

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TONY ANDERSON GEREMIAS

EFEITOS DO β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO (HMB) SOBRE A LIPÓLISE E
METABOLISMO DA GLICOSE EM TECIDO ADIPOSEO DE RATOS.

CURITIBA
2013

TONY ANDERSON GEREMIAS

EFEITOS DO β -HIDROXI- β -METILBUTIRATO (HMB) SOBRE A LIPÓLISE E
METABOLISMO DA GLICOSE EM TECIDO ADIPOSEO DE RATOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre em Fisiologia, no curso de
Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes

CURITIBA
2013

AGRADECIMENTOS

À Deus. Não só pelas portas que foram abertas ao longo do caminho, mas também pelos degraus e obstáculos encontrados neste trajeto.

Ao meu orientador, Professor Luiz, que mesmo sabendo das minhas dificuldades por morar em outra cidade, me aceitou como seu aluno possibilitando a realização de um sonho. Muito obrigado pelos ensinamentos e principalmente por não desistir de mim!

À Taíse, amor da minha vida. Esta merecia o título de mestre por aturar meu mau humor, e por estar ao meu lado nestes anos.

Aos meus pais, Carlos e Eliana, por me ensinarem valores e princípios que jamais serão esquecidos, e por sempre me incentivar a estudar.

Aos Manos Thomas e Beto, porque tenho a certeza que sempre posso contar com vocês.

Agradeço também ao meu amigo Gleisson, que com certeza foi colocado por Deus em meu caminho. Esse cara me fez ver que era possível. Muito obrigado pelos ensinamentos, e pelas consultorias políticas também!

À Isa, Dani e Adri, sem ajuda de vocês também não teria conseguido. Obrigado pela parceria naquele primeiro projeto. Isa, obrigado pela paciência em me ensinar algumas rotinas do lab., por me ensinar a trabalhar com o Prisma e me ajudar no tratamento dos dados.

Obrigado a todos do laboratório, com certeza cada um de vocês contribuiu de forma significativa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL – Ácido graxo livre

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

BCAA – Aminoácidos de cadeia ramificada

CCK – Colecistocinina

CGI 58 – Proteína comparativa de identificação de genes

ChSREBP - Fator de transcrição hepático responsivo ao carboidrato

CoA – Coenzima A

DAG - Diacilglicerol

ERK – Proteína reguladora de sinal extracelular

GLUT - Transportador de glucose

HMB - β -Hidroxi- β -Metilbutirato

HSL – Hormônio sensível lipase

IMC – Índice de massa corporal

IRS – Substrato do receptor da insulina

KIC – α -cetoisocaproato

MAG – Monoacilglicerol

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP – proteína quimioatrativa de monócito 1

PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase

PKA – Proteína quinase A

PKB – Proteína quinase B

PP1 – Proteína fosfatase-1

TA – Tecido adiposo

TAG - Triacilglicerol

TGL – Triglicerídeo lípase

TNF α – Fator de necrose tumoral – α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos fisiológicos envolvidos na inibição de apetite e ingesta calórica. (Adaptado de LANCHETA JR., 2012).....	14
Figura 2: Resumo dos processos lipolíticos demonstrando as principais enzimas envolvidas na lipólise. (Adaptado de ZECHNER, 2009).....	16
Figura 3: Sinalização da insulina. (Adaptado de SALTIEL; KAHN, 2001).....	20
Figura 4: Obesidade como indutor da resistência à insulina (adaptado de ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).....	22
Figura 5: Mecanismos envolvidos na lipogênese e oxidação lipídica. (Adaptado de MORRAL, 2007).....	26
Figura 6: Visão esquemática da utilização da glicose no adipócito. (Adaptado de DIGIROLAMO, 1992).....	27
Figura 7: Lipólise tecido adiposo epididimal do grupo C (n=9). * Quando comparado com a situação sem estímulo. (Two way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). P<0,05.....	41
Figura 8: Lipólise tecido adiposo epididimal do grupo EA (n=9). * Quando comparado com a situação sem estímulo. (Two way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). P<0,05.....	42
Figura 09: Lipólise tecido adiposo epididimal do grupo JE (n=9). * Quando comparado com a situação sem estímulo. (Two way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). P<0,05.....	43
Figura 10: Lipólise com o estímulo da adrenalina e sem o HMB no meio de incubação dos grupos EX, JE, e C. * quando comparado ao grupo controle (teste “t” student)p<0,05.....	44
Figuras 11 A, B e C: Produção de lactato pelo tecido adiposo incubado do grupo C, EA, e JE (n=9). * Quando comparado com grupo controle (one way ANOVA com pós-teste de Tukey) P<0,05. , ** quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo da insulina (one way ANOVA com pós-teste de Tukey).....	45
Figura 12: Kitt taxa de decaimento da glicose do grupo C. * Quando comparado à situação sem estímulo de insulina (HMB), ** quando comparada à situação com	

estímulo da insulina e sem HMB (I)(One way ANOVA com pós –teste de Tukey).....46

Figura 13: Kitt taxa de decaimento da glicose do grupo EX. * Quando comparado à situação sem estímulo da insulina (HMB) (One way ANOVA com pós teste de Tukey).....47

