

Frederico Gerlinger Romero

**EFEITOS DO BETA HIDROXI BETA METILBUTIRATO SOBRE A
EXPRESSÃO DE UBIQUITINA-LIGASES E VIAS DE SÍNTESE
PROTÉICA NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS
ALIMENTADOS E JEJUADOS E SUAS REPERCUSSÕES
FUNCIONAIS**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza Nunes

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

Gerlinger-Romero F. Efeitos do beta hidroxí beta metilbutirato sobre a expressão de ubiquitina-ligases e vias de síntese protéica na musculatura esquelética de ratos alimentados e jejuados e suas repercussões funcionais. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A investigação do papel da suplementação de aminoácidos na atividade física e na prática médica tem aumentado nos últimos anos, considerando as evidências de que eles proporcionam ganho de massa muscular, por promoverem aumento da síntese e/ou redução da degradação protéica. Dentre vários agentes, um metabólito do aminoácido leucina, o HMB, vem sendo utilizado para esse fim. O presente estudo tem como objetivo estudar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito do HMB sobre o metabolismo proteico na musculatura esquelética frente a um modelo de proteólise, bem como suas consequências funcionais. Para tanto, ratos Wistar adultos (~250 g) foram tratados com HMB (320 mg/Kg de peso corporal/mL de salina-0,9%), ou salina (controle), por gavagem, durante 28 dias. Após esse período, uma parcela de ambos os grupos sofreu jejum de 24 horas, com a finalidade de induzir proteólise muscular. Após os tratamentos especificados, parte dos animais destes grupos foi submetida a ensaios funcionais *in vivo*, por meio de um eletroestimulador acoplado a um transdutor de força. A outra parcela foi sacrificada, sendo os músculos gastrocnêmio (GASTRO) removidos e pesados; sóleo (SOL) e extensor digital longo (EDL), bem como parte do fígado, retirados para avaliação da expressão gênica (*real-time* PCR) e protéica (Western Blotting) de diversas proteínas envolvidas na síntese e degradação protéica na musculatura esquelética (IGF-I/Akt/mTOR/4E-BP1 e Ub-ligases). Não foram detectadas alterações na expressão dos atógenes em ambos os músculos (SOL/EDL) com o tratamento; no entanto observamos um indicativo de atenuação dos animais jejuados com o tratamento no jejum no EDL. Com relação à fosforilação da Akt não houve alteração da mesma com o jejum e nem com o tratamento com HMB no músculo SOL. Já no EDL, encontramos elevação da pAkt no grupo jejuado tratado comparado ao jejuado controle. Contudo, surpreendentemente não detectamos alteração nas demais vias de síntese, bem como na expressão e conteúdo proteico de IGF-I. Os dados funcionais revelaram apenas uma melhora no tempo de sustentação de isometria e na taxa de resistência à fadiga no EDL dos animais jejuados com o tratamento, sem qualquer alteração na AST. Esta, no entanto, apresentou-se reduzida no SOL. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento crônico com HMB não resultou em alterações nas vias de síntese e degradação protéica nos animais submetidos ao jejum. Contudo, eles apontam respostas músculo-específicas direcionadas principalmente ao EDL, no qual observamos aumento da atividade da Akt, acompanhado de uma melhora funcional, sugerindo que esse metabólito atue protegendo esse músculo do efeito deletério do jejum, sem adicional ganho de massa muscular.

Palavras-chave: HMB. Síntese protéica. Degradação protéica. Função contrátil.

ABSTRACT

Gerlinger-Romero F. Effects of beta hydroxy beta methylbutyrate on expression of ubiquitin ligases and the pathway of protein synthesis in skeletal muscle of fed and fasted rats and their functional consequences. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The investigations of role amino acids supplementation on physical activity and on medicinal practices had increased on the latest years, considering the evidence that they both provide muscle mass gain by increasing protein synthesis and / or diminishing its degradations. Among others factors, the HMB, a leucine metabolite, has been used for this purpose. The aims of this study is to explore the molecular mechanisms involved of the HMB effects over the protein metabolic on skeletal muscle compared to a proteolysis model, as well as their further functional consequences on muscle. For this, Wistar rats (250 g) were treated with HMB (320 mg/kg body weight/mL of saline-0, 9%), or only saline (control) daily by gavage for 28 days along. After it, a group of animals were subjected to 24-hour fast, in order to induce muscle proteolysis. After the specified treatments, another portion of these animals were submitted to performances test *in vivo* using an electrostimulator coupled to a force transducer. Another portion of animals were sacrificed, and their gastrocnemius (GASTRO) removed and weighed; furthermore, the soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL) and a piece of the liver were removed for evaluation of several genes expression (real-time PCR) and their proteins expression (Western Blotting). Those proteins were involved on protein synthesis and degradation of skeletal muscle (IGF-I/Akt/mTOR/4E-BP1 and Ub ligases). After treatment, no changes were detected on the atrogenes expression in both muscles (SOL / EDL); however it can be observed an indicative attenuation of fasted control animals compared HMB treatment fasted on EDL. In relation of Akt phosphorylation, on soleus muscle, it was not altered by fasting, neither by HMB treatment. We found the pAkt elevated on the EDL's muscle of the HMB group fasted compared to the control fasted. However, surprisingly we detected no changes in the other synthesis pathway, as well on IGF-I expressions and its proteins content. Functional data revealed an improvement on sustained time of the isometric force and the fatigue resistance rate on EDL of animals fasted and HMB treated, without any change on cross-sectional area (CSA). On the other hand, it appeared to be reduced in SOL. Those data suggesting that chronic HMB treatment have no change in the synthesis pathways and protein degradations in animals subjected to fasting. Nevertheless, they indicated responses of muscle-specific, mainly targeted to the EDL, in which was observed an increase of Akt activity, followed by a functional improvement, suggesting that this metabolite acts as a muscle protector of the deleterious fasting effects, without any additional muscle mass gain.

