CAIO YOGI YONAMINE

A suplementação crônica com beta hidroxí beta metilbutirato (HMB) reduz a sensibilidade à insulina de ratos de modo tecido-específico.

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

São Paulo
2013

CAIO YOGI YONAMINE

A suplementação crônica com beta hidroxí beta metilbutirato (HMB) reduz a sensibilidade à insulina de ratos de modo tecido-específico.

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. 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

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Yonamine, Caio Yogi.

A suplementação crônica com beta hidroxí beta metilbutirato (HMB) reduz a sensibilidade à insulina de ratos de modo tecido-específico / Caio Yogi Yonamine. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Laboratório de Fisiologia Endócrina: regulação hormonal da expressão gênica.

Versão do título para o inglês: Chronic supplementation of beta hydroxy beta methylbutyrate (HMB) reduces insulin sensitivity of rats in tissue-specific manner.

1. Insulina 2. Hormônio do crescimento 3. Suplementação alimentar
I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programada de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB030/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caio Yogi Yonamine.

Título da Dissertação: A suplementação crônica com beta hidroxí beta metilbutirato (HMB) reduz a sensibilidade à insulina de ratos de modo tecido-específico.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **93** nas fls. **106** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Tereza Nunes**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Bases moleculares dos efeitos do beta hidroxí beta metilbutirato sobre o metabolismo protéico na musculatura esquelética de ratos alimentado e jejuados*" do qual participam o(s) alunos **Frederico Gerlinger Romero, Lucas Guimaraes, Rafael Salgueiro, Carlos Flores, Caio Yogi Yonamine**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **15.07.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de julho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família e colegas/amigos que me acompanharam e incentivaram durante mais uma etapa de minha formação.

AGRADECIMENTOS

Sou muitíssimo grato à minha orientadora, a profa. Dra. Maria Tereza Nunes, que abriu as portas de seu laboratório, possibilitando o cumprimento de uma etapa importante de minha formação. Admiro-a pela sua dedicação e paixão pela pesquisa e ensino, bem como pela sua preocupação e carinho comigo e os demais alunos.

Agradeço ao prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado e à prof. Dra. Dânia que permitiram a utilização dos seus laboratórios para realização de parte dos experimentos.

Agradeço aos meus pais (Sr. Nelson e Sra. Milene), pelo apoio, incentivo e o fornecimento de uma vida muito confortável, que são fatores importantíssimos para a realização de meus estudos. Agradeço também a companhia do Neil e da Bia, que também me incentivam a sempre ir adiante.

Agradeço a todos os meus colegas e também amigos (as) do laboratório pela convivência ímpar e descontraída. Ao Fred, que teve a paciência em me auxiliar e dar conselhos nos momentos de dúvida e dificuldades, desde a IC; ao Croffi em seus auxílios técnico-computacionais; à Silvania e ao Carlos Flores pela colaboração e vontade em me ajudar nos experimentos; à Carol em me ajudar na parte de formatação da dissertação, e a todos os demais, em igualdade.

Sou muito grato e admiro a Lho por sua vontade e responsabilidade em ensinar a todos a maneira correta e segura da rotina dentro do laboratório.

Também devo agradecimento a toda a equipe da biblioteca pela excelente orientação nos procedimentos burocráticos para o depósito da dissertação, e em especial à Mônica pela revisão técnica da mesma.

Agradeço ao CNPQ e à FAPESP pelo importante auxílio financeiro dado para a realização dos experimentos de laboratório.

Por fim, peço desculpas caso tenha me esquecido de agradecer mais alguém.

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.

George Bernard Shaw

RESUMO

Yonamine CY. A suplementação crônica com beta hidroxibetametilbutirato (HMB) reduz a sensibilidade à insulina de ratos de modo tecido-específico. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O beta hidroxibetametilbutirato (HMB), metabólito derivado do aminoácido leucina, está entre os suplementos mais populares utilizados por atletas, praticantes de atividade física e na prática médica com o objetivo de reduzir a degradação e/ou aumentar a síntese proteica. Entretanto, trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo demonstraram que ratos submetidos à suplementação crônica deste metabólito apresentaram aumento da insulinemia, com manutenção da glicemia dentro da faixa de normalidade, sugerindo um quadro de resistência à ação da insulina (RI). Em paralelo observou-se um aumento da síntese e secreção de GH e da concentração plasmática de IGF-I, sugerindo um possível envolvimento do eixo somatotrófico nessas alterações. O presente estudo teve o objetivo de confirmar se a suplementação crônica (28 dias) com HMB promove RI em ratos, e caracterizar os possíveis mecanismos envolvidos. Observamos nestes animais uma menor taxa de decaimento de glicose, bem como aumento da concentração plasmática de insulina e da relação da área sob a curva (AUC) insulina/glicose ao longo do tempo, em resposta a sobrecarga de glicose (teste de tolerância à glicose - GTT), confirmando a RI. Após estímulo insulínico (10U), detectou-se redução significativa da atividade da via de sinalização deste hormônio no fígado (redução da fosforilação em tirosina dos receptores de insulina - pTyr IR e, em serina, da AKT - pSer AKT) e no músculo sóleo, diretamente pela redução do conteúdo de pSer AKT. No músculo EDL e no tecido adiposo periepídimal (TAB) não foram detectadas alterações significativas na via de sinalização da insulina. Em ambos os músculos, observamos redução no conteúdo de GLUT4 total e na membrana plasmática, sem alteração significativa da translocação. Nenhuma alteração significativa foi detectada no GLUT4 no TAB. Considerando que o GH exerce efeitos diabetogênicos, que são bastante proeminentes no fígado, investigamos nesse tecido a expressão das proteínas pSTAT5 e SOCS3, envolvidas na sua via de sinalização. Não observamos alterações significativas neste parâmetro. Adicionalmente, detectamos um aumento no conteúdo do mRNA e da proteína lipase hormônio sensível (LHS) no TAB, em paralelo ao aumento da concentração de ácidos graxos livres (AGL) plasmáticos, o que sugere uma estimulação da lipólise, processo que é ativado pelo GH, e que pode contribuir para a RI. Por meio da análise da área de secção transversa (AST) das fibras dos músculos esqueléticos observamos uma redução da AST no músculo sóleo, sem que alterações tenham ocorrido no músculo EDL, após a suplementação com HMB. Com base nos resultados obtidos, concluímos que a suplementação crônica com HMB compromete as vias de sinalização da insulina, levando a redução de sua sensibilidade nos tecidos periféricos (fígado e músculos esqueléticos). Sugerimos que o GH esteja envolvido, pelo menos em parte, nessas alterações.

Palavras-chave: HMB. Insulina. Hormônio do crescimento. Ácidos graxos livres.

ABSTRACT

Yonamine CY. Chronic supplementation of beta hydroxy beta methylbutyrate (HMB) reduces insulin sensitivity of rats in tissue-specific manner. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

HMB is a metabolite of leucine, which has been described as a potential substance able to increase protein synthesis and/or reduce protein degradation. However, studies carried out in our laboratory have shown that HMB-supplemented rats although normoglycemic, exhibited hyperinsulinemia, suggesting an insulin resistance status. In parallel, it was observed an increased activity of the GH-IGF-I axis, reinforcing the possibility of alterations on glucose sensitivity, since GH is recognized as being diabetogenic. The present study aimed to verify if HMB supplementation induces insulin resistance and characterize the possible mechanisms involved. The results demonstrate that HMB-supplemented rats present reduced glucose decay rate, increased plasma insulin levels and area under curve (AUC) insulinemia/glycemia ratio in response to glucose overload (glucose tolerance test – GTT), confirming the insulin resistance status. After insulin overload (10 U), it was detected a significant reduction on insulin signaling on liver (reduced pTyr IR and pSer AKT content) and soleus muscle (reduced pSer AKT content). On EDL and white adipose tissue (WAT), no differences were observed on insulin signaling pathway. In both skeletal muscle, it was detected a reduction on total and plasma membrane GLUT4 content, without alterations on GLUT4 translocation. In WAT, no significant alterations were observed on GLUT4 protein. Regarding that GH diabetogenic effects are prominent on liver, we investigated the expression of pTyr STAT5 and SOCS3, which are proteins related to GH signaling pathway. No significant alterations were detected on these parameters. In addition, in WAT, it was detected an increase on hormone sensitive lipase (HSL) mRNA and protein content, and plasma non-esterified fatty acids (NEFA) concentration, suggesting a stimulus on lipolysis. This process is activated by GH and could contribute to insulin resistance status. The fiber cross sectional area (CSA) of soleus skeletal muscle was shown to be reduced after HMB supplementation. This was not observed on EDL muscle. Based on the present results, we conclude that HMB supplementation impairs insulin signaling on peripheral tissues (liver and skeletal muscle), characterizing an insulin resistance status. We suggest that GH could be responsible, in part, for the alterations observed.

