FREDERICO GERLINGER ROMERO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE BETA HIDROXI BETA
METILBUTIRATO NA EXPRESSÃO GÊNICA DA
MIOSTATINA E IGF-I EM MÚSCULO ESQUELÉTICO E
DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GH) EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Humana do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof.^a Maria Tereza Nunes

São Paulo

2009

RESUMO

ROMERO, F. G. **Efeito da administração de beta hidroxí beta metilbutirato na expressão gênica da miostatina e IGF-I em músculo esquelético e do hormônio do crescimento (GH) em ratos.** 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Objetivos: Estratégias nutricionais têm sido utilizadas tanto por atletas, indivíduos que praticam atividade física ou no tratamento de patologias associadas à degradação protéica acentuada, com o objetivo de aumentar o ganho de massa muscular. Um metabólito da leucina, o HMβ, também tem sido utilizado para os mesmos fins, embora pouco se conheça sobre os mecanismos envolvidos no ganho de massa muscular atribuídos a ele e as repercussões fisiológicas do seu uso crônico. O objetivo central deste estudo foi investigar o efeito da administração crônica do beta hidroxí beta metilbutirato (HMβ) sobre a atividade do eixo somatotrófico, por meio da avaliação da expressão gênica do GH, IGF-I hepático, e do IGF-I sérico, bem como sobre a expressão do mRNA da miostatina. **Método:** Ratos Wistar tratados com HMβ (320 mg/Kg de peso corporal /mL de salina-0,9%), ou salina (controle), por gavagem, por 4 semanas, foram decapitados, e o sangue coletado para avaliação da concentração sérica de insulina (RIE), glicose (colorimetria) e IGF-I (RIE). Amostras de fígado, músculo extensor digital longo (EDL) e Sóleo foram coletadas para extração de RNA, para avaliação de expressão gênica de IGF-I e miostatina por *Real Time*-PCR, usando-se como controle interno da reação a ciclofilina e beta actina, respectivamente. As hipófises foram removidas para extração do RNA total e avaliação da expressão do mRNA do GH, por Northern Blot, utilizando-se o rcDNA do GH como sonda e o rRNA da 18S para normalização, bem como para avaliação da expressão do GH por Western blotting. Os dados foram analisados pelo teste-T de *Student* ($P < 0,05$). **Resultados:** O tratamento crônico com HMβ promoveu aumento no conteúdo de mRNA de GH ($> 60\%$; $p < 0,0001$), da proteína GH ($> 20\%$; $p < 0,05$), do mRNA do IGF-I ($\sim 24\%$; $p < 0,05$), bem como da concentração sérica de IGF-I ($p < 0,05$) e da insulina ($\sim 2x$; $p < 0,0001$), sem que alterações fossem detectadas na concentração sérica de glicose, na expressão do mRNA de miostatina e do mRNA de IGF-I nos músculos esqueléticos.

Conclusão: O aumento na expressão gênica do GH, do mRNA do IGF-I hepático e da concentração sérica de IGF-I indica claramente uma ativação do eixo somatotrófico induzida pelo HMβ, o que poderia, em parte, explicar os seus efeitos anabólicos. Repercussões sobre a expressão gênica da miostatina bem como do IGF-I muscular não foram observadas nesse modelo. Ainda, a elevação da concentração sérica de insulina poderia resultar do efeito hiperglicemiante do GH, ou de um efeito direto do HMβ na secreção de insulina, já que a leucina, do qual é derivado, exerce esse efeito secretagogo.

Palavras-chave: Hormônio do Crescimento; Beta hidroxí beta metilbutirato; IGF-I; Miostatina.

