

EVERSON ARAÚJO NUNES

**EFEITOS DO β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO (HMB) SOBRE PRODUÇÃO DE
CITOCINAS E VIAS DE SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS IMUNITÁRIAS**

CURITIBA

2009

EVERSON ARAÚJO NUNES

**EFEITOS DO β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO (HMB) SOBRE PRODUÇÃO DE
CITOCINAS E VIAS DE SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS IMUNITÁRIAS**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular na área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

CURITIBA

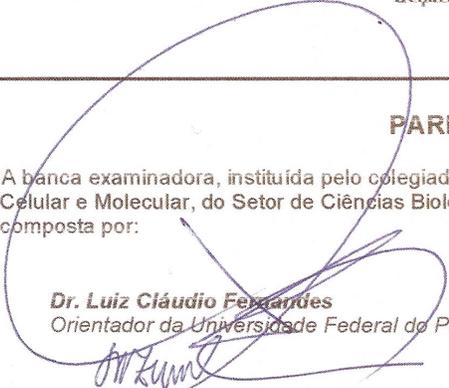
2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

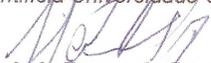
PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Orientador da Universidade Federal do Paraná - UFPR

Dr. Sílvio Marques Zanata
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Dra. Andréa Novaes Moreno
Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR


Dr. Luiz Fernando Pereira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR


Dr. Francisco Navarro
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

e tendo como suplentes,

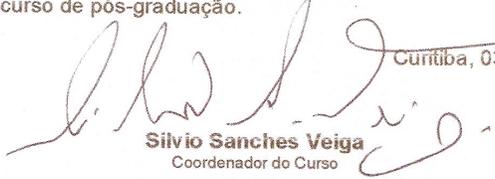
Dra. Dorly de Freitas Buchi
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Dr. Ricardo Fernandez Perez
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o(a) doutorando(a) **Everson Araújo Nunes**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Efeitos do B-hidroxi-B-metilbutirato (HMB) sobre produção de citocinas e vias de sinalização de células imunitárias**" é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em **Fisiologia**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 03 de dezembro de 2009


Sílvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amigo e orientador Prof^o Dr. Luiz Cláudio Fernandes. Por toda confiança e apoio que sempre depositou em mim.

Aos meus pais, Eliane e José, e irmãos, Jaelson e Francelize, por toda segurança e apoio que sempre me passaram em todos os caminhos que decidi seguir ... esses caminhos seriam bem mais difíceis sem a presença de vocês

A minha esposa, amante, namorada e companheira Fúlvia, pelo apoio que sempre me dá e pela paciência que tem comigo e com a rotina da vida que escolhi. Você é com certeza o melhor presente que a vida reservou para mim

Aos amigos e colegas do laboratório:

Adriana, Cíntia, Dalton, Daniele, Gina, Gleisson, Heros, Isabela, Júlia, Juliano, Katya, Marcelo, Ricardo, Ricelli, Sandro, Thiago e outros que passaram pelo lab, ou que estão entrando agora...

Obrigado por tudo que me ensinaram e ajudaram a construir... Podem ter certeza que serei sempre grato a vocês....

Ao pessoal da Universidade de Southampton:

Em especial ao Prof. Philip Calder por conseguir o financiamento e supervisionar os experimentos em Southampton (UK). Também agradeço ao restante da sua equipe: Elizabeth Miles, Jackie Madden, Paul Noakes, Norma Diaper, Amy Lomax, Maria Vlachava, Stella Kremmyda, Annette West, Alison Fear, Vera Barbosa e Christiaan Gelauf por me auxiliar com os experimentos.

Aos professores da banca pela paciência e atenção na leitura da tese e críticas ao trabalho.

Aos funcionários do biotério e da UFPR em geral

A CAPES e ao CNPq por financiar os experimentos aqui no Brasil e possibilitar a execução de parte do meu doutorado na Inglaterra.

A todos os ratos e voluntários que me auxiliaram na realização todos os trabalhos até hoje, sem eles não existiria progresso algum...

E finalmente a todas as pessoas que de alguma forma dividiram algum momento comigo durante todo meu caminho até aqui...

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 - O sistema imunitário.....	16
1.1.1 – Linfócitos.....	17
1.1.2 – Monócitos e Macrófagos	18
1.1.4 – Citocinas	20
1.1.4.1 - Fator de Necrose Tumoral.....	21
1.1.4.2 - Interleucina-1	23
1.1.4.3 - Interleucina-2	23
1.1.4.4 - Interleucina-4	24
1.1.4.5 - Interleucina-10	25
1.1.4.6 - Interferon- γ	25
1.2 - Generalidades sobre o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB).....	26
1.2.1 - Metabolismo da leucina e produção de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB).....	26
1.2.2 - Doses utilizadas, segurança e efeitos adversos	29
1.2.3 - Cinética após ingestão.....	30
1.2.4 - β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) e imunomodulação	31
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 – Experimentos com células de ratos	36
3.1.1 – Reagentes e sistemas comerciais	36
3.1.2 - Desenho de estudo usando células de ratos.....	36
3.1.3 – Cultivo de células do sangue total e de PBMC isoladas.....	37
3.1.3 - Quantificação da produção de nitrito (indicador da produção de óxido nítrico)	37
3.1.4 – Produção de TNF.....	38
3.2 – Experimentos com a linhagem de células Raw 264.7	38

3.2.1 - Reagentes e sistemas comerciais.....	38
3.2.4 – Proliferação de células Raw 264.7 por marcação com diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA).....	40
3.2.5 – Contagem das células após 72h de cultura	41
3.2.6 – Quantificação de Nitrito, TNF e IL-1 β em sobrenadantes de cultura de células Raw 264.7	41
3.3 – Experimentos com células Humanas.....	41
3.3.1 - Reagentes e Anticorpos usados nos experimentos com células humanas.....	41
3.3.2 - Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico humanas.....	42
3.3.3 – Análise dos parâmetros de proliferação de células mononucleares sanguíneas através da marcação com diacetato de 5-carboxifluoriceína	42
3.3.4 – Análise das fases do ciclo celular em células mononucleares sanguíneas	43
3.3.5 – Concentração de citocinas em culturas de células humanas.....	44
3.3.6 - Análise da expressão de CD25 na superfície em células mononucleares do sangue periférico humanas	44
3.3.7 – Expressão intracelular de p-ERK1/2 em células mononucleares do sangue periférico humanas	45
3.4 - Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1 – Influência do HMB sobre células derivadas de ratos Wistar	47
4.1.1 - HMB e produção de TNF por células do sangue total e PBMC	47
4.1.2 - Efeito do HMB sobre a quantidade de nitrito e TNF em sobrenadante de culturas de PBMC de ratos.....	49
4.2 – Efeitos do HMB sobre células Raw 264.7	50
4.2.1 - Efeitos do HMB sobre a proliferação de células Raw 264.7	50
4.2.2 - Número de células Raw 264.7 viáveis após 72h de cultura em presença de HMB ...	51
4.2.3 - Influência aguda do HMB na capacidade adesiva células Raw 264.7	52
4.2.4 - Efeitos do HMB sobre a produção de Óxido Nítrico por células Raw 264.7	53
4.2.5 - Efeitos do HMB sobre a produção de IL-1 β e TNF por células Raw 264.7	54
4.3 – Efeitos do HMB sobre PBMC de humanos	55
4.3.1 - Efeito do HMB na proliferação de PBMC humanas.....	55
4.3.2 - Efeito do HMB na progressão do ciclo celular em PBMC humanas.....	59

4.3.3 - Efeito do HMB nas concentrações de citocinas produzidas por PBMC	60
4.3.4 - Efeito do HMB na expressão de CD25 em PBMC humanas	62
4.3.5 - Efeito do HMB no conteúdo intracelular de pERK1/2 em PBMC humanas	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA: análise de variância

AP-1: Proteína-1 de ativação

BCAAT: transaminase de aminoácido de cadeia ramificada

BCKD: desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada

CaHMB: β -hidroxi- β -metilbutirato na forma de sal de cálcio monohidratado

CBA: ensaio citométrico de esferas ordenadas

CD25: subunidade α do receptor da interleucina-2

CEEA: Comitê de ética em experimentação animal

CFDA: diacetato de 5-carboxifluoriceína

COBEA: Colégio brasileiro de experimentação animal

ConA: Concanvalina A

CSF: Fatores estimulantes de colônias

DHT: Hipersensibilidade do tipo tardio

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DP: Desvio padrão

ECACC: Coleção europeia de culturas celulares

ELISA: Ensaio imunossorvente ligado a enzima

EPM: Erro padrão da média

ERK1/2: Quinase regulada por sinal extracelular

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FITC: Isotiocianato de fluoriceína

HMB: β -hidroxi- β -metilbutirato

HMG-CoA: β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA

IFN- γ : Interferon- γ

IL-1: Interleucina-1

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-13: Interleucina-13

IL-15: Interleucina-15

IL-2: Interleucina-2

IL-2R: Receptor para a interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-7: Interleucina-7

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

JAK3: Janus quinase 3

KICD: KIC desidrogenase

KIC- α : α -cetoisocaproato

LF: Linfotóxina

Linfócitos Th1: Linfócito T auxiliar (*helper*) 1

Linfócitos Th2: Linfócito T auxiliar (*helper*) 2

LPS: Lipopolissacarídeo

mAb: anticorpo monoclonal

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MFI: intensidade de fluorescência média

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade

MQ-NCSU: Linhagem de macrófagos de aves

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF- κ B: Fator Nuclear κ B

NK: Exterminadoras naturais

NO: Óxido nítrico

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: Salina tamponada com fosfatos

PE: Ficoeritrina

pERK1/2: quinase regulada por sinal extracelular na forma fosforilada

PI: Iodeto de propídio

PI-3K: Fosfatidil inosito 3-fosfato quinase

SFB: Soro fetal bovino

SIRS: Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição

TLR: Receptor do tipo toll

TNF: Fator de necrose tumoral

TNF-RI: Receptor de TNF do tipo I

TNF-II: Receptor de TNF do tipo II

TRAFs: Fatores associados ao receptor de TNF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - metabolismo do aminoácido leucina e síntese de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) ..	27
Figura 2 – produção de TNF em culturas de sangue total de ratos em presença de LPS (10 μ g/mL) por 48h.....	47
Figura 3 – produção de TNF por células mononucleares sanguíneas de ratos estimuladas com LPS (10 μ g/mL) por 48h..	48
Figura 4 – produção de nitrito por células mononucleares sanguíneas de ratos estimuladas com lps (10 μ g/mL) por 48h.....	49
Figura 5 – intensidade de fluorescência média (MFI) relativa após cultura das células raw 264.7 por 72h.....	50
Figura 6 – células raw 264.7 após 72h de cultura na presença de diferentes concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) no meio de cultura.....	51
Figura 7 – capacidade de adesão das células raw 264.7 após três horas de cultura na presença ou ausência de LPS (10 μ g/mL).	52
Figura 8 – concentração de nitrito (μ m) em meio de cultura após cultura das células raw 264.7 estimuladas com LPS (10 μ g/mL) por 48h.....	53
Figura 9 – concentração de IL-1 β (pg/mL) (a) e de TNF (pg/mL) (b) em meio de cultura após cultivo das células raw 264.7 por 48h na presença de lps (10 μ g/mL) e diferentes concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) no meio de cultura:	54
Figura 10 – índice de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas cultivadas em presença de várias concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) que não entrou em divisão celular.	56
Figura 11 – perfil de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas cultivadas em presença de várias concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)	57
Figura 12 – percentual de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas, cultivadas em presença de várias concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), que não entrou em divisão celular. as células foram separadas do sangue total de 8 voluntários, marcadas com diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA) e cultivados em presença de diferentes concentrações de hmb (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM) e também cona (5 μ g/mL) por 96 hr.....	58
Figura 13 – produção relativa de citocinas por pbmc humanas estimuladas com concanavalina A (ConA) 5 μ g/mL	61
Figura 14 – expressão relativa de cd-25 na superfície de células pbmc humanas estimuladas ou não com concanavalina A (ConA) 5 μ g/ml	62
Figura 15 – conteúdo intracelular relativo de perk1/2 em pbmc humanas estimuladas ou não com concanavalina A (ConA) 5 μ g/mL	63

RESUMO

Estudos em animais, como peixes e aves, demonstram existir potenciais efeitos imunopromotores do metabólito da leucina β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). Contudo, existe carência de estudos demonstrando esses mesmos efeitos em células derivadas de murinos ou humanos. Desta maneira, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar os potenciais efeitos imunomodulatórios do HMB nesses modelos. Foram usados para análises *in vitro*: o sangue total e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de ratos Wistar, a linhagem celular Raw 264.7 (monócito/macrófago de camundongos) e PBMC humanas. O HMB foi usado dentro da faixa de concentração 0,05 – 10 mM, com as concentrações específicas variando de acordo com tipo celular e dos parâmetros analisados. Sangue total foi coletado dos ratos para realizar o isolamento das PBMC e as culturas de sangue total. Posteriormente, ensaios para avaliar a produção de moléculas inflamatórias foram executados. A linhagem celular foi utilizada para avaliação da capacidade proliferativa e produção de marcadores inflamatórios (ex: fator de necrose tumoral-TNF e interleucina-1 β -IL-1 β). PBMC humanas foram isoladas do sangue de oito voluntários e testadas para capacidade proliferativa, progressão pelo ciclo celular, expressão de CD25 na superfície celular, expressão intracelular de pERK1/2 e produção de citocinas após exposição ao HMB (0,1 a 10 mM). Concentrações de HMB na faixa de 0,05 a 0,5 mM (representando concentrações dentro da faixa fisiológica pós-ingestão em humanos) não alteraram qualquer dos parâmetros testados em células de ratos. Em células Raw 264.7, o HMB (0,1; 1,0 e 10 mM) reduziu a produção de IL-1 β , estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) em pelo menos 20%. Adicionalmente, a concentração mais alta testada (10 mM) diminuiu a proliferação celular, o número de células viáveis e a produção de óxido nítrico. Em humanos, acima de 1 mM, o HMB diminuiu a extensão normal de proliferação das PBMC estimuladas com concanavalina A. Esta diminuição foi mais evidente no HMB a 10 mM, onde o índice de proliferação diminuiu em 50% quando comparado a ausência de HMB e a análise do ciclo celular demonstrou grande proporção de células em fase G0-G1. A expressão de CD25 e pERK1/2 não estão relacionadas ao efeito observado sobre a proliferação. O HMB afetou de maneira distinta a liberação de todas as cinco citocinas analisadas após estímulo. A quantidade de TNF nos meios de cultura foi reduzida em ~35% em todas as concentrações de HMB testadas. Quando o HMB foi testado a 1,0 ou 10 mM o perfil de citocinas Th1/Th2 foi modificado o balanço para Th2. A menor concentração testada (0,1 mM) promoveu algumas mudanças na secreção de citocinas, incluindo a diminuição do TNF, sem alterar proliferação ou progressão pelas fases do ciclo celular. Em conclusão, o HMB possui potencial para ser usado na modulação da função imunitária em situações específicas, pois apresenta alguns efeitos antiinflamatórios especialmente em células humanas.

Palavras chave: HMB; citocinas; PBMC; proliferação; antiinflamatório; imunomodulação

ABSTRACT

Studies in animals, e.g. fishes and chickens, have shown some potential immunomodulatory effects of the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). However, there is lack of evidence showing the same effects in human and murine cells. Our main goal was to investigate the potential effects of on immune cells. Different experimental models were used to test such effects *in vitro*: whole blood and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Wistar rats, the monocyte/macrophage mouse cell line Raw 264.7 and human PBMC. HMB was used in a range of 0.05 to 10mM depending of the cell type and which parameter was analyzed. Whole blood was harvested from Wistar rats to perform the PBMC isolation and whole blood cultures. Afterwards, assays to evaluate inflammatory molecules production were performed. The cell line was assayed for proliferation and production of inflammation markers (e.g. tumor necrosis factor – TNF and interleukin-1 β - IL-1 β). Human PBMC were isolated from the blood of eight volunteers and assayed for proliferation, cell cycle progression, surface expression of CD25, intracellular expression of pERK1/2 and cytokine production after *in vitro* exposure to a range of HMB concentrations (0.1 to 10 mM). Concentrations of HMB from 0.05 to 0.5 mM (representing a normal postingestion physiological range in humans) did not alter any parameter tested in rat cells. In Raw 264.7 it was shown that HMB, at 0.1, 1.0 and 10 mM, reduced the lipopolysaccharide (LPS) induced IL-1 β production by these cells in at least 20%. Also, the highest concentration tested (10mM) decreased cell proliferation, the number of viable cells and nitric oxide production. In human PBMC, above 1 mM, HMB decreased the extent of proliferation normally observed after stimulation by concanavalin A. Such decrease was evident at 10 mM HMB, when the proliferation index was 50% reduced when compared to the absence of HMB. Cell cycle analysis demonstrated an increase in the proportion of cells at the G0-G1 phase at 10 mM HMB. CD25 and pERK1/2 expression were not related to the observed effect on proliferation. HMB affected the concentrations of all five cytokines measured following stimulation. TNF concentration in the culture medium was reduced by ~35% at all HMB concentrations. Th1/Th2 cytokine production was modified towards a Th2 profile when HMB was at 1 or 10 mM. Thus, HMB at 10 mM impairs lymphocyte proliferation and progression through the cell cycle. The lowest concentration used here (0.1 mM) exerted some actions on cytokine production, including decreasing TNF production, but not on proliferation and cell cycle progression. In conclusion, HMB might be a useful agent for modulation of immune function in specific situations because it presents anti-inflammatory effects especially in human cells.

Key words: HMB; cytokines; PBMC; proliferation; anti-inflammatory; immunomodulation.

1. INTRODUÇÃO

Há várias categorias de dietas enterais e suplementos nutricionais comercializados atualmente. Entre estes estão os que promovem ganho de massa muscular e/ou prevenção da perda da massa magra, imunomodulação, entre outros. Muitos são os tipos de nutrientes adicionados ou usados *in solo* para esses fins, nos produtos presentes no mercado (KREIDER *et al.*, 2004). Nissen e Sharp (2003) destacaram em sua metanálise, que o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) é um dos suplementos nutricionais comercializados com provável eficácia demonstrada por estudos publicados com indivíduos saudáveis. Esse composto é um dos metabólitos do aminoácido leucina, candidato a promotor dos efeitos inibitórios da leucina sobre o catabolismo protéico, ao lado do α -cetoisocaproato (KIC) (OSTASZEWSKI *et al.*, 2000). Em humanos foram obtidos resultados variados quando da suplementação com HMB em condições de estresse patológico (câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida e artrite reumatóide), exercício ou mudanças fisiológicas decorrentes do envelhecimento, cujas respostas diferenciadas foram dependentes do protocolo experimental utilizado (MARCORA; LEMMEY; MADDISON, 2005; MAY *et al.*, 2002; CLARK *et al.*, 2000).

O aminoácido de cadeia ramificada leucina modula muitas funções celulares, incluindo às das células imunitárias (CALDER, 2006). Contudo, alguns dos efeitos observados após a exposição à leucina podem estar sendo promovidos, por seus metabólitos e não pela leucina em si (NONNECKE; FRANKLIN; NISSEN, 1991). Estudos em peixes demonstraram que o HMB melhora a resposta contra patógenos, entre outros fatores de estresse (SIWICKI *et al.*, 2004; SIWICKI *et al.*, 2000). Estas observações sugerem que o HMB pode influenciar a resposta imunitária. Corroborando com esta sugestão, outros estudos *in vivo* em peixes demonstraram que o HMB pode melhorar as funções imunitárias inatas e específicas (SIWICKI *et al.*, 2005; SIWICKI *et al.*, 2006), enquanto estudos *in vitro* (SIWICKI *et al.*, 2000, SIWICKI *et al.*, 2003; SIWICKI *et al.*, 2004) mostraram que o HMB pode aumentar alguns parâmetros de resposta de macrófagos e linfócitos T e B de peixes.