Keywords: HMB. Insulin. growth hormone. NEFA. CSA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do Beta Hidroxi Beta Metilbutirato (HMB).....	15
Figura 2 - Representação simplificada das etapas de metabolização do aminoácido leucina.....	16
Figura 3 - Esquema simplificado da via de sinalização da insulina envolvida na etapa descrita acima.	19
Figura 4 - Mecanismo de ação do GH via JAK/STAT.....	20
Figura 5 - Teste de tolerância à glicose (GTT).	32
Figura 6 - Avaliação do conteúdo de pTyr IR no fígado.	34
Figura 7 - Conteúdo total de IR no fígado.	35
Figura 8 - Conteúdo de pTyr IR no músculo sóleo.	36
Figura 9 - Conteúdo de pTyr IR no músculo EDL.....	37
Figura 10 - Conteúdo de pTyr IR no TAB.....	38
Figura 11 - Conteúdo de pTyr IRS no músculo sóleo.....	39
Figura 12 - Conteúdo de pTyr IRS no músculo EDL.	40
Figura 13 - Conteúdo de pSer AKT no fígado.	41
Figura 14 - Conteúdo de pSer AKT no músculo sóleo.	42
Figura 15 - Conteúdo de pSer AKT no músculo EDL.....	43
Figura 16 - Conteúdo de pSer AKT no TAB.	44
Figura 17 - Avaliação da proteína GLUT4 no músculo sóleo.	45
Figura 18 - Avaliação da proteína GLUT4 no músculo EDL.....	46
Figura 19 - Avaliação da proteína GLUT4 no TAB.	47
Figura 20 - Conteúdo total de PEPCK no fígado.....	48
Figura 21 - Distribuição de frequências da área de secção transversa dos músculos sóleo e EDL.....	49
Figura 22 - Área de Secção Transversa (AST).....	50
Figura 23 - Conteúdo total de pTyr STAT5 no fígado.....	51
Figura 24 - Conteúdo total de SOCS3 no fígado.	52
Figura 25 - Avaliação de mRNA e proteína da lipase hormônio sensível no TAB e da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) no plasma.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Beta Hidroxi Beta Metilbutirato (HMB)	15
1.2 Insulina	17
1.3 Eixo GH – IGFI	20
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais	23
3.2 Grupos experimentais	23
3.2.1 Grupo controle	23
3.2.2 Grupo HMB	23
3.3 Sacrifício	23
3.4 Procedimentos	24
3.4.1 Determinações plasmáticas	24
3.4.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)	24
3.4.3 Avaliação do grau de fosforilação de proteínas da via de sinalização da insulina (IR, IRS e AKT) e da translocação de GLUT4	24
3.4.4 Via de sinalização da insulina	24
3.4.5 Taxa de translocação de GLUT4	25
3.4.6 Avaliação da expressão da proteína fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), STAT5 fosforilada e SOCS3 no fígado	27
3.4.7 Área de secção transversa das fibras dos músculos sóleo e extensor digitorum longus (EDL)	28
3.4.8 Avaliação da expressão do mRNA e da proteína lipase hormônio sensível (LHS)	28
- mRNA	28
- Proteína	30
3.4.9 Análise da concentração de ácidos graxos livres no plasma (AGL)	30
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)	32
5.2 Vias de sinalização da insulina	33
5.2.1 Grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (pTyr IR)	34

5.2.2 Grau de fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (pTyr IRS).....	38
5.2.3 Grau de fosforilação em serina da AKT (pSer AKT).....	41
5.3 Conteúdo total e taxa de translocação do GLUT4.....	45
5.4 Avaliação da expressão da proteína fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no fígado	47
5.5 Análise da área de secção transversa (AST) dos músculos sóleo e EDL	49
5.6 Avaliação da fosforilação da STAT5 (pTyr STAT5) e expressão proteica da SOCS3 no fígado	50
5.7 Avaliação da expressão de mRNA e da proteína lipase hormônio sensível (LHS) e da concentração de ácidos graxos livres no plasma (AGL)	53
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A promoção de suplementos alimentares através dos diversos meios de divulgação tem aumentado ao longo dos últimos anos, o que vem fazendo com que a sua utilização venha se tornando cada vez mais popular. As empresas neste setor investem bilhões de dólares anualmente sem ter um conhecimento aprofundado dos efeitos da utilização de seus produtos sobre o organismo; estes ainda vêm sendo anunciados como estratégia para obtenção de perda de peso ou ganhos de massa muscular, o que atrai diversos tipos de consumidores (Palisin, Stacy, 2005).

Nesta condição, inserem-se os atletas de alto rendimento, que sempre estão na busca de novas estratégias visando melhorar o desempenho (Portal et al., 2010) e indivíduos comuns (Nissen et al., 1996), que investem quantias monetárias consideráveis na aquisição de suplementos na busca de um corpo perfeito direcionado por opiniões geradas pela sociedade em que estão inseridos (McCabe, Ricciardelli, 2001, 2005). Recentemente, diversos estudos na literatura buscam compreender os efeitos da utilização de suplementos no combate a severas perdas de massa muscular, associadas a patologias como câncer e sepse, bem como por indivíduos idosos que naturalmente apresentam um elevado grau de degradação proteica (Fitschen et al., 2012; Kovarik et al., 2010; Kuhls et al., 2007; Smith et al., 2005).

Justamente no intuito de obtenção de aumento de massa muscular ou redução da perda dela (Eley et al., 2007), bem como redução do percentual de gordura corporal, o Beta Hidroxi Beta Metilbutirato (HMB), um metabólito do aminoácido leucina é um composto que vem sendo utilizado pelos seguimentos populacionais descritos acima.

Em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, foram entrevistados 263 jogadores universitários de futebol americano e 16% relataram já ter feito uso do HMB, sendo considerado o sexto produto mais utilizado por esse perfil de consumidor e, somente nos Estados Unidos, a comercialização de HMB movimentou cerca de 50 milhões de dólares em 1998 (Slater, Jenkins, 2000).

Vale ressaltar que no Brasil a comercialização de HMB como um suplemento alimentar não é legalizada pela ANVISA, e tendo em vista a Resolução RDC n.18/2010 não há previsão de uso legalizado desta substância.

Os dados encontrados na literatura que demonstram os efeitos do HMB sobre o metabolismo de proteínas utilizam tamanho amostral relativamente pequeno, contribuindo para resultados controversos (Fitschen et al., 2012), bem como não estão bem descritos os efeitos do HMB, considerando o tempo de utilização, a dose administrada e a condição em que isto ocorre (Burke et al., 2009; Loud et al., 2003). Além disso, não há estudos na literatura sobre os efeitos da suplementação crônica com HMB no metabolismo de carboidratos.

Nesse sentido, estudos do nosso laboratório demonstraram que, após a suplementação crônica (28 dias) de HMB, os ratos apresentaram, concomitantemente, aumento da insulinemia e manutenção da glicemia dentro da faixa de normalidade, sugerindo que essa suplementação estaria induzindo uma resistência à ação da insulina (RI) (Gerlinger-Romero et al., 2011). Além disso, estes animais apresentaram aumento da atividade do eixo somatotrófico, visto que observamos um aumento da expressão gênica e proteica de hormônio do crescimento (GH) na hipófise, aumento da expressão gênica de IGF-I hepático e aumento da concentração plasmática de IGF-I (Gerlinger-Romero et al., 2011). Tatara et al. (2007, 2008) também observaram que a suplementação crônica com HMB em porcas prenhas ativa o eixo somatotrófico da prole, o mesmo ocorrendo em ovelhas sob essa suplementação no período pós-natal. Tais efeitos poderiam explicar a indução da síntese proteica promovida por esse composto, descrita em diversos estudos (Jówko et al., 2001; Nissen et al., 1996), bem como a redução do percentual de gordura, visto que o GH possui evidentes efeitos lipolíticos (Fain et al., 1999; Fain et al., 2008).

Sabe-se que alguns aminoácidos, mais especificamente a arginina e a leucina, induzem a secreção de GH e insulina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, respectivamente (de Castro Barbosa et al., 2006; Manninen, 2006), e que esses eventos a longo prazo, podem estar associados a um quadro de RI.

Assim, sabe-se que o GH interage com receptores de citocinas, levando a ativação da via da JAK/STAT (Lanning, Carter-Su, 2006), e dessa maneira, o GH aumenta a expressão de STAT5 e SOCS3 (Davey et al., 1999), sendo que esta última interage com proteínas da via de sinalização da insulina, regulando negativamente de diversas maneiras a ação da insulina. Detalhes a respeito da interação entre a via do GH e da insulina serão discutidas mais adiante.

Em suma, o **objetivo** do presente estudo foi confirmar a RI induzida pela suplementação crônica com HMB, e determinar os possíveis mecanismos envolvidos, incluindo a participação do GH nesse efeito. Adicionalmente, avaliamos o efeito da suplementação com HMB em parâmetros relacionados com a lipólise e morfologia da massa muscular esquelética, buscando uma associação destes com a possível RI.

Considerando que nosso estudo envolve as ações do HMB e suas possíveis relações com a insulina e GH, passaremos a descrever aspectos gerais dos mesmos.

1.1 Beta Hidroxi Beta Metilbutirato (HMB)

O Beta Hidroxi Beta Metilbutirato (HMB) é derivado exclusivamente da metabolização de um aminoácido essencial, a leucina, com isso, sua produção endógena é proporcional à quantia ingerida deste aminoácido por meio da dieta. A fórmula química molecular do HMB é $C_5H_{10}O_3$ e sua fórmula estrutural está representada na Figura 1, a seguir.

Figura 1 - Fórmula estrutural do Beta Hidroxi Beta Metilbutirato (HMB).

A leucina sofre primeiramente uma transaminação reversível, sendo convertida a α -cetoisocaproato (KIC) em tecidos extra-hepáticos, principalmente nos músculos esqueléticos pela ação da uma enzima conhecida como BCAA aminotransferase. O KIC formado nos músculos segue por meio da circulação sanguínea e adentra o fígado. Em condições normais aproximadamente 5% do KIC sofre ação, no fígado, da KIC dioxigenase, gerando o HMB. No citosol, o HMB é convertido a Beta Hidroxi Beta Metilglutaril-CoA (HMG-CoA) que está diretamente relacionada à biossíntese de colesterol. Os restantes 95% do KIC são convertidos à isovaleril-CoA, na mitocôndria, devido à ação da desidrogenase cetoácido de cadeia

ramificada (BCKD), enzima expressa no fígado e em outros tecidos (Zanchi et al., 2011). Ao final desta reação é formado acetil-CoA e acetoacetato. Vale ressaltar que cerca de 10-40% do HMB produzido é excretado por meio da urina. O esquema a seguir ilustra o processo brevemente descrito acima (Figura 2).

Figura 2 - Representação simplificada das etapas de metabolização do aminoácido leucina.

Fonte: Zanchi et al., 2011.

A leucina possui efeitos tanto em aumentar a síntese proteica (Haegens et al., 2012) quanto em reduzir a degradação proteica (Baptista et al., 2010). Estudos mostram que a utilização de inibidores da transaminação da leucina foi capaz de abolir os seus efeitos sobre a redução da degradação proteica, sugerindo que o HMB seja o responsável por esse efeito (Sabourin, Bieber, 1981).

Um indivíduo adulto com massa corporal de aproximadamente 70 kg produz aproximadamente 0,2 a 0,4 gramas de HMB diariamente, quantia esta insuficiente para que o HMB exerça seus efeitos de promoção de redução da proteólise e aumento de síntese proteica descritos na literatura, visto que a maioria dos estudos em humanos encontram tais efeitos em doses equivalentes ou superiores a 3 gramas de HMB por dia (Nissen et al., 1996; Panton et al., 2000).

