969). Cada sarcômero é formado por várias proteínas, dentre as quais se destacam a actina e miosina (Figura 1).

Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/sustentacao7.php>

Figura 1. Representação da fibra muscular com ampliação do sarcômero e proteínas contráteis.

A actina está intimamente ligada à outras duas proteínas chamadas troponina e tropomiosina. Já a miosina é um hexâmero formado por seis polipeptídeos, sendo duas cadeias pesadas (Myosin Heavy Chain - MHC), enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves (myosin light chain - MLC) (LOWEY et al., 1969; WEEDS e LOWEY, 1971; ELLIOTT e OFFER, 1978).

Cada MHC pode ainda ser separada em: meromiosina leve, em forma de bastão, e meromiosina pesada, também conhecida como porção globular da miosina, que contém um sítio de interação com a actina e uma região de ligação com a molécula de ATP (Adenosina Tri-fosfato) (HUXLEY, 1969; LOWEY et al., 1969).

A contração muscular ocorre através da interação entre os filamentos de actina e a porção globular da molécula de miosina no sarcômero (HUXLEY, 1969; VECHETTI-JUNIOR, 2015).

Com o desenvolvimento da biologia molecular descobriu-se que há apenas um tipo de actina, e as diferenças entre os tipos de fibras musculares devem-se à presença de várias isoformas de miosina (PETTE e STARON, 2000).

Baseada na atividade da mATPase na porção globular da miosina, concentração de glicogênio e atividade de várias enzimas, as fibras musculares puderam ser divididas em três grandes grupos, de acordo com seu perfil histoquímico (PETER et al., 1972) e bioquímico em: Fibras de contração lenta com metabolismo oxidativo (SO – Slow Oxidative), fibras de contração rápida com metabolismo oxidativo-glicolítico (FOG – Fast Oxidative-Glycolitic) e fibras de contração rápida com metabolismo glicolítico (FG – Fast Glycolitic).

Com advento da eletroforese e da Imunohistoquímica, além das reações histoquímicas para a mATPase, as fibras musculares puderam ser classificadas segundo sua isoforma de miosina em: fibras de contração lenta tipo I, expressando MHCI e fibras de contração rápida tipo II, subdivididas em tipo IIA (MHCIIa), tipo IID (MHCIIId) e tipo IIB (MHCIIb) (PETTE e STARON, 2001).

Além das fibras puras (fibras que expressam um único tipo de miosina), há ainda as fibras “híbridas” (fibras que expressam mais de um tipo de miosina) e foram classificadas em Tipo IC (MHCI > MHCIIa), tipo IIC (MHCIIa > MHCI), tipo IIAD (MHCIIa > MHCIIId), tipo IIDA (MHCIIId > MHCIIa), tipo IIDB (MHCIIId > MHCIIb) e tipo IIBD (MHCIIb > MHCIIId) (PETTE e STARON, 2000; PETTE e STARON, 2001).

Deste modo, determinou-se uma organização seqüencial das fibras puras, sendo intermediadas entre si pelas fibras híbridas em fase de transição da seguinte maneira (PETTE e STARON, 2000):

$$I \leftrightarrow IC \leftrightarrow IIC \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIAD \leftrightarrow IID \leftrightarrow IIDB \leftrightarrow IIB$$

Existem ainda outros tipos e subtipos de fibras, que podem ser fibras especializadas em determinadas funções (ex: fibras tônicas dos m. extraoculares e do m. tensor do tímpano) (PETTE e STARON, 2000; SCHIAFFINO e REGGIANE, 2011).

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).

Deste modo, a heterogeneidade de fibras musculares em um musculo constitui a base da flexibilidade funcional e a plasticidade à base de sua capacidade adaptativa. Isto faz com que um músculo possa responder da melhor maneira à sua demanda funcional, por exemplo: atividade continua de baixa intensidade (ação postural), repetidas contrações submáximas (locomoção), ou contrações máximas que exigem força e velocidade (salto, chute) (SCHIAFFINO e REGGIANE, 2011).

A variabilidade funcional que a plasticidade da fibra muscular proporciona ao músculo esquelético envolve mudanças metabólicas e diferentes expressões de miosinas entre outras proteínas miofibrilares, aprimorando desta maneira o ajuste fino do desempenho muscular (CHEMELO et al., 2011).

A diversidade funcional e metabólica dos diferentes tipos de fibras confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (CAMPOS et al., 2002). Sendo que, o perfil fenotípico de determinados músculos irá refletir diretamente a população de suas fibras fazendo com que as proporções de cada tipo de fibra dentro de um mesmo musculo determinem suas características e propriedades funcionais (PETTE e STARON, 2000; PETTE e STARON, 2001).

A plasticidade do tecido muscular faz com que este sempre busque se adaptar à sua demanda funcional, fazendo com que, músculos com diferentes ações apresentem diferentes composições no que tange à distribuição e proporção dos

tipos de fibras em cada musculo específico (PETTE e STARON, 2000; PETTE e STARON, 2001).

Esta especificidade de funções faz com que, músculos com diferentes ações apresentem diferentes composições. Neste contexto, pode-se citar dois músculos utilizados como exemplo clássico disto, o músculo sóleo e músculo extensor longo dos dedos (extensor digitorum longus - EDL) de ratos. São dois músculos presentes nos membros posteriores do rato, porém são antagonistas e que por sua ação oposta apresentam distribuição de fibras completamente divergente (SOUKUP et al., 2002; 2009; NOVAK et al., 2010).

No rato, m. sóleo é um musculo de ação postural, e por conta de sua demanda funcional apresenta uma grande maioria de fibras do tipo I (contração lenta), e um número variável mas geralmente baixo de fibras do tipo II 2A (contração rápida). Já o m. EDL é um músculo de contração rápida, composto por um número baixo de fibras de contração lenta (Tipo I) e variável proporção de fibras de contração rápida (IIa e IIb) (NOVAK et al., 2010).

Em seu estudo, Novak et al. (2010), analisou vários estudos que utilizaram a eletroforese, a reação imunohistoquímica e a mATPase para quantificar a distribuição das fibras no m. sóleo e m. EDL de diversas linhagens de ratos e viu que:

- No musculo sóleo a predominância de fibras do tipo I encontrada permaneceu entre 75,1% (CHIEN e CHU, 1995) e 98,4% (SOUKUP et al., 2009), sendo o restante distribuído entre fibras do tipo IIa e IIb.
- No m. EDL a predominância das fibras do tipo IIa, IIx e IIb estabeleceu-se entre 100% (ENG et al., 2008; MIZUNOYA et al., 2014) e 94,1% (SOUKUP et al., 2009), demonstrando que a presença de fibras do tipo I no m. EDL quando não é mínima é nula.