Em situações de catabolismo muscular intenso, geralmente, são utilizadas abordagens que utilizam suplementação nutricional direcionada para a estimulação da síntese protéica e/ou redução da quebra de proteínas (FLAKOLL *et al.*, 2004). A adição de HMB a suplementos ou a

comercialização do produto puro geralmente é feita na forma de sal de cálcio do HMB monohidratada. Nesta forma, ele pode ser encontrado em dietas enterais, formulações em pó, cápsulas e adicionado a barras protéicas ou substitutas de refeição. Estudos prévios indicaram que o HMB pode evitar o aumento da concentração sérica de marcadores de lesão muscular decorrente do exercício de endurance (KNITTER *et al.*, 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que o HMB poderia inibir a taxa de proteólise total *in vitro* em músculos de animais (OSTASZEWSKI *et al.*, 2000). Baseados em observações pontuais, outros autores procuraram investigar os efeitos do uso do HMB para aumentar o ganho de massa muscular tanto em homens quanto em mulheres idosas que fazem exercício físico (VUKOVICH *et al.*, 2001; FLAKOLL *et al.*, 2004), bem como em modelos animais (JOWKO *et al.*, 2001). Por possuir uma possível ação sobre vias catabólicas (ex: proteolíticas), o uso do HMB foi testado em alguns modelos de estresse metabólico induzido por doenças. Nestes modelos, foi demonstrado que o HMB é capaz de prevenir a excessiva proteólise desencadeada por mediadores envolvidos em respostas catabólicas sistêmicas (CLARK *et al.*, 2000 ; MAY *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2005). Resultados provenientes de projetos em nosso laboratório demonstraram, em modelos animais, efeitos inibitórios, sobre o crescimento tumoral, após administração de HMB por 8 semanas. Outro fato evidenciado nesses mesmos estudos foi à atenuação da instalação da caquexia oncológica nos indivíduos tratados com HMB, resultado este caracterizado pela prevenção da perda de peso e da modificação negativa de variáveis metabólicas como glicemia e lactatemia (KUCZERA, 2007; NUNES *et al.*, 2008).

Clark *et al.* (2000), May *et al.* (2002) e Marcora; Lemmey; Maddison (2005) utilizaram HMB em conjunto com arginina e glutamina, com o objetivo de tentar reverter o quadro de perda muscular esquelética observada em pacientes com artrite reumatóide, câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), respectivamente. Com exceção do trabalho de Marcora; Lemmey; Maddison (2005), a suplementação mostrou ser eficaz em promover ganho de massa muscular esquelética quando comparada ao placebo. Nos trabalhos com resultado positivo, os autores atribuíram o aumento da massa muscular ao efeito anti-catabólico do HMB associado ao aumento da síntese protéica causado pelos aminoácidos glutamina e arginina. Estas observações levantaram a hipótese de possível ação do HMB sobre vias de sinalização intracelulares específicas responsáveis pelo metabolismo protéico nas células musculares. Contudo, é sabido que quadros hipermetabólicos têm como componente grande participação de citocinas

produzidas pelo hospedeiro em resposta ao estresse que desencadeou o quadro. Desta maneira, a participação do sistema imunitário do desenvolvimento e/ou atenuação desses quadros não pode ser descartada (SILVA, 2006).

Como o HMB demonstrou ser capaz de modular a função imunitária, em modelos animais, e os efeitos de sua aplicação, em estados hipercatabólicos, podem talvez ser resultado de ações imunomodulatórias. Este trabalho teve como objetivo avaliar potenciais influências do HMB sobre parâmetros funcionais e/ou comumente relacionados à inflamação em células imunitárias.

1.1 - O sistema imunitário

O sistema imunitário atua na proteção do indivíduo contra infecções e também está envolvido no reparo de lesões. Funcionalmente esse sistema está dividido em sistema inato e adaptativo. As células que constituem o sistema imunitário se originam na medula óssea e são denominadas, genericamente, de leucócitos. A comunicação entre o sistema inato e adaptativo pode ocorrer pelo contato direto célula-célula e/ou pela liberação de vários mensageiros químicos (JANEWAY *et al.*, 2000).

Dentre as várias respostas imunitárias, a inflamação recebe grande destaque por possuir papel protetor e/ou agravador de doenças. O processo inflamatório é caracterizado pela ação de células imunitárias fagocíticas (ex: neutrófilos e macrófagos), produtoras de mediadores com potencial erradicador de infecções. Contudo, esses mesmos mediadores podem também ser agravantes de lesões e causar modificações metabólicas sistêmicas. Por mais que possa parecer contraditória, essa resposta, quando controlada, é necessária ao adequado reparo do tecido alvo da lesão e/ou infecção. De maneira geral, a inflamação se inicia após uma lesão subletal e termina após o reparo, estando relacionada a vários processos concomitantes como a angiogênese, cicatrização, remodelação/regeneração de tecidos e formação de tecidos conjuntivos (QUINTANA; COHEN, 2005).

1.1.1 – Linfócitos

Os linfócitos são células da imunidade adaptativa com características muito especiais para o funcionamento adequado de um sistema imunitário competente. Atualmente se conhece vários tipos distintos de linfócitos com diversas funções diferentes. Uma das características principais de grande parte dos linfócitos é a capacidade de reconhecer e distinguir diversos antígenos desenvolvendo uma resposta específica. Adicionalmente, a propriedade da diferenciação em células de memória é outra característica singular dos linfócitos. Dois subgrupos de células que possuem grande representação no conjunto dos linfócitos são os linfócitos T e os linfócitos B. A imunidade mediada por células é uma das atribuições dos linfócitos, especialmente dos linfócitos T. Estes têm como principais funções a defesa contra microorganismos que sobrevivem e se replicam dentro de células fagocíticas ou não fagocíticas. Os linfócitos T possuem a capacidade de reconhecer antígenos protéicos provindos de microorganismos intracelulares que foram apresentados na superfície de células infectadas (MACHADO *et al.*, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

As respostas imunológicas mediadas por células têm como característica: a formação de células efetoras a partir de células jovens (*virgens*) em órgãos linfóides periféricos; a migração destas células T entre outras para os locais necessários; ativação de outros leucócitos mediados por moléculas de comunicação. A diferenciação de linfócitos T jovens em linfócitos T efetores exige múltiplos estágios. Em um primeiro momento ocorre o reconhecimento do antígeno e posteriormente a proliferação e diferenciação das células ativadas. Dentre as principais células efetoras da imunidade adquirida estão os linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Os linfócitos T CD4⁺ são chamados de auxiliares ou *helper* (Th). Os linfócitos Th podem se diferenciar também em várias subpopulações com características funcionais muito distintas. Dessas, as Th1 e a Th2 são as subpopulações de linfócitos T efetores mais bem definidos. Um dos fatores de diferenciação das populações Th1 e Th2, é feita a através das citocinas produzidas pelas respectivas células. Citocinas estas que são bastante distintas (MACHADO *et al.*, 2004).

Uma das principais funções dos linfócitos Th1 é a defesa contra infecções causadas principalmente por microorganismos intracelulares. Para realizar esta função, essas células liberam mediadores que ativam fagócitos profissionais (ex: macrófagos e neutrófilos) além de estimularem a resposta humoral (produção de anticorpos por linfócitos B) contra o agente

invasor. A população Th2, por sua vez, está relacionada a imunidade de mucosas e a respostas mediadas por mastócitos, eosinófilos e linfócitos B que protegem contra infecções helmínticas. Curiosamente a indução de respostas com predomínio de linfócitos Th1 produz inibição de respostas Th2 e vice e versa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Como citado anteriormente, existem também linfócitos T CD8⁺. Estas são células efetoras com a capacidade de eliminar microorganismos intracelulares a partir da destruição da célula hospedeira. Por esta característica são chamados também de linfócitos T citotóxicos. O processo de destruição das células alvo por linfócitos T CD8⁺ é mediado pelo reconhecimento antigênico e posterior liberação de mediadores (granzimas e perforinas) ou expressão de moléculas (ligante de FAS) que induzirão a morte da célula alvo (MACHADO *et al.*, 2004).

Respostas inflamatórias possuem participação de várias células, entre elas os linfócitos. Geralmente as respostas inflamatórias com participação de linfócitos têm a subpopulação Th1 como principais efetoras. Os linfócitos Th1 podem desencadear reações de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) com a participação de macrófagos. Principalmente as DTH crônicas podem trazer graves repercussões e complicações como inflamações granulomatosas e fibrose tecidual (MACHADO *et al.*, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

1.1.2 – Monócitos e Macrófagos

Parte das respostas efetoras da imunidade natural é mediada por células conhecidas como fagócitos mononucleares. Estas células têm sua origem na medula óssea e são encaminhadas ainda imaturas ao sangue para que possam infiltrar em diferentes tecidos e passem por diferenciações. No sangue periférico, os monócitos são os principais representantes dessas células. O pró-monócito ao dividir-se na medula óssea dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 h. Após este período eles migram para a corrente sangüínea, na forma de monócitos circulantes. Estes permanecem na circulação por cerca de 70 h em humanos. Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes órgãos e cavidades do organismo (passando a denominar-se macrófago), tais como: fígado (células de Kúpffer), pulmão (macrófago alveolar), tecido conectivo (histiócitos), baço (macrófagos da polpa vermelha), linfonodos, timo, osso (osteoclasto), trato gastrintestinal, sistema nervoso

central (micróglia), cavidade pleural, cavidade peritoneal e medula óssea (STOUT; SUTTLES, 2005).

Os macrófagos estão extensamente distribuídos pelo corpo, mostrando grande variedade estrutural e heterogeneidade funcional. Os macrófagos caracterizam-se por serem células grandes, com forma irregular, medindo entre 10–80 μm de diâmetro, núcleo irregular e excêntrica mente posicionado, com um ou dois nucléolos e cromatina dispersa. Apresentam complexos de Golgi bem desenvolvido, em posição justanuclear, número variável de vesículas de endocitose e grande número de mitocôndrias. A superfície apresenta-se irregular, com microvilos e o citoesqueleto bem desenvolvido, rodeando o núcleo e estendendo-se até a periferia da célula. Os macrófagos expressam grande quantidade de receptores de superfície, envolvidos nas interações desta célula com o ambiente e com o controle da sua atividade (crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, endocitose e secreção) (JANEWAY *et al.*, 2000; STOUT; SUTTLES, 2005).

Os macrófagos são células geralmente encontradas em abundância em estágios tardios da resposta imunitária natural. Geralmente sua ação tem características um pouco diferentes da de outros fagócitos, ex: neutrófilos. A resposta dos macrófagos a microorganismos é rápida e frequentemente persiste por mais tempo nos locais de inflamação. Essas células podem responder a vasta gama de estímulos, como: microorganismos, mediadores inflamatórios e sinais de estresse celular. As respostas a esses estímulos podem acontecer de múltiplas maneiras diferentes. Por possuírem a fagocitose como uma de suas principais funções, os macrófagos podem produzir inúmeras espécies moleculares para auxiliar na destruição do que foi fagocitado (DELVES; ROITT, 2000; STOUT; SUTTLES, 2005). Entre essas espécies moleculares estão: espécies reativas do oxigênio (EROs) como: radical superóxido e peróxido de hidrogênio (KLIMP *et al.*, 2002) e espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (NO). Este último é produzido pela enzima citosólica óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Nos macrófagos em repouso ela é pouco expressa, contudo estímulos como moléculas derivadas de microorganismos aumentam sua expressão de maneira significativa. Por ser um gás, o NO é bastante difusível e dentro das vesículas, contendo os agentes fagocitados, ele pode se combinar com EROs formando produtos altamente reativos que auxiliam na eliminação de microorganismos (KLIMP *et al.*, 2002; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Outras funções de macrófagos ativados envolvem a ativação de outras células da imunidade inata e adaptativa. Esta ativação é desencadeada pela liberação de outros mediadores inflamatórios como as citocinas (STOUT; SUTTLES, 2005).

1.1.4 – Citocinas

As citocinas são um grande grupo de glicoproteínas e peptídeos de baixo peso molecular que medeiam interações diretas entre células e regulam funções celulares e teciduais. As citocinas têm grande participação no desenvolvimento embrionário, no crescimento e maturação celular, em processos de cura e reparo, na modulação da resposta imunitária de fase aguda e na formação de novos vasos sanguíneos. O termo citocina foi introduzido por Stanley Cohen em 1974 (MATARESE, 2004). A expressão citocina é formada pelos radicais: cito = célula e cinina = hormônio, são proteínas semelhantes a hormônios que permitem a comunicação entre a célula e o ambiente externo. O termo citocina é usado para designar várias substâncias como: linfocinas, monocinas, interleucinas, fatores estimulantes de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas (TAYAL; KALRA, 2008). Estas moléculas são secretadas por diversos tipos celulares como os leucócitos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). Entre as funções das citocinas estão: mediar e regular respostas imunitárias, inflamação e hematopoiese. As citocinas possuem 3 propriedades: pleiotropia, isto é, elas podem atuar de maneira diferente nos diferentes tipos celulares; redundância, ou seja, funções similares podem ser estimuladas por diferentes citocinas; multifuncionalidade refere-se ao fato de que uma mesma citocina pode regular diferentes funções imunitárias (TAYAL; KALRA, 2008).

Vários tipos celulares são capazes de liberar citocinas pelas vias secretoras, sendo que muitas citocinas são liberadas tanto na forma ativa como na forma de precursores inativos que requerem ativação; algumas se ligam a matriz extracelular (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). O sistema imunitário utiliza as citocinas para modular a resposta imunitária (LI; REID, 2001). Desta maneira a produção e liberação de citocinas são estritamente reguladas, onde complexos *feedbacks* contra-regulatórios envolvendo outras citocinas são disparados, os quais têm a função de propiciar o retorno ao estado de homeostase. A expressão descontrolada de citocinas pode

ocorrer em células que passaram por processos de transformação tornando-se malignas (DUNLOP; CAMPBELL, 2000).

As citocinas interagem com as células via receptores de alta afinidade, geralmente glicoproteínas, que estão localizadas na membrana celular ligadas a segundos mensageiros que podem acionar várias vias. As interações das citocinas podem ser: (1) intrácrina – a citocina e o receptor estão no interior da célula; (2) autócrina – a citocina produzida pela célula age em receptor de membrana da própria célula que a produziu; (3) parácrina – a citocina de um tipo celular interage com receptores de outros tipos celulares adjacentes. Isto pode envolver contato célula-célula, por citocinas ligadas à superfície da membrana. Formas solúveis irão difundir-se localmente para alcançar outras células. Se quantidades suficientes de citocinas são produzidas, elas podem ter efeito sistêmico. Os efeitos de qualquer citocina frequentemente podem variar de acordo com sua concentração, com a presença de outras citocinas, com o estado de desenvolvimento das células ou tecido alvo e do ambiente extracelular. Esta complexidade implica em análise cautelosa de estudos *in vitro* e *in vivo* (DUNLOP; CAMPBELL, 2000; TAYAL; KALRA, 2008)

1.1.4.1 - Fator de Necrose Tumoral

O TNF é um dos principais mediadores da fase aguda da resposta inflamatória a bactérias gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. Contudo, o TNF também parece ser o grande responsável por várias das complicações sistêmicas comumente presentes em casos de infecções graves. A nomenclatura empregada ao TNF foi embasada na observação original de uma substância presente no soro que causava necrose de alguns tipos de tumores. O TNF é, com frequência, chamado de TNF- α para diferenciá-lo do TNF- β , o qual é secretado principalmente por linfócitos e por isso conhecido como linfotóxina (LT) (DELVES; ROITT, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Vários tipos celulares têm a capacidade de sintetizar o TNF (ex: linfócitos T estimulados, células NK, mastócitos e fagócitos). Contudo, os fagócitos mononucleares ativados são a principal fonte de TNF. Um dos estímulos mais potentes para levar a liberação de TNF por macrófagos, por exemplo, é a ativação de um tipo de receptor do tipo toll (TLR) pela molécula de lipopolissacarídeo (LPS) entre outros produtos presentes em microorganismos. O TNF é

sintetizado como uma proteína de membrana que não possui glicosilações. A proteína final possui sua extremidade carboxiterminal extracelular e a aminoterminal intracelular. Esta proteína de membrana é expressa como um homotrímero que possui a capacidade de se ligar ao receptor de TNF tipo II (TNF-RII). O TNF de membrana é clivado por uma metaloproteinase associada à membrana, que resulta como produto um polipeptídeo de 17kD. Após a clivagem, três dessas cadeias polipeptídicas se polimerizam para formar a proteína circulante do TNF com 51kD. Este polipeptídeo assume forma de pirâmide triangular, onde cada lado da pirâmide é formado por uma subunidade. Por assumir essa conformação, existe a possibilidade de ligação simultânea a três receptores. Até o momento são conhecidos dois tipos principais de receptores para TNF, chamados de receptor de TNF tipo I (TNF-RI) e tipo II. Os dois receptores são membros de uma grande família de proteínas envolvidas nas respostas imunes e inflamatórias podendo ser encontrados em quase todos os tipos celulares como trímeros na membrana plasmática mesmo antes da ligação ao TNF. Após a ligação dessa citocina a seus receptores, ocorre o recrutamento de proteínas, conhecidas como fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), para os domínios citoplasmáticos dos receptores. Os TRAFs ativam fatores de transcrição, em especial o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a proteína-1 de ativação (AP-1) (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2009).

Entre as funções biológicas do TNF estão à estimulação do recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais e infecção e ativar essas células para erradicar microorganismos. Os mecanismos envolvidos nessas ações biológicas do TNF são vários; a expressão de moléculas de adesão, estimulação da produção de outras citocinas como interleucina-1 (IL-1) e ativação de neutrófilos são exemplos destes mecanismos. Além dos efeitos celulares, podem existir efeitos sistêmicos dependentes das concentrações plasmáticas de TNF. Os efeitos sistêmicos de elevadas concentrações de TNF são geralmente os principais causadores das complicações observadas na síndrome da reação inflamatória sistêmica e na síndrome do choque séptico. Entre as complicações causadas nesta última estão o colapso vascular, a coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos. Essa síndrome é desencadeada pela grande produção de citocinas inflamatórias (ex: TNF, interleucina-12, interferon- γ e IL-1) após a exposição das células ao LPS. As concentrações séricas de TNF podem ser preditivas de infecções graves por bactérias gram-positivas. Curiosamente o choque séptico pode ser induzido em animais de laboratório pela injeção de LPS ou TNF. Nestes modelos animais o uso de antagonistas, anticorpos anti-TNF ou receptores solúveis diminui a mortalidade, contudo em humanos os resultados ainda não são

totalmente similares aos obtidos em animais. O que pode estar relacionado à ação de outras citocinas que possuem efeitos sistêmicos similares aos do TNF, como a IL-1 por exemplo (DELVES; ROITT, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

1.1.4.2 - Interleucina-1

A IL-1 trabalha em conjunto com o TNF para modular a atividade da imunidade natural e a inflamação. Os fagócitos mononucleares ativados também podem ser considerados as principais fontes celulares de IL-1. No entanto, outros tipos celulares como neutrófilos, queratinócitos e células endoteliais também podem sintetizá-la. São conhecidas duas formas de IL-1, denominadas IL-1 α e IL-1 β . Elas possuem menos de 30% de homologia, contudo se ligam aos mesmos receptores de superfície celular e apresentam as mesmas atividades biológicas. Estas atividades são mediadas pela ativação de um receptor de membrana chamado receptor da IL-1 tipo I. As ações biológicas da IL-1 são bastante semelhantes ao do TNF, fato este que pode ser explicado em parte pela ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 também pela IL-1. Baixas concentrações de IL-1 agem como mediadores locais da inflamação. Quando em quantidades maiores pode exercer atividade endócrina podendo induzir febre, síntese de proteínas de fase aguda no fígado e a produção de plaquetas e neutrófilos na medula óssea. Apesar de possuir alguns efeitos similares ao do TNF, a IL-1 não induz morte celular por apoptose ou as alterações fisiopatológicas do choque séptico (DELVES; ROITT, 2000; MILLS; DUNNE, 2009).