Ao longo das últimas duas décadas, diversos estudos mostraram efeitos benéficos da suplementação com diferentes dosagens de HMB associada a várias situações de severa perda de massa muscular, como no envelhecimento (Wilson et al., 2012) ou patologias como AIDS e câncer (Clark et al., 2000; Smith et al., 2005). No entanto, ainda existem dados controversos na literatura a respeito da eficácia da suplementação com HMB, bem como da sua utilização crônica sobre o metabolismo (Fitschen et al., 2012), inclusive mostrando que a utilização de HMB em ratas idosas não foi eficaz em promover aumento do diâmetro da fibra muscular e de sua função (Kim et al., 2012).

Ressaltamos que, até o momento, a maior parte das ações descritas do HMB está relacionada ao metabolismo proteico, e que o nosso grupo é o primeiro a relatar efeitos dele no metabolismo dos carboidratos, o que evidencia a importância do presente estudo.

1.2 Insulina

A insulina é um hormônio peptídico, de aproximadamente 5,7 KDa, produzido e secretado pelas células β pancreáticas, sendo um importante regulador do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Magkos et al., 2010). Fisiologicamente, a insulina tem sua secreção aumentada em resposta ao aumento da concentração de glicose na corrente sanguínea (glicemia), durante o período absorptivo. Assim, a principal ação da insulina é permitir a captação, armazenamento

e utilização de glicose pelos tecidos periféricos, como fígado, músculos estriados e tecido adiposo branco (Pessin, Saltiel, 2000), normalizando os níveis glicêmicos.

O mecanismo de ação da insulina inicia-se com a interação deste hormônio com seu receptor de membrana do tipo tirosina cinase (IR), o que leva à sua ativação, por meio da sua fosforilação em tirosina, provocando o recrutamento e fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS 1-6) (Pirola et al., 2004). Na sequência, duas vias de sinalização distintas são ativadas: Ras-mitogen-activated-protein-kinase (MAPK) e PI3K/AKT.

A ativação da primeira leva fundamentalmente a expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação e crescimento celular, onde podemos salientar o seu papel anabólico sobre a musculatura esquelética promovendo a síntese e a inibição da degradação proteica, permitindo sua manutenção estrutural (González-Sánchez, Serrano-Ríos, 2007). Há evidências de que esta via também tenha alguma participação no controle do metabolismo energético, visto que, a JNK, proteína desta via de sinalização, por meio da ativação da proteína p90rsk, pode ativar a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) (Gehart et al., 2010).

A segunda está relacionada principalmente com o controle do metabolismo energético mediado pela insulina, que ocorre por meio da ativação da PI3K, que consequentemente ativa a PDK-1 (proteína cinase 1 dependente de fosfoinosítídeos), que por sua vez fosforila a AKT em treonina/serina, ativando-a. A AKT está diretamente envolvida com a captação de glicose por meio da ativação do substrato da AKT de 160 kDa (AS160), permitindo a translocação da isoforma 4 dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática e subsequente captação da glicose nos músculos estriados e tecido adiposo (Taniguchi et al., 2006). Segue esquema representativo desta última etapa (Figura 3).

Figura 3 - Esquema simplificado da via de sinalização da insulina envolvida na etapa descrita acima.

Fonte: Modificado de Schaan et al. (2005).

Nos músculos estriados a insulina também promove a glicogênese, por ativar a glicogênio sintetase, enzima responsável pela síntese de glicogênio.

No fígado, a insulina provoca a estimulação da atividade/expressão da hexocinase, o que leva à criação de um gradiente que permite o influxo de glicose do LEC para os hepatócitos, bem como da glicogênio sintetase (Pessin, Saltiel, 2000). Promove também, a inibição da atividade/expressão da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), enzima-chave da gliconeogênese, reduzindo a conversão de piruvato, lactato, aminoácidos e glicerol em glicose (Tsatsoulis et al., 2012), bem como reduz a glicogenólise. Com isso, a insulina aumenta a captação de glicose pelo fígado e reduz a sua liberação para a circulação sanguínea, contribuindo para a manutenção da glicemia.

Do ponto de vista molecular, sabe-se que alterações na via de sinalização da insulina levam ao quadro de RI, comprometendo as ações da insulina descritas acima (Pessin, Saltiel, 2000). Exemplificando, o IR e os IRS podem ser inativados por fosfatases de tirosina (PTP1B), fosforilação em serina ou algum ligante inibitório que dificulta a interação entre eles, como a SOCS 1 e 3 (Dominici et al., 2005; Taniguchi et al., 2006). As alterações da via de sinalização da insulina podem ocorrer também diretamente em etapas posteriores, como mostram os estudos de Tonks et al. (2013) em músculo de pacientes diabéticos, onde se detectou redução da ativação da AKT.

Estas são algumas das alterações nos mecanismos de ativação de proteínas da via de sinalização IR/PI3K/AKT, que poderiam estar alteradas nos animais suplementados com HMB.

1.3 Eixo GH – IGF-I

O hormônio do crescimento (GH) é uma proteína de aproximadamente 22 KDa, produzida e secretada de maneira pulsátil pelos somatotrofos em resposta ao GHRH hipotalâmico. Sua secreção também é controlada pela somatostatina, secretada pelo hipotálamo, que a inibe (Perrini et al., 2010). O GH promove o crescimento, como o próprio nome sugere (Herrington, Carter-Su, 2001), bem como participa do controle do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Ray et al., 2012).

Parte das ações do GH sobre o crescimento ocorre, indiretamente, devido à produção do fator de crescimento semelhante à insulina, o IGF-I (insulin-like growth factor 1). Este processo ocorre principalmente no fígado e, em menor escala, nos tecidos periféricos, como músculos esqueléticos, onde exerce ações similares à insulina, de forma autócrina e parácrina (Perrini et al., 2010). O IGF-I é transportado na circulação sanguínea ligado às proteínas conhecidas como IGFBP (insulin growth factor binding protein), principalmente a IGFBP-3, o que justifica a maior meia-vida do IGF-I em relação à insulina (Clemmons, 2012).

O GH interage com receptores pertencentes à superfamília dos receptores de citocinas, o que leva a fosforilação em tirosina da JAK2 (*janus kinase 2*), e consequente fosforilação, dimerização e ativação das STAT 1/3/5a (signal transducers and activator transcription). Uma vez ativas, as STATs migram para o interior do núcleo, onde promovem a expressão das SOCS (supressors of cytokine signaling) (Rawlings et al., 2004) (Figura 4). Além disso, sabe-se que existe um *cross-talk* entre as vias de sinalização discutidas até então, especialmente entre a JAK/STAT e PI3K/AKT, o que poderia contribuir com as ações diabetogênicas do GH, sendo este um possível mecanismo pelo qual a suplementação crônica com HMB pode resultar no desenvolvimento de RI.

Figura 4 - Mecanismo de ação do GH via JAK/STAT.

Fonte: Modificado de Rawlings et al. (2004).

2 OBJETIVOS

No presente estudo pretendemos confirmar e caracterizar as bases moleculares envolvidas na possível resistência insulínica induzida pela suplementação crônica de HMB, por meio da (o): (a) teste de tolerância à glicose (GTT); (b) avaliação da via de sinalização da insulina, em resposta a sua administração, em tecidos como músculo esquelético, adiposo branco e fígado; (c) taxa de translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, no músculo esquelético e tecido adiposo; (d) avaliação de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização do GH, que interferem com a via de sinalização da insulina; (e) avaliação de parâmetros relacionados com a lipólise e morfologia da massa muscular esquelética.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (200-250 g) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, onde foram mantidos em condições padronizadas de temperatura ambiental (25 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias). A água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais

3.2.1 Grupo controle

Foi constituído de animais que receberam salina 0,9% como veículo (1 ml), via sonda intragástrica (gavagem), por 28 d consecutivos, sempre às 14 h.

3.2.2 Grupo HMB

Foi constituído de ratos que receberam suplementação de HMB (320 mg/Kg de peso corporal) (Gerlinger-Romero et al., 2011) dissolvido em 1 ml de salina 0,9%, via sonda intragástrica (gavagem), por 28 d consecutivos, sempre às 14 h.

3.3 Sacrifício

Os animais foram submetidos à restrição alimentar 4 h antes do sacrifício por decapitação, realizado sempre às 10 h, para minimizar os efeitos de possíveis variações circadianas e do estado nutricional nos parâmetros avaliados entre os animais.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Determinações plasmáticas

Foram dosados: (a) Insulina, por radioimunoensaio (DPC Medlab Produtos Médico Hospitalares, São Paulo, S.P., Brasil) e (b) Glicose pelo método colorimétrico (kit colorimétrico – LABORLAB), seguindo as instruções dos fornecedores.

3.4.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Após o período de restrição alimentar de 4 h, uma parcela dos animais foi anestesiada com tiopental, na dose de 6 mg/kg e submetida ao Teste de Tolerância a Glicose (GTT), quando tiveram a veia jugular direita exposta e canulada. A cânula foi imobilizada e, por meio desta, foi injetada uma solução de glicose (0,75 g/kg peso corpóreo), conforme Campello et al. (2012). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos: 0 (basal), 4, 8, 16 e 30 min após a sobrecarga de glicose. As amostras foram mantidas a 4 °C em tubos contendo heparina, impedindo a coagulação das amostras, até a centrifugação a 2.000 rpm, a 4 °C por 10 min para a obtenção do plasma. O plasma foi armazenado a -20 °C para dosagem de glicose, utilizando-se um kit colorimétrico (kit colorimétrico – LABORLAB) e analisado por meio de um espectrofotômetro UV, e insulina (Radioimunoensaio – RIE).