ABSTRACT

ROMERO, F. G. **Effect of the beta hydroxy beta methylbutyrate (HMB) administration on the expression of Myostatin and IGF-I mRNAs in skeletal muscle, and of pituitary GH mRNA in rats.** 2009. 53 f. Master Thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Objective: Nutritional strategies have been used by athletes, individuals who are engaged in physical activity or in the treatment of diseases associated with protein degradation, with the objective of increasing the gain of muscle mass. A metabolite of leucine, the HMB, has also been used for the same purposes, although little is known about the mechanisms involved in the gain of muscle mass ascribed to it and the physiological effects of its chronic use. The aim of this study was to evaluate the influence of the chronic administration of beta hydroxy beta methylbutyrate (HMB) on the somatotrophic axis activity, by means of the evaluation of the GH gene expression (mRNA and protein), IGF-I mRNA expression in liver and IGF-I concentration in serum, as well as on myostatin gene expression in skeletal muscle.

Method: Rats treated with HMB (320 mg / kg body weight / mL of saline-0, 9%) or saline (control), by gavage, for 4 weeks, were decapitated and blood was collected for evaluation of serum concentration of insulin (RIA), glucose (colorimetric) and IGF-I (RIA). Samples of liver, *extensor digitoralis longus* (EDL) and soleus muscle were collected for extraction of RNA for evaluation of IGF-I and myostatin gene expression by Real Time-PCR, using Cyclophilin and beta actin, as internal control, respectively. Pituitaries were removed and used for evaluation of the GH mRNA expression of by Northern blot, using the GH rcDNA as probe and the 18S rRNA for normalization; as well as for evaluation of GH content, by western blotting. The data were analyzed by Student T-test ($P < 0.05$). **Results:** The chronic HMB treatment increased the content of GH mRNA ($> 60\%$, $p < 0.0001$), GH ($> 20\%$, $p < 0.05$), IGF-I mRNA ($\sim 24\%$, $p < 0.05$), IGF-I ($p < 0.05$) and insulin ($\sim 2x$, $p < 0.0001$) serum concentrations, but did not change the serum glucose concentration and the IGF-I and myostatin mRNAs expression in skeletal muscles.

Conclusion: The increase on GH gene expression, IGF-I mRNA content in liver, as well as IGF-I concentration in serum, clearly indicates that the somatotrophic axis activity is increased by the HMβ chronic treatment, which might explain, at least in part, the anabolic effects of this compound. Repercussions on the myostatin and IGF-I gene expression in muscles were not observed in this experimental model. Moreover, the increased serum insulin levels could be the result of the hyperglycemiant effect of GH, or of a direct effect of HMβ on insulin secretion, since leucine, from which it is derived, exerts this secretagogue effect.

Key words: Growth hormone; Beta hydroxyl beta methylbutyrate; IGF-I; Myostatin.

1 INTRODUÇÃO

Atletas e esportistas, na busca de acelerar os ganhos do desempenho físico pelo treinamento, utilizam estratégias nutricionais e/ou suplementos alimentares, os chamados recursos ergogênicos. Desde meados dos anos 50 tem-se manipulado diversas variáveis e buscado estratégias para prover aumento destes ganhos, tais como a indução de alterações no quadro hormonal.

Nesse sentido, aminoácidos como arginina, leucina e citrulina, por suas conhecidas propriedades secretagogas de GH, passaram a ser amplamente utilizados por atletas, com o objetivo de elevar os níveis plasmáticos de hormônio do crescimento (GH), para obtenção de maior massa muscular. Hormônios como o próprio GH, bem como análogos da testosterona, também começaram a ser utilizados, de maneira bastante discutível, com os mesmos propósitos.

Mais recentemente, aminoácidos como leucina e seu metabólito α -cetoisocaproato (KIC), conhecidos há mais de 35 anos como anti-catabólicos (HIDER et al., 1960), vem retornando ao foco de vários estudos. Observou-se que esses compostos ou, ainda, um subproduto do metabolismo deles, promovem inibição da proteólise muscular em ratos, levando à diminuição da perda de nitrogênio e de proteínas. Nissen et al. (1996) sugeriram ser o beta hidroxibeta metilbutirato (HMB) o responsável por esses efeitos, o que foi reforçado por estudos realizados com inibidores da transaminação, processo de metabolização do aminoácido leucina, que levaram à supressão da inibição da degradação protéica, sugerindo que um metabólito desse aminoácido seria responsável por tal efeito (SLATER e JENKINS, 2000). Lembrando que nem outros dois aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), isoleucina ou valina, e nem outros aminoácidos e seus metabolitos demonstraram tais efeitos (HOLECEK et al., 2009).