Keywords: HMB. Protein synthesis. Protein degradation. Muscle function.

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, aminoácidos como leucina e seu metabólito α -cetoisocaproato (KIC), conhecidos como anticatabólicos (1), vêm retornando ao foco de vários estudos. Observou-se que esses compostos, ou ainda, um subproduto do metabolismo dele, promovem inibição da proteólise muscular em ratos, levando à diminuição da perda urinária de nitrogênio e de proteínas (2). Nissen et al. (3) sugeriram ser o beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) o responsável por esses efeitos, já que a utilização de inibidores da transaminação da leucina, processo pelo qual é gerado o HMB, levou à supressão da inibição da degradação protéica (4). Vale ressaltar que outros aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), como isoleucina ou valina, bem como seus metabólitos, não promoveram esses efeitos, reforçando a possibilidade de que o HMB seja o elemento chave para o desencadeamento dos efeitos citados (5). O aumento da síntese protéica também tem sido associado a esse metabólito, o qual vem sendo empregado no tratamento de pacientes que apresentam caquexia (6), na prevenção da sarcopenia (7), ou mesmo para maximizar os ganhos de massa muscular durante os exercícios (8, 9), situações em que o controle fino entre síntese e degradação protéica parece ser afetado pelo metabólito.

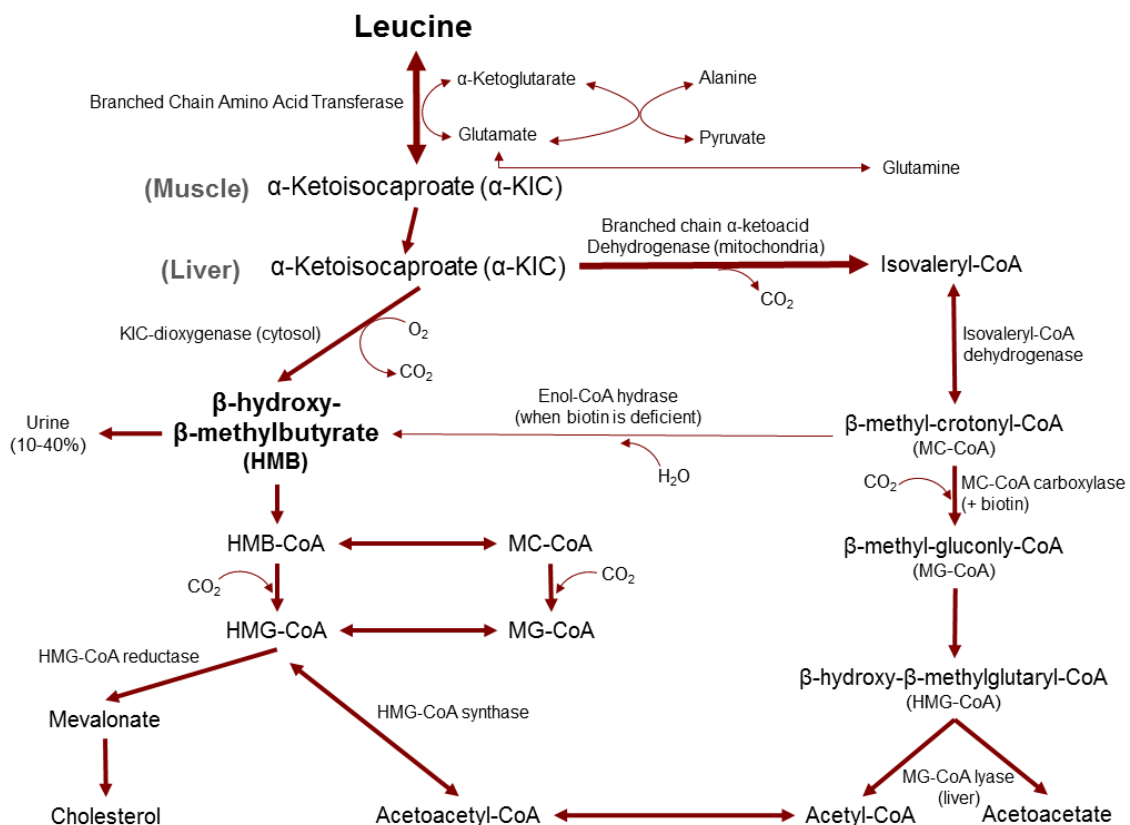
Efeitos diretos do HMB inibindo proteólise (~80%) e elevando a síntese protéica (~20%) foram evidenciados em secções de músculo esquelético de ratos e frangos, incubadas com várias concentrações do HMB (10). Outro estudo de Nissen et al. (3) demonstrou que indivíduos submetidos a treinamento por meio de exercício de força e HMB apresentaram redução de 20% na concentração de 3 metil histidina (3-MH) na urina e de 20 a 60% na concentração e atividade de enzimas que são indicadores plasmáticos de proteólise/dano muscular, como a creatina quinase.