1.1.4.3 - Interleucina-2

Por possuir a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados por antígenos, a interleucina-2 (IL-2) é também chamada de fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação dessas células (GESBERT; MOREAU; THÈZE, 2005). A IL-2 é sintetizada principalmente por linfócitos T CD4⁺ e possui ações autócrinas e parácrinas. A expressão de receptores funcionais para IL-2 é principalmente induzida quando da ativação de linfócitos T não ativados e efetores. Contudo linfócitos T reguladores sempre expressam receptores para IL-2 funcionais. Os receptores para IL-2 (IL-2R) são constituídos de três proteínas associadas de maneira não-covalente incluindo IL-2R α (CD25), IL-2/15R β e γ_c . Somente o CD25 é exclusivo

do IL-2R, no entanto a IL-2 liga-se a cadeia α com baixa afinidade não desencadeando qualquer sinalização citoplasmática ou resposta biológica detectável. A subunidade IL-2/15R β faz parte também do receptor da IL-15 e possui participação na ligação da IL-2 ativando vias de transdução de sinal dependentes de janus quinase 3 (JAK3) e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) 5. A cadeia γ é compartilhada por receptores da interleucina-4 (IL-4), interleucina (IL-7) e interleucina-15 (IL-15), sendo por isso chamada de cadeia γ comum (γ_c). Esta subunidade não está envolvida diretamente da ligação da IL-2, mas sua presença é necessária para que ocorra a ligação da IL-2 com alta afinidade ao complexo do receptor e também para ativação de vias de transdução que envolve proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e fosfatidil inositol 3-fosfato quinase (PI-3K). Linfócitos T em repouso expressam baixos níveis de complexos IL-2R $\beta\gamma_c$. A expressão da subunidade IL-2R α é neo-induzida e a da IL-2R β aumentada quando linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são ativados. Aparentemente a produção de IL-2 leva a expressão de IL-2R α e IL-2R β por ações autócrinas e parácrinas. Entre as principais funções biológicas da IL-2 estão: sobrevivência e provavelmente manutenção da função de células T regulatórias suprimindo respostas contra antígenos próprios e alguns antígenos exógenos; sobrevivência, proliferação e diferenciação de linfócitos t ativados por antígeno; proliferação e diferenciação de células exterminadoras naturais (NK); em linfócitos B a IL-2 parece atuar como estímulo para síntese de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2009).

1.1.4.4 - Interleucina-4

A IL-4 é a citocina chave na produção de anticorpos do isotipo IgE e no desenvolvimento de linfócitos Th2 sendo a principal citocina indutora e efetora destas células. Após a ligação da IL-4 ao seu receptor, ocorre a ativação de vias envolvendo JAK3 ou 4 e STAT6. Uma característica curiosa é que a IL-4 é a única citocina que ativa a proteína STAT6, a qual parece ser responsável por efeitos exclusivos desta citocina citados acima. Suas ações biológicas envolvem respostas imunes contra helmintos e artrópodes a partir da participação de linfócitos Th2, IgE e ação de eosinófilos. Além disso a IL-4 funciona como fator de crescimento autócrino para linfócitos Th2 inibindo ao mesmo tempo o desenvolvimento de células Th1 e Th17, ações estas contrárias às do IFN- γ . Adicionalmente, a IL-4, em conjunto com interleucina-13 (IL-13), promove ativação alternativa de macrófagos. Esta ativação tem como característica a

indução da produção de colágeno e expressão aumentada de receptores de manose, quase estão envolvidos no reconhecimento de moléculas na superfície de alguns microorganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

1.1.4.5 - Interleucina-10

A interleucina-10 (IL-10) é uma conhecida citocina antiinflamatória. Este status lhe foi dado devido ao fato de ela inibir macrófagos e células dendríticas ativadas, possuindo importante papel no controle de respostas envolvendo imunidade natural mediada por células. As principais fontes celulares de IL-10 são macrófagos ativados e linfócitos T reguladores, porém queratinócitos também podem sintetizá-la. Em macrófagos a IL-10 tem a importante tarefa de fazer com que estas células retornem ao estado de pré-ativação nos momentos em que a infecção microbiana já foi erradicada. Um dos mecanismos envolvidos na modulação da atividade dos macrófagos por parte da IL-10 envolve a inibição da produção da IL-12, a qual é o principal estímulo para liberação de interferon- γ (INF- γ), conhecido por seu papel na ativação de respostas naturais mediadas por células. Secundariamente, a IL-10 inibe a expressão de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Desta maneira ocorre o impedimento da ativação de células T e o transcorrer das respostas imunitárias mediadas por células (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2009).

1.1.4.6 - Interferon- γ

O INF- γ é uma citocina efetora importante para atividades antivirais. Esta citocina é produzida por células NK, linfócitos Th1 CD4⁺ e linfócitos CD8⁺, sendo a citocina que caracteriza respostas mediadas por linfócitos Th1. Na imunidade natural o INF- γ é secretado por células NK em resposta a interleucina-12 ou a ligantes ativadores presentes em células infectadas ou que estão em estado de estresse. Como citado anteriormente, o INF- γ é produzido também por linfócitos T, os quais o fazem em resposta ao reconhecimento de antígenos. Muitas são as funções biológicas do INF- γ , sendo estas funções de extrema importância para imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares. Entre essas ações estão à ativação das capacidades microbicidas de macrófagos (ex: transcrição de genes que codificam enzimas produtoras de

espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico) principalmente pela liberação de INF- γ por linfócitos Th1. Justamente a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th1 é dependente de INF- γ , o que leva a inibição da proliferação de células Th2. O efeito do indutor do INF- γ sobre as células Th1 é mediado pela ativação de fagócitos mononucleares que produzem IL-12. Em linfócitos B o INF- γ promove a produção de isotipos de anticorpos que se ligam a receptores Fc γ nos fagócitos e ativação do complemento. Adicionalmente, o INF- γ tem a capacidade de estimular expressão de moléculas do MHC de classe I e classe II e co-estimulatórias em células apresentadoras de antígeno (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2009).

1.2 - Generalidades sobre o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)

1.2.1 - Metabolismo da leucina e produção de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB)

A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada essencial, encontrado em muitas fontes protéicas na dieta e é considerada de vital importância para a construção de proteínas e funcionamento normal de vários tecidos (CALDER, 2006). Grande parte da leucina metabolizada em mamíferos passa por uma via metabólica característica que possui como seus produtos o acetoacetato e a acetil-CoA. Resumo das vias metabólicas envolvendo o aminoácido leucina está representado na FIGURA 1. Estes produtos são originados após seqüência de seis reações, catalisadas por enzimas, que se iniciam pela transferência do grupamento amino da leucina para o α -cetoglutarato formando glutamato. Para que ocorra a completa oxidação da leucina por esta via é necessário: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, pantotenato, biotina, ubiquinona e o ácido lipóico em quantidades ideais. Em menor proporção, parte da leucina (5-10%) é oxidada levando a produção de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). Uma terceira via de metabolização da leucina, conhecida como via β -ceto, acontece principalmente nos testículos (células de Sertoli), e no pâncreas. Sendo, na maioria dos outros tecidos, uma via que conta com a oxidação de menos do que 5% da metabolização de leucina disponível. A principal característica desta via é que ela possui sua primeira reação catalisada por uma (L-leucina-aminotransferase) das três enzimas conhecidas que necessita da cobalamina como grupo prostético (KOHLMEIER, 2003).

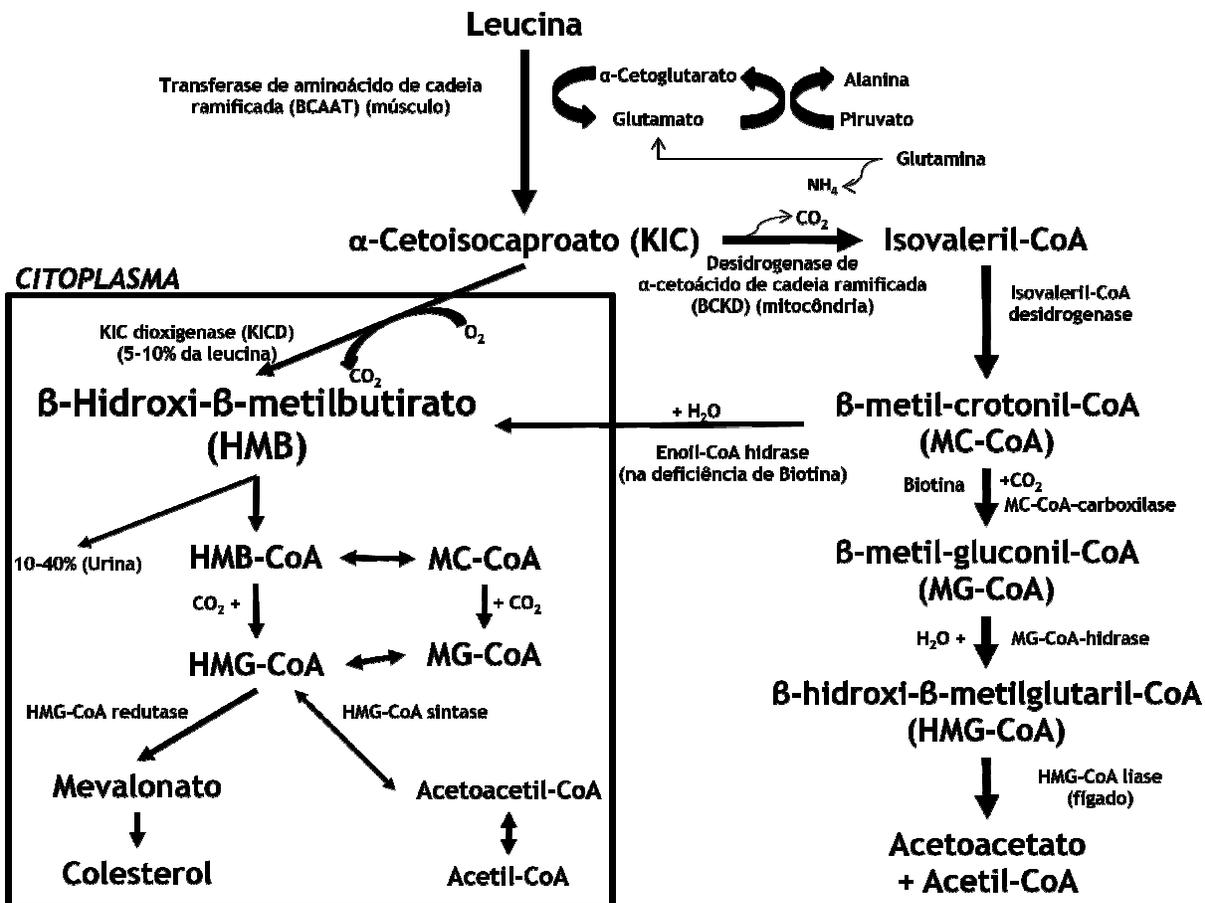


FIGURA 1 - Metabolismo do aminoácido leucina e síntese de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). KIC: α -cetoisocaproato (KIC) (Adaptado de DRISKELL, 2007).

A produção endógena de HMB ocorre principalmente no fígado e nos músculos (SABOURIN; BIEBEER, 1982), contudo outros tecidos podem ser sítios de síntese em menor proporção (NISSEN; ABUMRAD, 1997). A síntese pode iniciar no citoplasma e nas mitocôndrias de células musculares com a transferência do grupamento amino da leucina para o α -cetogluturato pela enzima transaminase de aminoácido de cadeia ramificada (BCAAT). Como produto desta etapa tem-se o α -cetoisocaproato (KIC) que posteriormente sofre descarboxilação oxidativa irreversível pela ação da enzima desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada (BCKD). Essa enzima é um grande complexo presente na matriz mitocondrial consistindo de múltiplas cópias de apenas três distintas subunidades. A subunidade E1 catalisa a reação de descarboxilação usando uma CoA reduzida como cosubstrato. A subunidade E2 ancora um resíduo de ácido lipóico, o qual serve como aceptor para o substrato descarboxilado, e

posteriormente o transfere para o acetil-CoA também reduzindo lipoamida para dihidrolipoamina no processo. A subunidade E3 é o componente lipoamida desidrogenase. Ela transfere o hidrogênio da dihidrolipoamida para a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) via flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O complexo enzimático é inativado por fosforilação, mediado pela 3-metil-2-oxobutanoato desidrogenase (lipoamida) quinase, e ativado por desfosforilação pela 3-metil-2-oxobutanoato desidrogenase (lipoamida) fosforilase. Aproximadamente 90% do KIC é descarboxilado a isovaleril-CoA nas mitocôndrias hepáticas. O isovaleril-CoA passa por reações seqüenciais na mitocôndria dando origem ao β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), o qual é transformado em acetoacetato e acetil-CoA pela HMG-CoA liase (DRISKELL, 2007).

A principal via de produção de HMB parece estar ativa no citoplasma das células hepáticas (XU *et al.*, 2000). Os ~10% de KIC que não foram metabolizados pela BCKD são oxidados a HMB pela enzima KIC dioxigenase (KICD). Esta enzima necessita de oxigênio molecular e ferro podendo ser idêntica a 4-hidroxi-fenilpiruvato dioxigenase, a qual é uma enzima importante no metabolismo do aminoácido tirosina (SABOURIN; BIEBER, 1982). Como a concentração hepática de KIC é $<5\mu\text{M}$ e a BCKD possui K_m vinte vezes menor que a KICD, acredita-se que a produção de HMB seja regula principalmente pela concentração de KIC e pela atividade das enzimas BCKD e KICD (VAN KOEVERING; NISSEN, 1992). Xu *et al.* (2000), demonstraram que a atividade da KICD no fígado de humanos é de aproximadamente 0,9mU/g de tecido, o que representa aproximadamente 14,2% da atividade total da BCKD. Em ratos este valor está próximo de 1%. Fato que é colocado, pelos mesmos autores, como uma sugestão de importância maior desta via hepática no catabolismo do KIC em humanos. Embora não existam dados sobre fatores moduladores da atividade da KICD em humanos, é sabido que a atividade física pode aumentar a atividade desta enzima em ratos, porém não a ingestão de dieta rica em BCAA (XU *et al.*, 2001).

Outra via que possivelmente pode produzir HMB tem como característica a hidroxilação do β -metil-crotonil-CoA, um dos produtos intermediários no metabolismo do isovaleril-CoA, a HMG-CoA, pela enzima enol-CoA hidrase. Contudo esta via parece ser ativa somente em casos de deficiência de biotina (NISSEN; ABUMRAD 1997).

Não existem dados precisos sobre a produção diária exata de HMB em humanos, mas, extrapolando dados de suínos, estima-se que um homem de aproximadamente 70 kg produza entre 0,2-0,4g de HMB/dia dependendo principalmente da sua ingestão de leucina. A

concentração plasmática basal do HMB no estado pós-absortivo em humanos está próxima de 1-4 μ M (NISSEN; ABUMRAD, 1997), contudo outros autores colocam que este valor poderia ser considerado zero (VUKOVICH *et al.*, 2001).

1.2.2 - Doses utilizadas, segurança e efeitos adversos

O β -hidroxi- β -metilbutirato também pode ser chamado de β -hidroxi-isovalerato e na forma de ácido é chamado de ácido β -hidroxi- β -metilbutírico ou ácido β -hidroxi-isovalérico. O sal de cálcio do ácido β -hidroxi- β -metilbutírico forma um monohidrato com fórmula química $\text{Ca}(\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (CaHMB monohidrato) e massa molecular 293, no qual o elemento cálcio corresponde a 13,7% do peso molecular. Este composto, quando colocado em água, dissolve-se rapidamente formando uma solução saturada a 27% (p/p) a 20°C (WILEY; DOBBINS, 2004). A adição de HMB a suplementos ou a comercialização do produto puro se faz, na sua grande maioria, na forma de CaHMB monohidrato, o qual pode ser encontrado em formulações em pó, cápsulas e adicionado a barras protéicas ou substitutas de refeição.

Em sua maioria, os trabalhos envolvendo suplementação com HMB utilizam doses entre 1-3 g/indivíduo/dia (NISSEN; SHARP, 2003), porém há estudos com doses de 6g/dia ou ainda ministradas de acordo com o peso dos voluntários. Exemplos de doses encontradas em alguns estudos podem ser 38 mg/kg/dia e 76 mg/kg/dia (VAN KOEVERING; NISSEN, 1992; GALLAGHER *et al.*, 2000a; PETERSON *et al.*, 1999). Estes valores correspondem a, aproximadamente, 3 e 6g/dia para indivíduos com massa corporal próxima a 80kg. Em estudo que demonstrou efeito positivo da suplementação com HMB sobre a massa isenta de gordura, a utilização de 6 g/dia não promoveu resultado significativamente diferente, quando comparado ao que uso de 3 g/dia (GALLAGHER *et al.*, 2000b).

Nas doses preconizadas na literatura, a suplementação com HMB não trouxe nenhum efeito colateral deletério aparente (PETERSON *et al.*, 1999). Estudos em modelos animais não demonstraram efeito tóxico com doses maiores que 100g/dia (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Recentemente, Baxter *et al.* (2005) demonstraram, em estudo com ratos, que dietas com até 5% de HMB por 91 dias não provocaram mudança em nenhum dos 18 parâmetros hematológicos nem nos 17 parâmetros bioquímicos analisados, assim como não provocou alteração perceptível nos pesos e na aparência dos principais órgãos e algumas glândulas dos indivíduos de ambos os sexos. A suplementação de HMB em humanos não causou nenhum efeito colateral após

suplementação com doses altas por mais de 7 semanas (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Estudos clínicos por períodos de até 12 semanas não demonstraram nenhum potencial efeito tóxico (NISSEN; ABUMRAD, 1997; NISSEN *et al.*, 2000). Entre estes estudos foram realizados levantamentos com questionários objetivando a pesquisa de efeitos adversos, porém nada foi encontrado. Após a ingestão de HMB a única variável modificada agudamente nos parâmetros metabólicos dos indivíduos foi a concentração plasmática do próprio HMB. A excreção de hormônios esteróides, as funções hepáticas e as renais também não tiveram nenhuma alteração após duas semanas de ingestão de 3g/HMB/dia (GALLAGHER *et al.*, 2000a). Crowe *et al.* (2003) relataram que atletas de *rugbi* que utilizaram 3g/dia de HMB por seis semanas não apresentaram efeito adverso à saúde.

1.2.3 - Cinética após ingestão

Um dos destinos da molécula de HMB após sua síntese ou ingestão é sua excreção na urina (VUKOVICH *et al.*, 2001). Valores obtidos em estudos com suínos e ovinos suplementados relataram excreção de até um terço do HMB (NISSEN; ABUMRAD, 1997), enquanto que em humanos suplementados com HMB este valor alcançou 50% da dose administrada (GALLAGHER *et al.*, 2000b).

Aparentemente o *turnover* do HMB pode ser considerado rápido. Alguns protocolos, avaliando a meia-vida do HMB em suínos e ovinos, demonstraram que após a ingestão de 2g de HMB a meia-vida foi de aproximadamente 2h (NISSEN; ABUMRAD, 1997). Um estudo em particular com humanos investigou a cinética do HMB após ingestão de 1g ou 3g do mesmo. Os resultados deste estudo demonstram que as concentrações plasmáticas de HMB atingem pico de, aproximadamente, 118 nmol/mL após 2h da ingestão de 1g, enquanto pico em torno de 480 nmol/mL foi atingido em apenas 1h após a ingestão de 3g de HMB. A meia-vida plasmática foi de, aproximadamente, 2,3h, enquanto que a excreção na urina foi dependente da dose, 14% para a de 1g e 29% para a de 3g. Quando HMB é ingerido juntamente com glicose, foi demonstrado que esse procedimento é capaz de provocar interferência na cinética do HMB; houve atraso, de, aproximadamente, 1h, e diminuição no pico de HMB plasmático. Ao mesmo tempo existiu pequeno aumento da meia-vida plasmática, o que pode estar relacionado à leve diminuição na excreção urinária de HMB. Outra constatação dos autores neste estudo foi a provável ausência de interferência da insulina na cinética do HMB (VUKOVICH *et al.*, 2001). Nissen *et al.* (1996),

mostraram que indivíduos que apresentavam concentrações basais de HMB plasmático de 2,8 μ M estavam com suas concentrações plasmáticas de HMB elevadas até 12h após a última ingestão do suplemento, 10,7 μ M e 20,3 μ M respectivamente para a ingestão de 1,5 e 3 g de CaHMB. Como o HMB aparentemente não aparece nas fezes, acredita-se que ele seja totalmente absorvido (DRISKELL, 2007).