Efeitos diretos do HMB no metabolismo muscular foram, a seguir, evidenciados em secções de músculo esquelético de ratos e frangos, incubados com várias concentrações do HMB (até 1000 mM). Nelas se observou uma inibição da proteólise (~ 80%) concomitantemente a uma elevação de aproximadamente

20% na síntese protéica (NISSEN e ABUMRAD, 1997). Em outro estudo de Nissen et al. (1996), em que indivíduos foram submetidos a treinamento por meio de exercício resistido, a evidência mais direta da alteração do metabolismo protéico induzida pelo HMB foi o decréscimo de 20% de 3 metil histidina (3-MH) na urina e um decréscimo de 20 a 60% nos níveis e atividade de enzimas, como a creatina quinase, que são indicadores plasmáticos de proteólise/dano muscular. Essa queda na proteólise é consistente com os estudos *in vitro*, já relatados, que sugerem que a leucina e os seus metabólitos agem diretamente diminuindo o catabolismo protéico muscular.

Estudos mais recentes mostraram que suplementação de HMB (ELEY et al., 2007), associado à caquexia, produz um efeito atenuante sobre a degradação protéica e estimulante sobre a síntese protéica, por múltiplos fatores intracelulares relacionados à maquinaria gênica. Essa é uma das razões pelas quais o HMB, associado a L-arginina e L-glutamina, vem sendo utilizado na clínica. O conjunto desses dados indica, portanto, que o HMB, por diminuir a proteólise, pode prevenir ou reduzir o dano muscular conseqüente a um trabalho muscular intenso.

A produção endógena de HMB é pequena. Um indivíduo de 70 kg produz cerca de 0,2 ~ 0,4 g de HMB/dia, do teor de leucina da dieta. Há evidências que o fígado seja o principal sítio de produção, por apresentar maior atividade da dioxigenase, enzima responsável pela produção do HMB livre no citosol. Estudos com homogeneizados e perfusatos também indicam que o músculo e outros tecidos produzem HMB, embora em baixas taxas (NISSEN e ABUMRAD, 1997).

O HMB ainda se encontra presente em alimentos, tais como, frutas cítricas, alguns peixes e no leite materno (NISSEN et al., 1996). Entretanto, embora ele possa ser encontrado na natureza, é muito difícil e impraticável conseguir uma base regular de alimentos que forneça as quantidades requeridas para promover inibição da proteólise e ganho de massa muscular. Esta é a razão pela qual a suplementação com HMB tem sido utilizada como alternativa para os praticantes de exercícios resistidos/musculação, para indivíduos sob extremo estresse muscular, na velhice, ou ainda por portadores de doenças associadas a síndromes de perda muscular, como câncer (SMITH et al., 2005).

Embora o efeito anti-proteolítico e/ou anabólico do HMβ esteja bem documentado na literatura, os mecanismos envolvidos no seu desencadeamento, bem como as consequências de sua utilização à longo prazo, ainda permanecem desconhecidos.

Considerando-se que a massa muscular esquelética é mantida por um equilíbrio entre a taxa de síntese e a de catabolismo protéico (GLASS, 2003; FRANCH e PRICE, 2005) e que algumas das proteínas diretamente envolvidas nesses processos são o **GH**, o **fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I)** e a **Miostatina (GDF-8)**, é possível que, ao menos, parte dos efeitos do HMβ ocorra por alterações na expressão das mesmas. Passaremos a descrever sucintamente os papéis biológicos destas proteínas.