Estudos mais recentes mostraram que a suplementação de HMB (11), associada à caquexia, produz um efeito atenuante sobre a degradação 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 arginina e glutamina, vem sendo utilizado na clínica (6, 12), observou-se ainda efeitos positivos da associação de HMB, arginina e lisina sobre parâmetros funcionais e ganho de massa muscular em idosos (7). O conjunto desses dados indica, portanto, que o HMB, por diminuir a proteólise e/ou estimular a síntese protéica, pode prevenir ou reduzir o dano muscular consequente a estados de disfunção metabólica em que há grande perda de peso ou ao trabalho muscular intenso.

Esse metabólito da leucina é gerado quando esta sofre transaminação reversível em α -KIC, processo que ocorre, principalmente, em tecidos extra-hepáticos (13). O α -KIC pode, então, seguir dois caminhos. No primeiro, ocorre a conversão em HMB por uma reação enzimática no citossol, em que atua a KIC dioxigenase (14), enzima citossólica que difere da

forma mitocondrial, a KIC desidrogenase (14, 15). Essa via de formação de HMB é direta e depende da KIC dioxigenase do fígado. No citossol o HMB é primeiro convertido para beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), sendo então destinado para síntese de colesterol (16) (Fig.1). Na outra via, o α -KIC, no fígado, gera isovaleril-CoA, por meio de uma reação enzimática em que atua a α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (branched-chain ketoacid dehydrogenase - BCKD), seguindo-se uma série de reações nas quais é gerada HMG-CoA por meio da enzima HMG-CoA-sintase. No entanto em condições normais, a maioria do α -KIC é metabolizado em HMB que, no fígado, é convertido à HMG-CoA, que é direcionado à biossíntese de colesterol. Acredita-se que essa conversão à colesterol possa ser eficaz para reparação rápida das células musculares danificadas (Fig. 3).

Figura 1-Síntese e metabolismo do HMB.



Fonte: (Zanchi et al., 2003) (17).

A produção endógena de HMB é pequena. Um indivíduo de 70 kg produz cerca de 0,2 - 0,4 g de HMB/dia, a partir do teor de leucina da dieta. Apesar de o fígado ser o principal sítio de produção de HMB, por apresentar maior atividade da dioxigenase, estudos

com homogeneizados e perfusatos também indicam que o músculo e outros tecidos produzem HMB, embora em baixas quantidades (10).

O HMB ainda se encontra presente em alimentos, tais como, frutas cítricas, alguns peixes e no leite materno (3). 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 de força/musculação, para indivíduos sob extremo estresse muscular, na velhice, ou ainda por portadores de doenças associadas a síndromes de perda muscular, como o câncer (18).

1.1 Turnover protéico muscular

Sabe-se que a musculatura esquelética possui características distintas quanto a sua composição e função. Alguns músculos, como o sóleo (SOL), expressam predominantemente a isoforma I da cadeia pesada da miosina (MHC-I), que apresenta baixa atividade ATPásica, o que lhes confere menor velocidade de contração, e elevada expressão de mioglobina e enzimas mitocondriais, o que lhes confere elevada capacidade oxidativa (19). Essas características fazem com que o SOL seja considerado um músculo de contração lenta e oxidativo. Outros músculos, como o extensor digital longo (EDL), expressam mais a MHC-II, isoforma que apresenta elevada atividade ATPásica, o que lhes confere maior velocidade de contração, e enzimas da via glicolítica; por outro lado apresentam baixa expressão de mioglobina e de enzimas oxidativas, bem como poucas mitocôndrias (19), razões pelas quais são conhecidos como músculos de contração rápida e glicolíticos. Ainda há músculos que expressam MHCII e enzimas oxidativas, sendo conhecidos como músculos de contração rápida e oxidativos (19).

Considerando essas variabilidades, a visão do balanço entre síntese e degradação controlando o *turnover* proteico que é colocada na literatura de forma genérica, torna-se simplista, pois os diferentes tipos de músculos certamente respondem aos diversos desafios com relação ao *turnover* protéico de maneira distinta.

Nesse sentido, Li e Goldberg (20)¹ mostraram que a privação de nutrientes é menos deletéria para os músculos lentos, como o sóleo (SOL) do que para os rápidos, como o EDL.

¹ 20 *apud* Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS J. 2013 Mar 21. doi: 10.1111/febs.12253.

Essa diferença possivelmente ocorreria devido a sensibilidade distinta entre os músculos (SOL menos sensível) frente ao cortisol, hormônio que induz degradação protéica (21)².

Estudos em ratos demonstraram que o tratamento com corticosteróide, por 11 dias, promoveu atrofia em fibras 2B e 2X (fibras rápidas e glicolíticas), sem repercussões sobre fibras 2A, rápidas e oxidativas, e fibra I, lenta e oxidativa (22), o que demonstra que esse modelo de proteólise foi capaz de induzir a degradação proteica de maneira distinta, e de forma mais proeminente sobre as fibras rápidas. Ainda, estudos de Goldberg utilizando modelos de hipertrofia em sóleo de ratos hipofisectomizados identificaram diminuição da degradação proteica, bem como aumento da síntese proteica, e quando os mesmos animais eram tratados com Hormônio do Crescimento (GH) observaram aumento da taxa de síntese protéica sem qualquer alteração sobre a taxa de degradação protéica (23)³.