Nota-se desta maneira que músculos que exercem funções diferentes são submetidos a estímulos distintos e por isso irão apresentar composições bastante divergentes. Desta maneira, por suas diferentes características, músculos diferentes irão responder de diferente maneira também frente à estímulos hipertróficos e atroficos.

2.2 ATROFIA MUSCULAR

A atrofia muscular é um fenômeno amplamente estudado sendo caracterizado pela perda de massa muscular devido a diversos fatores, à exemplo: a inatividade, doença ou envelhecimento (HASSELGREN, 2014).

A redução da força e potência, diminuição na resistência à fadiga e aumento na resistência insulínica, bem como decréscimo na área de secção transversa da fibra muscular e a perda de conteúdo de proteína são consequências morfológicas e funcionais comuns à todos os tipos de atrofia (KANDARIAN e JACKMAN 2006).

Segundo Britto et al., (2014), a atrofia muscular pode apresentar-se como consequência direta de diversas doenças crônicas, estando diretamente relacionada à qualidade de vida e mortalidade dos pacientes por ela acometidos.

Sob condições normais, a preservação da massa muscular é mantida pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas musculares. Sempre que os níveis de degradação proteica (proteólise) excedem os níveis de síntese de proteína, seja por aumento na degradação e/ou diminuição da síntese tem-se como resultante a redução na área de secção transversa da fibra muscular (HASSELGREN, 2014; GIRON et al., 2015).

A alteração deste balanço entre síntese/degradação pode ocorrer sob determinadas condições como jejum, desuso ou mesmo durante o envelhecimento, bem como resultado de doenças como Câncer, Diabetes, AIDS, sepse, desnervação ou tratamento por glicocorticoides (GIRON et al., 2015).

Neste sentido, a utilização de glicocorticoides tais como dexametasona (DEX), tem sido empregada *in vitro* (ZHENG et al., 2010) e *in vivo* (SCHAKMAN et al., 2013) como modelo de estudo experimental para atrofia muscular.

Isto justifica-se pelo fato de que o alto nível de glicocorticoides usado por um longo período tem a capacidade de causar atrofia muscular de ambas as maneiras, tanto diminuindo a síntese de proteínas quanto aumentando o catabolismo proteico (QIN et al., 2010).

De forma básica, glicocorticoides possuem diversos efeitos em tecidos específicos no metabolismo celular. Durante o estresse metabólico, por exemplo, glicocorticoides podem promover a degradação e supressão da síntese de proteínas musculares, fornecendo assim aminoácidos para a produção de glicose no fígado (KUO et al. 2013). Contudo, a manutenção de níveis elevados de glicocorticoides

sob tratamento com esteroides para condições inflamatórias tais como asma, artrite reumatoide, ou mesmo sob determinadas situações patológicas, tais como a síndrome de Cushing, câncer, lesões severas e sepse estimulam o desenvolvimento da atrofia muscular (AVERSA et al., 2012). A fraqueza muscular e a perda de massa muscular através do catabolismo glicocorticoide-dependente nestes casos é considerada um fator prognóstico subjacente destas doenças (SCHAKMAN et al., 2013; SON et al., 2015).

Nas células musculares, esta proteólise é mediada basicamente pelo aumento da atividade de duas vias, o sistema Autofágico-lisossômico e o sistema Ubiquitina-proteassoma (HASSELGREN et al., 2015; GIRON et al., 2015).

Autofagia é um processo fisiológico utilizado pelo músculo esquelético para sequestrar proteínas citoplasmáticas e organelas em vacúolos conhecidos como autofagossoma. Estes fundem com lisossomos que levam a digestão dos conteúdos por hidrolases lisossômicas. A autofagia é vital para a remoção de componentes celulares envelhecidos e danificados, a quebra de reservas de nutrientes não indicada e a remodelação da arquitetura celular. Contudo, estudos de diversas desordens musculoesqueléticas têm demonstrado que sob determinadas circunstâncias o sistema autofágico pode ser supra estimulado conduzindo à atrofia muscular (SCHIAFFINO et al., 2011; GIRON et al., 2015).

Já no sistema ubiquitina-proteassoma, a maioria das proteínas miofibrilares e solúveis são assinaladas para degradação por meio da marcação por moléculas de ubiquitina (ZHAO et al., 2007). As enzimas E3 do processo de ubiquitina-proteassoma, Atrogin-1 e MuRF1, são induzidas durante estados iniciais de atrofia muscular. Interessantemente o grau de atrofia muscular pode ser reduzido pela inativação seletiva destes genes (SCHAKMAN et al., 2013; GIRON et al., 2015).

Neste sentido, segundo Glass (2003), o sucesso para o tratamento da atrofia muscular pode residir tanto bloqueando via de degradação de proteína ativada durante a atrofia, quanto estimulando a via de síntese proteica induzida durante a hipertrofia. Esta perspectiva põe em foco as vias de sinalização que controlam a atrofia e hipertrofia muscular, incluindo suas principais proteínas atualmente identificadas, sendo esta a principal base para o desenvolvimento das intervenções farmacológicas nas doenças musculares.

2.3 β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO

O β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB) é um metabolito da leucina, cujos efeitos sobre os músculos esqueléticos foram identificados aproximadamente há duas décadas (NISSEN et al., 1996).

A leucina é um importante aminoácido da família dos BCAAs (Branched-Chain Amino Acid - Aminoácidos de Cadeia Ramificada) e seus efeitos anticatabólicos são vastamente conhecidos, sendo seus principais efeitos atribuídos à alguns de seus metabolitos (NISSEN et al., 1996).

Alguns pesquisadores afirmam ainda que a leucina possui papel fundamental no metabolismo do musculo esquelético, sendo conhecido por seu potente efeito anti-catabólico sobre o músculo e tendo função reguladora tanto na síntese como na inibição da degradação de proteínas (NISSEN e ABUMRAD, 1997; BAXTER et al., 2005).