GH

Sabe-se que o Hormônio de Crescimento (GH) também está relacionado com o aumento de massa muscular, sendo até mesmo utilizado como um ergogênico ilícito em competição olímpica, conforme já salientado. Em indivíduos normais, aumenta gradativamente a partir do nascimento, apresentando um pico na puberdade, ocorrendo redução e manutenção, em um certo nível, na idade adulta, quando participa da manutenção da massa magra e da massa gorda. Fisiologicamente, atua promovendo aumento do transporte de aminoácidos para os tecidos e da expressão de genes específicos, como o do IGF-I, favorecendo o anabolismo protéico, bem como estimulando a lipólise, sendo importante também para a manutenção da massa óssea e reparo dos tecidos. Na senescência ocorre redução da sua secreção, a que se tem atribuído a redução da massa magra, das defesas do indivíduo e o aumento da massa gorda. A secreção de GH se eleva no exercício e estudos relacionam diretamente a intensidade do exercício com as respostas nas concentrações de GH (BONIFAZI et al., 1998).

Conforme já salientado, muitos dos efeitos do GH são decorrentes da estimulação da síntese hepática e tecidual de IGF-I, que ele induz. Este fator de crescimento atua praticamente em quase todas as células do organismo,

promovendo efeitos generalizados sobre o ganho de massa muscular e reparação (SARTORELLI e FULCO, 2004; LEROITH et al., 2001; FLORINI et al., 1996; DEVOL et al., 1990).

Estudos desenvolvidos por Liu et al. (2003) mostraram, ainda, que animais com deficiência na secreção de GH quando tratados com este hormônio (05 mg/Kg/dia) apresentaram uma redução no mRNA da miostatina de aproximadamente 40%. Ainda, o efeito inibitório sobre a miostatina esteve associado a um aumento na massa muscular e na performance aeróbica, determinada pela análise de consumo de oxigênio e ventilação nesses animais. Estes dados sugerem que a miostatina pode ser um gene alvo da ação do GH.

Considerando-se que vários estudos apontam o envolvimento de aminoácidos no processo de secreção de GH, incluindo os de nosso grupo, que evidenciou que a arginina, em paralelo ao seu efeito secretagogo do GH estimula a sua síntese (ADRIÃO et al., 2004; DE CASTRO BARBOSA et al., 2006, 2008) torna-se interessante avaliar a possibilidade de que o HMB β , metabólito da leucina, possa exercer efeito semelhante sobre a expressão gênica do GH.

IGF-I

O IGF-I apresenta uma estrutura similar à molécula de pró-insulina, mas difere da insulina na sua regulação, receptores e efeitos biológicos. É produzido na maioria dos tecidos e exportado para as células vizinhas, agindo de maneira parácrina/autócrina. Dessa forma, este fator de crescimento atua praticamente em quase todas as células do organismo, promovendo efeitos generalizados sobre o ganho de massa muscular e reparação (LEROITH et al., 2001).

O IGF-I é importante para a proliferação e diferenciação dos mioblastos durante o desenvolvimento e, no período pós-natal é o principal indutor do crescimento de todos os tecidos. Camundongos deficientes em IGF-I são pequenos ao nascimento, exibindo defeitos variáveis na musculatura esquelética, dentre outros (SVANBERG et al., 1998).

Sua ação consiste em promover a captação de aminoácidos pelas células, bem como ativar a transcrição de genes que codificam proteínas estruturais e funcionais específicas na musculatura esquelética, e em outros tecidos.

Vale comentar que alguns estudos demonstraram que determinados estados catabólicos estão associados a uma aumento na concentração do mRNA da miostatina e redução nos níveis do mRNA de IGF-I no músculo (LANG et al., 2001).

Dessa maneira, a indução da expressão do gene do IGF-I pelo HMβ poderia também ser uma alternativa para o ganho de massa muscular.