Assim, estudos apontam que músculos lentos e rápidos diferem quanto as suas taxas de síntese e degradação protéica e que os diferentes modelos, sejam de indução da síntese proteica ou de degradação proteica, atingem os diferentes tipos de músculos de maneira distinta.

1.2 Controle traducional da síntese protéica

Alterações no conteúdo protéico muscular resultam de um desequilíbrio entre os processos de síntese e degradação protéica. Os processos de síntese de proteínas compreendem etapas que vão da transcrição gênica à tradução do mRNA, sendo esse último um passo fundamental e complexo que se divide em três etapas: a) iniciação, na qual o metionil-tRNA iniciador (met-tRNAⁱ - RNA transportador contendo o primeiro aminoácido, Metionina, da cadeia polipeptídica a ser formada) e o mRNA são ligados às subunidades ribossomais 40S e 60S; b) alongamento, o passo no qual os aminoácidos são incorporados à cadeia peptídica nascente; e c) término, quando o peptídeo completo é liberado do ribossomo. Esses processos dependem de proteínas conhecidas como fatores de iniciação eucarióticos (eIFs), fatores de alongamento e fatores de liberação (24, 25).

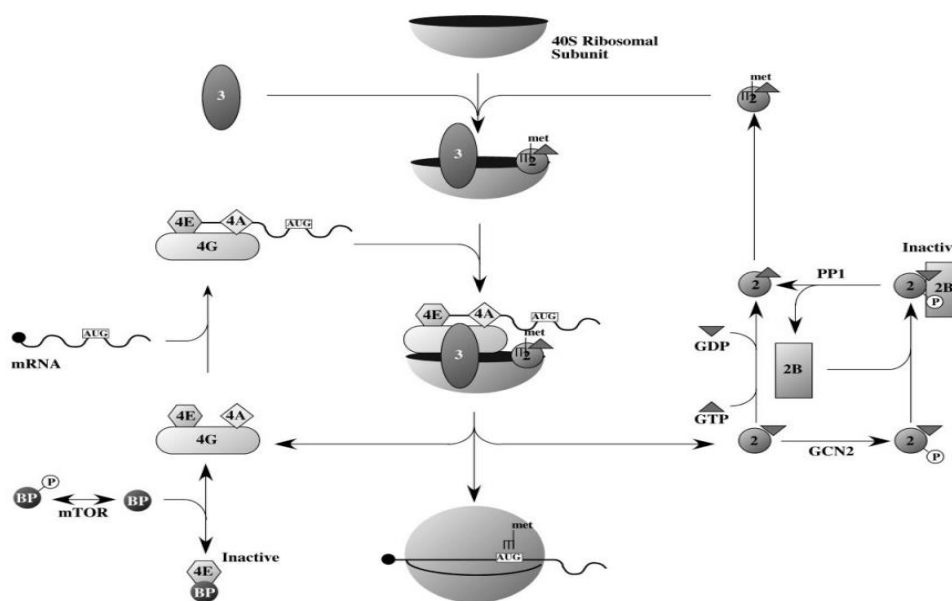
A tradução é um processo que envolve a interação de pelo menos 12 fatores de iniciação, met-tRNAⁱ, mRNA, subunidades ribossomais e nucleotídeos ATP e GTP (24). Dos passos descritos dois são reguladas de forma importante. No primeiro a ligação do met-tRNAⁱ à subunidade ribossomal 40S é mediada pelo eIF2 e regulada por modificações na

² 21 *apud* Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS J. 2013 Mar 21. doi: 10.1111/febs.12253.

³ 23 *apud* Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS J. 2013 Mar 21. doi: 10.1111/febs.12253.

atividade de troca de guanina-nucleotídeo da eIF2B. A segunda etapa regulatória ocorre ligação do mRNA à subunidade 40S envolvendo a proteína eIF4. Lembrando que o grau de fosforilação de fatores como eIF4E, eIF4G e 4E-BP1 controlam os passos da iniciação (24).

Figura 2-Ilustração das fases de iniciação da tradução.



A figura ilustra os passos da iniciação da tradução que envolvem a ligação de metionil-tRNAi (met) e mRNA na subunidade 40S dos ribossomos. Os fatores de iniciação de tradução que participam nas fases individuais são descritos como formas geométricas diferentes e são marcadas com um número ou letra e com base na identidade do fator. Por exemplo, o fator de iniciação eucariótico (eIF) eIF4E é descrito como um hexágono com o rótulo 4E no centro da forma. Além disso, a regulação da atividade eIF2B por fosforilação da subunidade alfa da eIF2 e o sequestro de eIF4E por eIF4E *binding protein-1* (4E-BP1) estão ilustradas. mTOR, *mammalian target of rapamycin*; AUG, (adenosina, uridina, guanosina); GCN2, controle geral da não repressão, eIF2 α , *protein kinase 2*. Fonte: (Kimball et al., 2002) (25).

Demonstrou-se que, em ratos diabéticos ocorre uma redução na taxa de síntese protéica muscular em consequência da diminuição da iniciação da tradução. Provavelmente isso ocorre devido a uma diminuição na atividade da eIF2B, bem como a inibição da ligação do mRNA ao complexo de iniciação 43S, pela menor fosforilação da 4E-BP1, com diminuição da disponibilidade de eIF4E ativa; esse processo é revertido totalmente com o tratamento de insulina, que restabeleceu os valores da taxa de tradução próximos aos do

grupo controle (25). Sabe-se que a administração de aminoácidos, hormônios e o treinamento de força acionam vias de sinalização que ativam os fatores de iniciação da tradução, gerando um aumento na taxa de síntese protéica (25). Assim, possíveis alterações sobre esse fino processo podem levar a um aumento na taxa de síntese proteica, resultando em uma hipertrofia, ou até a uma redução nessa taxa, gerando uma atrofia muscular.