1.2.4 - β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) e imunomodulação

Apesar da escassez de trabalhos em humanos, pesquisas em animais mostraram que em situações de estresse severo para moderado, a suplementação com HMB combate muitos dos efeitos negativos e pode melhorar a saúde do animal (GATNAU *et al.*, 1995; SIWICK *et al.*, 2004). Trabalhos com suplementação de HMB têm demonstrado diminuição na mortalidade em frangos e bezerras (VAN KOEVERING *et al.*, 1994, PETERSON *et al.*, 1999). Segundo Peterson *et al.* (1999), esta diminuição na mortalidade pode estar relacionada a modificação da função imunitária nos indivíduos suplementados com HMB. SIWICKI *et al.* (2000) demonstraram *in vitro*, que a adição de HMB ao meio de cultivo aumentou a capacidade proliferativa e citotóxica dos linfócitos de trutas e carpas. Adicionalmente, Peterson *et al.* (1999) demonstraram que o cultivo de macrófagos de frango em presença de HMB provocou aumento da capacidade fagocítica e da produção de NO. No entanto, os mecanismos pelos quais essas funções foram melhoradas ainda não foram elucidados.

Alguns estudos em truta arco-íris demonstraram que a adição de HMB a cultura de linfócitos promoveu aumento da proliferação destas células (SIWICKI *et al.*, 2003). Posteriormente, Siwicki *et al.*, (2004) demonstraram que o HMB estimulou a proliferação de linfócitos de espécies de peixe (*Silurus glanis* e *Ictalurus melas*), *in vitro*, sugerindo aplicação dessa substância para a modulação da imunidade mediada por células. Estudo *in vitro*, investigando a influência do HMB em macrófagos e linfócitos obtidos de truta arco-íris, demonstrou haver aumento na atividade destas células (SIWICKI *et al.*, 2000). Em estudos *in vivo* com HMB, também investigando macrófagos e linfócitos obtidos de truta arco-íris, foi demonstrado haver aumento da função destas células, melhorando a habilidade do organismo em lutar contra doenças e resistir a infecções (NISSEN *et al.*, 1996; SIWICKI *et al.*, 2000; SIWICKI *et al.*, 2003). O HMB aumentou a capacidade proliferativa de linfócitos T e B, estimulados com ConA e LPS respectivamente, obtidos de peixe *Silurus glanis* (SIWICKI *et al.*, 2004). Mais

recentemente, Siwicki *et al.*, (2006) demonstraram que a suplementação com 50mg/kg/dia de HMB para peixes da espécie *Tinca tinca* aumentou a atividade citotóxica, capacidade proliferativa e a produção de EROs por linfócitos estimulados com concanavalina A (estimulador de linfócitos T) e LPS (estimulador de linfócitos B).

Estudos investigando os efeitos do HMB sobre a funcionalidade de células imunitárias de mamíferos são raros na literatura atual (NONNECKE; FRANKLIN; NISSEN, 1991; GATNAU *et al.*, 1995; KUHLMAN *et al.*, 1998). Em humanos o HMB vem sendo usado para prevenir a perda de peso corporal, especificamente a perda massa magra, e para aumentar a massa muscular e força em indivíduos saudáveis e enfermos (GALLAGHER *et al.*, 2000a). Seu completo mecanismo de ação nessas situações não é totalmente conhecido, mas existem evidências provindas de modelos animais e linhagens celulares mostrando que o HMB pode agir como um agente anticatabólico interferindo em vias de sinalização específicas ligadas a degradação de proteínas e a inflamação (ELEY; RUSSEL; TISDALE, 2008a; ELEY; RUSSEL; TISDALE, 2008b).

Em humanos saudáveis, apenas um estudo conseguiu demonstrar algum tipo de modificação envolvendo algum parâmetro relacionado ao sistema imunitário após o uso de HMB. No estudo em questão, a suplementação com 3g de HMB por seis semanas demonstrou aumentar a contagem de monócitos em atletas saudáveis altamente treinados (CROWE *et al.*, 2003). Em contra partida, dois estudos, em situações patológicas, onde humanos fizeram o uso de suplemento oral contendo HMB sugerem potencial efeito imunomodulador mais evidente. Hsieh *et al.* (2006) demonstraram que indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica em unidades de tratamento intensivo suplementados com 3g de HMB por dia durante 7 dias apresentaram diminuições das concentrações séricas de proteína-C reativa (PCR), quando avaliados as situações pré e pós-suplementação. Este mesmo resultado não foi observado no grupo placebo. Kuhls *et al.* (2007) mostraram recentemente que pacientes de trauma em estado crítico que receberam HMB (3g de CaHMB) ou uma mistura de HMB (3g CaHMB), L-arginina (14g) e L-glutamina (14g) apresentaram redução da incidência da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no terceiro a sétimo dia pós-trauma quando comparados aos indivíduos que receberam placebo. Os resultados destes dois trabalhos indicam uma provável aplicação do HMB como imunomodulador, modificando a resposta ao trauma ou a doenças

inflamatórias levando a prevenção de alguns eventos adversos desencadeados por concentrações alteradas de mediadores inflamatórios nesses indivíduos. Contudo, nenhuma avaliação precisa da funcionalidade de células imunitárias ou da liberação de citocinas foi realizada em indivíduos ingerindo HMB ou usando exposição de células imunitárias humanas ao HMB *in vitro*.

Respostas imunitárias envolvem e são reguladas por múltiplos fatores incluindo citocinas e expressão de proteínas na superfície e/ou no interior das células. Existe carência de informações sobre os efeitos do HMB na expressão de moléculas relacionadas às funções imunitárias, como citocinas por exemplo. Recentemente foi demonstrado que linhagens de células musculares expostas ao HMB *in vitro* possuem expressão aumentada de proteínas da via MAPK/ quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (KORNASIO *et al.*, 2009), uma via envolvida em proliferação celular e manutenção da vida destas células. Esta via também é importante na regulação de células como os linfócitos por exemplo (LI *et al.*, 1999). Desta maneira, se existir algum efeito do HMB sobre a funcionalidade e comportamento de células imunitárias, talvez eles possam ser explicados pela ação do HMB sobre a atividade e/ou expressão de proteínas específicas.

Apesar das investigações sobre a funcionalidade das células imunitárias nos diversos trabalhos citados até então são escassas as publicações focando alterações na produção de citocinas e vias de sinalização de células imunitárias expostas ao HMB. As mudanças na funcionalidade das células imunitárias são acompanhadas de modificações no padrão de secreção de citocinas e também na expressão e ativação de proteínas específicas responsáveis pelo controle dessas funções. Algumas das mudanças nesses padrões precisam ser identificadas com o intuito de dar suporte às possíveis alterações funcionais. Os resultados obtidos em investigações sobre o efeito do HMB sobre a funcionalidade de células imunitárias e os recentes achados sobre a interferência do HMB em vias de sinalização em outros tipos celulares, justificam investigações em vias de sinalização e produção de citocinas em células imunitárias. Estas investigações são justificáveis, pois os componentes citados são os principais fatores modificadores do comportamento funcional imunitário. Os frutos destas investigações podem possuir potencial aplicação futura no tratamento e de grande variedade de doenças que estão relacionadas a distúrbios na modulação do sistema imunitário.

Por existir pouca informação sobre as influências do HMB sobre a função imunitária, especialmente em humanos, este estudo foi conduzido com o intuito de investigar os efeitos da exposição *in vitro* ao HMB sobre parâmetros inflamatórios em células imunitárias. Se colocarmos de lado os estudos em peixes e focarmos os dados indiretos de estudos em humanos, pode-se levantar hipótese de potenciais efeitos antiinflamatórios do HMB.

2. OBJETIVOS

Este trabalho estudou as influências da exposição de células imunitárias a diferentes concentrações de HMB *in vitro* sobre a funcionalidade, produção de citocinas, expressão de proteínas de superfície e intracelulares. Análises foram realizadas para se buscar padrões de respostas anti ou pró inflamatório. Para alcançar estes objetivos serão analisados:

- ✓ Influência da exposição *in vitro* a HMB sobre a produção de TNF por células do sangue total e PBMC de ratos Wistar.
- ✓ Influência da exposição *in vitro* a HMB sobre a produção de nitrito por PBMC de ratos Wistar.
- ✓ Efeitos do HMB *in vitro* sobre a proliferação, número de células viáveis, adesão, produção de IL-1 β e TNF por células Raw 264.7.
- ✓ Perfil proliferativo e progressão pelo ciclo celular de PBMC humanas expostas a diferentes concentrações de HMB.
- ✓ Produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF por células mononucleares sanguíneas humanas expostas a diferentes concentrações de HMB.
- ✓ Em células mononucleares sanguíneas humanas expostas a diferentes concentrações de HMB a expressão das proteínas: CD-25 e pERK1/2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Experimentos com células de ratos

3.1.1 – Reagentes e sistemas comerciais

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A. Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, concanavalina A (ConA) e o meio de cultura (RPMI 1640) foram provenientes da Sigma Chemical Co. (EUA). O antibiótico (penicilina e estreptomicina) e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (São Paulo, BR). Os sistemas comerciais para mensuração de citocinas por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) foram obtidos da eBioscience Inc. (California, EUA) .

3.1.2 - Desenho de estudo usando células de ratos

Foram utilizados cinquenta ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus) com 70 dias de idade, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os procedimentos adotados nos experimentos envolvendo ratos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPR, protocolo nº. 196 (ANEXO 1), e estão de acordo com os princípios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências estabelecidas em “*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”. Os ratos foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), com temperatura controlada a 22 ± 1 °C, com água e alimentação *ad libitum* (Nuvilab CR-1 – Nuvital, Colombo, Brasil). Todos os animais foram anestesiados com quetamina (60 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) para realização de punção cardíaca, para retirada de sangue, seguida de eutanásia por deslocamento cervical. Os experimentos foram realizados em dez momentos diferentes utilizando-se cinco animais em cada momento. Para estes experimentos foi utilizada a estrutura física do Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.1.3 – Cultivo de células do sangue total e de PBMC isoladas

O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos do tipo sistema Vacutainer® BD Biosciences (Abingdon, UK) com heparina sódica com capacidade para 10 mL. Aproximadamente 8 mL foram coletados de cada rato. Para os cultivos do sangue total, o mesmo foi diluído cinco vezes com meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de SFB e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL). O sangue diluído foi posteriormente pipetado em placas de 24 poços (450 µL/ poço) onde foi adicionado meio de cultura RPMI-1640 e/ou as soluções contendo HMB e/ou lipopolissacarídeo (LPS) 10 µg/mL dependendo da necessidade completando o volume total de 500 µL/poço. Para os cultivos de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) isoladas o sangue total foi fracionado por gradiente de densidade com Histopaque-1077 após centrifugação a 300 g por 20 min a temperatura ambiente. A camada de células superior foi coletada e lavada duas vezes em meio RPMI-1640 suplementado com glutamina 2mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 10mg/mL. A viabilidade e a contagem das células foram realizadas com o auxílio de azul de tripan em câmara de Neubauer. O HMB utilizado para as culturas foi obtido da Alfa Aesar (Heysham, UK) na forma de ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico 98%. Soluções estoque de HMB 100 mM pH 7,3 em meio de cultura RPMI foram preparadas e filtradas em filtros 0,2 µM Millipore (Livingston, UK). As concentrações de HMB utilizadas nesses experimentos foram 0 mM; 0,05 mM; 0,1 mM e 0,5 mM. Em placas de 24 poços, foram pipetados 450 µL solução de células contendo 10⁶ células/mL em cada poço. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura RPMI-1640 e/ou as soluções contendo HMB e/ou LPS 10 µg/mL dependendo da necessidade completando o volume total de 500 µL/poço.

3.1.3 - Quantificação da produção de nitrito (indicador da produção de óxido nítrico)

A produção de nitrito foi avaliada como descrito por Stuehr; Marletta (1985). O NO formado é rapidamente convertido a nitrito/nitrato. Por este método quantifica-se NO mensurando o nitrito/nitrato, utilizando o reagente de Griess que, ao reagir com o nitrito, produzirá cor lilás com leitura a 550 nm. Para esta dosagem, PBMC foram isoladas e cultivadas em placas de 24 poços como descrito anteriormente. Após as 48h, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi recolhido e misturado com o reagente de Griess

(1:1) em placas de cultura de 96 poços. Para o preparo deste reagente, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletlenodiamina (0,1%) dissolvido em H_3PO_4 (5%) e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H_3PO_4 (5%). Pouco antes do uso, as soluções foram misturadas na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizada com base em curvas padrões utilizando diferentes concentrações de $NaNO_3$ (15 μM até 1000 μM). As amostras foram lidas em leitor de microplacas (Bench Mark – Biorad) a 550 nm.

3.1.4 – Produção de TNF

O sangue total e PBMC isoladas foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 $\mu g/mL$) a 37 °C em atmosfera de 95% ar / 5% CO_2 , por 48 horas. As células foram estimuladas com LPS (10 $\mu g/mL$), em placas de 24 poços com volume final de 500 μL /poço. No final do período de cultivo, as placas foram centrifugadas para separação das células do meio. Alíquotas do meio foram congeladas (-20 °C) para posterior análise das citocinas, através de sistemas comerciais para ELISA para TNF (eBioscience – California, EUA) segundo as metodologias descritas pelo fabricante. Os resultados foram expressos na forma de índice de estimulação, dividindo-se a quantidade de TNF produzida em pg/mL pelas células estimuladas com LPS pela quantidade produzida pelas mesmas células sem estímulo.

3.2 – Experimentos com a linhagem de células Raw 264.7

3.2.1 - Reagentes e sistemas comerciais

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A. Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*., concanavalina A (ConA) e o meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foram provenientes da Sigma Chemical Co. (EUA). O antibiótico (penicilina e estreptomicina) e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Gibco (São Paulo, BR). Os sistemas comerciais para mensuração de citocinas por ELISA foram obtidos da R&D Systems Ltd (Abingdon, UK) e da Biosource – Invitrogen (Califórnia, EUA)

3.2.2 – Células Raw 264.7

As células Raw 264.7 foram originalmente estabelecidas a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia Abselon (A-MuLV) em um camundongo macho. São células com características de monócitos/macrófagos de crescimento semi-aderente. Possuem capacidade de produzir óxido nítrico e TNF quando estimuladas com LPS. Células Raw 264.7 foram obtidas da Coleção Européia de Culturas Celulares (ECACC) (Salisbury, UK). Estas células foram mantidas em subconfluência (70-80%) em ar 95%, 5% CO₂ com umidade e temperatura de 37°C controladas. As culturas de manutenção das células e para os experimentos foram realizadas com *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% SFB, glutamina (concentração final 2 mM), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram mantidas em frascos de 25 cm² entre 2-4x10⁴ células/cm². Nestes frascos, as células eram mantidas em aproximadamente 6 mL de meio DMEM completo. As células foram rotineiramente contadas em câmara de Neubauer e o número de células viáveis determinado por exclusão em azul de tripan 0,1%. As células eram repicadas duas vezes por semana. Para os experimentos usando HMB, foram usadas células entre a sétima e a vigésima passagem.

3.2.3 – Capacidade de adesão das células Raw 264.7

Cento e sessenta microlitros de suspensão de células Raw 264.7 (2x10⁵ células/mL) foram pipetados por poço em placas de 96 poços. O volume total por poço foi completado para 200 µL com meio DMEM e/ou soluções contendo HMB e/ou LPS (concentração final 10µg/mL) dependendo da necessidade para atingir a concentrações finais de HMB desejadas (0; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mM). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 3 h. Após este período, foi realizada a técnica de Rosen e Gordon (1987), com algumas modificações. As células aderidas à microplaca foram fixadas pela incubação com 150 µL de metanol. Após 10 minutos em temperatura ambiente, o metanol sobrenadante foi descartado e a placa foi deixada por 10 minutos em estufa a 37 °C para secar o resíduo metanólico. Foram então adicionados 100 µL de solução de Giemsa (0,2%, v:v, em água destilada). Após 40 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e cada poço da placa foi lavado com água destilada. O corante restante na placa, impregnado apenas nos macrófagos das amostras, foi então

solubilizado com 200 μL de metanol. A absorbância da solução resultante foi lida em espectrofotômetro para microplacas (Benchmark®, Bio Rad), em comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à situação controle.

3.2.4 – Proliferação de células Raw 264.7 por marcação com diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA)

Uma solução estoque de diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA) (5 mg/mL) foi mantida a -20°C . Esta solução foi diluída oito vezes para preparação da solução de trabalho em cada experimento. Dez microlitros da solução de trabalho foram adicionados para cada mL de suspensão de células (2×10^5 células/mL) em meio DMEM pré-aquecido sem SFB. Após 10 minutos de incubação a 37°C no escuro, as células foram diluídas 1:1 meio de cultura DMEM com SFB 10% gelado e incubadas por 5 minutos em gelo na ausência de luz. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em meio completo (DMEM, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10% SFB) para obter concentração final de 2×10^5 cels/mL. Cento e sessenta microlitros da suspensão de células foram pipetados por poço, em placas de 96 poços. O volume total por poço foi completado para 200 μL com de meio de cultura ou meio de cultura mais 20 μL HMB para atingir a concentração final desejada (0; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mM). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 por 72 h. Após este período as células foram lavadas duas vezes em PBS e adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur e software Cell-Quest-Pro. Foram adquiridas 10000 células para posterior análise usando o software Weasel v.2.6.1. A fluorescência do CFDA presente nas células parentais é diluída pela metade para as filhas assim que cada ciclo celular é completado, desta maneira após sucessivos ciclos celulares as células apresentam progressiva diminuição da intensidade de fluorescência média (MFI). Amostras com MFI maiores representam células que completaram menos ciclos celulares, enquanto que amostras com MFI menores representam células que sofreram várias divisões.

3.2.5 – Contagem das células após 72h de cultura

Alíquotas de 20 μ L das mesmas células Raw 264.7, usadas no ensaio de proliferação por marcação com CFDA, foram coletadas após 72h de cultura para contagem do número de células. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e o número de células viáveis determinado por exclusão em azul de tripan 0,1%. Os resultados estão apresentados como percentual, usando as células não expostas ao HMB como referência.

3.2.6 – Quantificação de Nitrito, TNF e IL-1 β em sobrenadantes de cultura de células Raw 264.7

Cento e sessenta microlitros de suspensão de células Raw 264.7 (2×10^5 células/mL) foram pipetados por poço em placas de 96 poços. O volume total por poço foi completado para 200 μ L com meio DMEM e/ou soluções contendo HMB e/ou LPS (concentração final 10 μ g/mL) dependendo da necessidade para atingir a concentrações finais de HMB desejadas (0; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mM). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 48 h. Após este período, as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm e alíquotas do meio de cultura foram coletadas para avaliação das concentrações de TNF e IL-1 β por sistemas comerciais para ELISA, R&D Systems Ltd e Biosource – Invitrogen, respectivamente. Os resultados obtidos para essas citocinas foram representados como média em pg/mL de pelo menos três experimentos. A quantidade de nitrito nos sobrenadantes foi avaliada pelos mesmos procedimentos descritos para as células dos ratos Wistar e está representada em μ M.

3.3 – Experimentos com células Humanas

3.3.1 - Reagentes e Anticorpos usados nos experimentos com células humanas

A grande maioria reagentes usados foram obtidos da Sigma (Poole, UK). Aqueles que foram obtidos de outros fornecedores estão com a respectiva indicação ao lado. O HMB utilizado para as culturas foi obtido da Alfa Aesar (Heysham, UK) na forma de ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico 98%. Soluções estoque de HMB 100 mM pH 7,3 em meio de cultura RPMI foram preparadas e filtradas em filtros 0,2 μ M Millipore (Livingston, UK). O anticorpo monoclonal de

camundongo anti-CD25 (IL-2R α) humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), o anticorpo de camundongo IgG1 isotipo não reativo, o anticorpo monoclonal de camundongo anti-fosfo-ERK1/2 humana (T202/Y204) conjugado com Ficoeritrina (PE) e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-fosfo-ERK1/2 humana (T202/Y204) não conjugado foram comprados da BD Biosciences (Abingdon, UK).

3.3.2 - Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico humanas

Os experimentos envolvendo células humanas foram realizados no laboratório de metabolismo do instituto de ciências do desenvolvimento da Universidade de Southampton (Southampton, UK). Sangue venoso foi coletado de oito voluntários saudáveis (3 homens e 5 mulheres) não fumantes com idade entre 23 e 45 anos. Todos os voluntários assinaram termo de consentimento livre e esclarecido segundo os padrões da Universidade de Southampton (ANEXO 2). Os mesmos foram orientados a não praticarem atividade física vigorosa e evitar a ingestão de etanol, nas 24 e 72 horas, respectivamente, que antecederam a coleta de sangue, na tentativa de obter amostras biológicas de pacientes em estado metabólico de equilíbrio. Foram coletados 10 mL de sangue venoso, em tubos do tipo sistema Vacutainer[®] BD Biosciences (Abingdon, UK) com heparina sódica. O sangue total foi fracionado por gradiente de densidade com Histopaque-1077 após centrifugação a 300 g por 20 min a temperatura ambiente. A camada de células superior foi coletada e lavada duas vezes em meio RPMI-1640 suplementado com glutamina 2mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 10mg/mL. A viabilidade e a contagem das células foram realizadas com o auxílio de azul de tripan em câmara de Neubauer.