Miostatina

A Miostatina ou GDF-8 pertence à superfamília dos fatores de crescimento e transformação beta (*transforming growth factor-beta*, TGF-β), que inclui um grande grupo de fatores de crescimento e diferenciação, os quais exercem importantes efeitos na regulação do desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostase tecidual nos animais adultos (MCPHERRON et al., 1997a). Ela se expressa predominantemente no músculo esquelético em desenvolvimento e adulto e, em menores quantidades, no tecido adiposo (MCPHERRON e LEE, 1997b). Durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, a expressão da miostatina é restrita ao miótomo dos somitos em desenvolvimento e, em estágios mais avançados e no animal adulto, é expressa em diferentes músculos do corpo. Sua função é de regular negativamente o crescimento tecidual, já que animais *knockout* para esse gene apresentam aumento de três vezes na sua massa muscular, efeito que parece resultar de uma combinação de hipertrofia e hiperplasia das células musculares (MCPHERRON e LEE, 1997b).

O gene da miostatina é altamente conservado, sendo a seqüência de aminoácidos da porção ativa da molécula idêntica em muitas espécies de mamíferos e aves. Nesta região, a seqüência humana é idêntica à do rato (MCPHERRON et al., 1997a). Além disso, a função da miostatina também parece estar conservada entre as espécies, uma vez que a mutação do gene que a codifica promove duplicação da massa muscular em gado (MCPHERRON et al., 1997a; MCPHERRON e LEE,

1997b). Esses fatos se mostram importantes, pois revelam um forte potencial terapêutico da manipulação da miostatina na recuperação e manutenção da massa muscular perdida em pacientes portadores de câncer, AIDS e distrofias musculares. Isso pôde ser evidenciado por Gonzáles-Cadavid et al., 1998, que mostraram que homens portadores do HIV apresentam uma severa atrofia muscular e expressam altos níveis de uma proteína muscular com características estruturais semelhantes às da miostatina (*myostatin-immunoreactive protein*), dados indicativos de uma ação da miostatina, ou um semelhante, na regulação negativa do crescimento muscular durante essa condição patológica.

Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de identificar os fatores que controlam a regulação da expressão da miostatina. Os estudos realizados em membros submetidos à imobilização, condição em que ocorre perda significativa da massa muscular, reafirmam o efeito da miostatina no sentido de regular negativamente o crescimento muscular, uma vez que nessa condição, tanto o conteúdo de mRNA quanto o da proteína miostatina aumentaram significativamente. Além disso, há evidências de que a mobilização, após e durante os períodos de imobilização, previne/reduz o efeito da miostatina no músculo esquelético, demonstrando o importante papel da atividade muscular sobre a inibição da expressão desse gene. Redução na expressão da miostatina também é evidenciada na sobrecarga induzida para a hipertrofia muscular em homens adultos (WALKER et al., 2004), quando esta, então, se apresenta reduzida na circulação, em concentrações opostas às do IGF-I.

Portanto substâncias que reduzam a expressão do gene da miostatina poderiam ser importantes no ganho de massa muscular, e o HMβ poderia ser uma delas.

7 CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados apresentados nos permite concluir que o tratamento crônico (30 dias) com HM β aumenta a atividade somatotrófica de ratos, com elevação da síntese e secreção de GH e conseqüente aumento da síntese hepática e liberação de IGF-I para a circulação, o que aponta um aspecto molecular da ação desse suplemento de grande relevância. Apesar dessa importante ativação, não identificamos qualquer repercussão no peso dos músculos esqueléticos estudados, que pudesse indicar a ativação da síntese protéica e ou inibição da proteólise, bem como sobre a expressão do gene do IGF-I e miostatina muscular. Chama-nos a atenção que os indícios de resistência insulínica nos animais tratados com HM β , não puderam ser confirmados por meio do teste de tolerância a insulina, fato que ainda será objeto de investigação. Em suma, o HM β na dose e tratamento utilizados se mostrou capaz de estimular o eixo somatotrófico de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADRIÃO, M.; CHRISMAN, C.J.; BIELAVSKY, M.; OLINTO, S.C.; SHIRAISHI, E.M.; NUNES, M.T. Arginine increases growth hormone gene expression in rat pituitary and GH3 cells. **Neuroendocrinology**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2004.