O conteúdo protéico muscular pode ainda ser alterado por meio de ativação/inativação de vias envolvidas na proteólise, na qual se encontram envolvidos três mecanismos, que a seguir descreveremos sucintamente.

1.3 Vias de degradação protéica

1.3.1 Sistema lisossomal

O sistema lisossomal foi o primeiro sistema proteolítico descoberto e contribui de forma importante para a proteólise em diversos processos. Sabe-se que ele é parte do sistema endocítico da célula responsável pela degradação de proteínas. Seu interior apresenta uma acidez elevada (pH~4,5) e diversas enzimas digestivas, responsáveis por digerir proteínas extracelulares e de membrana endocitada. No músculo, várias proteases lisossomais são expressas, como as catepsinas B, H, L e D (24). Corroborando esses dados, Lowell e colaboradores (26) em um estudo clássico com músculos de ratos jejados por 24 h e incubados com inibidores de proteases lisossomais, não observaram qualquer alteração na proteólise total, sugerindo assim que essa via teria pouca ou nenhuma participação no processo proteolítico muscular.

1.3.2 Proteases ativadas por cálcio

Este sistema depende da ação de cisteína-proteases ativadas por cálcio, denominadas calpaínas (27). Existem ao menos seis isoformas delas no músculo esquelético, sendo duas as principais: a microcalpaína (μ -calpaína) e a milicalpaína (m-calpaína) (28), que, embora possuam duas subunidades e várias propriedades similares, são produtos de genes distintos. A diferença entre estas isoformas está relacionada à concentração e afinidade dos íons cálcio necessárias para a sua ativação. Esta denominação faz referência à concentração de cálcio necessária para sua ativação.

No entanto, essas isoformas precisam se tornar ativas para exercerem seus efeitos. Essa ativação é modulada pela sensibilidade das calpaínas ao cálcio citossólico (29),

processo esse chamado de autoproteolítico. Importante ressaltar que as células possuem um inibidor endógeno dessa protease, que é a calpastatina (30, 31).

Estudo com desuso de 10 dias em animais que superexpressam o gene da calpastatina mostrou uma redução na perda da massa muscular do sóleo de apenas aproximadamente 30% (28), o que indica que as calpaínas não se mostraram eficientes em degradar todas as classes de proteínas sarcoméricas (31), demonstrando a importância de outros mecanismos proteolíticos nesse processo.

1.3.3 Sistema ubiquitina-proteassoma

Sabe-se que esse é o principal mecanismo envolvido na quebra de proteínas miofibrilares (32). Demonstrou-se que em modelos de inibição desse sistema frente a condições de proteólise, tais como desnervação e sepse, ocorreu atenuação desse quadro, caracterizando assim a importância desse mecanismo no estado de proteólise muscular intenso (33).

Esse sistema envolve a participação de um complexo enzimático citossólico chamado proteassoma, composto de duas subunidades regulatórias (19S) e uma catalítica (20S), que é ativado na presença de ATP, diferentemente dos outros processos proteolíticos (34).

Os substratos protéicos destinados à degradação pelo proteassoma são marcados por um componente de 76 aminoácidos, chamado ubiquitina (35). As ubiquitinas E1, conhecidas como ativadoras, e a E2, chamadas de conjugadoras, têm a função de preparar esse complexo, enquanto a E3 (chamadas ub-ligases), enzima chave desse sistema, identifica a proteína destinada ao complexo proteolítico proteassoma (35, 36). Importante ressaltar que existe apenas uma proteína E1, algumas E2 e cerca de milhares de E3. No entanto, essas últimas conferem especificidade ao complexo (36) e se mostram importantes no processo de atrofia muscular; entre essas estão a: atrogin-1 (MAFbx), MuRF-1 e E3 α (37, 38).

Sabe-se que o sistema ubiquitina-proteassoma não é capaz de hidrolisar as proteínas miofibrilares de maneira direta, necessitando da mediação da caspase-3, (30), a qual cliva essas proteínas em peptídeos menores (~14kDa), sendo assim possível serem destinadas ao proteassoma (39).

O sistema ubiquitina-proteassoma também está relacionado à degradação de uma série de proteínas anormais que sofreram, dentre outras coisas, mutações, oxidações e desnaturações (34).

Em paralelo aos mecanismos que induzem proteólise muscular, há mecanismos envolvidos com o aumento de síntese protéica. Dentre esses fatores vamos destacar o IGF-I.

1.4 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 (40), por meio do aumento da replicação de células satélites, consequentemente, do número de mionúcleos, evidenciado pelo aumento do conteúdo total de DNA (41). Estudos em ratos com inativação tecido-específica do receptor do IGF-I prejudicou o crescimento muscular e reduziu o número e tamanho das fibras, bem como a função muscular (42).