3.3.3 – Análise dos parâmetros de proliferação de células mononucleares sanguíneas através da marcação com diacetato de 5-carboxifluoriceína

Uma solução estoque de diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA) (5 mg/mL) foi mantida a -20 °C. Esta solução foi diluída oito vezes para preparação da solução de trabalho em cada experimento. Dez microlitros da solução de trabalho foram adicionados para cada mL de suspensão de células PBMC (10⁶ células/mL) em meio RPMI pré aquecido sem SFB. Após 10 minutos de incubação a 37°C no escuro, as células foram diluídas 1:1 meio de cultura RPMI com

SFB 10% gelado e incubadas por 5 minutos em gelo na ausência de luz. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em meio completo (RPMI-1640, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/mL, 10% SFB) para obter concentração final de 10^6 cells/mL. Cento e sessenta microlitros da suspensão de células foram pipetados por poço, em placas de 96 poços, com 20 μ L de ConA (50 μ g/mL) (estimuladas) ou meio RPMI (não estimuladas). O volume total por poço foi completado para 200 μ L com 20 μ L de HMB para atingir a concentração final desejada (0; 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 mM). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 96 h. Após este período as células foram lavadas duas vezes em tampão de marcação e adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur e software Cell-Quest-Pro. Foram adquiridas 10000 células para posterior análise usando o software Weasel v.2.6.1. A fluorescência original do CFDA presente nas células parentais é diluída pela metade para as filhas assim que cada ciclo celular é completado. Desta maneira, a análise por citometria de fluxo permite identificar a proporção de células que passaram por ciclos celulares sequenciais. Foram calculados o índice de proliferação e o percentual de células que não entrou em divisão celular. O índice de proliferação foi calculado pela soma das células presentes em todas as gerações e posterior divisão pela soma das células parentais necessárias para originar as células em cada geração. O percentual de células parentais que não entrou em divisão foi calculado pela seguinte fórmula: $100 - [(células \text{ em todas as gerações} / células \text{ parentais que proliferaram}) \times 100]$ (LYONS, 2000).

3.3.4 – Análise das fases do ciclo celular em células mononucleares sanguíneas

Para a análise das fases do ciclo celular as células utilizadas no ensaio de marcação com CFDA, descrito acima, foram lavadas duas vezes em salina tamponada com fosfatos (PBS) e ressuspensas em 400 μ L de tampão de ensaio composto de: água destilada, 0,1% Triton X-100, citrato de sódio 1 mg/mL, RNase A 50 μ g/ml (Invitrogen; Renfrew, UK) e iodeto de propídio (PI) 50 μ g/ml. As células foram incubadas a 4°C por 30 min. A determinação da distribuição pelas fases do ciclo celular foi realizada por aquisição em citômetro de fluxo FACScalibur e software Cell-Quest-Pro. Foram adquiridas 10000 células para posterior análise usando o software Weasel v.2.6.1 (TELFORD, KING, FRAKER, 1991).

3.3.5 – Concentração de citocinas em culturas de células humanas

Sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico marcadas com CFDA, cultivadas por 96h em presença de HMB (forma ácida) em concentrações crescentes (0; 0,1; 1 e 10 mM) foram coletados e congelados em recipientes estéreis a -20°C. No momento do ensaio, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e concorrentemente usadas para análise das concentrações de interferon- γ (INF- γ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral- α (TNF). Esta foi realizada através do citometria de fluxo com sistema comercial para mensuração de citocinas (ensaio citométrico de esferas ordenadas - CBA - Human Th1/Th2 cytokine kit II – BD-Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras das células estimuladas foram diluídas 5x para adequação a curva padrão do ensaio. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur através do software CellQuest-Pro. Curvas padrões para cada citocina foram plotadas e as concentrações de cada amostra teste foram calculadas usando o software FCAP array v.1.0.2 (BD-Biosciences). Os dados foram expressos como percentual da concentração da situação em que as células estavam expostas somente a ConA.

3.3.6 - Análise da expressão de CD25 na superfície em células mononucleares do sangue periférico humanas

A determinação quantitativa dos marcadores de superfície em células mononucleares sanguíneas humanas foi realizada através de citometria de fluxo (FACScalibur). A aquisição dos dados foi realizada através do software CellQuest-Pro, segundo metodologia descrita por Sanderson *et al.* (1997). Células mononucleares do sangue periférico ($1,6 \times 10^5$ células/poço) cultivadas por 24h em presença de HMB em concentrações crescentes (0; 0,1; 1 e 10 mM) e estimuladas ou não com ConA foram usadas para esta determinação. Após as 24h de culturas, as células foram transferidas para tubos de citometria de fluxo e lavadas duas vezes com tampão de marcação da Pharmigen (Pharmigen Stain Buffer – BD-Biosciences). Todas as amostras foram então fixadas com tampão de fixação BD Cytofix™ (BD – Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente mantidas em tampão de marcação para uso futuro. Subseqüentemente, as células foram mantidas a 4°C por 30 minutos em presença de 15 μ L

anticorpo monoclonal (mAb) de camundongo marcado com isotiocianato de fluoriceína (FITC) anti-CD25 humano (IL-2R α). Os controles negativos foram incubados com anticorpo isotipo não reativo IgG1. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes em tampão de marcação e analisadas. Foram adquiridos 10000 eventos nas respectivas regiões onde as células de interesse estavam presentes, os quais foram analisados posteriormente com o software Weasel v2.6.1. Os dados foram expressos como percentual da expressão da situação em que as células não estavam expostas ao HMB ou a ConA, situação denominada controle (C).

3.3.7 – Expressão intracelular de p-ERK1/2 em células mononucleares do sangue periférico humanas

A abundância de fosfo-ERK1/2 (pERK1/2) em PBMC foi realizada por citometria de fluxo após expor as células a diferentes concentrações de HMB (0; 0,1; 1 e 10 mM) por 24h. As culturas foram realizadas como descrito nas seções anteriores. Após as 24h de culturas, as células foram transferidas para tubos de citometria de fluxo e lavadas duas vezes com tampão de marcação da Pharmigen (Pharmigen Stain Buffer – BD-Biosciences). Todas as amostras foram então fixadas com tampão de fixação BD CytofixTM (BD – Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez fixadas, as células foram permeabilizadas usando tampão Phosflow – Perm Buffer III (BD Biosciences) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a marcação das proteínas intracelulares as células foram incubadas por 30 minutos com 20 μ L de anticorpo monoclonal de camundongo anti-fosfo-ERK1/2 humana (T202/Y204) conjugado com Ficoeritrina (PE) (BD Biosciences). Os controles negativos foram incubados com anticorpo monoclonal de camundongo anti-fosfo-ERK1/2 humana (T202/Y204) não conjugado (BD Biosciences). Finalmente as células foram lavadas duas vezes em tampão de marcação e adquiridas em citômetro de fluxo FACScalibur e software Cell-Quest-Pro. Foram adquiridas 10000 células para posterior análise usando o software Weasel v.2.6.1.

3.4 - Análise estatística

Os dados de experimentos envolvendo células de ratos Wistar e linhagens celulares foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados de experimentos envolvendo células humanas foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Todos os dados revelaram

seguir distribuição normal após serem submetidos ao teste de normalidade D'Agostinho Pearson. A análise de variância de uma via (one way-ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey foi utilizada para avaliar os dados de experimentos onde células foram expostas a concentrações crescentes de HMB. Para comparação de situações onde existiam células estimuladas e não estimuladas foi empregado o teste t de *student* para confirmação da eficácia do estímulo. O valor de $P < 0,05$ foi adotado como nível de significância. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas em software graphpad prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA).

4. RESULTADOS

4.1 – Influência do HMB sobre células derivadas de ratos Wistar

4.1.1 - HMB e produção de TNF por células do sangue total e PBMC

O sangue total de ratos Wistar foi cultivado em presença ou ausência de HMB. As células imunitárias sanguíneas respondem a estímulos como o LPS de várias maneiras, entre estas está a produção de TNF. Nenhuma das concentrações de HMB testadas (0,05; 0,1 e 0,5 mM) modificou de maneira significativa a quantidade de TNF nos sobrenadantes das culturas realizadas por 48h. As células estimuladas com LPS produziram em todas as situações aproximadamente 25 vezes mais TNF do que as células não estimuladas (FIGURA 2)

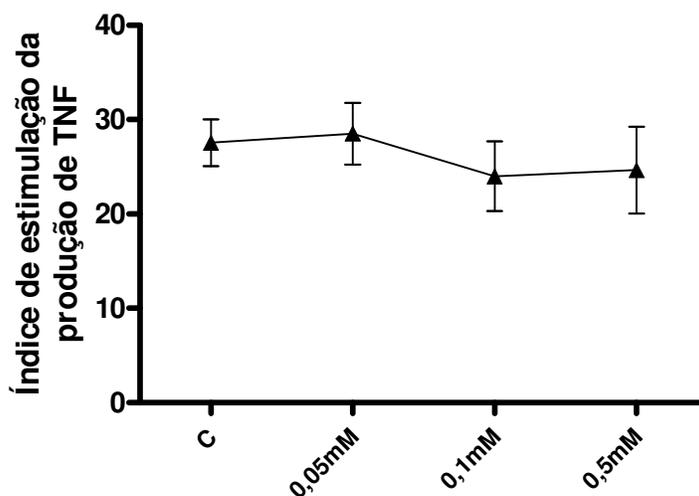


FIGURA 2 – Produção de TNF em culturas de sangue total de ratos em presença de LPS (10 µg/mL) por 48h. Onde indicado foi adicionado β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB) ao meio de cultura nas respectivas concentrações: 0,05 mM; 0,1 mM e 0,5 mM. O índice é resultado da divisão do valor provindo das células estimuladas pelo valor das células não estimuladas. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Ao submeter PBMC de ratos Wistar a concentrações crescentes de HMB (0,05; 0,1 e 0,5 mM) não houve qualquer mudança na quantidade de TNF nos sobrenadantes das células cultivadas por 48h. As células estimuladas com LPS produziram em todas as situações aproximadamente 5,9 vezes mais TNF do que as células não estimuladas (FIGURA 3)

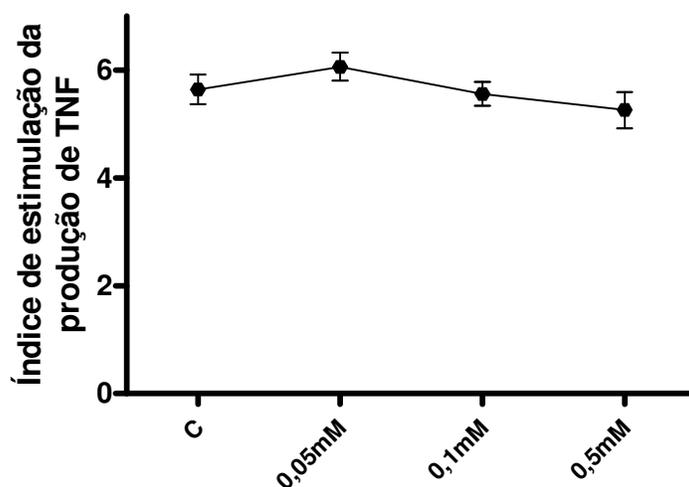


FIGURA 3 – Produção de TNF por células mononucleares sanguíneas de ratos estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48h. Onde indicado foi adicionado β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) ao meio de cultura nas respectivas concentrações: 0,05 mM, 0,1 mM e 0,5 mM. O índice estimulação da produção é resultado da divisão do valor provindo das células estimuladas pelo valor das células não estimuladas. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.1.2 - Efeito do HMB sobre a quantidade de nitrito e TNF em sobrenadante de culturas de PBMC de ratos

As mesmas amostras de sobrenadante usadas para mensuração do TNF foram também submetidas a análise do conteúdo de nitrito. Contudo o método utilizado para detecção do nitrito neste estudo só é eficaz em amostras que não contenham plasma. Desta maneira a técnica em questão só foi aplicada aos sobrenadantes das culturas de PBMC. Não houve qualquer efeito do HMB sobre a produção de nitrito das células PBMC estimuladas com LPS após 48h de cultura (FIGURA 4).

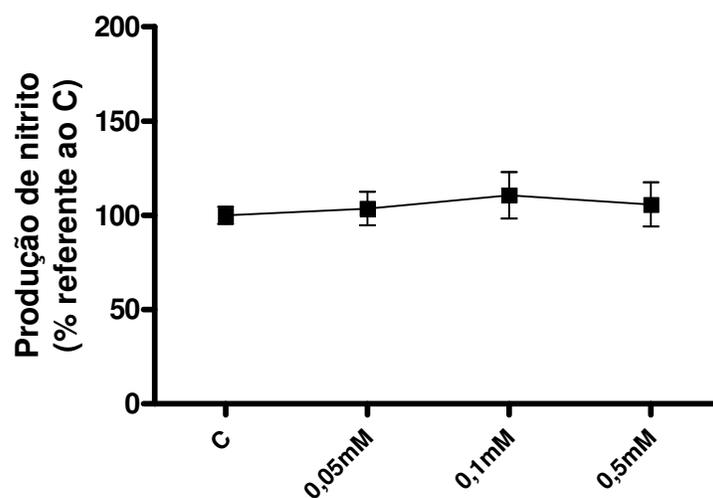


FIGURA 4 – Produção de nitrito por células mononucleares sanguíneas de ratos estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48h. Onde indicado foi adicionado β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) ao meio de cultura nas respectivas concentrações: 0,05 mM, 0,1 mM e 0,5 mM. As células não estimuladas produziram quantidades não detectáveis de nitrito, por esta razão os resultados estão organizados na forma de percentual do controle. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.2 – Efeitos do HMB sobre células Raw 264.7

4.2.1 - Efeitos do HMB sobre a proliferação de células Raw 264.7

As células Raw 264.7 foram carregadas com o marcador fluorescente CFDA. Conforme as células originais vão se dividindo, e produzindo células filhas, a fluorescência original vai sendo distribuída uniformemente para as novas células formadas. Esta característica gera um perfil de perda de fluorescência progressiva pelas células quando analisadas por citometria de fluxo. Desta maneira, amostras contendo células que apresentam maior intensidade de fluorescência média (MFI) não passaram pelo mesmo número de divisões celulares quando comparadas a células com menores intensidades de MFI. Apenas concentrações muito altas de HMB (ex: 10 mM) foram capazes de provocar mudança no perfil de perda de fluorescências das células Raw 264.7 após 72h em cultura (FIGURA 5).

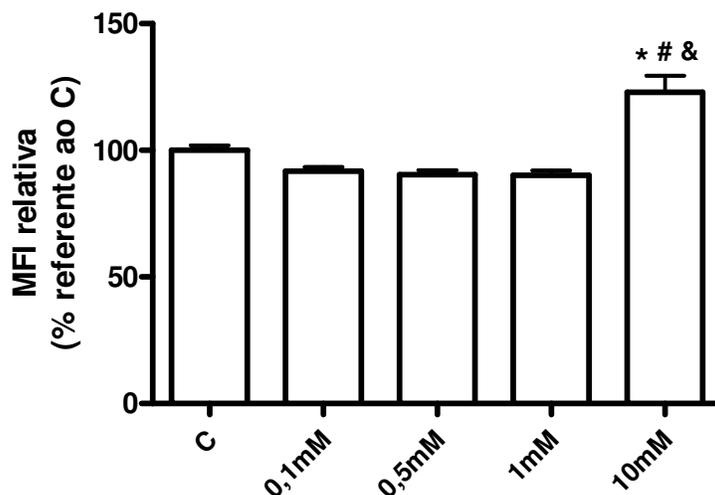


FIGURA 5 – Intensidade de fluorescência média (MFI) relativa após cultura das células Raw 264.7 por 72h. Onde indicado foi adicionado β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) ao meio de cultura nas respectivas concentrações: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 10 mM. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ quando comparado a C. # $P < 0,05$ quando comparado a 0,1 mM e 0,5 mM. & $P < 0,05$ quando comparado a 1 mM.

4.2.2 - Número de células Raw 264.7 viáveis após 72h de cultura em presença de HMB

As mesmas células Raw 264.7 que foram marcadas com CFDA, foram também usadas para se avaliar o número de células após o período de 72h em cultura. Esta análise revelou que o HMB, na concentração de 10 mM, reduziu significativamente ($P < 0,05$) o número de células quando comparado a das culturas sem HMB, ou contendo HMB nas concentrações que variaram de 0,1 a 1 mM (FIGURA 6).

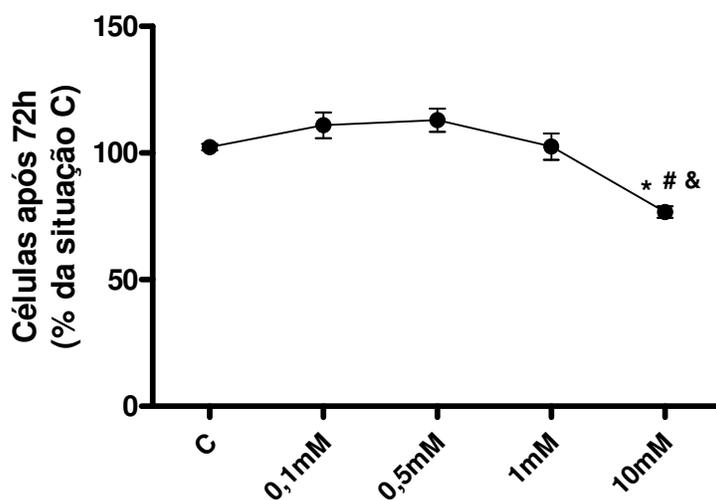


FIGURA 6 – Células Raw 264.7 após 72h de cultura na presença de diferentes concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) no meio de cultura: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 10 mM. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. O número de células na situação controle (C) foi considerado como 100%. Os valores respectivos encontrados para cada concentração de HMB testada foram calculados com base nos dados da situação controle. * $P < 0,05$ quando comparado a C. # $P < 0,05$ quando comparado a 0,1 mM e 0,5 mM. & $P < 0,05$ quando comparado a 1 mM.

4.2.3 - Influência aguda do HMB na capacidade adesiva células Raw 264.7

As células Raw 264.7 crescem em condições de semi-aderência. Desta maneira foi realizado ensaio de adesão para averiguar se a exposição destas células ao HMB modifica a capacidade adesiva induzida ou não por LPS. Quando as células foram estimuladas com LPS, a adesão foi aumentada em aproximadamente 25% em comparação às situações de ausência de LPS ($P < 0,05$). Contudo isto não se repetiu para a situação onde a concentração de HMB no meio de cultura foi de 1 mM, pois somente a presença do HMB pareceu também aumentar a adesão das células. Apesar desse comportamento na concentração de 1 mM sem estímulo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as células em contato com o LPS por 3h qualquer que fosse a concentração de HMB usada (FIGURA 7).

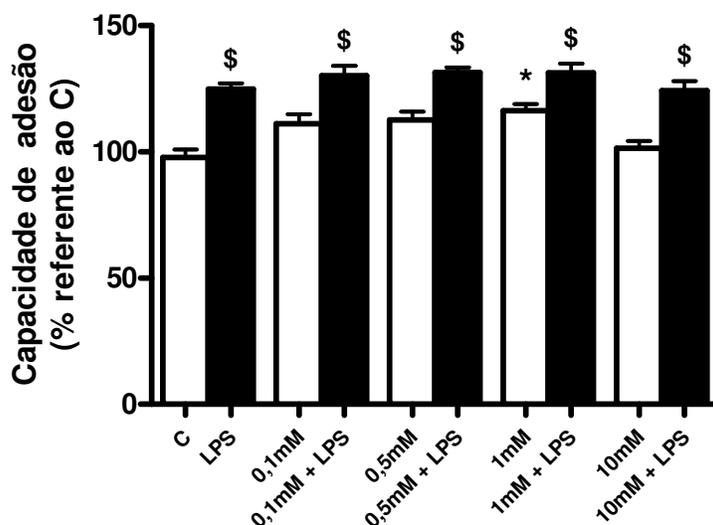


FIGURA 7 – Capacidade de adesão das células Raw 264.7 após três horas de cultura na presença ou ausência de LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Onde indicado foi adicionado β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) ao meio de cultura nas respectivas concentrações: 0,1mM, 0,5mM, 1mM e 10mM. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. \$ $P < 0,05$ quando comparado a respectiva situação sem estímulo. * $P < 0,05$ quando comparado a C.