Foram Nissen et al., (1996) quem sugeriram que estes efeitos fossem induzidos pelo HMB, demonstrando diminuição da proteólise e aumento do ganho de massa magra quando associado ao exercício resistido.

Em seu artigo de revisão Nissen e Abumrad (1997) concluíram que o HMB poderia fornecer o aporte necessário de colesterol através de HMG-CoA às células imunes, glândula mamária e aos músculos para a síntese de nova membrana celular ou regeneração das membranas danificadas.

Após estas observações relatadas referente aos efeitos benéficos do HMB diversos estudos começaram a reportar resultados ao uso do HMB em outras situações ou condições patológicas associadas à perda acelerada de massa muscular, tais como caquexia por câncer (MAY et al., 2002; SMITH et al., 2005; AVERSA et al., 2011), AIDS (CLARK et al., 2000), sepse (KOVARIK et al., 2010) e envelhecimento (VUKOVICH et al., 2001).

A partir de então diversos trabalhos começaram a descrever a maneira como o HMB estimula a síntese e atenua a degradação proteica, descrevendo o mecanismo molecular pelo qual o HMB exerce este efeito de proteção sobre o musculo esquelético.

Em estudos experimentais notou-se que o HMB é capaz de aumentar a quantidade de glicogênio e ATP intramuscular (PINHEIRO et al., 2011). Eleva também a expressão de mTOR e a fosforilação da p70s6k (PIMENTEL et al. 2011),

ambas reguladoras da síntese de proteínas no músculo esquelético. Fato que justifica também a capacidade do HMB de se opor à atrofia em condições patológicas.

Deste modo, justifica-se analisar se o HMB é um agente anticatabólico capaz de atenuar ou até mesmo anular o efeito atrofico induzido pela dexametasona, observando-se a área e diâmetro mínimo das fibras musculares.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o HMB é capaz de prevenir a atrofia muscular induzida pela DEX

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar se o HMB inibe ou atenua a perda de peso corporal induzida pela DEXA.
- b) Verificar se a perda de massa magra pela DEX é prevenida pelos efeitos anticatabólicos do HMB no musculo esquelético.
- c) Verificar se o m. sóleo e m. EDL respondem de maneira diferente ao HMB frente ao estímulo atrofico da DEX.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Toda esta pesquisa foi conduzida sob aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) sob N° 018/2013, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP).

O delineamento experimental, processamento histológico e morfométrico foram realizados no Laboratório de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP).

4.1 ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS E DIVISÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados 32 animais da linhagem Wistar com idade de 60 dias, fornecidos pelo Biotério da Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Bauru.

Os animais foram acondicionados em caixas coletivas com 4 animais por caixa, com comida e água à vontade em sala climatizada com temperatura de 22°C e respeitando o ciclo de 12 horas claro/escuro controlado por um timer.

Previamente à qualquer intervenção os animais foram pesados e distribuídos de maneira que os grupos possuísem aproximadamente a mesma média e fossem formados por animais de pesos aproximados. Feita esta distribuição foi feito um sorteio para determinar quais tratamentos cada um dos grupos receberiam.

Esta metodologia foi empregada, pois sabe-se da existência de uma relação entre o peso dos animais, peso do músculo e a área dos diferentes tipos de fibras musculares. Com isso pretendeu-se evitar que algum grupo fosse formado por animais mais pesados ou mais leves já no início do experimento, o que poderia comprometer ou colocar em dúvida os resultados obtidos no final do experimento.

Foram distribuídos os seguintes grupos: Grupo Experimental Placebo (GEP) n=8, Grupo Experimental Dexametasona (GED) n=8, Grupo Experimental HMB (GEH) n=8 e Grupo Experimental Dexametasona+HMB (GEDH) n=8.

Após a determinação dos grupos todos os animais foram tratados diariamente por 10 dias consecutivos seguindo os respectivos tratamentos para cada um dos grupos.

4.2 PROTOCOLO DE ADMINITRAÇÃO DAS DROGAS

4.2.1 Dexametasona

Para os grupos tratados com DEX foi seguido o protocolo descrito por Barel et al., (2010), utilizando-se uma dosagem de 1mg/Kg corporal de dexametasona administrada por via intraperitoneal por 10 dias consecutivos.

Os grupos que não receberam dexametasona foram submetidos também à injeção intraperitoneal, porém contendo apenas solução salina no mesmo volume dos grupos tratados.

4.2.2 β -hidroxi- β -MetilButirato

A administração de HMB foi realizado por meio de gavagem. O HMB foi aplicado na dosagem de 0,3g/kg de peso corporal diluído em 1ml de solução fisiológica, diariamente, por 10 dias consecutivos.

Aos grupos que não receberiam o HMB foi realizada a gavagem contendo apenas a solução salina.

4.3 TRATAMENTO DOS GRUPOS

4.3.1 Grupo Experimental Placebo – GEP

Os animais deste grupo foram tratados por 10 dias consecutivos com gavagem e injeção intraperitoneal, ambas contendo apenas solução salina. Este procedimento foi adotado para que o estresse dos tratamentos fosse comum também a este grupo porém sem o efeito de quaisquer drogas.

4.3.2 Grupo Experimental DEX – GED

Os animais deste grupo foram tratados por 10 dias consecutivos com gavagem contendo solução salina e injeção intraperitoneal contendo dexametasona,

submetendo desta maneira os animais ao efeito da dexametasona e ao mesmo estresse do tratamento por gavagem.

4.3.3 Grupo Experimental HMB – GEH

Os animais deste grupo foram tratados por 10 dias consecutivos com gavagem contendo HMB e injeção intraperitoneal contendo solução salina, submetendo desta maneira os animais ao efeito do HMB e ao mesmo estresse do tratamento por injeção intraperitoneal.

4.3.4 Grupo Experimental DEX + HMB – GEDH

Os animais deste grupo foram tratados por 10 dias consecutivos com gavagem contendo HMB e injeção intraperitoneal contendo DEX, submetendo desta maneira os animais ao efeito das duas drogas para verificar se o HMB seria capaz de atenuar ou mesmo prevenir a atrofia muscular induzida por dexametasona.

4.4 COLETA DAS AMOSTRAS E ANÁLISES

4.4.1 Anestesia, pesagem e retirada das amostras

Decorridos dez dias de tratamento, os animais foram eutanasiados para a coleta do material. Para isso os animais foram anestesiados com injeções intraperitoneais de Cloridrato de Xilazina (10mg/kg – Anasedan®, Vetbrands, São Paulo, Brasil) associado à Cloridrato de Ketamina (50mg/kg – Dopalen®, Vetbrands, São Paulo, Brasil).