RESUMO

Uma condição clínica de crescente incidência na população mundial é a obesidade. O desenvolvimento da obesidade está associado com o aparecimento de vários distúrbios fisiológicos. Uma intervenção considerada no tratamento da obesidade é a abordagem nutricional através de suplementos alimentares. O metabólito da leucina β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB), vem ganhando destaque entre os suplementos alimentares mais estudados. Em nosso laboratório, o HMB já demonstrou efeitos positivos sobre os parâmetros imunitários. Recentemente, alguns autores têm investigado se o HMB interfere nos parâmetros metabólicos do tecido adiposo, porém os dados são controversos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o do HMB sobre o metabolismo da glicose e atividade lipolítica no tecido adiposo. Neste estudo, o tecido adiposo de ratos da linhagem wistar foi incubado na presença de duas concentrações diferentes de HMB (1mM e 5mM), com ou sem o estímulo da adrenalina e sob a interferência de três estados metabólicos distintos: basal (C), jejum (JE) e exercício agudo (EA). No grupo C, ou seja, situação metabólica basal, o HMB não exerceu nenhum efeito sobre a lipólise na condição com, ou sem o estímulo da adrenalina, pois quando foi adicionado o HMB em duas concentrações diferentes (1mM e 5mM), a lipólise mostrou-se inalterada em relação ao meio incubado apenas com adrenalina (A). Frente à condição metabólica de pós-exercício (EA), o HMB novamente não provocou alteração na lipólise. O padrão lipolítico observado no grupo exercitado foi semelhante ao padrão controle, pois foi demonstrado uma diminuição da taxa lipolítica quando as concentrações de 1 e 5mM de HMB foram adicionados ao meio de incubação estimulado com adrenalina (-69% e 58% respectivamente). No grupo JE o perfil lipolítico não foi diferente daquele encontrado nos grupos C e EA, onde o HMB não demonstrou exercer nenhum efeito sobre a atividade lipolítica com ou sem o estímulo da adrenalina. O exercício agudo exerceu efeito aditivo sobre a lipólise. Neste grupo, a lipólise foi significativamente aumentada em relação ao grupo JE e C. (EA: 225%, JE: 161%, C 175%). O efeito do HMB sobre o metabolismo da glicose também foi avaliado. Para este fim, o tecido adiposo foi incubado nas mesmas condições citadas acima, e a produção de lactato foi analisada. A adição de HMB ao meio de incubação, em duas concentrações diferentes (1 e 5mM), não alterou a produção de lactato pelo tecido adiposo nas condições com e sem estímulo da insulina. Quando a interferência do HMB sobre o metabolismo da glicose foi testada de maneira *in vivo*, este mostrou potencializar a ação da insulina. A administração de HMB e insulina simultaneamente ocasionou uma taxa de decaimento da glicose 240% maior do que quando a insulina foi administrada sem o HMB. Porém esse efeito foi observado apenas no grupo controle. Os resultados deste trabalho demonstram que a exposição do tecido adiposo ao HMB, não alterou os padrões metabólicos envolvendo a produção de lactato e lipólise. Os dados sugerem ainda um efeito potencializador do HMB sobre a ação da insulina *in vivo*.