3.4.3 Avaliação do grau de fosforilação de proteínas da via de sinalização da insulina (IR, IRS e AKT) e da translocação de GLUT4

3.4.4 Via de sinalização da insulina

Para avaliação do grau de fosforilação do IR; IRS e AKT, os animais foram submetidos a 4 h de restrição alimentar. Os músculos esqueléticos sóleo e EDL, fígado e tecido adiposo branco periepídídimo foram removidos antes e após a administração intravenosa de insulina (10 U), em tempos previamente determinados (30 s para o fígado e 90 s para o tecido adiposo e músculos esqueléticos) e homogeneizados em tampão quente (96 °C) contendo Trizma base 100 mM pH 7,5;

EDTA 10 mM; SDS 10%; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 10 mM; ortovanadato de sódio 10 mM, conforme descrito por de Castro Barbosa et al. (2009). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.400 g por 40 min a 4 °C. Foi determinado o conteúdo proteico do sobrenadante, e as amostras, contendo 60 µg de proteína cada, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas (*Western blotting*) a uma membrana de nitrocelulose, que, após bloqueio com solução contendo 5% de albumina, foi incubada com anticorpo primário, diluído em solução contendo 2,5% de albumina, contra as proteínas de interesse, que no caso foram: anti-fosfotirosina (1:200; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, M.A., USA); anti pSer AKT (1:1.000; Cell Signaling Technology Inc.); anti-IR total (1:500; Cell Signaling Technology Inc.). Em seguida foram realizadas as lavagens (6X/5 min cada) das membranas com PBS+Tween 1X, para que o excesso de anticorpo primário fosse removido e, em seguida, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário específico, diluído em uma proporção de 1:5.000 em solução contendo 2,5% de albumina. Após duas horas de incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi novamente lavada com PBS+Tween 1X, adicionando-se, a seguir, solução de ECL contendo Tris 1M pH 8,5; luminol; ácido pecumárico e peróxido de hidrogênio durante 2 minutos. A intensidade do sinal correspondente aos *blots* foi expressa em unidades arbitrárias (U.A.) e a normalização foi feita por meio da análise densitométrica das bandas obtidas após a coloração das membranas com Ponceau, etapa esta que foi realizada anteriormente a incubação com solução de bloqueio.

3.4.5 Taxa de translocação de GLUT4

Para avaliar a taxa de translocação do GLUT4 os músculos esqueléticos sóleo e EDL foram removidos e homogeneizados em tampão específico, contendo 10 mM Trizma; 1 mM EDTA e 250 mM sacarose, na proporção 1:6. A etapa de homogeneização foi realizada utilizando-se um Polytron a 25.000 rpm durante 30 segundos. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 760 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante obtido (S1) foi separado e o pellet foi ressuspenso em 1/3 do volume inicial de tampão; seguiu-se nova centrifugação, igual à anterior, e o sobrenadante (S2) formado nesta última foi misturado com o S1. A amostra obtida (S1 + S2) foi submetida a uma centrifugação a 31.000 g por 60 min a 4 °C, sendo que o pellet

resultante foi ressuspensionado em aproximadamente 300-500 µl de tampão. Esta amostra representa a fração de membrana plasmática (MP). Após esta centrifugação, o sobrenadante foi separado e submetido a uma ultracentrifugação a 190.000 g por 60 min a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o pellet formado foi ressuspensionado em 300 µl de tampão. Esta amostra representa a fração microssomal (M). Após determinação do conteúdo de proteínas presentes nas mesmas, seguiu-se a eletroforese em gel (10%) de poliacrilamida, transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, incubação da mesma com solução de bloqueio contendo 5% de albumina, seguido de incubação com anticorpo anti-GLUT4 (1:5.000; Cell Signaling Technology Inc.) diluído em solução contendo 2,5% de albumina, e posterior incubação com o anticorpo secundário apropriado, também diluído em solução contendo 2,5% de albumina. A somatória das frações MP e M foram consideradas como sendo a quantidade total de GLUT4, e a fração MP corresponde ao conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática. O conteúdo de proteína em cada fração foi avaliado por meio da intensidade do sinal obtido nos *blots*, e foi expresso em U.A., conforme especificado, e a normalização dos dados foi realizada por meio da análise densitométrica das bandas obtidas após a coloração das membranas com Ponceau, etapa que ocorreu anteriormente à incubação com solução de bloqueio contendo 5% de albumina, conforme mencionado anteriormente. A taxa de translocação de GLUT4 para a membrana plasmática foi calculado da seguinte forma:

$$100 \times \text{MP} / \text{MP} + \text{M}.$$

Para avaliar a taxa de translocação do GLUT4 do tecido adiposo branco, este foi removido, homogeneizado em tampão específico, contendo 10 mM Trizma; 1 mM EDTA e 250 mM sacarose, na proporção 1:4. A etapa de homogeneização foi realizada utilizando-se um Polytron a 20.000 rpm durante 30 s. Seguiu-se uma centrifugação a 1.000 g por 15 min a 4 °C; o sobrenadante (fat cake) foi descartado e a porção infranadante foi colhida, utilizando-se uma pipeta Pasteur. Parte do sobrenadante, aproximadamente 1 ml, foi separada para a avaliação do conteúdo total de proteínas, enquanto que o restante foi submetido a uma nova etapa de centrifugação a 12.000 g por 15 min a 4 °C. O pellet formado nesta etapa representa uma fração rica em membrana plasmática (MP). O sobrenadante foi submetido a

uma nova centrifugação a 28.000 g por 15 min a 4 °C, sendo que o pellet formado nesta etapa foi descartado, e o sobrenadante foi separado e submetido a uma ultracentrifugação a 146.000 g por 75 min, a 4 °C. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em 300 µl de tampão. Esta amostra representa a fração microssomal (M). Após determinação do conteúdo de proteínas presentes nas mesmas, seguiu-se a eletroforese em gel (10%) de poliacrilamida, transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, incubação da mesma com solução de bloqueio contendo 5% de albumina, seguido de anticorpo anti-GLUT4 (1:5.000; Cell Signaling Technology Inc.) diluído em solução contendo 2,5% de albumina, seguida de incubação com o anticorpo secundário apropriado, também diluído em solução contendo 2,5% de albumina. A somatória das frações MP e M foram consideradas como sendo a quantidade total de GLUT4, e a fração MP corresponde ao conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática. A quantidade de proteína em cada fração foi avaliada por meio da intensidade do sinal obtido nos *blots*, e foi expressa em U.A., conforme especificado, a normalização foi realizada utilizando-se a própria membrana, corada com Ponceau anteriormente a etapa de incubação com solução de bloqueio contendo 5% de albumina, conforme mencionado anteriormente. A taxa de translocação de GLUT4 para a membrana plasmática foi calculado da seguinte forma:

$$100 \times \text{MP} / (\text{MP} + \text{M}).$$

3.4.6 Avaliação da expressão da proteína fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), STAT5 fosforilada e SOCS3 no fígado

Para a avaliação da expressão dessas proteínas por *western blotting*, procedeu-se conforme descrito por de Castro Barbosa et al. (2009). Foram utilizados os anticorpos primários contra a PEPCK (1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), pTyr (694), STAT5 (1:1.000; Cell Signaling Technology Inc.) e SOCS3 (1:1.000; Abcam ab16030), e anticorpo secundário apropriado, diluído na proporção de 1:5.000, todos diluídos em solução contendo 2,5% de albumina. A intensidade do sinal correspondente aos *blots* foi expressa em U.A. e a normalização foi feita por meio da análise densitométrica das bandas obtidas após a coloração das

membranas com Ponceau, etapa esta que foi realizada anteriormente a incubação com solução de bloqueio.

3.4.7 Área de secção transversa das fibras dos músculos sóleo e extensor digitorum longus (EDL)

Os músculos sóleo e EDL foram removidos dos animais e, logo em seguida, mergulhados em tiopentano durante 20 s e estocados à -80 °C. Na etapa seguinte, foram realizados cortes transversais (12 µm de espessura), sempre na região mediana do ventre muscular utilizando um criostato (Frigocut 2800N – Leica, Wetzlar, Germany). Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em uma estufa a 37 °C por 1 h, para que os cortes fossem fixados a lâmina corretamente. Após este período de fixação, as lâminas foram armazenadas à -80 °C. Os cortes foram corados com Eosina e Hematoxilina conforme descrito por Harcourt et al. (2005). As imagens foram capturadas utilizando um microscópio Aristoplan com uma objetiva de cinco vezes de aumento, acoplada a uma câmera (Spot model 1.3.0; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA), controlada por um programa computacional (Spot Diagnostic Software, Michigan, USA). As imagens digitalizadas foram analisadas, em duplo-cego, utilizando-se o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Inc., Rockville, M.D., USA).

3.4.8 Avaliação da expressão do mRNA e da proteína lipase hormônio sensível (LHS)

- mRNA

A análise da expressão do mRNA de LHS foi feita por *Real Time* PCR. Primeiramente, aproximadamente 0,4 g de tecido adiposo branco periepididimal foi utilizado para a extração de RNA total. A integridade do RNA extraído foi confirmada pela verificação, por eletroforese, do padrão do RNA ribossomal da 28S e 18S em gel de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta. Em seguida foi feita a reação de transcrição reversa, para obtenção de um híbrido mRNA:ssDNA, a partir de 2 µg do RNA total de cada amostra, com volume total de reação de 20 µl. Foram adicionados: oligo dT (100 µg/mL); 10 mM de cada dNTP; 5X First-Strand buffer e 1

μl de enzima (200 U/μl) M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin, USA). A reação de transcrição reversa foi realizada mantendo as amostras a 65 °C por 10 min, seguido de 42 °C por 60 min e 95 °C por 10 min. Os produtos gerados foram estocados a -20 °C até o momento de sua utilização na reação de Real Time PCR. Posteriormente, 1μl de produto da reação de transcriptase foi utilizado em 10 μl de reação de Real Time PCR contendo 200 nM de cada par de *primers* designados para os genes HLS e RPL-19, sendo esta última utilizada como controle endógeno.