Sob efeito da anestesia os animais foram pesados e em seguida iniciou-se a coleta da amostra.

Após a pesagem dos animais foi realizada tricotomia e assepsia do local para retirada dos músculos sóleo e EDL. Para isso foi realizada incisão na pele e tela subcutânea da região ventro-medial do membro pélvico direito, para exposição, e retirada de cada um dos músculos. Cada um dos músculos retirados do membro pélvico direito foi cuidadosamente retirado de sua inserção proximal à sua inserção distal, sendo este procedimento realizado por um único operador para todos os animais. Este critério foi

adotado para evitar a subjetividade de cada operador buscando assim um padrão de retirada das amostras uma vez que estas seriam usadas para aferição do peso muscular.

Cada um dos músculos retirados era pesado logo após sua retirada e os animais foram imediatamente sacrificados com uma dose de anestésico três vezes superior à dosagem adequada ao peso do mesmo.

As amostras musculares, após retiradas e pesadas, foram reduzidos à amostras de 1,0 cm de comprimento da porção média do ventre muscular, priorizando a preservação do sentido longitudinal das fibras musculares em cada amostra. As amostras 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.

Após o congelamento, as amostras foram armazenadas a -80°C em um freezer (INDREL®, IULT 2430, Londrina, Paraná, Brasil) para que posteriormente se realizasse o processamento histológico.

4.4.2 Processamento Histológico dos Músculos

Para o processamento histológico das amostras, foram obtidos cortes semi-seriados com dez micrômetros de espessura do material histológico congelado, obtidos em criostato à -20° C.

Os cortes histológicos obtidos foram submetidos à coloração pelo protocolo de Hematoxilina e Eosina (HE).

Figura 2. Criostato utilizado no corte dos músculos

4.4.3 Análise morfométrica

As observações e as morfometrias dos músculos foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico da marca/modelo OLYMPUS BX-50 acoplado à uma câmera fotográfica modelo OLYMPUS DP-71 (Figura 2), conectados a um microcomputador com o software de visualização e captura de imagem DP Controller.

De cada amostra muscular foram capturadas três imagens na objetiva de 20x, para realização da morfometria de 220 fibras musculares.

A morfometria foi realizada manualmente circulando cada uma das fibras para que o software (Image Pro Plus 6.0) calculasse sua área. Em cada fibra também foi mensurado o diâmetro mínimo.

Figura 3. Microscópio Óptico integrado ao computador

Após a morfometria, os dados foram submetidos ao cálculo de média aritmética para cada músculo de cada animal, sendo que, a partir desta etapa cada animal seria representado por um valor correspondente à média da área da fibra e diâmetro mínimo dos músculos sóleo e EDL, para subsequente análise por grupos.

4.5 Análise Estatística

As médias de todos os grupos para as variáveis de Peso corpóreo dos animais, peso dos músculos Sóleo e EDL e os valores de médias obtidos na morfometria (Área da fibra e diâmetro mínimo) foram todos submetidos ao teste One-Way ANOVA, seguidos do Teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. Para efeitos de diferença entre as médias, foi considerado estatisticamente significativo o valor de $p > 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Durante a fase experimental nenhum dos animais morreu ou sofreu de modo que se fizesse necessário a interrupção dos tratamentos. Deste modo, todos os grupos iniciaram e terminaram a fase de protocolo experimental com $n=8$ para todos os grupos.

5.1 Peso Corporal dos Animais

As médias dos pesos, inicial e final, dos animais dos grupos GEP, GED, GEH e GEDH estão representada no gráfico da Figura 4, sendo seus valores descritos subsequentemente na Tabela 1.

Figura 4. Gráfico representando Média Inicial e Final de Peso Corpóreo dos grupos

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Tabela 1. Média dos pesos, inicial e final dos animais dos Grupos estudados.

Peso	GCP		GED		GEH		GEDH		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Inicial	254,5	±13,5	252,5	±20,9	253,9	±19,5	254,2	±16,6	$p=0,996$
Final	305,7	±11,5	183,8 ^a	±26,2	276,9 ^b	±23,1	181,3 ^a	±9,4	$p>0,025$

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Observando-se os dados do Gráfico 1 e Tabela 1 nota-se que:

- a-) no início do experimento nenhum dos grupos apresentava diferença estatisticamente significativa entre si por conta da distribuição realizada afim de uniformizar os grupos (descrito na metodologia);
- b-) no Peso Final todos os grupos apresentaram variação da média de peso corporal, sendo que, alguns apresentaram ganho de peso e outros perda de peso.
- c-) Quando comparadas as médias finais dos grupos, houve diferença dos grupos GED e GEDH em relação ao GCP, sendo que ambos não tiveram diferença estatisticamente quando comparados entre si. Já o grupo GEH apresentou média de peso corpóreo estatisticamente menor que o GCP, contudo foi estatisticamente maior do que de GED e GEDH.

5.2 Peso Muscular

As médias das massas dos músculos EDL e sóleo, dos animais de GCP, GED, GEH e GEDH estão representada no gráfico da Figura 5, sendo seus valores descritos subsequentemente na Tabela 2.

Figura 5. Grafico das Médias de Peso Muscular dos grupos

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Tabela 2. Média de peso muscular dos musculo Sóleo e EDL (g)

Peso	GCP		GED		GEH		GEDH		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
EDL	0,138	±0,01	0,081 ^a	±0,01	0,129	±0,01	0,085 ^a	±0,01	p>0,001
Sóleo	0,158	±0,01	0,113 ^a	±0,02	0,134 ^b	±0,01	0,123 ^{ab}	±0,01	p>0,05

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Observando-se os dados do Gráfico 2 e Tabela 2 nota-se que:

- a-) evidente diminuição do peso muscular nos animais submetidos ao tratamento com dexametasona (GED e GEDH) em ambos músculos;
- b-) nota-se também que o HMB não foi capaz de evitar a perda de peso muscular induzida pela DEX, quando atuou em conjunto com a mesma, em ambos os músculos;

c-) no músculo EDL

c1-) o GEH não apresentou diferença estatisticamente significante em comparação ao GCP;

c2-) GED e GEDH apresentaram diminuição significativa da massa muscular em relação ao GCP e GEH

c3-) GED e GEDH não apresentaram diferenças entre si.

d-) no músculo sóleo

d1-) os três grupos experimentais, GED, GEH e GEDH apresentaram diminuição da massa em comparação ao GCP;

d2-) dentre os grupos experimentais, a diferença deu-se apenas entre GED e GEH;

d3-) GEDH não apresentou diferença estatisticamente significante nem em comparação ao GED nem ao GEH.