4.2.4 - Efeitos do HMB sobre a produção de Óxido Nítrico por células Raw 264.7

Após o estímulo com LPS, as células Raw 264.7 produzem vários mediadores relacionados a respostas inflamatórias e microbicidas. Dentre estes mediadores está o óxido nítrico. Este possui curta meia vida e por isso é indiretamente mensurado pela concentração de nitrito no sobrenadante de culturas celulares. Quando células Raw 264.7 são mantidas em cultura sem estímulo algum elas não produzem óxido nítrico em quantidades detectáveis pelo método de Griess. Desta maneira, as células foram cultivadas por 48h em presença de LPS e concentrações crescentes de HMB. A presença de altas concentrações HMB (10 mM) no meio de cultura causou diminuição da concentração de nitrito (FIGURA 8).

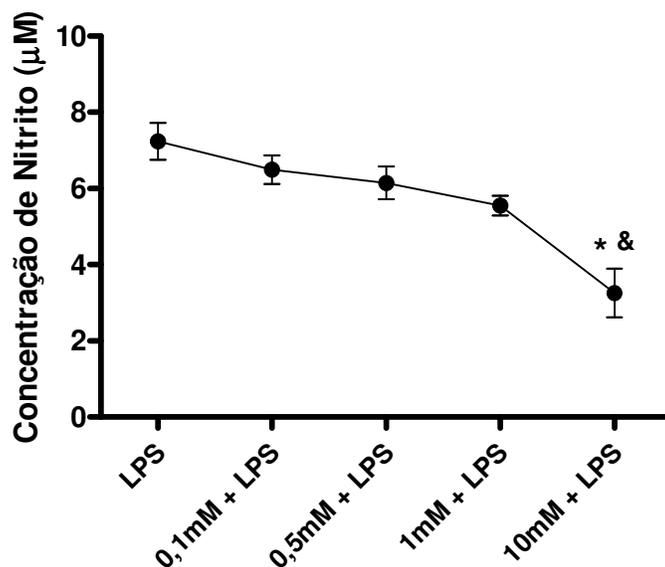


FIGURA 8 – Concentração de nitrito (μM) em meio de cultura após cultura das células Raw 264.7 estimuladas com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) por 48h. Onde indicado foi adicionado β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) ao meio de cultura nas respectivas concentrações: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM e 10 mM. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ quando comparado a LPS. & $P < 0,05$ quando comparado a 0,1 mM+LPS, 0,5 mM+LPS e 1 mM+LPS.

4.2.5 - Efeitos do HMB sobre a produção de IL-1 β e TNF por células Raw 264.7

Os mesmos sobrenadantes das culturas para mensuração de nitrito foram utilizados para a quantificação de IL-1 β e TNF. Contudo, foram avaliadas as concentrações dessas citocinas inflamatórias somente para as situações onde o HMB estava nas seguintes concentrações: 0 mM, 0,1 mM, 1 mM e 10 mM. Todas as amostras contendo HMB mostraram quantidades significativamente menores de IL-1 β quando comparadas a situação controle, somente com LPS. Enquanto as células cultivadas somente com LPS produziram 165pg/mL, a produção em presença de HMB não foi maior que 135 pg/mL. As menores concentrações de IL-1 β foram apresentadas pelas amostras com tendo HMB 10 mM (~91 pg/mL), padrão similar ao dos efeitos do HMB sobre a produção de nitrito nestas células (FIGURA 9A). Quando analisadas as concentrações de TNF nessas mesmas amostras, apenas na concentração de 10 mM o HMB produziu alguma influência na liberação dessa citocina. Interessantemente a maior concentração testada fez com que a quantidade de TNF nos sobrenadantes fosse um pouco maior que o dobro (~1000 pg/mL) quando em comparação as outras situações experimentais (~450 pg/mL) (FIGURA 9B).

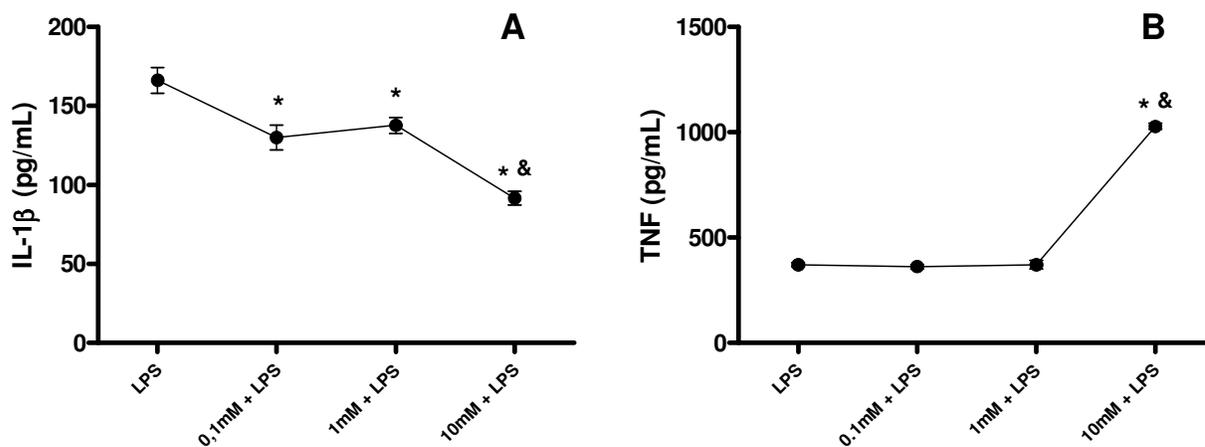


FIGURA 9 – Concentração de IL-1 β (pg/mL) (A) e de TNF (pg/mL) (B) em meio de cultura após cultivo das células Raw 264.7 por 48h na presença de LPS (10 μ g/mL) e diferentes concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) no meio de cultura: 0,1 mM, 1 mM e 10

mM. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. * $P < 0,05$ quando comparado a LPS. & $P < 0,05$ quando comparado a 0,1 mM+LPS e 1 mM+LPS.

4.3 – Efeitos do HMB sobre PBMC de humanos

4.3.1 - Efeito do HMB na proliferação de PBMC humanas

Para investigar os efeitos sobre a proliferação, PBMC foram pré-marcadas com CFDA, um marcador que se liga a região aminoterminal de proteínas citoplasmáticas. Com o transcorrer das divisões celulares o CFDA é passado para as células filhas. O aumento da concentração de HMB no meio de cultura alterou o percentual de distribuição das células filhas nas gerações formadas quando comparado a situação onde só estava presente o mitógeno ConA. O percentual de células parentais (células originais que não dividiram) também foi avaliado por citometria de fluxo. O índice de proliferação diminuiu significativamente na situação HMB 10 mM (FIGURA 10). A proporção de células em cada geração não foi afetada pelas menores concentrações testadas (0,1 mM e 0,5 mM) comparada as proporções observadas na situação ConA (FIGURA 11A e FIGURA 11B). No entanto, concentrações maiores alteraram o padrão de divisão: 1 mM e 5 mM resultaram em proporções aumentadas na 5^a geração e diminuída na 6^a geração (FIGURA 11C e FIGURA 11D). Quando o HMB foi usado a 10 mM existiu um grande percentual de células parentais e também na 2^a, 3^a. e 4^a. gerações. Enquanto que na 5^a. e 6^a foram encontradas baixas proporções de células filhas (FIGURA 11E). Análises adicionais demonstraram que o percentual de células parentais que não dividiram, quando estimuladas com ConA, foi consideravelmente maior quando o HMB foi usado na concentração de 10 mM quando comparado ao percentual de células que não dividiram em ConA ou ConA+0,1 mM (FIGURA 12)

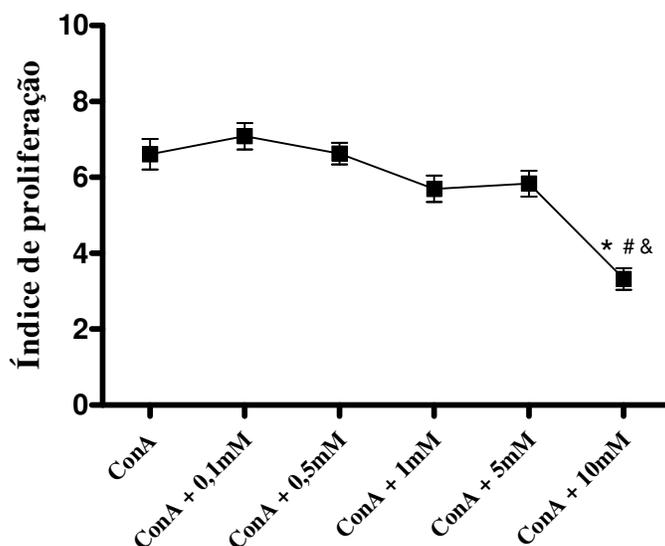


FIGURA 10 – Índice de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas cultivadas em presença de várias concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) que não entrou em divisão celular. As células foram separadas do sangue total de 8 voluntários, marcadas com diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA) e cultivados em presença de diferentes concentrações de HMB (0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM e 10mM) e também ConA (5 μ g/mL) por 96 hr. A fluorescência do CFDA foi analisada por citometria de fluxo. O índice de proliferação foi calculado pela soma das células presentes em todas as gerações e posterior divisão pela soma das células parentais necessárias para originar as células em cada geração. Os dados estão representados na forma de média \pm DP de 8 indivíduos. * $P < 0,05$ quando comparado a ConA. # $P < 0,05$ quando comparado a ConA + 0,1 mM. & $P < 0,05$ quando comparado a ConA + 0,5 mM, ConA + 1 mM e ConA + 10 mM.

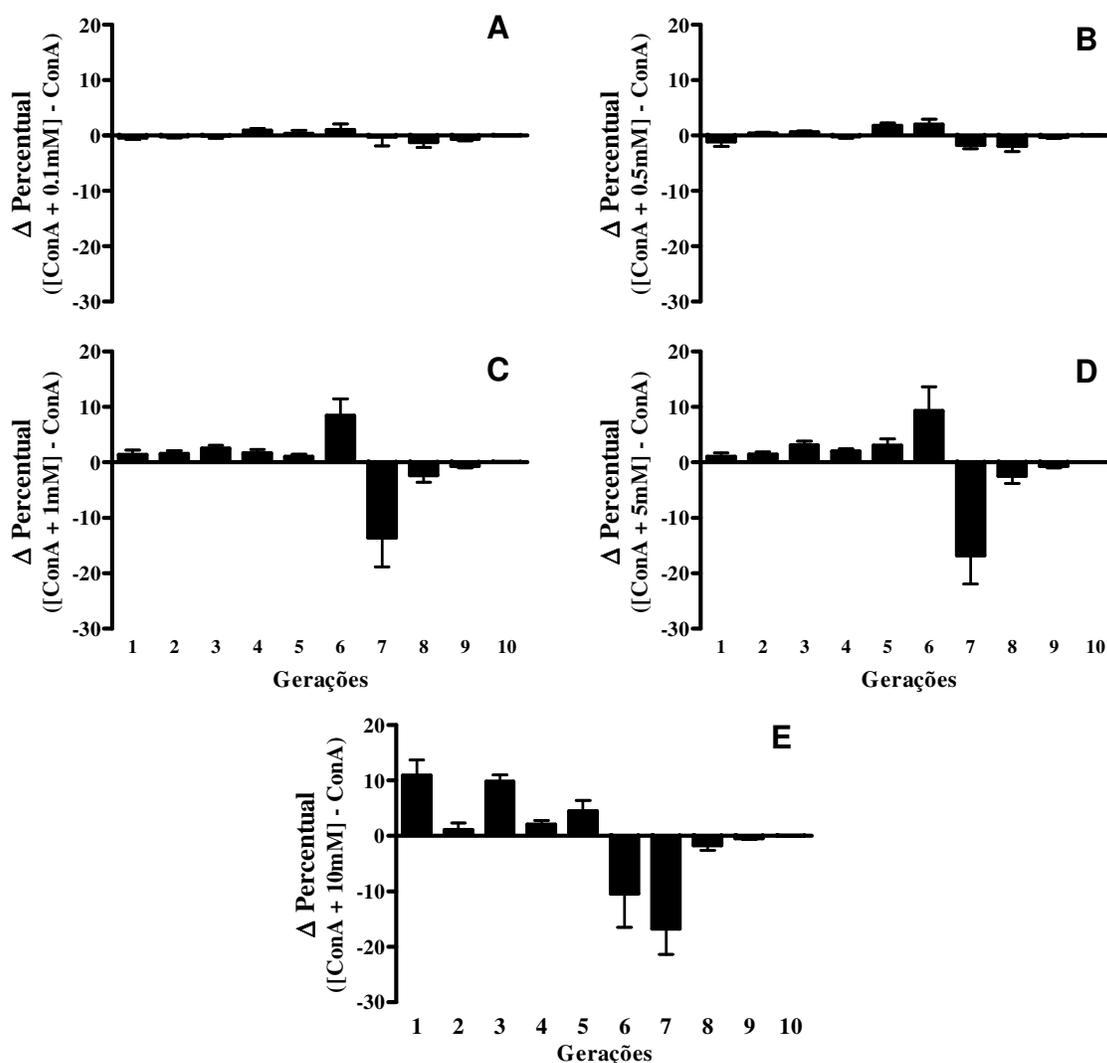


FIGURA 11 – Perfil de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas cultivadas em presença de várias concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). As células foram separadas do sangue total de 8 voluntários, marcadas com diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA) e cultivados em presença de diferentes concentrações de HMB (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM) e também ConA (5 μ g/mL) por 96 hr. A fluorescência do CFDA foi analisada por citometria de fluxo. Após a análise, a distribuição das gerações das células cultivadas na ausência de HMB (ConA) foi subtraída das distribuições dos outros tratamentos. (A) ConA + 0,1 mM HMB; (B) ConA + 0,5 mM HMB; (C) ConA + 1 mM HMB; (D) ConA + 5 mM HMB; (E) ConA + 10 mM HMB. Valores negativos no eixo y representam abundâncias celulares menores para a respectiva geração, enquanto valores positivos significam

abundâncias celulares maiores naquela geração para o tratamento específico quando comparado a ConA. No eixo x estão representadas as gerações celulares formadas durante o tempo de cultura. Os dados estão representados na forma de média \pm DP de 8 indivíduos.

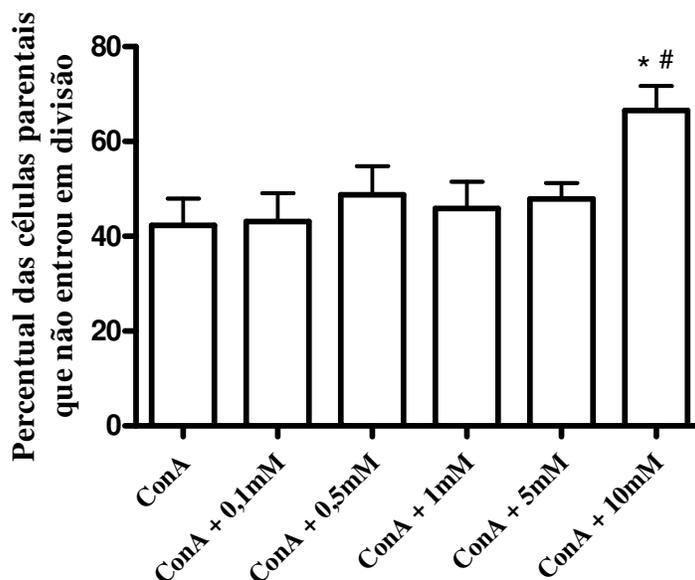


FIGURA 12 – Percentual de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas, cultivadas em presença de várias concentrações de β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), que não entrou em divisão celular. As células foram separadas do sangue total de 8 voluntários, marcadas com diacetato de 5-carboxifluoriceína (CFDA) e cultivados em presença de diferentes concentrações de HMB (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM) e também ConA (5 μ g/mL) por 96 hr. A fluorescência do CFDA foi analisada por citometria de fluxo. O percentual de células parentais que não entrou em divisão foi calculado pela expressão: $100 - [(células em todas as gerações / células parentais que dividiram) \times 100]$. Os dados estão representados na forma de média \pm DP de 8 indivíduos. * $P < 0,05$ quando comparado a ConA. # $P < 0,05$ quando comparado a ConA + 0,1mM.

4.3.2 - Efeito do HMB na progressão do ciclo celular em PBMC humanas

A estimulação das células PBMC com ConA em cultura resultou em aproximadamente 66% das células nas fases G0-G1 após 96h de cultura e aproximadamente 22% e 10% das células na fase S e G2-M, respectivamente. Estes percentuais não foram significativamente afetados pelo HMB a 0,1 e 1 mM. Contudo, a 10 mM o HMB aumentou expressivamente o percentual de células nas fases G0-G1 e diminuiu por conseqüência o percentual de células em S e G2-M (TABELA 1)

TABELA 1– Fases do ciclo celular de células mononucleares sanguíneas humanas, estimuladas com Concanavalina A (ConA) 5µg/mL, após 96h de cultura em presença de diferentes concentrações de β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB) (0,1 mM, 1 mM e 10 mM). Após a cultura as células foram fixadas e marcadas para citometria de fluxo. As fases do ciclo celular foram determinadas pela caracterização do conteúdo de DNA nuclear ligado ao iodeto de propídio (PI). Núcleos com intensidades de fluorescência menores foram considerados em fase G0-G1; núcleos com intensidade de fluorescência alta foram considerados como em fase G2-M; núcleos com intensidade de fluorescência intermediária foram considerados em fase S. Apenas dados de células estimuladas com ConA, visto que ~99% das células não estimuladas estavam com seus núcleos em fase G0-G1 (dados não apresentados). Os dados estão representados na forma de média ± DP de 8 indivíduos.

	ConA	ConA + 0,1mM	ConA + 1mM	ConA + 10mM
G0-G1 (%)	66,38 ± 3,95	62,81 ± 1,89	67,42 ± 8,15	75,03 ± 7,64* [#]
S (%)	21,86 ± 2,63	23,19 ± 3,74	20,25 ± 3,01	16,99 ± 2,66* [#]
G2-M (%)	9,83 ± 1,80	10,56 ± 2,37	8,80 ± 3,74	5,99 ± 3,01 [#]

* P<0,05 quando comparado a ConA. # P<0,05 quando comparado a ConA + 0,1 mM.

4.3.3 - Efeito do HMB nas concentrações de citocinas produzidas por PBMC

A concentração de citocinas em meio de cultura de células não estimuladas é freqüentemente muito baixa, e muitas vezes não detectável pelos métodos utilizados neste trabalho. Contudo a estimulação com ConA resultou em grande produção de todas as citocinas analisadas. A presença de HMB modificou de maneira distinta o perfil de produção das citocinas avaliadas (FIGURA 13). As concentrações de IL-2 e IL-4 foram significativamente menores para HMB 0,1 e 1 mM, mas não para 10 mM (FIGURA 13A e FIGURA 13B). O HMB causou diminuição concentração-dependente na produção de IFN- γ (FIGURA 13C) e de IL-10 (FIGURA 13D), sendo esta produção significativamente menor a partir da concentração de 1 mM a 10 mM de HMB. Para se determinar o efeito do HMB no balanço das respostas Th1 e Th2, a razão da produção de IFN- γ e IL-4 foi calculada, pois estas são citocinas características de linfócitos Th1 e Th2, respectivamente. Essa razão demonstrou que o HMB nas concentrações de 1 e 10 mM favoreceu certa mudança para balanço Th2 (FIGURA 13F). Por fim, todas as três concentrações testadas neste ensaio diminuíram significativamente a quantidade de TNF- α em meio de cultura em aproximadamente 35% (FIGURA 13E).