ABSTRACT

A clinical condition of increasing incidence in the world is obesity. The development of obesity is associated with the onset of various physiological disorders. An intervention considered in the treatment of obesity nutritional approach is through dietary supplements. The leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), is gaining prominence among the most studied dietary supplements. In our laboratory, HMB has shown positive effects on immune parameters. Recently, some authors have investigated whether HMB interfere in the metabolic parameters of adipose tissue, but the data are controversial. The aim of this study was to evaluate the HMB on glucose metabolism and lipolytic activity in adipose tissue. In this study, adipose tissue of Wistar rats were incubated in presence of two different concentrations of HMB (1 mM and 5 mM) with or without stimulation and epinephrine interference under three different metabolic states: basal (C) Fasting (JE) and acute exercise (AE). In group C, or basal metabolic state, HMB had no effect on lipolysis in the condition with or without stimulus adrenaline, because when HMB was added at two different concentrations (5 mM and 1 mM) showed lipolysis unchanged in relation to the only incubated with epinephrine (A). Front of the metabolic condition of post-exercise (AE), HMB again did not affect lipolysis. The lipolytic pattern observed in the exercised group was similar to the standard control, as has been demonstrated a decrease in lipolytic rate when concentrations of 1 and 5 mM HMB were added to the incubation medium stimulated with adrenalin (-69% and 58% respectively). JE group lipolytic profile was not different from that found in groups C and EA, which HMB is not shown to have no effect on lipase activity with or without stimulation of epinephrine. Acute exercise exerted additive effect on lipolysis. In this group, lipolysis was significantly increased in the group JE and C. (EA: 225%, JE: 161% C 175%). The effect of HMB on glucose metabolism was also evaluated. To this end, the adipose tissue was incubated in the same conditions mentioned above, and lactate production was examined. The addition of HMB to the incubation medium at two different concentrations (1 and 5 mM) did not alter the lactate production by adipose tissue under the conditions with and without stimulation of insulin. When the interference of HMB on glucose metabolism was tested in vivo in a way, this showed potentiate the action of insulin. The administration of HMB and insulin simultaneously caused a decay rate of glucose greater than 240% when insulin was administered without HMB. However, this effect was only observed in the control group. The results of this study demonstrate that exposure of adipose tissue to HMB, did not alter the metabolic patterns involving lactate production and lipolysis. The data also suggest an effect of HMB on potentiating insulin action in vivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Obesidade	12
1.2 Metabolismo do tecido adiposo	14
1.3 Exercício agudo x lipólise	16
1.4 Jejum e lipólise	17
1.5 Modulação da lipólise pela insulina no exercício (efeitos endócrino)	18
1.6 Ação e sinalização da insulina.....	19
1.7 Resistência à insulina.....	21
1.8 Tecido adiposo, Insulina, e Metabolismo de Glicose.....	24
1.9 Metabolismo de lipídios e insulina.....	25
1.10 Produção de lactato pelo tecido adiposo.....	27
1.11 β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB) generalidades	29
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	35
Objetivo geral	35
Objetivos específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Exercício Agudo	36
4.3 Efeito do HMB sobre a lipólise com e sem o estímulo de adrenalina	37
4.4 Mensuração de Lactato	37
4.5 Teste de tolerância à insulina.....	39
4.6 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Lipólise grupo controle.....	41
5.2 Lipólise exercício.....	42

5.3 Lipólise jejum.....	43
5.4 Lipólise entre grupos.....	44
5.5 Lactato.....	45
5.6 Tolerância à insulina	46
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	48
6.1 Lipólise	48
6.2 Metabolismo da glicose.....	51
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

A busca desenfreada por melhor desempenho esportivo e benefícios estéticos, ocasionou o consumo irrestrito e excessivo de suplementos alimentares. Esses suplementos são consumidos principalmente por atletas de elite e praticantes de atividades físicas sem fins competitivos. Os suplementos alimentares também despertaram o interesse do meio científico, que têm investigado a eficácia destes suplementos em indivíduos saudáveis e em situações patológicas. Estudos têm evidenciado a eficácia de alguns suplementos alimentares em promover melhora de diversas capacidades físicas desportivas, perfil antropométrico, e até mesmo em indicadores de saúde, sugerindo uma possível abordagem no tratamento e prevenção de algumas doenças (NUNES, 2008; CLARK, 2000).

A obesidade pode ser considerada uma condição patológica que geralmente é acompanhada por distúrbios fisiológicos como hipertensão, resistência à insulina, e uma série de complicações de origem metabólica. A ineficiência em mobilizar e oxidar lipídios parece ser uma característica comum em indivíduos obesos (ACHTEN, 2004). Sendo assim, investigar possíveis intervenções com a proposta de otimizar o metabolismo lipídico é de grande relevância para o meio científico. Além disso, a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na mobilização e oxidação lipídica deve ser aprofundada.

Uma intervenção considerada no tratamento da obesidade é a abordagem nutricional através de suplementos alimentares. E com a crescente população de obesos, muitos suplementos estão sendo direcionados comercialmente ao emagrecimento. Visto que a obesidade tornou-se um problema de saúde pública de âmbito mundial, muitos pesquisadores voltaram seus esforços científicos para testar a eficácia desses suplementos alimentares (PANTON, 2000; VUKOVICH, 2001; PORTAL, 2011).

O metabólito da leucina β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB), vem ganhando destaque entre os suplementos alimentares mais estudados, pois sua provável eficácia como inibidor das vias de sinalização da proteólise, e como um possível agente promotor da hipertrofia, tem sido demonstrada por muitos estudos (NISSEN, 2003). Em grande parte destes estudos envolvendo humanos, a gordura corporal é um dos parâmetros avaliados, porém os dados são conflitantes (WILSON, 2008),

indicando a necessidade de maiores investigações relacionadas aos efeitos do HMB sobre o metabolismo de lipídios.

Especula-se que a divergência dos resultados obtidos deve-se a grandes dificuldades metodológicas inerentes aos procedimentos de pesquisa envolvendo humanos. A diversidade de tipos de população (sedentários, atletas, jovens e idosos) utilizadas nos estudos, duração e tipo de treinamento, além de outras variáveis difíceis de serem controladas, como nutrição e descanso, nos levam a ter certa cautela na hora de interpretar os dados (WILSON, 2008).

Dessa forma, faz-se necessário a investigação dos efeitos do HMB sobre o metabolismo do tecido adiposo, de maneira que as dificuldades experimentais citadas acima não comprometam a validade dos resultados.