5.3 Morfologia e morfometria dos músculos Sóleo e EDL

Nas Figuras 6 e 7 seguem as imagens dos cortes histológicos, onde pode-se observar as diferenças morfológicas entre os grupos:

Figura 6. Fotomicrografia do músculo sóleo dos grupos: (A) GEP, (B) GED, (C) GEH e (D) GEDH corados em HE (fotos obtidas com a objetiva de 40x)

A imagem acima demonstra a fotomicrografia do musculo sóleo dos grupos: Na imagem nota-se diferença entre GEP em relação ao GED e GEDH referente à área das fibras.

Figura 7. Fotomicrografia do músculo EDL dos grupos: (A) GEP, (B) GED, (C) GEH e (D) GEDH corados em HE (fotos obtidas com a objetiva de 40x)

A imagem acima demonstra a fotomicrografia do musculo EDL dos grupos: Na imagem do musculo EDL, é possível diferença entre a área das fibras do GEP em relação ao GED e GEDH.

Os dados referentes à área e o diâmetro mínimo das fibras dos músculos EDL e sóleo estão representados nos gráficos da Figura 8 e Tabelas 3 e 4.

Figura 8. Gráficos dos valores de área da fibra e diâmetro mínimo dos grupos nos músculos EDL e sóleo.

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Tabela 3. Média dos valores de área da fibra dos músculos EDL e Sóleo.

	EDL		SO	
	Área (μm^2)	DP	Área (μm^2)	DP
GCP	1826,862	± 157,088	2671,854	± 223,205
GED	1062,340 ^a	± 155,508	1860,559 ^a	± 365,302
GEH	2041,362	± 344,242	2565,538	± 467,623
GEDH	1188,613 ^a	± 586,142	2385,533	± 401,243

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Tabela 4. Média dos valores de diâmetro mínimo da fibra dos músculos EDL e Sóleo.

	EDL		SO	
	DM (μm)	DP	DM (μm)	DP
GCP	37,354	1,814	45,481	1,885
GED	28,027 ^a	2,113	37,021 ^a	3,817
GEH	39,220	3,863	44,298	4,144
GEDH	27,886 ^a	11,902	42,782	4,117

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Observando-se os dados exibidos no Gráfico 3 e Tabelas 3 e 4 nota-se que:

a-) os resultados obtidos com o músculo EDL foram diferentes do obtidos com o músculos sóleo;

b-) em relação ao músculo EDL

b1-) que os dados da área e diâmetro mínimo das fibras são concordantes;

b2-) que ocorreu atrofia das fibras nos músculos submetidos à dexametasona (GED e GEHD), em relação ao grupos não submetidos a ela (GCP e GEH);

b3-) que não houve diferenças entre os grupos submetidos à dexametasona;

b4-) que não houve diferenças entre GCP e GEH.

c-) em relação ao músculo sóleo

c1-) que os dados da área e diâmetro mínimo das fibras são concordantes;

c2-) que a área das fibras do GED foi menor do que nos demais grupos.

c3-) que entre as fibras de GCP, GEH e GEDH não houve diferenças entre si.

Observando-se os dados dos gráficos nas Figuras 4 e 5 e das Tabelas 2, 3 e 4 nota-se uma discordância entre os resultados da massa e a morfometria do músculo sóleo

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Delineamento experimental

No que se refere à administração intraperitoneal de dexametasona, diversos autores divergem em relação ao protocolo de tratamento utilizado, variando tanto as dosagens, quanto o tempo de tratamento (BAREL et al., 2010; BAPTISTA et al., 2013; NOH et al., 2014; GIRON et al. 2015; KRUG et al., 2015)

Baptista et al., (2013) em seu estudo administrou a dexametasona por 7 dias consecutivos, porem em seu artigo não relata a dosagem. Noh et al. (2014) em seu protocolo, utilizou dose de 0,6 mg/kg/dia por 5 dias consecutivos. Giron et al. (2015) tratou os animais com 0,1mg/kg/dia durante 21 dias e Krug et al. (2015) utilizaram 0,5mg/kg/dia por 10 dias. Todos estes métodos foram efetivos como modelo experimental em induzir atrofia muscular, porém o protocolo de administração da dexametasona estabelecido em nosso trabalho foi o mesmo adotado por Barel et al. (2010), onde aplicou-se a dexametasona intraperitonealmente à 1mg/kg de peso corporal por dez dias consecutivos.

O HMB foi administrado por meio de gavagem. A escolha pelo método de gavagem deu-se por conta da padronização da quantidade administrada à cada animal e também por ser uma via de administração diferente da dexametasona, para que assim a interação entre as drogas fosse unicamente sistêmica.

A respeito da dosagem do HMB, Eley et al. (2007) em seu estudo utilizaram HMB à 250 mg/kg de peso corporal em ratos com perda de massa induzida por tumor e concluíram que o HMB diminuiu a inibição da síntese proteica induzida pelo tumor, ressaltando que este efeito é partilhado também pela leucina, contudo o HMB é mais potente do que a leucina em atenuar o desenvolvimento da caquexia.

Hao et al. (2011) em seu estudo utilizaram a suspensão do membro posterior de ratos idosos como modelo atrofico e descreveram em seu artigo que, em seu estudo piloto, dosagens baixas de HMB não foram efetivas, contudo à 340 mg/kg de peso corporal o HMB foi eficaz no combate à atrofia induzida pela suspensão dos membros.

Uma dosagem bastante próxima à usada no trabalho anterior, foi a utilizada por Gerlinger-Romero et al. (2011), Pimentel et al. (2011) e Pinheiro et al. (2011) que

utilizaram 320 mg/kg de peso corporal por dia em ratos sedentários e demonstraram as alterações hormonais, metabólicas e proteicas, descrevendo as adaptações ao uso do HMB como favoráveis em situações patológicas ou quando associadas ao exercício físico. Tais resultados nos incentivaram à utilizar dose similar no presente estudo, afim de verificar sua efetividade frente a atrofia muscular induzida no modelo atrófico adotado por Barel et al., (2010).