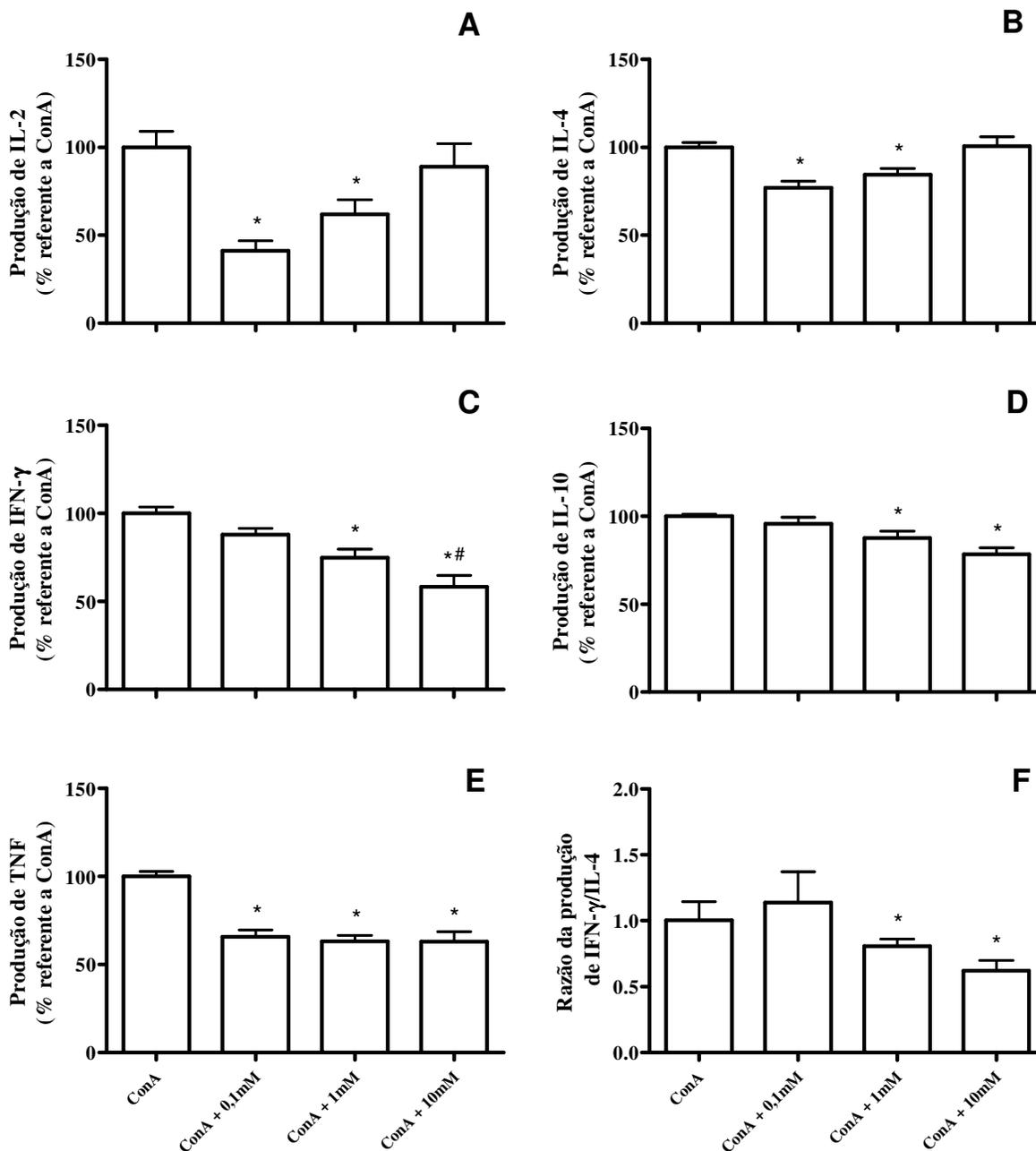


FIGURA 13 – Produção relativa de citocinas por PBMC humanas estimuladas com Concanavalina A (ConA) 5 μg/mL. As células foram cultivadas por 96h em presença de diferentes concentrações de β-hidroxi-β-metilbutirato (HMB) (0,1 mM, 1 mM e 10 mM) e após este período o meio de cultura foi coletado para a mensuração das citocinas. (A) Produção de interleucina-2 (IL-2). (B) Produção de interleucina-4 (IL-4). (C) Produção de interferon-γ (IFN-γ). (D) Produção de interleucina-10 (IL-10). (E) Produção de fator de necrose tumoral (TNF). (F)

Razão entre produção de IFN- γ e IL-4. Os dados estão representados na forma de média \pm DP de 8 indivíduos. * $P < 0,05$ quando comparado a ConA. # $P < 0,05$ quando comparado a ConA+0,1 mM.

4.3.4 - Efeito do HMB na expressão de CD25 em PBMC humanas

A estimulação com ConA estimulou significativamente a expressão de CD25 (IL-2R α) na superfície das PBMC. No entanto, a exposição destas células ao HMB por 24h não alterou expressão da proteína em questão tanto na presença quanto na ausência de ConA (FIGURA 14).

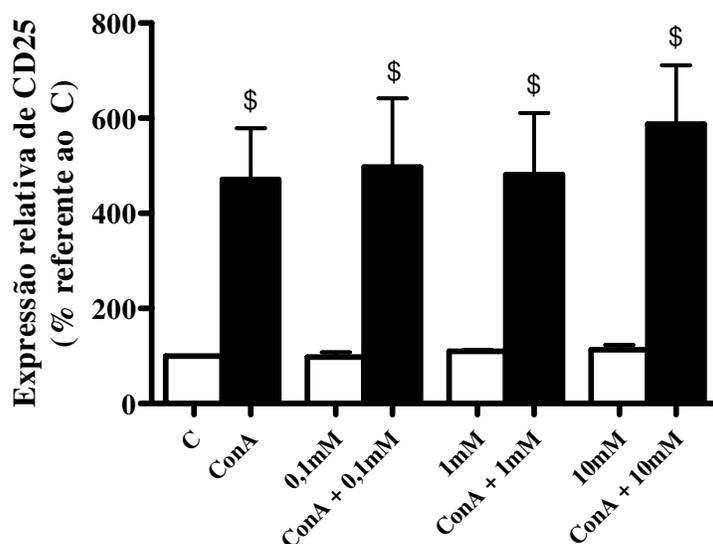


FIGURA 14 – Expressão relativa de CD-25 na superfície de células PBMC humanas estimuladas ou não com Concanavalina A (ConA) 5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram cultivadas por 24h em presença de diferentes concentrações de HMB (0,1 mM, 1 mM e 10 mM). Os dados estão representados na forma de média \pm DP de 8 indivíduos. \$ $P < 0,05$ quando comparado a respectiva situação sem estímulo.

4.3.5 - Efeito do HMB no conteúdo intracelular de pERK1/2 em PBMC humanas

As células estimuladas com ConA apresentaram grande aumento no conteúdo de pERK1/2. Contudo, a adição de HMB ao meio de cultura por 24h não promoveu alteração alguma nas células estimuladas ou não estimuladas. Curiosamente, as células em presença de HMB 10 mM sem adição de ConA apresentaram conteúdo ~45% maior de pERK1/2 quando comparadas as células C ($P < 0,05$) (FIGURA 15).

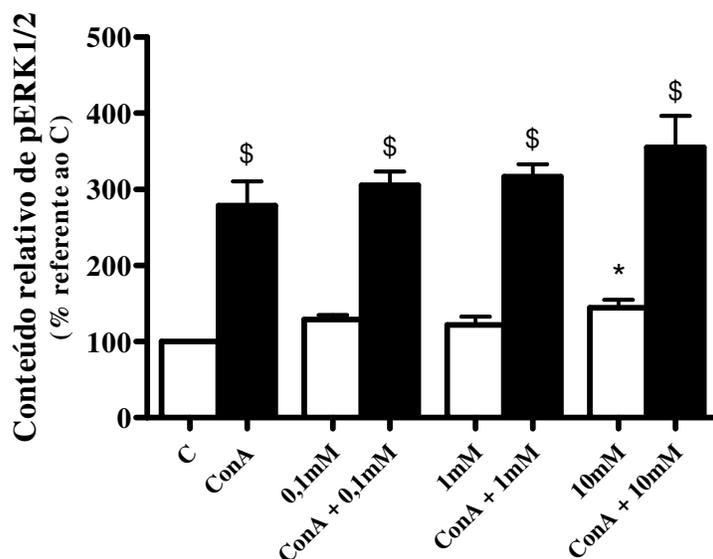


FIGURA 15 – Conteúdo intracelular relativo de pERK1/2 em PBMC humanas estimuladas ou não com Concanavalina A (ConA) 5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram cultivadas por 24h em presença de diferentes concentrações de HMB (0,1 mM, 1 mM e 10 mM). Os dados estão representados na forma de média \pm DP de 8 indivíduos. * $P < 0,05$ quando comparado a C. \$ $P < 0,05$ quando comparado a respectiva situação sem estímulo.

5. DISCUSSÃO

A suplementação com HMB vem sendo usada com sucesso em alguns estudos para atenuar a perda de massa corporal induzida por doenças como AIDS, caquexia oncológica e reumática (CLARK *et al.*, 2000; MAY *et al.*, 2002; MARCORA; LEMMEY; MADDISON, 2005). Mais recentemente, o uso de produtos contendo HMB por indivíduos com complicações clínicas de ordem inflamatória levantou suspeita sobre potencial ação antiinflamatória deste nutriente (HSIEH *et al.*, 2006 KUHLS *et al.* 2007). Nos estudos em humanos, o HMB é administrado como um de vários componentes do suporte nutricional aos indivíduos. Geralmente, os pacientes envolvidos ingerem 1,5 a 3g de HMB por dia, dependendo da quantidade do produto fonte de HMB que é consumida. Vukovich *et al.* (2001) mostraram que 2h após ingerir solução de 1,5 ou 3 g de HMB a concentrações plasmáticas dessa molécula atingem 0,11 mM e 0,49 mM, respectivamente. De posse destas informações, os protocolos experimentais utilizados no presente estudo utilizaram adições de HMB ao meio de cultura para atingir concentrações que variaram de 0,05 a 10mM. Esta faixa de concentração foi proposta para que fosse possível testar os efeitos de concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas (ex: >1 mM), considerando os valores para humanos. Até o momento da redação deste trabalho não foram encontradas quaisquer publicações científicas, em revistas indexadas no sistema PubMed, investigando respostas de células imunitárias humanas ou de ratos expostas ao HMB. As preparações celulares usadas neste estudo envolveram sangue total de ratos Wistar, PBMC (humanas e de ratos Wistar) e células Raw 264.7, a qual é uma linhagem de monócitos/macrófagos de camundongos.

Trabalhos anteriores que avaliaram os efeitos da exposição de células imunitárias *in vitro* ao HMB basearam seus protocolos na adição do HMB na forma de sal de cálcio ao meio de cultura (PETERSON *et al.*, 1999; SIWICKI *et al.*, 2000; SIWICKI *et al.*, 2006). Estes estudos encontraram potenciais efeitos pró-inflamatórios da exposição de células imunitárias ao HMB *in vitro*, o que foi considerado como resposta importante para prevenção e combate a doenças nos animais estudados. No presente trabalho, foi utilizado HMB na forma ácida com o intuito de prevenir qualquer interferência do cálcio adicional ao meio de cultura sobre a funcionalidade das células. Este cuidado foi tomado, pois existem evidências de que altas concentrações

extracelulares de cálcio possam influenciar as taxas de proliferação celular, liberação de citocinas e até induzir a morte das células em cultura (PANYI; VARGA; GÁSPÁR, 2004; HAMMOND *et al.*, 2007; OH-HORA; RAO, 2008). Aparentemente, os trabalhos *in vitro* envolvendo HMB e células imunitárias de peixes e aves, citados anteriormente (PETERSON *et al.*, 1999; SIWICKI *et al.*, 2000; SIWICKI *et al.*, 2006), não se certificaram das possíveis influências da adição de cálcio ao meio de cultura decorrente da fonte do HMB usada nos experimentos.

Peterson *et al.* (1999) avaliaram os efeitos do HMB *in vitro* sobre a funcionalidade de macrófagos e linhagens de macrófagos de aves. Segundo os resultados desses autores, a exposição da linhagem de macrófagos de aves (MQ-NCSU) ao HMB, em concentrações entre 0,17 mM e 0,68 mM, aumentaram a quantidade de nitrito (em $\sim 2,5 \mu\text{M}$) no sobrenadante das culturas após 24h quando comparado a situação sem HMB. Os resultados do presente trabalho usando sangue total ou PBMC isoladas de ratos não conseguiram mostrar efeito algum do HMB (entre 0,05 e 0,5 mM) sobre a produção de nitrito e/ou TNF, o qual não foi avaliado em nenhum dos trabalhos presentes na revisão bibliográfica para este estudo. As discrepâncias entre os resultados encontrados aqui e os publicados por Peterson *et al.* (1999), para as concentrações de nitrito, podem estar relacionadas ao tipo de células usadas como modelo experimental ou ao a fonte de HMB usada. Resumidamente, o HMB não pareceu exercer qualquer efeito pro ou antiinflamatório sobre células de ratos Wistar em cultura primária nas condições testadas.

Para testar se o HMB poderia ter efeitos diferentes em uma linhagem celular, quando em comparação a células em culturas primárias, foram utilizadas as células Raw 264.7 como modelo experimental. Esta linhagem produz óxido nítrico e citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF, após estímulo com LPS. Após a realização dos experimentos com essas células, não foi encontrado qualquer efeito potencializador na síntese de óxido nítrico e/ou IL-1 β do HMB em concentrações que variaram de 0,1 a 10 mM. Inversamente ao encontrado anteriormente por Peterson *et al.* (1999) na linhagem MQ-NCSU, nas células Raw 264.7 as concentrações crescentes de HMB diminuíram progressivamente a quantidade de nitrito nos sobrenadantes das culturas. Diminuição esta que se tornou bastante significativa para a concentração 10 mM. Contudo, a significativa diminuição da quantidade de nitrito e IL-1 β para essa concentração pode, talvez, ser justificada pelo menor número de células viáveis nas amostras. Fato que ficou

evidenciado nos experimentos de contagem de células realizados. Apesar de válida para concentração 10 mM, esta última hipótese não se aplica para os efeitos do HMB nas concentrações 0,1 e 1 mM sobre a produção de IL-1 β . Esta colocação é possível porque essas concentrações diminuíram a produção de IL-1 β estimulada por LPS em aproximadamente 25%, sem efeito aparente sobre o número de células viáveis. Quando a produção de TNF foi analisada, o HMB, nas concentrações 0,1 mM e 1 mM, não causou efeito aparente algum sobre as células Raw 264.7. Contudo, na concentração de 10 mM, o HMB provocou considerável aumento na concentração de TNF nos sobrenadantes das culturas dessas células. Hipótese potencial para explicar este fato pode, talvez, estar relacionada à diminuição do número de células viáveis, que pode ter sido causado pela morte eventual de algumas células pelo processo de necrose. Fato que pode ter causado aumento da liberação de TNF pelas células restantes. Alternativamente, não se pode descartar também algum efeito direto do HMB, em altas concentrações, sobre a liberação de TNF nestas células. No entanto estas hipóteses precisam ser confirmadas futuramente. Algo que justifica a investigação futura destas hipóteses é o efeito do HMB 10 mM sobre a proliferação. Os resultados deste trabalho mostram que as células Raw 264.7 apresentaram leve atraso no seu perfil de proliferação na presença de HMB a 10 mM. Fato que também merece investigação futura para desdobramento dos mecanismos envolvidos. Deixando de lado os resultados relacionados ao TNF, o HMB pareceu exercer atividade antiinflamatória e anti-proliferativa sobre as células Raw 264.7, esta última somente para a mais alta concentração testada (10 mM).

Em razão dos potenciais efeitos antiinflamatórios do HMB sugeridos por trabalhos em humanos, foram realizados estudos *in vitro* para se averiguar os efeitos de concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas do HMB sobre células imunitárias humanas. Nas preparações de células sanguíneas humanas isoladas, as PBMC têm os linfócitos T como representantes mais abundantes. Estas células possuem grande capacidade proliferativa e produzem múltiplas citocinas regulatórias, possuindo desta maneira importante papel em respostas imunitárias, assim como na sua regulação (DELVES; ROITT, 2000). Este estudo demonstrou que o HMB pode modificar a resposta proliferativa, a progressão pelas fases do ciclo celular e/ou a produção de citocinas produzidas pelas subpopulações de linfócitos Th1 e Th2. Efeitos inibitórios sobre a proliferação e progressão pelo ciclo celular em PBMC foram observados somente quando o HMB estava presente na maior concentração testada (10 mM). Enquanto o HMB, a 10 mM,

diminuiu o percentual de células que passaram por mais de um ou dois ciclos de divisão celular e aumentou o percentual de células parentais que não se dividiram, as concentrações 1 mM e 5 mM diminuíram o percentual de células que passaram por mais de 4 ciclos de divisão. Desta maneira essas concentrações parecem também impedir a proliferação normal das PBMC. Contudo seus efeitos parecem ser menos severos quando comparados ao HMB a 10 mM, visto que o HMB a 1 mM e a 5 mM não tiveram qualquer efeito inibitório sobre o número de células parentais que entraram em divisão. Embora nossos resultados tenham demonstrado efeitos inibitórios do HMB em altas concentrações (>1 mM) sobre a proliferação de linfócitos, outros trabalhos utilizando linfócitos de peixes encontraram efeitos estimulatórios *in vitro* (NONNECKE *et al.*, 1991; SIWICKI *et al.*, 2004; SIWICKI *et al.*, 2005). Estes resultados divergentes podem talvez estar relacionados à distinção entre os ensaios empregados, às diferenças entre as espécies fonte das células ou, como já comentado, ao tipo de fonte de HMB utilizada.

Os achados aqui apresentados sugerem que concentrações supra-fisiológicas de HMB (ex: 10 mM) podem impedir um ou mais processos de sinalização que direcionam o processo de divisão celular. É bem conhecido que sinais autócrinos e parácrinos são cruciais que ocorra a expansão clonal das PBMC (LIN; KARIN, 2007). Alguns desses sinais importantes são acionados pela produção de citocinas específicas e pela expressão de receptores de superfície envolvidos na ativação e respostas posteriores dos linfócitos a estímulos (ex: ConA), outras citocinas e/ou antígenos (DELVES; ROITT, 2000). A IL-2 e seu receptor (do qual o CD25 faz parte) estão entre o grupo de moléculas que orquestram a ativação e as respostas linfocitárias (GORJÃO *et al.*, 2007). O HMB não modificou a produção de IL-2 na concentração de 10 mM ou a expressão de CD25 em qualquer concentração testada. Desta maneira, altas concentrações de HMB podem influenciar negativamente a proliferação de linfócitos por outros mecanismos relacionados a vias de crescimento e proliferação não investigadas aqui, as quais merecem atenção futura.

A exposição das PBMC a concentrações de HMB, equivalentes àquelas atingidas pós-ingestão de HMB (ex: 0,1mM), reduziram as concentrações de IL-2 liberadas em meio de cultura em aproximadamente 50%, sem efeito aparente sobre a proliferação ou expressão de CD25 nestas células. Após a ligação da IL-2 ao seu receptor, qual é formado por 3 subunidades IL-2R α

(CD25); IL-2R β e IL-2R γ , ocorre a ativação de múltiplas vias de sinalização, incluindo a vias que acionam ERK1/2 por fosforilação (GORJÃO *et al.*, 2007). Este evento promove a ativação de fatores de transcrição responsáveis pela mitogênese. Como a produção de IL-2 e a expressão de CD25 são necessárias para resposta proliferativa linfocitária após o estímulo com ConA (GESBERT; MOREAU; THÈZE, 2005), talvez menores concentrações de IL-2 em presença de 0,1 mM de HMB sejam ainda suficientes para promover perfeita resposta proliferativa destas células. A IL-2 é um sinal importante e necessário para desencadear a fosforilação e ativação da ERK1/2, contudo o HMB não promoveu alteração no conteúdo de pERK1/2. Desta maneira, mais uma vez pode-se sugerir que baixas concentrações de IL-2 na presença de 0,1 mM de HMB são suficientes para garantir normal estado de fosforilação e ativação da ERK1/2.