No que concerne ao nosso conhecimento, até o presente momento não há nenhum estudo na literatura científica que tenha analisado de forma isolada os efeitos do HMB sobre a oxidação lipídica *in vitro*.

1.1 Obesidade

A obesidade pode ser definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal e por conta disto o sobrepeso. O seu diagnóstico é feito através do índice de massa corporal (IMC), o qual pode ser calculado pelo peso em kilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado. Recentemente o ministério da saúde levantou dados alarmantes referentes à obesidade no Brasil. Segundo o ministério da saúde o percentual de obesos subiu de 11,4% em 2006 para 15,8% em 2011. A obesidade é um forte fator de risco para saúde e tem relação com altos níveis de gordura e açúcar no sangue, excesso de colesterol e diabetes. Pessoas obesas também têm mais chance de sofrer com doenças cardiovasculares, principalmente isquêmicas (infarto, trombose, embolia e arteriosclerose), além de problemas ortopédicos, asma, apneia do sono, alguns tipos de câncer, esteatose hepática e distúrbios psicológicos. O aumento do consumo alimentar associado principalmente ao crescimento da economia e o sedentarismo, certamente são os grandes responsáveis pelo crescimento na população obesa do país.

A etiologia da obesidade não é de fácil identificação, pois se trata de uma doença multifatorial de complexa interação entre fatores comportamentais, culturais,

genéticos, fisiológicos e psicológicos. O balanço energético positivo tem importante papel no desenvolvimento da obesidade. Porém, a literatura indica que o equilíbrio entre o consumo e gasto energético não é o único fator que regula o desenvolvimento da obesidade. Segundo WEST (1998), o perfil da dieta também deve ser considerado, pois dietas hiperlipídicas podem levar a hiperfagia. Além disso, indivíduos obesos demonstraram uma redução na atividade lipolítica quando submetidos à dieta hiperlipídica (LLADO, 2002). Outro ponto a ser considerado no desenvolvimento da doença é a alta taxa de sedentarismo entre os obesos. Segundo FREITAS (1998), cerca de 80% dos obesos não praticam nenhuma atividade física.

Alguns hormônios estão fortemente relacionados com a obesidade, um deles é a leptina. A leptina é produzida pelo tecido adiposo e possui seus receptores em centros inibidores do apetite no hipotálamo e em tecidos periféricos. Sua produção é proporcional ao tamanho e quantidade das células adiposas, portanto o excesso deste tecido em indivíduos obesos ocasiona em hiperleptinemia, fenômeno que contribui para o desenvolvimento da resistência à leptina (ZACHARY A., 2012). Esse fenômeno pode agravar ainda mais a obesidade, pois a leptina tem papel fundamental no metabolismo lipídico em tecidos periféricos como o fígado e o músculo (MUOIO, 1999). Além da leptina outras substâncias estão relacionadas com o controle da ingesta energética, e são provenientes principalmente do trato gastrointestinal, como a colecistocinina (CCK), polipeptídeo pancreático, a grelina entre outros (LANCHA JR, 2012).

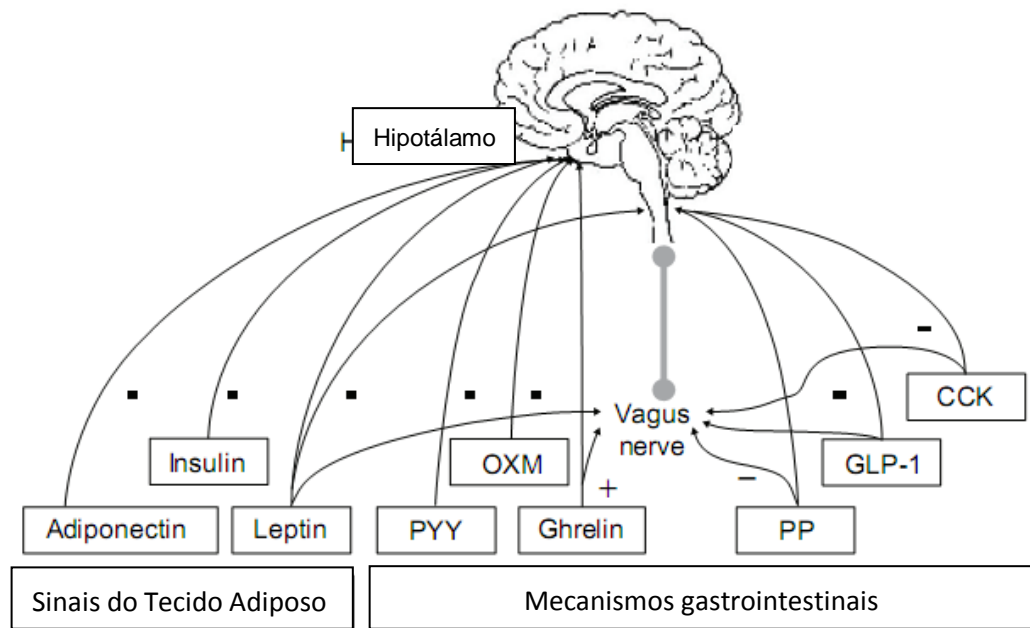


Figura 1: Mecanismos fisiológicos envolvidos na inibição de apetite e ingestão calórica. Evidências sugerem que esses mecanismos ficam prejudicados no indivíduo obeso. (Adaptado de LANCHA Jr., 2012)