Estudos *in vitro* em miotubos em modelo de hipertrofia induzida por IGF-I mostraram ser o efeito hipertrófico dependente da via da PI3K/Akt, e da subsequente ativação da via da mTOR (43), proteína essa capaz de ser ativada pelo aminoácido leucina (44) do qual o HMB é um metabolito. A ativação dessa via é importante para os processos de iniciação de tradução, assim como para a p70s6k e a 4E-BP1, citadas anteriormente. Sabe-se ainda, que um importante inibidor seletivo da via da mTOR, a rapamicina, mostrou-se eficaz em bloquear os mecanismos de síntese proteica, em modelos de indução de aumento da síntese (38).

Ainda, a administração desse fator de crescimento em animais jejuados provocou redução da expressão dos atrogênes, como atrogin-1 e MuRF1, relacionadas à proteólise. O efeito do IGF-I em atenuar a expressão desses genes também foi observado em modelos *in vitro* de indução proteólise (45). Portanto, além dos seus efeitos sobre vias específicas relacionadas ao aumento da síntese protéica, o IGF-I exerce um importante papel sobre a inibição da proteólise por ser capaz de ativar Akt e esta ser capaz de reter a Foxo1 e 3 no citossol, impedindo que esta migre para o núcleo e ative a transcrição de genes relacionados a proteólise, como atrogin-1 e MuRF1 (46).

Estudos com camundongos desnervados que superexpressam IGF-I muscular mostraram redução (~30%) na atrofia muscular quando comparados com os controles (47);

ainda, verificou-se que a administração desse fator de crescimento em animais desnervados atenuou a proteólise mantendo a capacidade funcional contrátil (48).

No entanto, estudos de Yakar et al. (49) identificaram, por meio de uma deleção específica do gene do IGF-I hepático em camundongos, que estes apresentavam uma redução nos níveis séricos de IGF-I em comparação aos controles, sem que fossem observadas alterações no seu crescimento e desenvolvimento, mostrando assim que esse fator de crescimento exerce seus maiores efeitos sobre o controle da síntese protéica quando produzido localmente.

1.5 HMB e metabolismo protéico muscular

Resultados de estudos desenvolvidos no nosso laboratório demonstraram que ratos tratados com HMB, por 30 dias, apresentam aumento da atividade do eixo somatotrófico, caracterizado por aumento da expressão gênica e protéica de GH na hipófise, da expressão hepática de mRNA de IGF-I, e da sua concentração sérica, sendo os últimos dois parâmetros reconhecidamente apontados como dependentes do aumento da secreção de GH (50). A relação do HMB com o eixo somatotrófico também foi observada por Tatara et al. (51) que tratou porcas durante a gestação com HMB e observou que a prole apresentou aumento da atividade deste eixo.

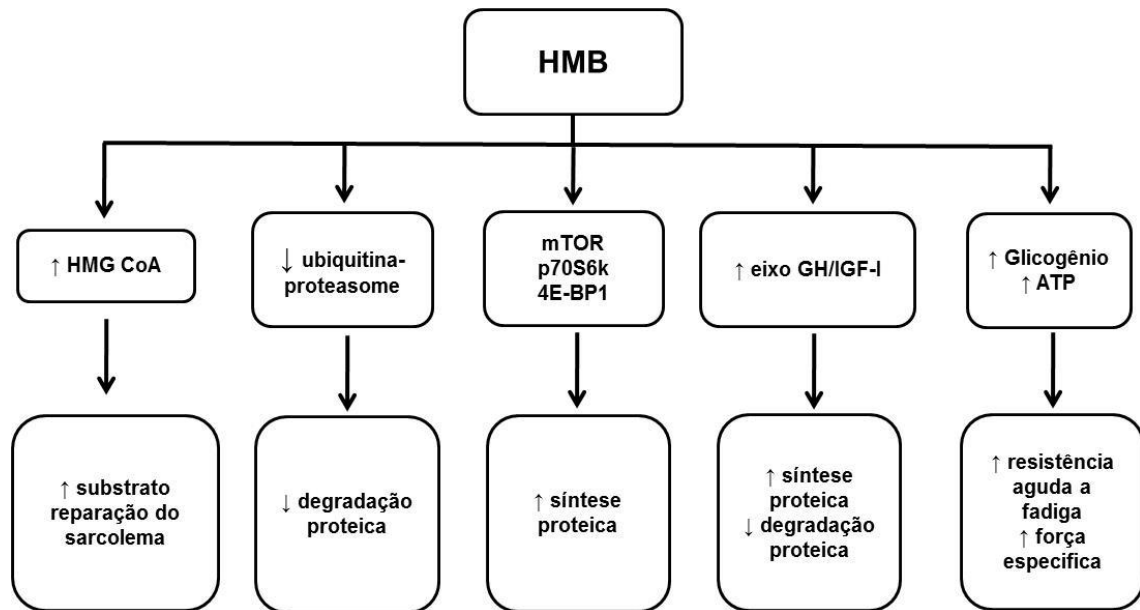
Estudos com indução de proteólise em miotubos tratados com HMB mostraram a eficiência desse metabólito em atenuar o aumento da expressão de atrogenes, bem como em ativar a síntese proteica via PI3k/Akt (7). Outros estudos, em que foram utilizados animais intactos e com sepse, a fim de induzir proteólise, evidenciaram um efeito do HMB de atenuação sobre a proteólise em comparação com os animais intactos, via sistema ubiquitina-proteassoma, sem que efeitos sobre a síntese fossem detectados. Esses efeitos foram encontrados somente no músculo sóleo (52). O tratamento crônico com esse suplemento promoveu uma atenuação da redução do tamanho das células musculares que ocorre em função da idade, em jovens adultos e idosos, bem como do aumento da expressão dos atrogenes (53). Recentes estudos evidenciaram uma melhora no quadro de perda de massa muscular em idosos acamados tratados com HMB, bem como na reabilitação muscular dos mesmos (54).