Alguns trabalhos recentes levantaram suspeitas sobre potenciais efeitos antiinflamatórios do HMB ingerido isoladamente ou em conjunto com arginina e glutamina (HSIEH *et al.*, 2006 KUHLS *et al.* 2007). No estudo de Kuhls *et al.*, (2007) pacientes que sofreram trauma apresentaram diminuição dos escores usados para diagnosticar SIRS. Vários autores ligam a incidência e a severidade da SIRS a concentrações plasmáticas de citocinas relacionadas a respostas pró-inflamatórias (ARNALICH *et al.*, 2000, BOZZA *et al.*, 2007). Uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes e efectoras de vários efeitos sistêmicos de respostas inflamatórias é o TNF, o qual é produzido também PBMC (tanto monócitos quanto linfócitos) (LIN; KARIN, 2007). Nossos resultados mostraram que todas as concentrações de HMB testadas tiveram a capacidade de atenuar a produção de TNF em pelo menos 35%. Este evento pode ser resultado de efeito direto do HMB sobre a liberação de TNF e/ou estar relacionado à mudança de perfil de liberação das citocinas para o padrão Th2. Estudos futuros devem ser conduzidos para avaliar se o HMB pode inibir a produção e liberação de TNF por células PBMC humanas. No entanto, foi demonstrado aqui que a presença do HMB (1 mM e 10 mM) promoveu mudança no balanço Th1/Th2 para a resposta Th2. A mudança para perfil Th2 pode ser positivo em casos de doenças inflamatórias por promover eventos anti-inflamatórios, os quais são característicos de respostas Th1 (LENZ; FRANKLIN; CHEADLE, 2007). Baseado nesta verificação pode-se sugerir que alguns dos efeitos observados em estudos com humanos suplementados possam estar relacionados a modulações na produção de TNF. Os autores que investigaram a incidência de SIRS, em pacientes que ingeriram HMB, não fizeram qualquer análise que ligasse o TNF às respostas observadas, contudo a possibilidade do envolvimento do TNF não pode ser descartada

sem futuras investigações. Apenas de posse dos resultados da produção citocinas e das vias analisadas aqui, não está claro como o HMB pôde diminuir a produção de TNF. Futuros estudos terão que focar de maneira mais específica estes mecanismos.

As principais limitações deste estudo estão nas observações de procedimentos realizados *in vitro* com células isoladas. Células imunitárias trabalham em conjunto com várias outras células de diferentes tecidos liberando e expressando vasta gama de moléculas que auxiliam na mediação e regulação dos processos inflamatórios locais ou sistêmicos. Os dados apresentados aqui podem direcionar à formulação de protocolos experimentais futuros objetivando o estudo dos efeitos imunomoduladores do HMB.

6. CONCLUSÃO

Células do sangue total ou PBMC isoladas de ratos Wistar e cultivadas com HMB, nas concentrações 0,05 – 0,5mM, não apresentaram qualquer mudança no perfil de liberação de alguns fatores pró-inflamatórios. Estes parâmetros foram avaliados através da produção de óxido nítrico e TNF por células estimuladas com LPS.

Utilizando-se a linhagem de monócito/macrófagos de camundongo Raw 264.7, o HMB demonstrou ter efeito inibidor sobre a proliferação e produção de óxido nítrico apenas quando em muito alta concentração (ex: 10 mM). Contudo, a produção de IL-1 β , induzida por LPS nessas células, foi inibida por todas as concentrações de HMB testadas (0,1 mM, 1 mM e 10 mM). Fato que sugere potencial efeito modulador sobre o potencial inflamatório nessas células.

Nos experimentos com PBMC humanas, os achados deste trabalho sugerem que o HMB não altera resposta proliferativa dessas células em concentrações fisiológicas, mas modula a produção de citocinas para resposta Th2 e principalmente a disponibilidade de TNF. Desta maneira, existe potencial para o uso de HMB em dietas ou formulações aplicadas em estados inflamatórios. Contudo, as implicações clínicas do uso do HMB precisam ser avaliadas em estudos posteriores *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ARNALICH, F.; GARCIA-PALOMERO, E.; LÓPEZ, J.; JIMÉNEZ, M.; MADERO, R.; RENART, J.; VÁZQUEZ, J.J.; MONTIEL, C. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. **Infect Immun**, 68(4), 1942-1945, 2000.

BAXTER, J.H., CARLOS, J.L., THURMOND, J.; REHANI, R.N.; BULTMAN, J.; FROST, D. Dietary toxicity of calcium b-hydroxy-b-methylbutyrate (CaHMB). **Food and Chem Toxicol**, 43 (12): 1731–1741, 2005.

BOZZA, F.A.; SALLUH, J.I.; JAPIASSU, A.M.; SOARES, M.; ASSIS, E.F.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care**, 11(2), R49, 2007.

CALDER, P.C. Branched-chain amino acids and immunity. **J Nutr**, 136(1 Suppl), 288S-293S, 2006.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proc Nutr Soc**, Nov, 57(4), 487-502, 1998.

CLARK, R.H.; FELEKE, G.; DIN, M.; YASMIN, T.; SINGH, G.; KHAN, F.A.; RATHMACHER, J.A. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double blind, placebo-controlled study. **J Parenter Enteral Nutr**, 24(3), 133-139, 2000.

COMMINS S.P.; BORISH. L.; STEINKE, J.W. 5. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, Nov 23, 2009.

CROWE, M.J.; O'CONNOR, D.M.; LUKINS, J.E. The effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and HMB/creatine supplementation on indices of health in highly trained athletes. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, 13 (2), 184-197, 2003.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, 6;343(1):37-49, 2000.

DRISKELL, J.A. **Sports Nutrition, Fats and Proteins**. Taylor & Francis Group; New York, USA, 2007.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and advanced cancer. **J Pain Symptom Manage**, Sep 20(3):214-232, 2000.

ELEY, H.L.; RUSSELL, S.T.; TISDALE, M.J. Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 295(6), E1409-1416, 2008a.

ELEY, H.L.; RUSSELL, S.T.; TISDALE, M.J. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 295(6), E1417-E1426, 2008b.

FLAKOLL, P.; SHARP, R.; BAIER, S.; LEVENHAGEN, D.; CARR, C.; NISSEN, S. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. **Nutrition**, 20(5), 445-451, 2004.

GALLAGHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SCHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate ingestion, part II: effects on hematology, hepatic and renal function. **Med Sci Sports Exerc**, 32 (12):2116–2119, 2000b.

GALLAGHER, P.M.; CARRITHERS, J.A.; GODARD, M.P.; SCHULZE, K.E.; TRAPPE, S.W. β -hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part I: effects on strength and fat free mass. **Med Sci Sports Exerc**, 32(12): 2109-2115, 2000a.

GATNAU, R.; ZIMMERMAN, D.R.; NISSEN, S.L.; WANNEMUEHLER, M.; EWAN, R.C. Effects of excess dietary leucine and leucine catabolites on growth and immune responses in weanling pigs. **J. Anim. Sci**, 73:159-165, 1995.

GESBERT, F.; MOREAU, J.L.; THÈZE, J. IL-2 responsiveness of CD4 and CD8 lymphocytes: further investigations with human IL-2Rbeta transgenic mice. **Int Immunol**, 17(8):1093-1102, 2005.

GORJÃO, R.; HIRABARA, S.M.; DE LIMA, T.M.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; CURI, R. Regulation of interleukin-2 signaling by fatty acids in human lymphocytes. **J Lipid Res**, 48(9), 2009-2019, 2007.

HAMMOND, C.M.; WHITE, D.; TOMIC, J.; SHI, Y.; SPANER, D.E. Extracellular calcium sensing promotes human B-cell activation and function. **Blood**. Dec 110(12), 3985-3995, 2007.

HSIEH, L.C.; CHIEN, S.L.; HUANG, M.S.; TSENG, H.F.; CHANG, C.K. Anti-inflammatory and anticatabolic effects of short-term beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. **Asia Pac J Clin Nutr**, 15(4):544-50, 2006.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JOWKO, 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**, 17 (7-8):558–566, 2001.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, Nov;44(2), 143-161, 2002.

KNITTER, A.E.; PANTON, L.; RATHMACHER, J.A.; PETERSEN, A.; SHARP, R. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. **J Appl Physiol**, 89 (4), 1340–1344, 2000.

KOHLMEIER, M. **Nutrient metabolism**, Elsevier, California, USA, 2003.

KORNASIO, R.; RIEDERER, I.; BUTLER-BROWNE, G.; MOULY, V.; UNI, Z.; HALEVY, O. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation,

differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. **Biochim Biophys Acta**, May, 1793(5), 755-763, 2009.

KREIDER, R.B.; ALMADA, A.L.; ANTONIO, J.; BROEDER, C.; EARNEST, C.; GREENWOOD, M.; INCLEDON, T.; KALMAN, D.S.; KLEINER, S.M.; LEUTHOLTZ B.; LOWERY, L.M.; MENDEL, R.; STOUT, J.R.; WILLOUGHBY, D.S.; ZIEGENFUSS, T.N. International society of sports nutrition exercise & sport nutrition review: research & recommendations. **Sports Nutr Rev J**, 1 (1), 1-44, 2004.

KUCZERA, D. **Suplementação crônica da dieta com Beta-hidroxi-beta-metilbutirate (HMB) e treinamento contra-resistido reduzem a taxa de crescimento do tumor de Walker 256. Identificação dos mediadores participantes neste processo.** Tese de Mestrado, UFPR, Paraná, 2007.

KUHLMAN, G.; ROTH, J.A.; FLAKOLL, P.J.; VANDEHAAR, M.J.; NISSEN, S. Effects of dietary leucine, alpha-ketoisocaproate and isovalerate on antibody production and lymphocyte blastogenesis in growing lambs. **J. Nutr**, 118:1564-1569, 1998.

KUHLS, D.A.; RATHMACHER, J.A.; MUSNGI, M.D.; FRISCH, D.A.; NIELSON, J. BARBER, A.; MACINTYRE, A.D.; COATES, J.E.; FILDES, J.J. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation in critically ill trauma patients. **J Trauma**, 62 (1), 125-131, 2007.

LENZ A.; FRANKLIN G. A.; CHEADLE W.G. Systemic inflammation after trauma. **Injury, Int. J. Care Injured**, 38, 1336-1345, 2007.

LI, Y.P.; REID, M.B. Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. **Curr Opin Rheumatol**, Nov, 13(6), 483-487, 2001.

LI, Y.Q.; HIL, C.S.; DER, C.J.; FERRANTE, A. Direct evidence that ERK regulates the production/secretion of interleukin-2 in PHA/PMA-stimulated T lymphocytes. **Immunology**, 96(4), 524-8, 1999.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J Clin Invest**, 117(5):1175-1183, 2007.

LYONS, A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **J Immunol Methods**, 21;243(1-2):147-54, 2000.

MACHADO, P.R.L.; ILMA, M.A.S.; CARVALHO, A.L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An bras Dermatol, Rio de Janeiro**, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.

MARCORA, S.; LEMMEY, A.; MADDISON, P. Dietary treatment of rheumatoid cachexia with b-hydroxy-b-methylbutyrate, glutamine and arginine: A randomized controlled trial. **Clin Nutr**, 24(3):442–454, 2005.

MATARESE, G.; LA CAVA, A. The intricate interface between immune system and metabolism. **TRENDS in Immunology**, 25:193-200, 2004.

MAY, P.E.; BARBER, A.; D'OLIMPIO, J.T.; HOURIHANE, A.; ABUMRAD, N.N. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. **Am J Surg**, 183(4), 471-479, 2002.

MILLS, K.H.; DUNNE, A. Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation. **Nat Med**, 15(12), 1363-4, 2009.

NISSEN, S.; SHARP, R.; RAY, M.; RATHMACHER, J.A.; RICE, D.; FULLER, J.C. JR, CONNELLY, A.S.; ABUMRAD, N. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. **J Appl Physiol**, 81 (5):2095–2104, 1996.

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

NISSEN, S.L.; SHARP, R.L. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. **J Appl Physiol**, 94 (2), 651-659, 2003.

NONNECKE, B.J.; FRANKLIN, S.T.; NISSEN, S.L. Leucine and its catabolites alter mitogen-stimulated DNA synthesis by bovine lymphocytes. **J Nutr**, 121(10), 1665-1672, 1991.

NUNES, E.A.; KUCZERA, D.; BRITO, G.A; BONATTO, S.J.; YAMAZAKI, R.K.; TANHOFFER, R.A.; MUND, R.C.; KRYCZYK, M.; FERNANDES, L.C. Beta-hydroxy-beta-

methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-kappaB expression. **Nutr Res**, Jul, 28(7), 487-493, 2008.

OH-HORA, M.; RAO, A. Calcium signaling in lymphocytes. **Curr Opin Immunol**, Jun, 20(3), 250-258, 2008.

OSTASZEWSKI, P.; KOSTIUK, S.; BALASINSKA, M.; JANK, M.; PAPET, I.; GLOMOT, F. The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens in vitro. **J Anim Physiol Anim Nutr**, 84, 1-8, 2000.

PANYI, G.; VARGA, Z.; GÁSPÁR, R. Ion channels and lymphocyte activation. **Immunol Lett**, Mar 29, 92(1-2), 55-66, 2004.

PETERSON, A.L.; QURESHI, M. A.; FERKET, P.R.; FULLER, J.C. JR. Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β -hydroxy- β -methylbutyrate. **Immunopharm. Immunotoxicol**, 21 (2), 307-330, 1999.

QUINTANA, F.J.; COHEN, I.R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. **J Immunol**, Sep 1, 175(5), 2777-2782, 2005.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **J Exp Med**, 166, 1685-1701, 1987.

SABOURIN, P.J.; BIEBER, L.L. Purification and characterization of an alpha-ketoisocaproate oxygenase of rat liver. **J Biol Chem**, Jul 10, 257(13), 7460-7467, 1982.

SILVA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Rev. Bras. de Cancerologia**, 52(1), 59-77, 2006.

SIWICKI, A.K.; FULLER, J.C. JR.; NISSEN, S.; MORAND, M.; POZET, F.; VINCENT, F.; KAZUN, B. Effect of HMB (β -hydroxy- β -methylbutyrate) on in vitro proliferative responses of sheatfish (*Silurus glanis*) and catfish (*Ictalurus melas*) lymphocytes stimulated by mitogens. **Acta Vet. Brno**, 273, 199-122, 2004.

SIWICKI, A.K.; ZDZISZAW, Z.; FULLER, J.C. JR.; NISSEN, S.; TRAPKOWSKA, S.; GZABSKI, E.; KAZUN, K.; KOWALSKA, A.; TERECH-MAJEWSKA, E. The effect of feeding the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity and protection against *Yersinia ruckeri* in pikeperch (*Sander lucioperca*). **Aquac. Res**, 36, 16-21, 2005.

SIWICKI, A.K.; FULLER Jr, J.C.; NISSEN, S.; OSTASZEWSKI, P.; STUDNICKA, M. In vitro effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity in fish. **Vet. Immunol. Immunopatol**, 76, 191-197, 2000.

SIWICKI, A.K.; FULLER Jr, J.C.; NISSEN, S.; MORAND, M.; POZET, F.; VINCENT, F.; KAZUN, B. Effect of HMB (β -hydroxy- β -methylbutyrate) on in vitro Proliferative Responses of Sheatfish (*Silurus glanis*) and Catfish (*Ictalurus melas*) Lymphocytes Stimulated by mitogens. **Acta Vet. Brno**, 73, 199-122, 2004.

SIWICKI, A.K.; MORAND, M.; FULLER Jr, J.; NISSEN, S.; GORYCZKO, K.; OSTASZEWSKI, P.; KAZUN, K.; GLOMBSKI, E. Influence of feeding the leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on the non-specific cellular and humoral defence mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Appl. Ichthyol**, 19, 44-48, 2003.

SIWICKI, A.K.; ZAKES, Z.; FULLER JR, J.C.; NISSEN, S.; KAZUN, K.; GLABSKI, E. The influence of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity in tench *Tinca tinca* (L.): *in vitro* and *in vivo*. **Aquac. Intern**, 14, 153-161, 2006.

SMITH, H.J.; MUKERJI, P.; TISDALE, M.J. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. **Cancer Res**, 65(1), 277-83, 2005.

STOUT, R.D.; SUTTLES, J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity:dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. **Immunol Rev**, 205, 60-71, 2005.

STUEHR, P. J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysacchaide. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 82: 7738-7742, 1985.

TAYAL, V.; KALRA, B.S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. **Euro. J. Pharmaco**, 579, 1-12, 2008.

TELFORD, W.G.; KING, L.E.; FRAKER, P.J. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. **Cell Prolif**, 24, 447-59, 1991.

VAN KOEVERING, M.; NISSEN, S. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 262, E27-31, 1992.

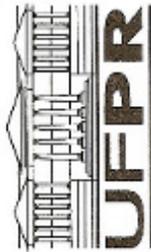
VUKOVICH, M.D.; SLATER, G.; MACCHI, M.B.; TURNER, M.J.; FALLON, K.; BOSTON, T.; RATCHMACHER, J. β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. **J. Nutr. Biochem**, 12(11), 631-639, 2001.

VUKOVICH, M.D.; STUBBS, N.B.; BOHLKEN, R.M. Body composition in 70-year-old adults responds to dietary beta-hydroxy-beta-methylbutyrate similarly to that of young adults. **J Nutr**, 131, 2049–2052, 2001.

WILEY, D.B.; DOBBINS, T.A. **Composition and method for enhancing the bioavailability of calcium and magnesium in dietary supplements and food additives**. United States Patent. 2004; 20040220266.

XU, M.; NAGASAKI, M.; OBAYASHI, M.; SATO, Y.; TAMURA, T.; SHIMOMURA, Y.; Mechanism of activation of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex by exercise. **Biochem Biophys Res Commun**, Sep 28, 287(3), 752-726, 2001.

XU, M.; NAKAI, N.; ISHIGURE, K.; NONAMI, T.; NAGASAKI, M.; OBAYASHI, M., LI, Z.; SATO, Y.; FUJITSUKA, N.; MURAKAMI, T.; SHIMOMURA, Y. The alpha-ketoisocaproate catabolism in human and rat livers. **Biochem Biophys Res Commun**, Oct 5;276(3):1080-1084, 2000.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

N.º 196

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.044280/2006-93

TÍTULO:

Efeitos da suplementação com β -hidróxi- β -metilbutirato (HMB) sobre produção de citocinas e vias de sinalização de células imunitárias

AUTORES:

Luiz Claudio Fernandes, Everson Araújo Nunes, Sérgio Ricardo Brito Beto, Gleisson Alisson Pereira Brito, Fernanda Muriel Chermín

DEPARTAMENTO:

Fisiologia

APROVADO.

RO 11/2006 - 21/11/2006

Curitiba, 23 de novembro de 2006.

Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA

ANEXO 2

CONSENT FORM

**THE EFFECT OF NUTRITIONAL SUPPLEMENTS ON IMMUNE FUNCTION
 IN HEALTHY HUMAN ADULTS**

LREC Reference Number:

SSA:

Name of Chief Investigator: Professor Philip Calder

- | | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1. | I confirm that I have read and understand the information sheet for the above study and have had the opportunity to ask questions | <input type="checkbox"/> |
| 2. | I understand that my participation is voluntary and that I am free to withdraw at any time, without giving reason, without my medical care or legal rights being affected | <input type="checkbox"/> |
| 3. | I consent to my general practitioner being notified of my participation in this research and receiving copies of my study results | <input type="checkbox"/> |
| 4. | I consent to give two blood samples (20ml each) | <input type="checkbox"/> |
| 5. | I agree that samples (blood) taken as part of the protocol of this study may be stored for 5 years and used in further research studies. Samples will only be used in studies that have been approved by the appropriate Ethics Committee | <input type="checkbox"/> |
| 6. | I understand that samples taken as part of this study can be analysed in another laboratory outside of the University of Southampton. All samples will be made anonymous, and no personal information will be sent to another laboratory. | <input type="checkbox"/> |
| 7. | I am willing to be contacted again in the future about the present study and any potential follow-up from it. I understand that I am under no obligation to undergo any future additional tests and can withdraw this consent at any time by notifying the study team | <input type="checkbox"/> |
| 8. | I agree to take part in the above study | <input type="checkbox"/> |

Volunteer: Print _____ Date _____ Signature _____

Member of research team taking consent: Print _____ Date _____ Signature _____

Chief Investigator: Print _____ Date _____ Signature _____

3 copies required: 1 for researcher, 1 for volunteer, 1 to be kept with research subjects notes

Version 1: 8TH June 2008