1.2 Metabolismo do tecido adiposo

O tecido adiposo exerce a importante função de estocar reservas energéticas em forma de triacilglicerol (TAG) em seus adipócitos. Os adipócitos são células especializadas em armazenar lipídios na forma de TAG, por isso possuem enzimas reguladoras específicas que atuam na síntese e estoque de TAG (lipogênese) (FONSECA-ALANIZ, 2006). Para a biossíntese de TAG, o adipócito necessita de uma fonte de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P), e de ácido graxo livre (AGL) complexado com coenzima A (CoA), constituindo o composto acilCoA. O primeiro é obtido como um produto da via glicolítica, e o segundo provém da biossíntese a partir de acetilCoA (FONSECA-ALANIZ, 2006). A produção de glicerol-3-P envolve a captação de glicose através de proteínas transportadoras específicas, os GLUTs (GLUT1 e GLUT4), e esse processo é controlado pela insulina (FONSECA-ALANIZ, 2006).

Outra importante ação metabólica do tecido adiposo é a lipólise. A lipólise pode ser definida como o catabolismo dos TAG estocados no adipócito, resultando na liberação de glicerol e ácidos graxos (ZECHNER, 2012). A hidrólise do TAG

requer três etapas que envolvem pelo menos três enzimas diferentes. A triglicerídeo lipase (TGL) catalisa a etapa inicial da lipólise, convertendo TAG em diacilglicerol (DAG). A enzima hormônio-sensitivo-lipase (HSL), é responsável pela segunda etapa, que hidrolisa o DAG em monoacilglicerol (MAG), e a MAG lipase catalisa a última etapa hidrolisando o MAG (ZECHNER, 2012). Segundo SCHWEIGER et al (2006), as enzimas TGL e HSL são responsáveis por pelo menos 90% da hidrólise do TAG.

A importância da enzima TGL tornou-se evidente com estudos em ratos *knockout* para o gene que expressa essa enzima (TGL-*ko*) (HAEMMERLE, 2006). A ausência da enzima TGL causa a redução de mais de 75% de liberação de AG do tecido adiposo, ocasionando no acúmulo de TAG em muitos órgãos (ZECHNER, 2009). Um dos mais importantes ativadores da lipólise são as catecolaminas. As catecolaminas agem aumentando a concentração de AMPc intracelular, seguido pela a ativação da proteína-quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA fosforila a enzima HSL que se encontra no citosol. Esse processo leva a translocação da enzima para a gotícula lipídica onde terá acesso aos estoques de TAG (SCHWEIGER, 2006). Diferentemente da HSL, a TGL já se encontra na gotícula lipídica tanto no estado basal como no estado ativado. Além disso, a TGL não é fosforilada pela PKA, sua ativação é feita através de uma proteína denominada CGI-58. Tal proteína não exerce atividade sobre a lipase HSL (ZIMMERMANN, 2004). No estado basal, ou quando os adipócitos não estão sendo hormonalmente estimulados, a CGI-58 está ligada a perilipina A, e dessa forma incapaz de ativar a enzima TGL. Com a estimulação hormonal, a perilipina A é fosforilada em vários resíduos de serina de sua cadeia protéica, só então a CGI-58 se dissocia da perilipina A e interage com a enzima TGL que atuará nas primeiras etapas da lipólise. Simultaneamente com a ativação da TGL, a HSL é translocada do citosol para as gotículas lipídicas onde atuará na hidrólise dos DAG, produto lipolítico da atividade da TGL (ZECHNER, 2009).