APERGHIS, M; VELLOSO, C.P.; HAMEED, M.; BROTHWOOD, T.; BRADLEY, L.; BOULOUX, P. M.; HARRIDGE, S.D.; GOLDSPINK, G. Serum IGF-I levels and IGF-I gene splicing in muscle of healthy young males receiving rhGH. **Grow. Horm. IGF Res.**, v.19, n. 1, p. 61-7, 2009.

BAIER, S.; JOHANNSEN, D.; ABUMRAD, N.; RATHMACHER, J.A.; NISSEN, S.; FLAKOLL, P. Year-long changes in protein metabolism in elderly men and women supplemented with a nutrition cocktail of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), L-arginine, and L-lysine. **J. Parenter. Enteral. Nutr.**, v. 33, n. 1, p. 71-82, 2009.

BONIFAZI, M.; BELA E.; LUPO C.; MARTELLI G.; ZHU B.; CARLI G. Influence of training on the response to exercise of adrenocorticotropin and growth hormone plasma concentrations in human swimmers. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 78, n. 5, p. 394-7, 1998.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATONI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance test with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 68, p. 374–378, 1989.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159. 1987.

DE CASTRO BARBOSA, T.; NICOLETTI DE CARVALHO, J.E.; POYARES, L.L.; BORDIN, S.; FABRES MACHADO, U.; NUNES, M.T. Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. **Endocrinology**, v. 23, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências:elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE CASTRO BARBOSA, T.; LOURENÇO POYARES, L.; FABRES MACHADO, U.; NUNES, M.T. Chronic oral administration of arginine induces GH gene expression and insulin resistance. **Life Sci.**, v. 79, n. 15, p.1444-9, 2006.

DEVOL, D. L.; ROTWEIN, P.; SADOW, J. L.; NOVAKOFSKI, J.; BECHTEL, P. J. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 89–95, 1990.

ELEY, H.L.; RUSSELL, S.T.; BAXTER, J.H.; MUKER, J.I.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.**, v. 293, n. 4, p. 923-31, 2007.

ELSHAL, M.F.; MCCOY, J.P. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 317-23, 2006.

FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; COOLICAN, S.A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocr. Rev.**, v. 17, p. 481-517, 1996.

FRANCH, H.A.; PRICE, S.R. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 8, n. 3, p. 271-5, 2005.

FURUYA, D.T.; BINSACK, R.; MACHADO, U.F. Low ethanol consumption increases insulin sensitivity in Wistar rats. **Braz. J. Med. Biolog. Res.**, v. 36, n. 1, p. 125–130, 2003.

GLASS, D.J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends Mol. Med.**, v. 9, n. 8, p. 344-50, 2003.

GONZÁLEZ-CADAVID, N.F.; TAYLOR, W.E.; YARASHESKI, K.; SINHA-HIKIM, I.; MA, K.; EZZAT, S.; SHEN, R.; LALANI, R.; ASA, S.; MAMITA, M.; NAIR, G.; ARVER, S.; BHASIN, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 14938-14943, 1998.

GOSTELLI-PETER, M.; WINTERHALTER, K.H.; SCHMID, C.; FROESCH, E.R.; ZAPF, J. Expression and regulation of insulin like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized

rats infused with IGF-I and growth hormone. **Endocrinology**, v.135, p. 2558–2567, 1994.

HIDER, R.C.; FERN, E.B.; LONDON, D.R. Relationship between intracellular amino acids and protein synthesis in the extensor digitorum longus muscle of rats. **Biochem. J.**, v. 114, p. 171-178, 1960.