Primers utilizados para a reação:

HLS:

sense: 5'TTTCCACCCACGGCGCTCAA 3'

Antisense: 5' TCCAGAGCGCACGCCACAAG 3'

RPL-19:

sense: 5'CCAATGAAACCAACGAAATCG3'

Antisense: 5'TCAGGCCATCTTTGATCAGCT3'

A reação de PCR em tempo real foi realizada em aparelho Quiagen (Corbett Research, Sydney, Australia) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 5 min, e 45 repetições de um ciclo de 95 °C por 20 s, 60 °C por 1 min, 72 °C por 15 s. O ponto inicial do ciclo (CT) do *real-time* RT-PCR é avaliado em duplicata para cada amostra. Os valores de CT correspondem ao número do ciclo do PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto do RT-PCR amplificado do gene alvo e são inversamente proporcionais ao conteúdo de mRNA da amostra. O valor da variação de CT (Δ CT) é calculado subtraindo-se o valor do CT dos genes de interesse do valor do CT do gene usado como controle interno. Para verificar a igualdade na quantidade de RNA total entre as amostras, todas elas são normalizadas pela média da variação do valor de CT (Δ CT) dos animais controle, originando um valor chamado de $\Delta\Delta$ CT. A expressão relativa dos genes de interesse é calculada usando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ e são representadas em unidades arbitrárias (Livak, Schmittgen, 2001).

- Proteína

Amostras do tecido adiposo periepididimal foram removidas logo após o sacrifício dos animais. Para a realização da extração de proteínas totais, aproximadamente 0,05–0,3 g de tecido foi homogeneizado em 1 ml de tampão contendo: 100 mM Trizma, pH 7.5; 10 mM EDTA; 1% SDS; 10 mM pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio; 10 mM ortovanadato de sódio; 2 mM MPSF e 0,25 mg aprotinina. Para a homogeneização do tecido foi utilizado o Polytron a 25.000 rpm durante 30 s. O homogeneizado obtido foi incubado com 10% de Triton X-100 durante 30 min e, em seguida, centrifugado a 13.400 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e sua concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California, USA). O *Western blotting* foi feito utilizando-se anticorpo anti-HLS, conforme especificações do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, C.A., USA); como constitutiva foi utilizado GAPDH, na concentração especificada pelo fabricante (Santa Cruz Biotechnology, C.A., USA). Na sequência, as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário específico. A detecção dos *blots* foi feito por ECL e para a análise foi utilizado Scion Image software (ScionCorp, Frederick, M.D., USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.).

3.4.9 Análise da concentração de ácidos graxos livres no plasma (AGL)

Primeiramente foi pipetado 1 ml de tampão fosfato em cada tubo. Em seguida, as amostras de plasma (50 e 100 µl) ou padrão foram pipetadas em duplicata. Foi adicionado, em cada tubo, 6 ml de uma solução extratora (CHM), incluindo os padrões. Na sequência, os tubos foram agitados vigorosamente durante 10 min, seguidos de 15 min de repouso. A parte aquosa superior da solução foi aspirada por meio de uma bomba a vácuo. Após a aspiração, foi transferido 4 ml da fase inferior para outro tubo contendo 2 ml da solução Cooper, seguindo agitação durante 20 min. Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 20 min. Foi transferido 2 ml da parte superior para um tubo de leitura e acrescentado 0,5 ml de solução DPC. Após 15 min, foi realizada a leitura de cada amostra em 500 nm por meio de um espectrofotômetro (Chromý et al., 1977).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo teste *t-Student* não paramétrico, teste *t-Student* não pareado ou análise de variância (ANOVA) duas vias, com pós-teste Bonferroni, conforme a adequação da análise.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Os animais suplementados com HMB apresentaram uma maior elevação da glicemia (Fig. 5A), aumento da concentração plasmática de insulina (Fig. 5B) bem como da relação da AUC insulina/glicose ao longo do tempo, em resposta a sobrecarga de glicose (Figura 5C).

Figura 5 - Teste de tolerância à glicose (GTT).

C

Uma sobrecarga de glicose (0,75 g/kg peso corpóreo) foi administrada na veia jugular, e a concentração plasmática de glicose e insulina foram analisados entre o tempo zero, 4, 8, 16 e 30 min. Em A, temos o gráfico da variação da glicemia ao longo do tempo e o da área sob a curva da glicemia; B mostra o gráfico da variação da insulinemia ao longo do tempo, e o da área sob a curva da insulinemia e C mostra a relação entre área sob a curva da insulina/glicose (n=9).

5.2 Vias de sinalização da insulina

5.2.1 Grau de fosforilação em tirosina do receptor de insulina (pTyr IR)

Ao contrário do observado nos animais do grupo controle, o conteúdo de pTyr IR no fígado de ratos suplementados com HMB não foi alterado em resposta ao estímulo de insulina. Ainda, ele se apresentou reduzido significativamente em resposta ao estímulo de insulina, quando comparado ao grupo controle (Figura 6). Não foram observadas alterações no conteúdo total de IR (Figura 7).

Figura 6 - Avaliação do conteúdo de pTyr IR no fígado.

Animais do grupo controle e suplementado com HMB antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=9). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni e adotada significância de $p < 0.05$.

Figura 7 - Conteúdo total de IR no fígado.

Antes (barras em branco) e após (barras preenchidas) a suplementação com HMB ($p=0.37$). Foi utilizado teste t student não pareado ($n=9$).

Ambos os grupos, controle e suplementado com HMB, apresentaram aumento significativo de pTyr IR após estímulo de insulina, no músculo esquelético sóleo e no tecido adiposo branco periepídimal (TAB) (Figuras 8,9 e 10). Nestes tecidos não houve diferença na resposta à insulina entre os referidos grupos.

Figura 8 - Conteúdo de pTyr IR no músculo sóleo.

Animais do grupo controle e suplementado com HMB, antes (-) e após (+) a injeção intravenosa de insulina (n=9). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

Figura 9 - Conteúdo de pTyr IR no músculo EDL.

Animais do grupo controle e suplementado com HMB, antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=9). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

Figura 10 - Conteúdo de pTyr IR no TAB.

Animais do grupo controle e suplementado com HMB antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=4). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

5.2.2 Grau de fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (pTyr IRS)

Não foram detectadas respostas diferentemente significativas do conteúdo de pTyr IRS após estímulo com insulina entre os grupos controle e suplementado com HMB (Figura 11 e 12).

Figura 11 - Conteúdo de pTyr IRS no músculo sóleo.

p Tyr IRS

PONCEAU

Antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=9). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

Figura 12 - Conteúdo de pTyr IRS no músculo EDL.

Antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=9). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

5.2.3 Grau de fosforilação em serina da AKT (pSer AKT)

Encontramos uma redução no conteúdo de pSer AKT em resposta ao estímulo de insulina, no fígado e no músculo sóleo de animais suplementados com HMB vs. controle (Figuras 13 e 14). No músculo EDL e no TAB não foram detectadas alterações neste parâmetro (Figuras 15 e 16).

Figura 13 - Conteúdo de pSer AKT no fígado.

Antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=8). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

Figura 14 - Conteúdo de pSer AKT no músculo sóleo.

Antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=8). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

Figura 15 - Conteúdo de pSer AKT no músculo EDL.

Antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=6). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

Figura 16 - Conteúdo de pSer AKT no TAB.

Antes (-) e após (+) injeção intravenosa de insulina (n=5). Foi utilizado ANOVA duas vias, com pós-teste Bonferroni. A significância adotada foi $p < 0.05$.

5.3 Conteúdo total e taxa de translocação do GLUT4

A porcentagem de translocação de GLUT4 no músculo sóleo foi similar entre os grupos (Figura 17A), entretanto, o conteúdo total de GLUT4 diminuiu significativamente após a suplementação com HMB (Figura 17B). Dessa forma, o conteúdo absoluto de GLUT4 presente na membrana plasmática diminuiu no grupo suplementado com HMB em relação ao controle (Figura 17C).

Figura 17 - Avaliação da proteína GLUT4 no músculo sóleo.

(A) Porcentagem de GLUT4 translocado do citosol para a membrana plasmática ($p=0.26$); (B) Conteúdo total de GLUT4 ($p=0.02$) e (C) Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática ($p=0.02$), no músculo sóleo de animais do grupo controle e suplementado com HMB ($n=6$). Foi utilizado teste t student não pareado.

No músculo EDL de ratos suplementados com HMB (vs controle) não foi observada alteração da porcentagem de translocação de GLUT4 (Figura 18A), porém observou-se diminuição do conteúdo total de GLUT4 (Figura 18B), e na quantidade absoluta de GLUT4 na membrana plasmática (Figura 18C).

Figura 18 - Avaliação da proteína GLUT4 no músculo EDL.

(A) Porcentagem de GLUT4 translocado do citosol para a membrana plasmática (p=0.077); (B) Conteúdo total de GLUT4 (p=0.003) e (C) Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática (0.018), no músculo EDL de animais do grupo controle e suplementado com HMB (n=10). Foi utilizado teste t student não pareado.

No TAB não houve alterações significativas em nenhum parâmetro avaliado envolvendo a expressão proteica de GLUT4, incluindo porcentagem de translocação (Figura 19A), conteúdo total (Figura 19B) e quantidade absoluta na membrana plasmática (Figura 19C).

Figura 19 - Avaliação da proteína GLUT4 no TAB.

(A) Porcentagem de GLUT4 translocado do citosol para a membrana plasmática ($p=0.64$); (B) Conteúdo total de GLUT4 ($p=0.56$) e (C) Conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática ($p=0.34$), no TAB entre o grupo controle e suplementado com HMB ($n=10$). Foi utilizado teste t student não pareado ($n=10$).

5.4 Avaliação da expressão da proteína fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no fígado

No fígado, não houve alteração significativa da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) entre o grupo controle e suplementado com HMB (n=4).

Figura 20 - Conteúdo total de PEPCK no fígado.

Antes (barras em branco) e após (barras preenchidas) a suplementação com HMB (n=4). Foi utilizado teste t student não pareado ($p=0.15$).

5.5 Análise da área de secção transversa (AST) dos músculos sóleo e EDL

A análise da AST dos músculos sóleo e EDL demonstrou que a suplementação com HMB reduziu a AST ($p=0,06$) apenas no músculo sóleo (Figura 21).

Figura 21 - Distribuição de frequências da área de secção transversa dos músculos sóleo e EDL.

Imagens do músculo sóleo controle (A); do sóleo HMB (B); do EDL controle (C) e do EDL HMB (D) bem como o gráfico da AST de cada músculo (E), onde cada linha horizontal representa a média da área de todas as fibras do grupo e cada ponto ilustra cada fibra mensurada (n=4).

Figura 22 - Área de Secção Transversa (AST).