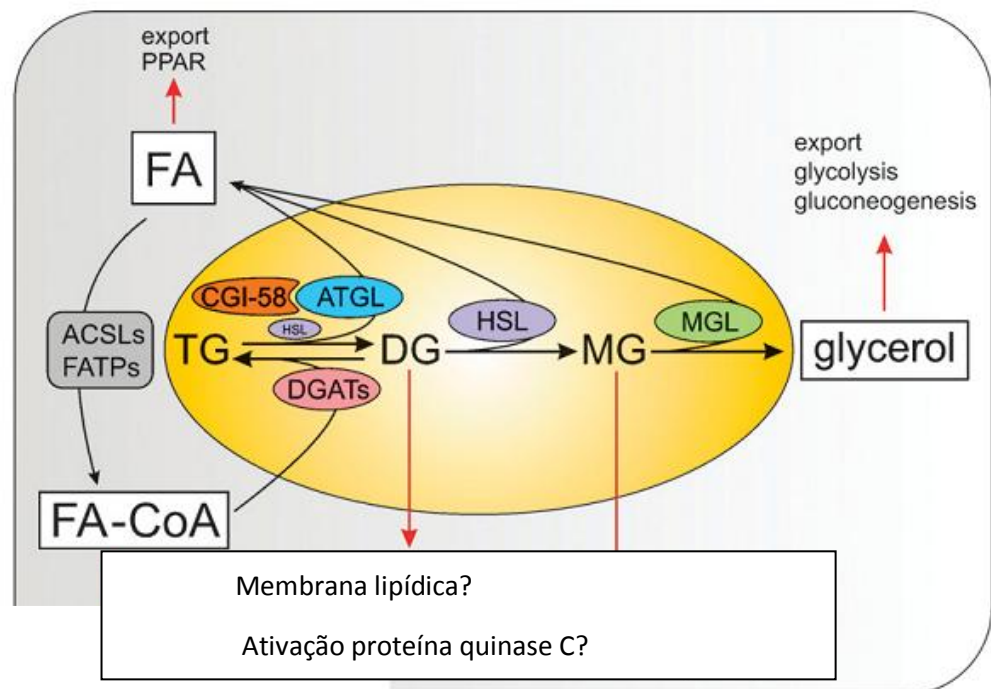


Figura 2: Resumo dos processos lipolíticos demonstrando as principais enzimas envolvidas na lipólise. (Adaptado de ZECHNER, 2009)

1.3 Exercício agudo x lipólise

Uma das respostas fisiológicas promovidas pelo exercício agudo é a ativação da via simpático-adrenal, ocasionando na descarga de catecolaminas no sangue. As catecolaminas por sua vez irão estimular a hidrólise de TAG nas gotículas lipídicas no adipócito, liberando AGL e glicerol que serão usados no metabolismo energético (OGASAWARA, 2010). Essa resposta fisiológica é mediada pela transdução de sinais através de receptores beta-adrenérgicos do tipo 1,2, e 3. A cascata lipolítica inicia com a ativação da enzima adenilil-ciclase que ao estimular a produção de AMPc ativará a proteína-quinase A (PKA) que terá como alvo duas proteínas que exercem papel fundamental na lipólise, a HSL e Perilipina A (HOLM, 2000). Um estudo conduzido por OGASAWARA (2004), demonstrou que a produção intracelular de AMPc em adipócitos epididimal aumentou consideravelmente logo após (0h), e três horas após o exercício agudo, mas sofreu uma redução significativa 24h após o exercício. Além disso, OGASAWARA (2006), também verificou que a

expressão dos receptores beta-adrenérgicos do tipo 2 na membrana celular, está associado aos níveis de AMPc intracelular. Esses resultados sugerem que o exercício agudo pode gerar mudanças fisiológicas e bioquímicas na cascata lipolítica logo após o exercício. Outro mecanismo fisiológico que parece ser alterado pelo exercício agudo é a fosforilação do resíduo Ser660 da enzima HSL. A fosforilação deste resíduo leva ao aumento na atividade da enzima, o que contribui para a estimulação da lipólise (TALANIAN, 2006).

Um experimento investigou os efeitos do exercício no fornecimento de energia na forma de TGL e glicogênio hepático, em ratos deficientes na produção da enzima TGL (TGL-ko). Este experimento revelou que estes ratos são incapazes de aumentar a circulação de TGL durante o exercício, e esta redução na disponibilidade de energia na forma de TGL levam a rápida depleção do glicogênio hepático e por consequência à hipoglicemia, demonstrando a importância desta enzima no fornecimento de energia durante o exercício (SCHOISWOHL, 2010).

Em humanos, o exercício resistido aumentou de 16 a 18 vezes a atividade da enzima TGL nos primeiros 5 a 10 minutos do exercício em homens obesos e magros, aumentando o gasto energético (CHATZINIKOLAOU, 2008). Segundo os autores a lipólise foi estimulada pelo aumento progressivo dos níveis de catecolaminas plasmáticas. E o aumento na atividade da TGL foi ocasionado pela ativação da HSL, que sofreu translocação às gotículas lipídicas quando a perilipina A foi fosforilada.

1.4 Jejum e lipólise

O jejum estimula a lipólise agudamente, e por consequência há um aumento nas concentrações séricas de ácidos graxos livres e glicerol que agem na manutenção do fornecimento de energia nestas situações. Assim como no exercício as catecolaminas são os ativadores primários da lipólise durante o jejum. A ligação da norepinefrina em seu receptor beta-adrenérgico gera um sinal estimulatório na enzima adenilil ciclase que atuará na produção de AMPc. O aumento nas concentrações de AMPc ativará a PKA levando a dissociação desta proteína em suas subunidades regulatórias e catalíticas, sendo que a subunidade catalítica que irá fosforilar diversos sítios da enzima lípase HSL ocasionando na translocação

dessa enzima do citosol para a gotícula lipídica (DUNCAN, 2007). A PKA também fosforila a perilipina na gotícula lipídica. As perilipinas, especificamente as do tipo A e B, agem como uma barreira protetora que revestem as gotículas lipídicas, restringindo assim o acesso das lipases em situações basais promovendo o armazenamento de TAG, e limitando a lipólise (BRASAEMLE, 2000). Em situações fisiológicas de déficit energético, a perilipina é fosforilada pela PKA em seus resíduos de serina, que facilita a lipólise através do remodelamento das gotículas lipídicas aumentando a área de superfície disponível à ligação das lipases (BRASAEMLE, 2007).