Em suma, há evidências de que esse metabólito age sistemicamente, bem como diretamente sobre a musculatura esquelética, exercendo seus efeitos anabólicos e anticatabólicos sobre o metabolismo protéico.

Essas ações poderiam envolver a redução da atividade do sistema ubiquitina-proteasoma, responsável pela degradação de proteínas (53, 55, 56); ou ainda uma a

ativação de vias intracelulares específicas, como mTOR e fosforilação da p70S6k e 4EBP1, aumentando a síntese e inibindo a degradação protéica (11, 56, 57), efeitos que poderiam ser melhor caracterizados em modelo experimental de jejum alimentar, onde intensa proteólise é evidenciada nas primeiras 24 horas.

Figura 3-Resumo das ações descritas para o HMB.



Fonte: Adaptado de Hermano et al. 2013 (58).

REFERÊNCIAS⁶

1. Hider RC, Fern EB, London DR. Relationship between intracellular amino acids and protein synthesis in the extensor digitorum longus muscle of rats. *The Biochemical Journal*. 1969;114(2):171-8.
2. Nissen S. Measurement of muscle proteolysis and the impact on muscle wasting. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 1997;56(2):793-9.
3. Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher Ja, Rice D, Fuller JC, et al. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1996;81(5):2095-104.
4. Slater GJ, Jenkins D. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation and the promotion of muscle growth and strength. *Sports Medicine (Auckland, NZ)*. 2000;30(2):105-16.
5. Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009;47(1):255-9.
6. Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan FA, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Jpen-Parenter Enter*. 2000;24(3):133-9.
7. Fuller JC, Baier S, Flakoll P, Nissen SL, Abumrad NN, Rathmacher Ja. Vitamin D status affects strength gains in older adults supplemented with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine, and lysine: a cohort study. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2011;35(6):757-62.

⁶ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

8. Kraemer WJ, Hatfield DL, Volek JS, Fragala MS, Vingren JL, Anderson JM, et al. Effects of amino acids supplement on physiological adaptations to resistance training. *Medicine and science in sports and exercise*. 2009;41(5):1111-21.
9. Wilson JM, Kim JS, Lee SR, Rathmacher JA, Dalmau B, Kingsley JD, et al. Acute and timing effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on indirect markers of skeletal muscle damage. *Nutr Metab (Lond)*. 2009;6:6.
10. Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1997;8(6):300-11.
11. Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. 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*. 2007;293(4):E923-31.
12. May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *American journal of surgery*. 2002;183(4):471-9.
13. Block KP, Buse MG. Glucocorticoid regulation of muscle branched-chain amino acid metabolism. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(3):316-24.
14. Sabourin PJ, Bieber LL. Formation of beta-hydroxyisovalerate by an alpha-ketoisocaproate oxygenase in human liver. *Metabolism: clinical and experimental*. 1983;32(2):160-4.
15. Sabourin PJ, Bieber LL. Subcellular distribution and partial characterization of an alpha-ketoisocaproate oxidase of rat liver: formation of beta-hydroxyisovaleric acid. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1981;206(1):132-44.
16. Rudney H. The biosynthesis of beta-hydroxy-beta-methylglutaric acid. *J Biol Chem*. 1957;227(1):363-77. Epub 1957/07/01.

17. Zanchi NE, Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, de Siqueira Filho MA, Felitti V, Lira FS, et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. *Amino acids*. 2011;40(4):1015-25.
18. Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer research*. 2005;65(1):277-83.
19. dos Santos RA, Giannocco G, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2001;11(6):545-50.
20. Li JB, Goldberg AL. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *The American journal of physiology*. 1976;231(2):441-8.
21. Goldberg AL, Goodman HM. Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. *J Physiol*. 1969;200(3):667-75. Epub 1969/02/01.
22. Verheul AJ, Mantilla CB, Zhan WZ, Bernal M, Dekhuijzen PN, Sieck GC. Influence of corticosteroids on myonuclear domain size in the rat diaphragm muscle. *J Appl Physiol*. 2004;97(5):1715-22.
23. Goldberg AL. Protein turnover in skeletal muscle. I. Protein catabolism during work-induced hypertrophy and growth induced with growth hormone. *J Biol Chem*. 1969;244(12):3217-22.
24. Anderson M, Capen C. The Endocrine System. In: Benirschke K, Garner FM, Jones TC, editors. *Pathology of Laboratory Animals*: Springer New York; 1978. p. 423-508.
25. Kimball SR, Farrell Pa, Jefferson LS. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2002;93(3):1168-80.

26. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Biochem J.* 1986;234(1):237-40.
27. Croall DE, DeMartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 1991;71(3):813-47.
28. Tidball JG, Spencer MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J Physiol.* 2002;545(Pt 3):819-28.
29. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 1994;8(11):814-22.
30. Du J, Hu Z, Mitch WE. Molecular mechanisms activating muscle protein degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions. *European journal of clinical investigation.* 2005;35(3):157-63.
31. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008;86(14 Suppl):E19-35.
32. Whitehouse aS, Tisdale MJ. Downregulation of ubiquitin-dependent proteolysis by eicosapentaenoic acid in acute starvation. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001;285(3):598-602.
33. Tawa NE, Jr., Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest.* 1997;100(1):197-203.
34. Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001;4(3):183-90. Epub 2001/08/23.
35. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell death and differentiation.* 2005;12(9):1178-90.

36. Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(10):2088-97.
37. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr.* 1999;129(1S Suppl):227S-37S.
38. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
39. Wing SS, Banville D. 14-kDa ubiquitin-conjugating enzyme: structure of the rat gene and regulation upon fasting and by insulin. *The American journal of physiology.* 1994;267(1 Pt 1):E39-48.
40. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine reviews.* 2001;22(1):53-74.
41. Fiorotto ML, Schwartz RJ, Delaughter MC. Persistent IGF-I overexpression in skeletal muscle transiently enhances DNA accretion and growth. *FASEB J.* 2003;17(1):59-60.
42. Mavalli MD, DiGirolamo DJ, Fan Y, Riddle RC, Campbell KS, van Groen T, et al. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(11):4007-20.
43. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1009-13.
44. Li F, Yin Y, Tan B, Kong X, Wu G. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids.* 2011;41(5):1185-93.
45. Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, et al. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogen-1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology.* 2004;145(11):4806-12.

46. Favier FB, Benoit H, Freyssenet D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch.* 2008;456(3):587-600.
47. Shavlakadze T, White JD, Davies M, Hoh JF, Grounds MD. Insulin-like growth factor I slows the rate of denervation induced skeletal muscle atrophy. *Neuromuscular disorders : NMD.* 2005;15(2):139-46.
48. Day CS, Buranapanitkit B, Riano FA, Tomaino MM, Somogyi G, Sotereanos DG, et al. Insulin growth factor-1 decreases muscle atrophy following denervation. *Microsurgery.* 2002;22(4):144-51.
49. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7324-9.
50. Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, Giannocco G, Nunes MT. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society.* 2011;21(2):57-62.
51. Tatara MR, 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.* 2007;40(6):1615-22.
52. Kovarik M, Muthny T, Sispera L, Holecek M. Effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate treatment in different types of skeletal muscle of intact and septic rats. *Journal of physiology and biochemistry.* 2010;66(4):311-9.
53. Wilson JM, Grant SC, Lee S-R, Masad IS, Park Y-M, Henning PC, et al. Beta-hydroxy-beta-methyl-butyrate blunts negative age-related changes in body composition, functionality and myofiber dimensions in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2012;9(1):18-.

54. Deutz NE, Pereira SL, Hays NP, Oliver JS, Edens NK, Evans CM, et al. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on lean body mass during 10 days of bed rest in older adults. *Clin Nutr.* 2013.
55. Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer research.* 2004;64(23):8731-5.
56. Aversa Z, Alamdari N, Castellero E, Muscaritoli M, Rossi Fanelli F, Hasselgren P-O. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012;423(4):739-43.
57. 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. *Biochimica et Biophysica acta.* 2009;1793(5):755-63.
58. Bagchi D, Nair S, Sen C. An Overview on beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) Supplementation in Skeletal Muscle Function and Sports Performance. In: Pinheiro CHJ, Curi R, Guimarães-Ferreira L, Gerlinger-Romero F, editors. *Nutrition and Enhanced Sports Performance.* 1st ed 2013.
59. Farrell PA, Fedele MJ, Hernandez J, Fluckey JD, John L, Iii M, et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise exercise synthesis with acute exercise in rats Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. 2011:1075-82.
60. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
62. Harcourt LJ, Holmes AG, Gregorevic P, Schertzer JD, Stupka N, Plant DR, et al. Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. *The American Journal of Pathology.* 2005;166(4):1131-41.

63. Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, de Souza-Jr AL, Vitzel KF, Nachbar RT, et al. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2011.
64. da Justa Pinheiro CH, de Queiroz JC, Guimaraes-Ferreira L, Vitzel KF, Nachbar RT, de Sousa LG, et al. Local Injections of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammation and Increase Angiogenesis Ameliorating the Dystrophic Phenotype in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle. *Stem Cell Rev*. 2011.
65. Pinheiro CH, Vitzel KF, Curi R. Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. *Scand J Med Sci Sports*. 2012;22(1):24-33.
66. Bassit RA, Pinheiro CH, Vitzel KF, Sproesser AJ, Silveira LR, Curi R. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *Eur J Appl Physiol*. 2010;108(5):945-55.
67. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal*. 2013.
68. Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *J Cell Physiol*. 2002;191(3):283-9.
69. Lang CH, Pruznak A, Navaratnarajah M, Rankine KA, Deiter G, Magne H, et al. Chronic alpha-hydroxyisocaproic acid treatment improves muscle recovery after immobilization-induced atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013.
70. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004;18(1):39-51.
71. Kraemer WJ, Hatfield DL, Volek JS, Fragala MS, Vingren JL, Anderson JM, et al. Effects of amino acids supplement on physiological adaptations to resistance training. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(5):1111-21.

72. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* 2007;6(6):472-83.
73. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology.* 2005;146(3):1473-81.
74. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med.* 2007;13(6):252-9.
75. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 2004;14(3):395-403.
76. Bouskila M, Hirshman MF, Jensen J, Goodyear LJ, Sakamoto K. Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(1):E28-35.
77. Pinheiro CHDJ, Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, de Souza-Jr AL, Vitzel KF, Nachbar RT, et al. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology.* 2012;112(7):2531-7.