(A) músculo sóleo e (B) músculo EDL. Foi utilizado test t student não paramétrico. * $p=0.06$ ($n=4$).

5.6 Avaliação da fosforilação da STAT5 (pTyr STAT5) e expressão proteica da SOCS3 no fígado

O conteúdo de pTyr STAT5 não aumentou significativamente nos animais suplementados com HMB em comparação aos animais controle (n=8). A expressão de SOCS 3 não foi alterada significativamente entre os animais suplementados com HMB em comparação com os animais controle (n=9).

Figura 23 - Conteúdo total de pTyr STAT5 no fígado.

Antes (barras em branco) e após (barras preenchidas) a suplementação com HMB (n=8). Foi utilizado teste t student não pareado (p=0.27).

Figura 24 - Conteúdo total de SOCS3 no fígado.

Antes (barras em branco) e após (barras preenchidas) a suplementação com HMB (n=9). Foi utilizado teste t student não pareado ($p=0.84$).

5.7 Avaliação da expressão de mRNA e da proteína lipase hormônio sensível (LHS) e da concentração de ácidos graxos livres no plasma (AGL)

Conforme observado na Figura 25 (A e B), houve um aumento significativo tanto da expressão de mRNA quanto da proteína LHS após o suplementação com HMB, condição em que também se observou um aumento na concentração de ácidos graxos livres plasmáticos (Figura 25 C).

Figura 25 - Avaliação de mRNA e proteína da lipase hormônio sensível no TAB e da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) no plasma.

Expressão de mRNA (A), da proteína (B) lipase hormônio sensível (LHS) e concentração de ácidos graxos livres plasmáticos (C) dos animais do grupo controle e suplementado com HMB (n=6). Foi utilizado teste t student não pareado e adotada significância de $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a suplementação crônica com HMB promove, em ratos, aumento da concentração plasmática de insulina coexistindo com uma glicemia dentro da normalidade, dado indicativo de um quadro de resistência à ação da insulina (RI) (Gerlinger-Romero et al., 2011).

Os dados obtidos no presente estudo reforçam essas evidências, uma vez que no decorrer do teste de tolerância à glicose (GTT) os ratos suplementados com HMB se apresentaram intolerantes à glicose, mesmo na vigência de um aumento da concentração plasmática de insulina. Esse quadro ficou evidente quando calculamos a integral da área sob a curva da insulinemia (AUC insulinemia) e da glicemia (AUC glicemia), bem como a relação entre ambas (AUC insulinemia / AUC glicemia), a qual se apresentou três vezes maior nos ratos suplementados com HMB. Esse dado indica que a intolerância à glicose observada ocorreu devido ao desenvolvimento de uma RI e não a alterações no processo de secreção deste hormônio (Figura 5).

A RI pode ser resultado de alterações na própria via de sinalização da insulina, conforme apontam diversos estudos (Pessin, Saltiel, 2000; Taniguchi et al., 2006). Sabe-se, por exemplo, que a redução do conteúdo de receptores de insulina fosforilados em tirosina (pTyr IR) e de seus respectivos substratos (pTyr IRS), bem como do conteúdo total deles, deve-se a uma redução da atividade desta via de sinalização. Adicionalmente, um aumento do conteúdo destas proteínas fosforiladas em serina também contribui para a instalação de RI (Tanti, Jager, 2009). Em situações de RI, são também descritas alterações em etapas posteriores da via de sinalização, como redução do conteúdo de AKT fosforilado em serina (pSer AKT) (Tonks et al., 2013).

Dessa maneira, os estudos que se seguiram tiveram o objetivo de investigar algumas dessas alterações moleculares, que possivelmente estariam envolvidas na RI observada logo após a suplementação com HMB. Existem tecidos que são considerados alvos clássicos da ação da insulina, como o fígado, músculos estriado e tecido adiposo branco (TAB) (Pessin, Saltiel, 2000), portanto, o presente estudo passou a ser direcionado para a análise desses processos nesses locais. Vale ressaltar que, os músculos esqueléticos são responsáveis pela captação de mais de 50% do conteúdo total de glicose plasmática após uma refeição sendo, portanto, um importante regulador da homeostase glicêmica (Song et al., 2013).

No fígado dos animais suplementados com HMB observamos uma redução do conteúdo de pTyr IR (Figura 6), em resposta a sobrecarga de insulina (10 U) intraperitoneal, dado indicativo de uma RI. Esse dado corrobora estudos que evidenciam o mesmo em animais diabéticos (tipo 2) e obesos, quando também é observada uma redução no conteúdo total de IR (Pirola et al., 2004), o que não foi observado após a suplementação com HMB (Figura 7). Ainda no fígado, houve uma redução do conteúdo de pSer AKT nos animais suplementados com HMB (Figura 13), dados que reforçam uma RI neste órgão (Taniguchi et al., 2006), embora não tivéssemos detectado um aumento no conteúdo da PEPCK (Figura 20), evento que seria esperado, já que a insulina atua suprimindo a sua expressão (Tsatsoulis et al., 2012; Wang et al., 2013). Esses dados corroboram os de Jin et al. (2012), que também observaram em ratos submetidos à dieta hiperlipídica, uma hiperinsulinemia, com manutenção da glicemia dentro da normalidade, sem alterações na atividade desta enzima-chave da gliconeogênese.

Nos músculos sóleo e EDL não foram observadas alterações significativas em relação ao conteúdo de pTyr IR (Figuras 8 e 9), bem como de pTyr IRS, em resposta a sobrecarga de insulina (Figuras 11 e 12). Porém no músculo sóleo de animais suplementados com HMB observamos redução significativa do conteúdo de pSer AKT, após a sobrecarga de insulina (Figura 14), evidenciando uma possível redução da sensibilidade a este hormônio neste tecido, a partir deste ponto da via. Defeito direto na atividade da AKT também foi observado por Tonks et al. (2013) em músculo esquelético de pacientes com RI.

A AKT é responsável pelo controle de diversas ações fisiológicas, sendo capaz de ativar ou inativar proteínas envolvidas: (a) na síntese de proteínas, via proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40); (b) na atividade transcricional, via forkhead box O (FOXO); (c) na síntese de glicogênio, via GSK-3 (glicogênio sintase kinase-3); (d) na promoção da glicogênese e (e) na captação de glicose, via Akt substrate of 160 kDa (AS160), dentre outras (Liu et al., 2009; Taniguchi et al., 2006; Zick, 2005).

O controle da captação de glicose pela AKT é mediado pela translocação de vesículas contendo a isoforma 4 de proteínas transportadoras de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática; esta isoforma é a mais expressa nos músculos estriados e tecido adiposo branco (Bogan, 2012), sendo a única sensível à ação da insulina (Wallberg, Zierath, 2001). Na ausência de insulina, a maior parte das

vesículas contendo GLUT4 encontra-se no citossol (Stöckli et al., 2011). Em situações normais e, portanto, na presença de insulina, a maior parte do GLUT4 presente nos músculos esqueléticos e tecido adiposo branco encontra-se na membrana plasmática; no entanto, em situações de RI, bem como em animais diabéticos, observa-se uma redução do conteúdo de GLUT4 na membrana, que parece ser devida a uma reduzida ação da insulina (Bogan, 2012).

Estudos realizados em camundongos cre/lox KO para GLUT4, especificamente no músculo esquelético, mostram a importância do GLUT4 muscular para a manutenção da homeostase glicêmica, já que esta se encontra comprometida nesses animais, que desenvolvem diabetes (Kim et al., 2001). No entanto, um estudo mais recente conduzido por Fam et al. (2012) que também utilizou animais cre/lox KO de GLUT4 no músculo esquelético e também cardíaco verificaram captação de glicose normal, detectada por meio do GTT e clamp hiperinsulinêmico/euglicêmico, contradizendo o estudo citado anteriormente. Uma explicação para tal fenômeno seria que outros GLUTs poderiam estar sendo superexpressos (ainda não descobertos), o que poderia contribuir para a manutenção da homeostase glicêmica.

Inversamente, estudos que utilizaram animais transgênicos que superexpressam GLUT4, porém apresentando deficiência em sua translocação para a membrana, desenvolvem RI, sugerindo que o processo de translocação é fator crucial para a manutenção da homeostase glicêmica (Bogan, 2012).

Considerando-se os fatos apresentados, verifica-se a grande importância fisiológica tanto da expressão quanto da localização de GLUT4, dessa forma, analisamos nos músculos (sóleo e EDL), bem como no TAB o conteúdo total de GLUT4, a porcentagem translocada para a membrana plasmática e o conteúdo absoluto na fração correspondente à membrana plasmática.

No músculo sóleo detectamos uma redução significativa do conteúdo total de GLUT4 e do conteúdo de GLUT4 absoluto na membrana, sem que fossem detectadas alterações na porcentagem de translocação de GLUT4 para a membrana plasmática entre os grupos (Figura 17). Sabe-se que a insulina, via pSer AKT, participa ativamente do processo de tradução dos mRNAs em proteínas, e esse menor conteúdo de GLUT4 total e na membrana plasmática poderia decorrer da redução do conteúdo de pSer AKT nos animais tratados com HMB, nos quais se caracterizou uma RI. Contudo, a pSer AKT também está envolvida no processo de

translocação de GLUT4 e a redução no conteúdo de pSer AKT, deveria comprometer a taxa de translocação de GLUT4, o que não foi observado. No entanto, não podemos desconsiderar que a manutenção do tônus muscular leva à ativação da via da AMPK, a qual também participa do processo de translocação de GLUT4 de um pool citossólico diferente daquele que é mobilizado pela ação da insulina (Bogan, 2012). Esse evento poderia compensar uma possível redução na translocação de GLUT4 decorrente da RI.

No EDL a suplementação com HMB promoveu redução do conteúdo total de GLUT4, com manutenção da translocação e redução do seu conteúdo na membrana plasmática (figura 18). Nesse músculo o conteúdo de pSer AKT não foi alterado, explicando em parte a manutenção da taxa de translocação. Embora a redução do conteúdo total do GLUT4 não possa ser explicada pelo conteúdo de pSer AKT, que não foi alterado, não se pode descartar as evidências da literatura que identificam acúmulo de diacilglicerol e ceramidas em músculos de ratos com resistência à insulina, o que determinou uma redução do conteúdo de GLUT4 total (Kelley et al., 2002; Martins et al., 2012). Esse dado indica que outros mecanismos poderiam contribuir com essa redução do conteúdo total de GLUT4.