THOMAS e col. (2011) analisaram se o jejum e o exercício afetam os níveis da enzima TGL e de uma proteína recém descoberta denominada GOS2 responsável por inibir a ação da TGL. Esses pesquisadores verificaram que os níveis de TGL expressos aumentaram, e a expressão da proteína inibidora GOS2 diminuíram na condição de jejum, sugerindo um aumento na atividade desta enzima.

1.5 Modulação da lipólise pela insulina no exercício (efeitos endócrino)

Entre os efeitos metabólicos da insulina, o efeito antilipolítico está entre os que se destacam. Porém, durante e logo após o exercício, evidências apontam que há uma diminuição da insulina plasmática, e um aumento nas concentrações de glucagon (SHILO, 1990). MUSI (2001) verificou que as concentrações plasmáticas de insulina diminuíram 61% e 59% em indivíduos diabéticos e não diabéticos respectivamente, logo após a uma sessão de exercício. Portanto, o aumento da taxa de lipólise durante e logo após a uma sessão de treinamento, pode ser atribuído também à queda dos níveis de insulina plasmática. Quando os níveis de insulina plasmática foram suprimidos por um análogo da somatostatina durante o exercício, houve um aumento na lipólise induzida pelo exercício (KOPPO, 2010).

A insulina exerce seus efeitos antilipolíticos através de mecanismos dependentes e não-dependentes de AMPc. A supressão da lipólise através de mecanismos dependentes de AMPc envolve a ativação da fosfodiesterase 3B. A ligação da insulina em seu receptor seguido da ativação do mesmo, leva a fosforilação de seus resíduos de tirosina da subunidade catalítica, ocasionando assim na ligação da subunidade regulatória p85 da fosfatidil inositol 3 quinase

(PI3K). Quando ativada a PI3K fosforila sua subunidade catalítica p110, que é responsável pela fosforilação e ativação da proteína-quinase B/Akt (PKB/Akt). Na sequência a PKB/Akt fosforila a fosfodiesterase 3B que por sua vez degrada o AMPc, que seria responsável pela ativação da PKA. Dessa forma a supressão da lipólise acontece pela inativação da PKA e conseqüentemente a redução da fosforilação de HSL e perilipinas.

A regulação da lipólise pela insulina através de mecanismos independentes de AMPc envolve a estimulação da proteína fosfatase 1, a qual desfosforila e inibe a HSL causando assim redução da lipólise (LAFONTAN, 2009; DUNCAN et. al., 2007).

1.6 Ação e sinalização da insulina

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido. Sua ação promove a síntese e estoque de carboidrato, lipídios e proteínas, ao mesmo tempo que inibe a degradação e liberação na circulação destas substâncias.

Os receptores de insulina presente nos tecidos sensíveis à insulina pertencem ao grupo de receptores conhecido como receptores tirosino-quinase. Esses receptores são proteínas tetraméricas que possuem duas subunidades alfa e duas subunidades beta, que funcionam como enzimas alostéricas. A subunidade alfa inibe a atividade enzimática de tirosino-quinase da subunidade beta. Porém a ligação da insulina a subunidade alfa promove a autofosforilação da subunidade beta e sua mudança conformacional. A atividade quinase da subunidade beta catalisa a fosforilação de proteínas importantes nas vias de sinalização da insulina, como as proteínas substratos para receptor de insulina (IRS), Shc e Cbl (SALTIEL, 2001).