ISGAARD, J.; CARLSSON, L.; ISAKSSON, O.G.; JANSSON, J.O. Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. **Endocrinology**, v.123, n. 6, p. 2605-10. 1988.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Amino acids as regulators of gene expression. **Nutr. Metab.**, Londres, v. 17, n. 1, p. 1-3, 2004.

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**, v. 3, 2009.

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANG, C.H.; SLVIS, C.; NYSTROM, G.; FROST, R.A. Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury. **FASEB J.**, v. 15, n. 10, p. 1807-9, 2001.

LEROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J.L.; BUTLER, A. The somatomedin hypothesis. **Endocr. Rev.**, v. 22, p. 53-74, 2001.

LIU, W.; THOMAS, S.G.; ASA, S.L.; GONZÁLEZ-CADAVID, N.; BHASIN, S.; EZZAT, S. Myostatin is a skeletal muscle target of growth hormone anabolic action. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, n. 11, p. 5490-6, 2003.

MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β super family member. **Nature**, v. 387, p. 83-90, 1997a.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 12457-12461, 1997b.

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

NISSEN, S.; SHARP, R.L.; PANTON, L.; VUKOVICH, M.; TRAPPE, S.; FULLER, J.C. JR. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. **J. Nutr.**, v. 130, n. 8, p. 1937-45, 2000.

NISSEN, S.; SHARP, R.; RATHMACHER, J.A.; RICE, J.; FULLER, J.C.JR.; CONNELLY, A.S.; ABUMRAD, N.N. The effect of leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) on muscle metabolism during resistance-exercise training. **J. Appl. Physiol.**, v. 81, p. 2095-2104, 1996.

PETTE, D.; STARON, R.S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 116, p. 1-76, 1990.

RABAGLIA, M.E.; GRAY-KELLER, M.P.; FREY, B.L.; SHORTREED, M.R.; SMITH, L.M.; ATTIE, A.D. Alpha-Ketoisocaproate-induced hypersecretion of insulin by islets from diabetes-susceptible mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, n. 2 p. 218-24, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. The identification of recombinant clones. In: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (Ed.). **Molecular Cloning**: laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 324-328.

SANTOS, R.A.; GIANNOCO, G.; NUNES, M.T. Thyroid hormone stimulates Myoglobin (Mb) expression in Sóleo (S) and Extensorum Digitalis Longus (EDL) muscles of rats: Concomitant alterations in the activities of Krebs Cycle oxidative enzymes. **Thyroid**, v. 11, n. 6, p. 545-550, 2001.

SARTORELLI, V.; FULCO, M. Molecular and Cellular Determinants of Skeletal Muscle Atrophy and Hypertrophy, **Sci. STKE**, v. 27, 2004.

SLATER, G.J.; JENKINS, D. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation and the promotion of muscle growth and strength. **Sports Med.**, v. 30, n. 2, p. 105-16, 2000.

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.**, v. 65, n. 1, p. 277-83, 2005.

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

SVANBERG, E.; POWELL-BRAXTON, L.; OHLSSON, C.; ZACHRISSON, H.; LUNDHOLM, K. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in stimulation of protein synthesis in skeletal muscles following oral refeeding. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4906-10, 1998.

TATARA, M. R.; SLIWA, E.; KRUPSKI, W. Prenatal programming of skeletal development in the offspring: effects of maternal treatment with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1615-22, 2007.

VUKOVICH, M.D.; SLATER, G.; MACCHI, M.B.; TURNER, M.J.; FALLON, K.; BOSTON, T.; RATHMACHER, J. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, n. 11, p. 631-639, 2001.

WALKER, K. S.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, H. K. Resistance Training Alters Plasma Myostatin but not IGF-1 in Healthy Men. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 5, p. 787-793, 2004.

ZHANDE, R.; MITCHELL, J.J.; WU, J.; SUN, X.J. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 1016-1026, 2002.