No tecido adiposo periepididimal não foi detectado nenhuma alteração na via de sinalização da insulina, mostrando que a suplementação com HMB, nas condições experimentais estudadas, não altera a ação da insulina neste tecido (Figuras 10 e 16). Dessa forma, não foram observadas alterações entre os grupos quanto ao conteúdo total, porcentagem de translocação para a membrana plasmática, bem como do conteúdo absoluto de GLUT4 na membrana plasmática, (Figura 19).

A análise da área de secção transversa das fibras dos músculos sóleo e EDL mostrou uma redução da mesma, apenas no músculo sóleo de animais suplementados com HMB (Figuras 21 e 22). Segundo Wang et al. (2006), uma redução da atividade da via PI3K/AKT em músculo esquelético está relacionada a um aumento da atividade da caspase-3 envolvida na proteólise muscular (Chaudhary et al., 2012). Isto poderia justificar nossos achados de redução da AST das fibras do músculo sóleo, no qual se demonstrou o comprometimento desta via após a suplementação com HMB. Reforçando este ponto, sabe-se que a AKT, quando fosforilada em serina, promove fosforilação de FoxO, o que impede sua translocação do citossol para o núcleo, onde atua elevando a expressão dos

atrogenes (MURF1, atrogin 1), relacionados à proteólise (Schiaffino, Mammucari, 2011). Portanto, uma redução da atividade da AKT induzida pela suplementação com HMB, pode reduzir o efeito inibitório sobre a FoxO, aumentando a sua translocação para o núcleo, o que poderia elevar a expressão desses atrogenes e justificar, ao menos em parte, a redução da AST.

Os dados apresentados e discutidos até o momento evidenciam a instalação de um quadro de RI, que foi verificada pela menor resposta à insulina no fígado e no músculo sóleo de ratos suplementados com HMB. No entanto, os agentes envolvidos na gênese deste quadro ainda não foram identificados.

Sabe-se que os animais suplementados com HMB apresentam aumento da expressão hipofisária de GH (Gerlinger-Romero et al., 2011). Sabe-se também que a elevação crônica da secreção deste hormônio está associada a um quadro de RI, com elevação da insulinemia e manutenção da glicemia (Hansen et al., 1986), quadro semelhante ao que observamos anteriormente (Gerlinger-Romero et al., 2011) e no presente estudo, após a suplementação com HMB.

Contribuindo para a RI, o GH estimula a lipólise e a gliconeogênese, e por meio de um cross-talk, interfere na via da sinalização da insulina (Taniguchi et al., 2006), sendo este um mecanismo antagonista de suas ações (Costa et al., 1998).

O GH age via receptor de citocinas, como a interleucina-6 e a leptina, ativando a JAK2 que, por sua vez, fosforila a STAT5 em tirosina, o que é seguido pela sua dimerização. O dímero migra para o núcleo elevando a expressão da SOCS3 (Dominici et al., 2005). Estas são capazes de migrar para o citoplasma e reduzir a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina, a interação do IR com o IRS e causar degradação proteassomal do IRS-1, reduzindo a ação da insulina (Herrington, Carter-Su, 2001; Lebrun, Van Obberghen, 2008). Esse é um mecanismo fisiológico de controle da ação tecidual da insulina. Contudo esse processo se encontra exacerbado em situações de elevação crônica de GH, o que leva à RI (Taniguchi et al., 2006).

Dessa forma, avaliamos o conteúdo de STAT5 fosforilada em tirosina (pTyr STAT5) e SOCS3 no fígado, uma vez que este é o local mais susceptível para a instalação de uma RI em condições de excesso de GH, e onde primeiramente se instalam essas alterações (Dominici et al., 2005).

O conteúdo de pTyr STAT5 e SOCS3 não alterou significativamente nos animais suplementados com HMB (Figuras 23 e 24). Considerando que os animais

suplementados com HMB apresentam aumento significativo da expressão de GH e que evidenciamos uma RI no fígado dos mesmos, é possível que este hormônio interfira na via de sinalização da insulina, neste tecido, por meio do aumento da expressão de STAT3 (de Castro Barbosa et al., 2009).

Devemos considerar também que existem outros mecanismos descritos que evidenciam o cross-talk entre o GH e a insulina, causando a redução da ação da última. Em situações de excesso de GH observa-se um aumento da expressão de SOCS1, que está relacionada principalmente a redução da fosforilação em tirosina do IRS2 (Ueki et al., 2004). Adicionalmente, nesta situação, bem como em diabetes tipo 2 e obesidade, também é observada um aumento da fosforilação da JNK (Dominici et al., 2005; Nakatani et al., 2004).

Adicionalmente, sabemos que o GH aumenta a atividade/expressão da lipase hormônio sensível (LHS) e, portanto, a hidrólise de triacilglicerol em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol, promovendo o aumento da concentração de AGL na circulação (Fain et al., 2008). Nesse sentido, observamos que os animais suplementados com HMB tiveram o conteúdo de mRNA e da proteína LHS no tecido adiposo branco aumentados, bem como os níveis de AGL plasmáticos (Figura 25). Estes dados corroboram dados de Widdowson et al. (2009), que observaram que a administração suprafisiológica de GH em atletas aumenta os níveis de AGL plasmáticos, e de Costa et al. (1998), que observaram redução da gordura visceral em coelhos expostos cronicamente a altas concentrações de GH bovino e IGF-1.

Está bem descrito na literatura que o aumento da concentração de AGL está relacionado com quadro de RI, sendo observado aumentos significativos de AGL em animais portadores de diabetes tipo 2 (Chabowski et al., 2012), podendo este ser mais um mecanismo que contribui para RI, observada nos animais suplementados com HMB.

Além disso, alguns ácidos graxos, como o ácido palmítico, são utilizados em modelos de indução de RI *in vitro* (Deng et al., 2012). O palmitato é capaz de reduzir a captação de glicose em miócitos C2C12, e o mecanismo molecular envolve a redução do conteúdo de pSer AKT, sem alterações na atividade da PI3K (Feng et al., 2012). Desta forma, nossos dados, mostram concomitantemente um aumento de AGL plasmáticos e RI, indo ao encontro desses estudos, uma vez que após o suplementação com HMB, observamos no músculo sóleo alteração na via de sinalização da insulina diretamente na redução da pSer AKT.

No entanto, os possíveis mecanismos de indução de RI mediada por ácidos graxos ainda não estão claramente estabelecidos. Uma explicação a favor do aumento da concentração AGL no plasma observado após a suplementação com HMB, e que se relaciona a RI seria o desvio da utilização de carboidratos pelo de lipídios por meio do ciclo de Randle (Newsholme, Randle, 1962). Este propõe que o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos causaria um aumento da utilização deste substrato para obtenção de energia, ativando a via da beta oxidação, que por sua vez elevaria a produção de acetilCoA e citrato, que, quando aumentados, levam a inibição de enzimas importantes da via glicolítica (piruvato desidrogenase e fosfofrutocinase), reduzindo assim a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Esse aumento de glicose sanguínea leva a um aumento da secreção de insulina, gerando consequentemente uma hiperinsulinemia.

A hiperinsulinemia, demonstrada nos nossos estudos por meio do GTT, poderia também contribuir para instalação da RI, já que há evidências de que nessa condição ocorre redução do conteúdo total de IR e/ou de p Tyr IR (Shanik et al., 2008).

Não podemos descartar ainda a possibilidade do HMB, *per se*, ser o agente direto na hipersecreção de insulina, mesmo em situações basais, ou seja, sem o estímulo de insulina, contribuindo assim para a gênese da RI observada até então, uma vez que o HMB é um metabólito do aminoácido leucina e que, este último, de acordo com a literatura, é capaz de aumentar agudamente a secreção de insulina *in vitro* e *in vivo* (Yang et al., 2010; Yang et al., 2012).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a demonstrar que a suplementação crônica de HMB, nas condições experimentais aqui definidas, promove, em ratos, redução da sensibilidade à insulina na musculatura esquelética e no fígado, caracterizada pelas alterações na sua via de sinalização nestes tecidos, dados que foram reforçados pelo GTT.

Dado ao reconhecido papel diabetogênico do GH, cuja secreção está aumentada nesse modelo, podemos sugerir que ele contribua de maneira importante com o quadro de resistência insulínica observado. No entanto, o seu envolvimento nesse efeito não pode ser comprovado, ao menos pela avaliação da expressão da SOCS3 e STAT5. Porém, o aumento da lipólise e da concentração plasmática de AGL sugere fortemente sua participação nesse efeito.

O conjunto de dados apresentados deve ser levado em consideração, já que o uso de HMB vem sendo preconizado como coadjuvante no tratamento de patologias associadas à severa perda de massa muscular, uma vez que nessas condições esse composto se mostrou eficiente em aumentar a síntese proteica, bem como em reduzir a proteólise na musculatura esquelética (Aversa et al., 2011; Nissen et al., 1996; Panton et al., 2000; Slater, Jenkins, 2000; Smith et al., 2005). Vale ressaltar que a dose de HMB administrada nos estudos citados, envolvendo animais, é equivalente a utilizada no presente estudo.

REFERÊNCIAS *

Aversa Z, Bonetto A, Costelli P, Minero VG, Penna F, Baccino FM, Lucia S, Rossi Fanelli F, Muscaritoli M. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. *Int J Oncol*. 2011 Mar;38(3):713-20.

Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve*. 2010 Jun;41(6):800-8.

Bogan JS. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:507-32.

Burke LM, Castell LM, Stear SJ. BJSM reviews: A-Z of supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance Part 1. *Br J Sports Med*. 2009 Oct;43(10):728-9.

Campello RS, Alves-Wagner AB, Abdulkader F, Mori RC, Machado UF. Carbohydrate- and lipid-enriched meals acutely disrupt glycemic homeostasis by inducing transient insulin resistance in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 May;90(5):537-45.

Chaudhary P, Suryakumar G, Prasad R, Singh SN, Ali S, Ilavazhagan G. Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy: role of ubiquitin-proteasome pathway and calpains. *Mol Cell Biochem*. 2012 May;364(1-2):101-13.