6.2 Perfil do animal utilizado

Ao planejar o delineamento experimental, a idade dos animais foi um importante fator levado em consideração no trabalho executado. Isto porque, as principais variáveis aqui estudadas (Peso Corporal, peso muscular, área da fibra muscular) tem relação direta em sua variação conforme a idade do rato (DARÉ, 2013).

Outro importante aspecto levado em consideração foi o gênero dos animais, uma vez que machos e fêmeas apresentam diferentes características em relação à perfil hormonal, peso corporal, massa muscular, dentre outros aspectos (FLAKOLL et al., 2004; DARÉ et al., 2015).

No presente estudo, o modelo animal utilizado foi de ratos jovens machos com idade de 60 dias, período em que este modelo animal está em fase de ganho de peso (conforme observado no GEP), todavia, diversos fatores causais podem quebrar este ciclo, como pôde ser observado nos demais grupos experimentais.

6.3 Peso corporal e peso muscular

Neste trabalho, ao final dos 10 dias de tratamento foi possível notar a diferença de peso corporal apresentada entre os grupos, destacando-se a perda de peso sofrida pelos animais dos grupos tratados com dexametasona. Os animais do grupo GED e GEDH apresentaram, respectivamente, perda aproximada de 28,1% e 28,8% de seu peso corporal durante a fase de tratamento, sendo que, concluíram o tratamento apresentando uma diminuição de aproximadamente 40% de peso corporal se comparados ao peso final do GEP.

Os dados do presente trabalho corroboram com os de outras pesquisas que avaliaram o efeito da dexametasona sobre o peso corporal de ratos, estudando

maneiras de se preservar a massa muscular, tais como, exercício aeróbio (BAREL et al.; 2010), treinamento resistido associado à suplementação de leucina (NICASTRO et al., 2012), exercício resistido de alta intensidade (KRUG et al., 2015) e tratamento de calor (MORIMOTO et al., 2015). Em todos estes estudos houve preservação (parcial) da massa muscular, porem nenhuma diferença entre os grupos com dexametasona e os grupos dexametasona + tratamento. Tal fato reforça a o pensamento de que a perda de peso induzida por dexametasona não é oriunda apenas da perda de massa muscular, mas também de outros tecidos.

Em seu estudo, Nunes et al. (2013) apresenta em seus resultados a diminuição do peso de corporal total e também de determinados órgãos (coração, fígado, rins, baço) quando comparado o grupo tratado com dexametasona ao grupo controle.

Segundo Krug et al. (2015), a perda de peso corporal induzida pela dexametasona pode ser explicada por conta da redução na ingestão alimentar que ocorre com os animais sob tratamento. Isto porque glicocorticoides também estão associados à grelina e leptina, duas adipocinas envolvidas no controle da fome e saciedade, respectivamente.

Inusitadamente, o GEH mesmo não sendo submetido ao tratamento com dexametasona também não atingiu o peso alcançado pelo GEP. Neste sentido, os dados aqui apresentados discordam do resultado do estudo de Baxter et al. (2005), onde os ratos foram suplementados por 90 dias com dosagens de 1%,3% e 5% de HMB em sua dieta diária, e não foi encontrada perda significativa no peso dos animais entre os grupos suplementados e não suplementado. Daré (2013), neste mesmo sentido, avaliou em seu trabalho o efeito do HMB (0,3g/kg/dia) por 4 semanas em ratos sedentários, concluindo que o HMB tambem não induziu diminuição de massa em seus animais.

No presente estudo, no que se refere à peso corporal, o HMB não foi capaz de produzir ganho na massa muscular do GEH, nem tampouco minimizar a perda induzida pela dexametasona no GEDH. Estes dados corroboram com os obtidos por, Nunes et al. (2013) e Noh et al. (2014), que tambem utilizaram o HMB em ratos submetidos à dexametasona, e não houve diferença estatística entre grupos suplementados e não suplementado quando submetido à dexametasona.

Em contrapartida, Giron et al. (2015) foi o único relato científico encontrado demonstrando em seu estudo que o HMB foi hábil em contrapor-se à perda de peso

corporal induzida pela dexametasona, ainda que parcialmente. Porém, cabe a ressalva de que no artigo em questão a dosagem de dexametasona empregada foi 10x menor do que a aplicada neste estudo (0,1mg/kg/dia *versus* 1,0mg/kg/dia, respectivamente).

6.4 Morfometria

Determinados estudos apontam que a atrofia por dexametasona afeta principalmente músculos com predominância de fibras brancas (tipo IIb) (Nava et al., 1996; Pereira e Carvalho 2011). Todavia, no presente trabalho notou-se que a diminuição tanto da área da fibra, quanto diâmetro mínimo ocorreu em ambos os músculos (sóleo predominantemente de fibras do tipo I e EDL predominantemente de fibras do tipo II) do GED. Tal fato reforça a necessidade de se utilizar músculos com predominâncias diferentes dos tipos de fibras, tornando desta maneira o resultado mais abrangente.

Interessantemente, no musculo sóleo o HMB agiu positivamente frente à atrofia induzida pela dexametasona. O GED foi o único grupo a apresentar valores de área da fibra e diâmetro mínimo significativamente inferiores ao GEP, os demais grupos apresentaram-se estatisticamente semelhantes. O que nos sugere efeito anticatabólico do HMB em músculos com predominâncias de fibras do tipo I.

Tal fenômeno também ocorreu no experimento de Noh et al. (2014), que suplementaram com 150 e 600 mg/kg/dia de HMB submetidos à 0,6 mg/kg/dia de dexametasona. O experimento foi conduzido durante 5 dias e ao analisar a área da fibra do musculo sóleo, os grupos de ambas dosagens de HMB foram semelhantes ao controle e estatisticamente diferentes do grupo tratado apenas com a dexametasona.

Baptista et al. (2013) analisaram o musculo sóleo, usando reação histoquímica mATPase para classificar e investigar separadamente fibras do tipo I e fibras o tipo II. Em ambos os tipos de fibras, a dosagem do HMB (320mg/kg/dia) quando associado à dexametasona não foi efetiva no combate à atrofia. Contudo, o autor não cita no texto a dosagem utilizada de dexametasona, o que representa um forte viés na interpretação dos resultados.