Chromý V, Gergel J, Vozníček J, Krombholzová L, Musil J. Assay of serum free fatty acids by extraction-photometric procedure. *Clin Chim Acta*. 1977 Oct 15;80(2):327-32.

Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan FA, Rathmacher JA. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2000 May-Jun;24(3):133-9.

Clemmons DR. Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in normal physiology and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012 Jun;41(2):425-43, vii-viii.

Costa C, Solanes G, Visa J, Bosch F. Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus. *FASEB J*. 1998 Nov;12(14):1455-60.

Davey HW, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Hilton DJ, Adams TE. STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol Cell Endocrinol*. 1999 Dec 20;158(1-2):111-6.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

de Castro Barbosa T, Lourenço Poyares L, Fabres Machado U, Nunes MT. Chronic oral administration of arginine induces GH gene expression and insulin resistance. *Life Sci.* 2006 Sep 5;79(15):1444-9.

de Castro Barbosa T, de Carvalho JE, Poyares LL, Bordin S, Machado UF, Nunes MT. Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. *Endocrinology.* 2009 May;150(5):2080-6.

Deng YT, Chang TW, Lee MS, Lin JK. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem.* 2012 Feb 1;60(4):1059-66.

Dominici FP, Argentino DP, Muñoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res.* 2005 Oct;15(5):324-36.

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 Oct;293(4):E923-31.

Fam BC, Rose LJ, Sgambellone R, Ruan Z, Proietto J, Andrikopoulos S. Normal muscle glucose uptake in mice deficient in muscle GLUT4. *J Endocrinol.* 2012 Sep;214(3):313-27.

Fain JN, Ihle JH, Bahouth SW. Stimulation of lipolysis but not of leptin release by growth hormone is abolished in adipose tissue from Stat5a and b knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Sep 16;263(1):201-5.

Fain JN, Cheema P, Tichansky DS, Madan AK. Stimulation of human omental adipose tissue lipolysis by growth hormone plus dexamethasone. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Nov 25;295(1-2):101-5.

Feng XT, Wang TZ, Leng J, Chen Y, Liu JB, Liu Y, Wang WJ. Palmitate contributes to insulin resistance through downregulation of the Src-mediated phosphorylation of Akt in C2C12 myotubes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(7):1356-61.

Fitschen PJ, Wilson GJ, Wilson JM, Wilund KR. Efficacy of β -hydroxy- β -methylbutyrate supplementation in elderly and clinical populations. *Nutrition.* 2012 Jan;29(1):29-36.

Gehart H, Kumpf S, Ittner A, Ricci R. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 2010 Nov;11(11):834-40.

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 Horm IGF Res.* 2011 Apr;21(2):57-62.

González-Sánchez JL, Serrano-Ríos M. Molecular basis of insulin action. *Drug News Perspect.* 2007 Oct;20(8):527-31.

Harcourt LJ, Holmes AG, Gregorevic P, Schertzer JD, Stupka N, Plant DR, Lynch GS. Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol.* 2005 Apr;166(4):1131-41.

Hansen I, Tsalikian E, Beaufre B, Gerich J, Haymond M, Rizza R. Insulin resistance in acromegaly: defects in both hepatic and extrahepatic insulin action. *Am J Physiol.* 1986 Mar;250(3 Pt 1):E269-73.

Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2001 Aug;12(6):252-7.

Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:325-46. Epub 2002 Jan 4. Review.

Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, Zong H, Dong J, Kahn CR, Kahn BB, Shulman GI. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):153-60.

Kim JS, Park YM, Lee SR, Masad IS, Khamoui AV, Jo E, Park BS, Arjmandi BH, Panton LB, Lee WJ, Grant SC. β -hydroxy- β -methylbutyrate did not enhance high intensity resistance training-induced improvements in myofiber dimensions and myogenic capacity in aged female rats. *Mol Cells.* 2012 Nov;34(5):439-48.

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. *J Physiol Biochem.* 2010 Dec;66(4):311-9.

Kuhls DA, Rathmacher JA, Musngi MD, Frisch DA, Nielson J, Barber A, MacIntyre AD, Coates JE, Fildes JJ. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation in critically ill trauma patients. *J Trauma.* 2007 Jan;62(1):125-31.

Jin ES, Beddow SA, Malloy CR, Samuel VT. Hepatic glucose production pathways after three days of a high-fat diet. *Metabolism.* 2013 Jan;62(1):152-62.

Jówko E, Ostaszewski P, Jank M, Sacharuk J, Zieniewicz A, Wilczak J, Nissen S. Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. *Nutrition.* 2001 Jul-Aug;17(7-8):558-66.

Lanning NJ, Carter-Su C. Recent advances in growth hormone signaling. *Ver Endocr Metab Disord.* 2006 Dec;7(4):225-35.

Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf).* 2008 Jan;192(1):29-36.

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 Dec;25(4):402-8.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Aug;8(8):627-44.

Loud KJ, Field AE, Micheli LJ. Primary care of the elite or elite-emulating adolescent male athlete. *Adolesc Med*. 2003 Oct;14(3):647-61.

Magkos F, Wang X, Mittendorfer B. Metabolic actions of insulin in men and women. *Nutrition*. 2010 Jul-Aug;26(7-8):686-93.

Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 2012 Feb 23;11:30.

Manninen AH. Hyperinsulinaemia, hyperaminoacidaemia and post-exercise muscle anabolism: the search for the optimal recovery drink. *Br J Sports Med*. 2006 Nov;40(11):900-5.

McCabe MP, Ricciardelli LA. Parent, peer, and media influences on body image and strategies to both increase and decrease body size among adolescent boys and girls. *Adolescence*. 2001 Summer;36(142):225-40.

McCabe MP, Ricciardelli LA. A prospective study of pressures from parents, peers, and the media on extreme weight change behaviors among adolescent boys and girls. *Behav Res Ther*. 2005 May;43(5):653-68.

Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45803-9.

Newsholme EA, Randle PJ. Regulation of glucose uptake by muscle. 6. Fructose 1,6-diphosphatase activity of rat heart and rat diaphragm. *Biochem J*. 1962 May;83(2):387-92.

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*. 1996 Nov;81(5):2095-104.

Panton LB, Rathmacher JA, Baier S, Nissen S. Nutritional supplementation of the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (hmb) during resistance training. *Nutrition*. 2000 Sep;16(9):734-9.

Palisin T, Stacy JJ. Beta-hydroxy-beta-Methylbutyrate and its use in athletics. *Curr Sports Med Rep*. 2005 Aug;4(4):220-3.

Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol*. 2010 Jun;205(3):201-10.

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

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):165-9.

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 2004 Feb;47(2):170-84.

Ray BN, Kweon HK, Argetsinger LS, Fingar DC, Andrews PC, Carter-Su C. Research resource: identification of novel growth hormone-regulated phosphorylation sites by quantitative phosphoproteomics. *Mol Endocrinol*. 2012 Jun;26(6):1056-73.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1281-3. Review.

Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S262-8.

Sabourin PJ, Bieber LL. Subcellular distribution and partial characterization of an alpha-ketoisocaproate oxidase of rat liver: formation of beta hydroxyisovaleric acid. *Arch Biochem Biophys*. 1981 Jan;206(1):132-44.

Schaan BD, Rabelo ER, Irigoyen MC. [Insulin: cardiovascular effects and therapeutic applications]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Dec;48(6):793-802.

Slater GJ, Jenkins D. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation and the promotion of muscle growth and strength. *Sports Med*. 2000 Aug;30(2):105-16.

Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*. 2011 Jan 24;1(1):4.

Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by {beta}-hydroxy-{beta}-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):277-83.

Stöckli J, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. *J Cell Sci*. 2011 Dec 15;124(Pt 24):4147-59. doi: 10.1242/jcs.097063. Review.

Song R, Peng W, Zhang Y, Lv F, Wu HK, Guo J, Cao Y, Pi Y, Zhang X, Jin L, Zhang M, Jiang P, Liu F, Meng S, Zhang X, Jiang P, Cao CM, Xiao RP. Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders. *Nature*. 2013 Feb 21;494(7437):375-9.

Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Dec;9(6):753-62.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):85-96.

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 Jun;40(6):1615-22.

Tatara MR. Effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) administration on volumetric bone mineral density, and morphometric and mechanical properties of tibia in male turkeys. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2009 Dec;93(6):669-77.

Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: An adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment – An evolutionary perspective. *Metabolism*. 2012.

Tonks KT, Ng Y, Miller S, Coster AC, Samocha-Bonet D, Iseli TJ, Xu A, Patrick E, Yang JY, Junutula JR, Modrusan Z, Kolumam G, Stöckli J, Chisholm DJ, James DE, Greenfield JR. Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects. *Diabetologia*. 2013.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun;24(12):5434-46. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;25(19):8762.

Yang J, Chi Y, Burkhardt BR, Guan Y, Wolf BA. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev*. 2010 May;68(5):270-9.

Yang J, Dolinger M, Ritaccio G, Mazurkiewicz J, Conti D, Zhu X, Huang Y. Leucine stimulates insulin secretion via down-regulation of surface expression of adrenergic α 2A receptor through the mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway: implication in new-onset diabetes in renal transplantation. *J Biol Chem*. 2012 Jul 13;287(29):24795-806.

Wang R, Gao H, Xu W, Li H, Mao Y, Wang Y, Guo T, Wang X, Song R, Li Z, Irwin DM, Niu G, Tan H. Differential expression of genes and changes in glucose metabolism in the liver of liver-specific glucokinase gene knockout mice. *Gene*. 2013.

Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mitch WE. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006 Sep;147(9):4160-8.

Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice (review). *Mol Membr Biol*. 2001 Jul-Sep;18(3):205-11.

Widdowson WM, Healy ML, Sönksen PH, Gibney J. The physiology of growth hormone and sport. *Growth Horm IGF Res.* 2009 Aug;19(4):308-19.

Zanchi NE, Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, de Siqueira Filho MA, Felitti V, Lira FS, Seelaender M, Lancha AH Jr. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. *Amino Acids.* 2011 Apr;40(4):1015-25.

Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE.* 2005 Jan 25;2005(268):pe4. Review