No presente estudo o EDL apresentou tanto uma menor área quanto diâmetro mínimo das fibras nos grupos submetidos ao tratamento com dexametasona. Estes

dados corroboram com os de Nava et al. (1996), que observaram que o tratamento com dexametasona afeta prioritariamente músculos com predominância de fibras brancas tipo II. O GEDH não apresentou diferença para o grupo GED, que leva-nos a concluir que o HMB não exerceu efeito protetivo no GEDH (efeito também demonstrado através do peso muscular).

Os dados da atual pesquisa são semelhantes aos resultados obtidos por Baptista et al. (2013) que analisaram no musculo sóleo os tipos de fibras separadamente. Neste trabalho eles observaram que apenas fibras do tipo II (tipagem de fibra predominante no musculo EDL) não houve diferença entre o grupo suplementado e o não suplementado.

Entretanto, não se pode estabelecer uma firme comparação uma vez que as fibras do tipo II no musculo sóleo representam apenas 1,6 à 24,9% da composição do musculo (conforme descrito na revisão da literatura). O que torna a relação fraca não sendo adequado usa-la como parâmetro.

Outro estudo é o de Giron et al. (2015), que analisaram o musculo gastrocnêmio (musculo considerado misto por sua distribuição dos tipos de fibras), e demonstraram que o HMB foi capaz de abrandar os efeitos atroficos induzidos pela dexametasona.

Deste modo, nota-se por meios dos artigos estudados, e dos resultados aqui contidos, que muito tem a ser esclarecido e estudado ainda.

Limitações do presente trabalho:

- Recursos disponíveis para aplicação no experimento.

Perspectivas futuras:

- Utilizar análises moleculares que expliquem o resultado morfológico;
 - Estudar outras maneiras de prevenir a perda de massa neste modelo atrofico.
-
-

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Considerando-se as limitações do estudo e os resultados aqui encontrados, pode-se concluir que:

- No delineamento experimental aqui aplicado, o HMB não foi capaz de atenuar ou prevenir a perda de peso corporal induzida pela DEX;
 - Frente ao tratamento por DEX, o HMB não teve quaisquer efeito sobre o peso muscular;
 - O efeito anticatabólico do HMB foi capaz de prevenir a atrofia muscular no musculo sóleo, porém não repercutiu da mesma maneira no musculo EDL.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

(Formato Vancouver)

Andreyev HJ, Norman AR, Oates J, Cunningham D. Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur J Cancer*. 1998 Mar;34(4):503-9.

Aversa Z, Alamdari N, Castellero E, Muscaritoli M, Rossi Fanelli F, Hasselgren PO. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jul 13;423(4):739-43.

Baptista IL, Silva WJ, Artioli GG, Guilherme JP, Leal ML, Aoki MS, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine and HMB differentially modulate proteasome system in skeletal muscle under different sarcopenic conditions. *PLoS One*. 2013 Oct 4;8(10):e76752.

Barel M, Perez OA, Giozzet VA, Rafacho A, Bosqueiro JR, do Amaral SL. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Mar;108(5):999-1007.

Baxter J.H., Carlos J.L., Thurmond J., Rehani R.N., Bultman J., Frost D. Dietary toxicity of calcium β -hydroxy- β -methylbutyrate (CaHMB). *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43:1731–1741.

Boff SR. A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo. *ACTA FISIATR* 2008; 15(2): 111 – 116

Britto FA, Begue G, Rossano B, Docquier A, Vernus B, Sar C, Ferry A, Bonnieu A, Ollendorff V, Favier FB. REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol*

Metab. 2014 Dec 1;307(11):E983-93.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray T, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, and Staron RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. Eur J Appl Physiol 2002; 88: 50-60.

Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, Pavone FS, Bottinelli R. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jan 3;103(1):87-92. Epub 2005 Dec 21.

Chemello F, Bean C, Cancellara P, Laveder P, Reggiani C, Lanfranchi G. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. PLoS One. 2011 Feb 22;6(2):e16807.

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

Clark RH, Feleke G, Din M, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using β -hydroxy- β -methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Parent Enteral Nutr 2000; 24:133–9.

Dal Pai-Silva M, Dal Pai V e Carvalho RF. 2005. Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Eds) Células: uma abordagem multidisciplinar. Editora Manole, São Paulo: p83-94.

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

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.

Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, Evans WJ, Cella D, Dalton JT, Steiner MS. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annu Rev Med*. 2011; 62:265-79.

Eley H.L., Russell S.T., Baxter J.H., Mukerji P., Tisdale M.J., Signaling pathways initiated by β -hydroxy- β -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* (2007); 293: E923–E931

Elliott A and Offer G. Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol* 1978; 123: 505-519

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* 2008; 211: 2336-2345.

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

Flakoll P., Sharp R., Baier S., Levenhagen D., Carr C., Nissen S.: Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition*, 2004; 20(5): 445-51.

Gerlinger-Romero F., Guimarães-Ferreira L., Giannocco G., Nunes M.T.: Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB)

increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. *Growth Hormone & IGF Research* 2011.

Girón MD, Vílchez JD, Shreeram S, Salto R, Manzano M, Cabrera E, Campos N, Edens NK, Rueda R, López-Pedrosa JM. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0117520.

Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003 Aug; 9(8): 344-50.

Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol*. 2003 Feb;5(2):87-90.

Hao Y, Jackson JR, Wang Y, Edens N, Pereira SL, Alway SE. 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*. 2011 Sep;301(3):R701-15.

Hasselgren PO. Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999 May;2(3):201-5.

Hasselgren PO. Pathways of muscle protein breakdown in injury and sepsis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999 Mar;2(2):155-60.

Hasselgren PO. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) and prevention of muscle wasting. *Metabolism*. 2014 Jan;63(1):5-8.

Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science* 1969; 164: 1356-1365.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

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

Knitter AE, Panton L, Rathmacher JA, Petersen A, Sharp R. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Oct;89(4):1340-4.

Kovarik M, Muthny T, Sispera L, et al. Effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate treatment in different types of skeletal muscle of intact and septic rats. *J Physiol Biochem* 2010;66: 311–9.

Krug AL, Macedo AG, Zago AS, Rush JW, Santos CF, Amaral SL. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2015 Sep 10.

Kuo T, Harris CA, Wang JC Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2013; 380 79–88.

Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, and Baker H. Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 1969; 42: 1-29.

May PE, Barber A, D'Olimpio JT, et al. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), arginine, and glutamine. *Am J Surg* 2002; 183:471–9.

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* 2014; 85, 293–304.

Morimoto Y, Kondo Y, Kataoka H, Honda Y, Kozu R, Sakamoto J, Nakano J, Origuchi T, Yoshimura T, Okita M. Heat treatment inhibits skeletal muscle

atrophy of glucocorticoid-induced myopathy in rats. *Physiol Res*. 2015 Dec 29; 64(6) :897-905.

Nava S, Gayan-Ramirez G, Rollier H, Bisschop A, Dom R, de Bock V, Decramer M. Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Jun; 153 (6 Pt 1):1888-96.

Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, das Neves W, Valente KS, Lancha AH Jr. Leucine supplementation combined with resistance exercise improves the plasma lipid profile of dexamethasone-treated rats. *Lipids Health Dis*. 2012 Jan 11:7.

Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher JA, Rice D, Fuller JC Jr, Connelly AS, Abumrad N. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol* (1985). 1996 Nov; 81(5): 2095-104.

Nissen S.L., Abumrad N. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). *Journal Nutritional Biochemistry*, 1997; 8: 300-311.

Noh KK, Chung KW, Choi YJ, Park MH, Jang EJ, Park CH, Yoon C, Kim ND, Kim MK, Chung HY. β -Hydroxy β -methylbutyrate improves dexamethasone-induced muscle atrophy by modulating the muscle degradation pathway in SD rat. *PLoS One*. 2014 Jul 17; 9 (7): e102947.

Nunes EA, Gonçalves-Neto LM, Ferreira FB, dos Santos C, Fernandes LC, Boschero AC, Calder PC, Rafacho A. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013 Nov; 38(11): 1137-46.

Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions.

Microsc Res Tech. 2000 Sep 15; 50(6) :500-9. Review.

Pette D, Staron RS.. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. Histochem Cell Biol 2001; 115: 359-372

PETTE, D. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Historical perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. J Appl Physiol, 2001; v. 90, p. 1119 – 1124.

Pimentel G.D., Rosa J.C., Lira F.S., Zanchi N.E., Ropelle E.R., Oyama L.M., Nascimento C.M.O., de Mello M.T., Tufik S., Santos R.V.T., b-Hydroxy-b-methylbutyrate (HMB) supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway. Nutrition & Metabolism, 2011; 8:11.

Pinheiro C.H.J., Gerlinger-Romero F., Guimarães-Ferreira L., Souza-Jr A.L., Vitzel K.F., Nachbar R.T., Nunes M.T., Curi R.: Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. European Journal of Applied Physiology 2011.

Piovesan D, DiZio P, Lackner JR. A new time-frequency approach to estimate single joint upper limb impedance. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2009; 1282-5.

Qin W, Pan J, Wu Y, Bauman WA, Cardozo C. Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1 α . Biochem Biophys Res Commun. 2010 Dec 17; 403(3-4):473-8.

Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Oct; 45(10): 2163-72. Epub 2013 Jun 24.

Schiaffino S and Reggiani C.: Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1994; 77: 493-501.

Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1447-531.

Smith H.J., Mukerji P., Tisdale M.J.: Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Research*, 2005; 65: 277 - 283.

Son YH, Lee SJ, Lee KB, Lee JH, Jeong EM, Chung SG, Park SC, Kim IG. Dexamethasone downregulates caveolin-1 causing muscle atrophy via inhibited insulin signaling. *J Endocrinol.* 2015 Apr; 225(1): 27-37.

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

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.* 2009; 58: 253-262.

Vechetti-Junior IJ, Bertaglia RS, Fernandez GJ, de Paula TG, de Souza RW, Moraes LN, Mareco EA, de Freitas CE, Aguiar AF, Carvalho RF, Dal-Pai-Silva M. Aerobic Exercise Recovers Disuse-induced Atrophy Through the Stimulus of the LRP130/PGC-1 α Complex in Aged Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015 May 19.

Vukovich MD, Stubbs NB, Bohlken RM. Body composition in 70-year-old adults responds to dietary β -hydroxy- β -methyl-butyrate similarly to that of young adults. *J Nutr* 2001;131: 2049–52.

Weeds AG and Lowey S.: Substructure of the myosin molecule II. The light chains of myosin. *J Mol Biol* 1971; 61: 701-725

West DW, Phillips SM. Anabolic processes in human skeletal muscle: restoring the identities of growth hormone and testosterone. *Phys Sportsmed*. 2010 Oct; 38(3): 97-104.

Zeiderman MR, McMahon MJ. The role of objective measurement of skeletal muscle function in the pre-operative patient. *Clin Nutr*. 1989 Jun; 8(3): 161-6.

Zhao TJ, Yan YB, Liu Y, Zhou HM. The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *J Biol Chem*. 2007 Apr 20; 282(16): 12022-9.

Zheng B, Ohkawa S, Li H, Roberts-Wilson TK, Price SR. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *FASEB J*. 2010 Aug; 24(8): 2660-9. Epub 2010 Apr 6.

Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*. 1972 Jul 4; 11(14): 2627-33.

Staron RS. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol*. 1997 Aug;22(4):307-27. Review.

Gollnick PD, Matoba H. The muscle fiber composition of skeletal muscle as a predictor of athletic success. An overview. *Am J Sports Med*. 1984 May-Jun;12(3):212-7. Review

Pereira RMR, Carvalho JF: Glucocorticoid-induced myopathy: *Joint Bone Spine*. 2011; 78: 41–44

NOVÁK P, ZACHAŘOVÁ G, SOUKUP T: Individual, Age and Sex Differences in Fiber Type Composition of Slow and Fast Muscles of Adult Lewis Rats: Comparison With Other Rat Strains: *Physiol. Res.* 2010; 59: 783-801.

Li H, Malhotra S, Kumar A: Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med* 2008; 86:1113–1126.

ANEXOS

ANEXO

Anexo 1 – Carta de aprovação do comitê de ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 018/2013

Bauru, 28 de junho de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado ***Efeitos da suplementação com HMB sobre a musculatura esquelética de ratos submetidos ao tratamento com Dexametasona***, de autoria de Mizael Pereira, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **17 de junho 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. Luis Antônio de Assis Taveira,
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

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

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8358
<http://www.fob.usp.br>