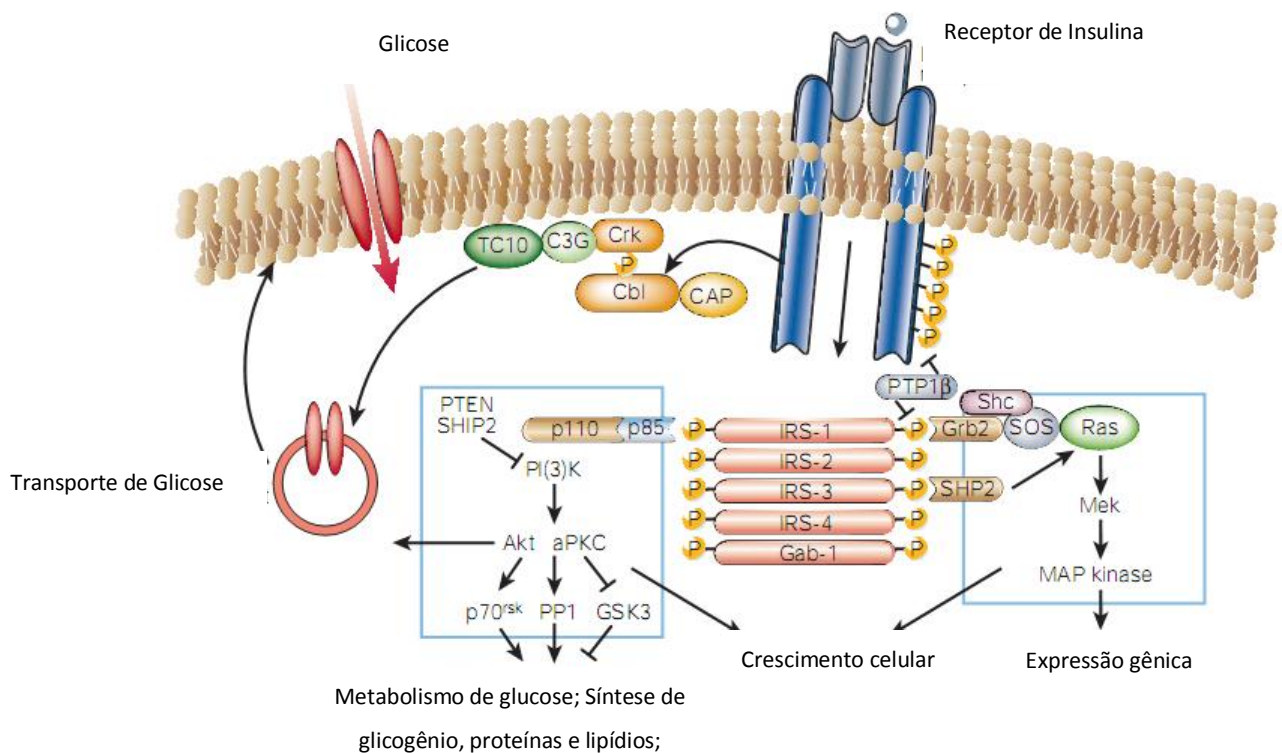


Figura 3: Sinalização da insulina. (Adaptado de SALTIEL; KAHN, 2001)

A insulina inicia a sua ação quando a se liga ao receptor heterotetrâmico e, ativa assim, a tirosina quinase. A fosforilação da tirosina ocorre nos domínios 1158/62/63 na porção citosólica do receptor (KIDO et al., 2001). Estes resíduos de tirosina fosforilados do receptor atuam como sítios de interação para várias proteínas (IRS, GAB e DOK) permitindo, por sua vez, a fosforilação e interação das mesmas com outras proteínas que possuem domínio SH2. As três principais vias ativadas por proteínas IRS, são as vias da PI3K, da CAP/Cbl/Tc10 e da MAPK (PIROLA et al., 2004). A PI-3K ativada aumenta as concentrações de fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato (PtdIns (3,4,5)P3), que regulam, por sua vez, a atividade de diferentes proteínas serina quinases como a proteína quinase B (PKB ou Akt), PDK-1 e as PKCs atípicas ζ/λ (PIROLA et al., 2004). A ativação da via da PI3K encontra-se envolvida com o transporte de glicose (translocação de GLUT4 para a membrana plasmática), síntese de glicogênio e lipogênese (Figura 4). Uma via paralela envolvida com a captação de glicose e recentemente descrita, é a via da CAP/Cbl/Tc10, iniciada pela associação da Cbl com o receptor da insulina através da proteína adaptadora CAP. O complexo CAP- Cbl encontra-se associado a “balsas” lipídicas e à proteína caveolar flotilina (PIROLA et al., 2004).

A via da MAPK também é ativada pela insulina através da associação SHC com o receptor de insulina e da Grb2. As MAPK ou ERKs (Extracellular signal-regulated kinases) não possuem papel principal nas respostas metabólicas, embora aumento na atividade basal de MAPK parece contribuir com o desenvolvimento da resistência à insulina (PIROLA et al., 2004).

1.7 Resistência à insulina

A redução da sensibilidade à insulina caracteriza o estado de resistência à insulina. A resistência à insulina acarreta na redução do transporte e metabolismo da glicose nos tecidos sensíveis a esse hormônio (tecido adiposo e músculo esquelético), além de aumentar a liberação da mesma pelo fígado. (KAHN, 2000).

A hipertrofia das células adipócitas desregula a secreção e liberação de adipocinas. O aumento da secreção de MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócito – 1) provoca aumento da infiltração de macrófagos dando início, assim, a um estado pró-inflamatório. A citocina TNF- α , produzida e secretada pelo macrófago infiltrado no tecido adiposo, exerce efeitos inibitórios sobre a sinalização da insulina através do aumento da fosforilação das proteínas IRS (substrato do receptor de insulina) em resíduos serina e treonina. Esta mesma citocina está envolvida com o aumento da expressão de proteínas como a JNK-1, ERK-1,2 e MAP4K4 (GUILHERME et al., 2008).

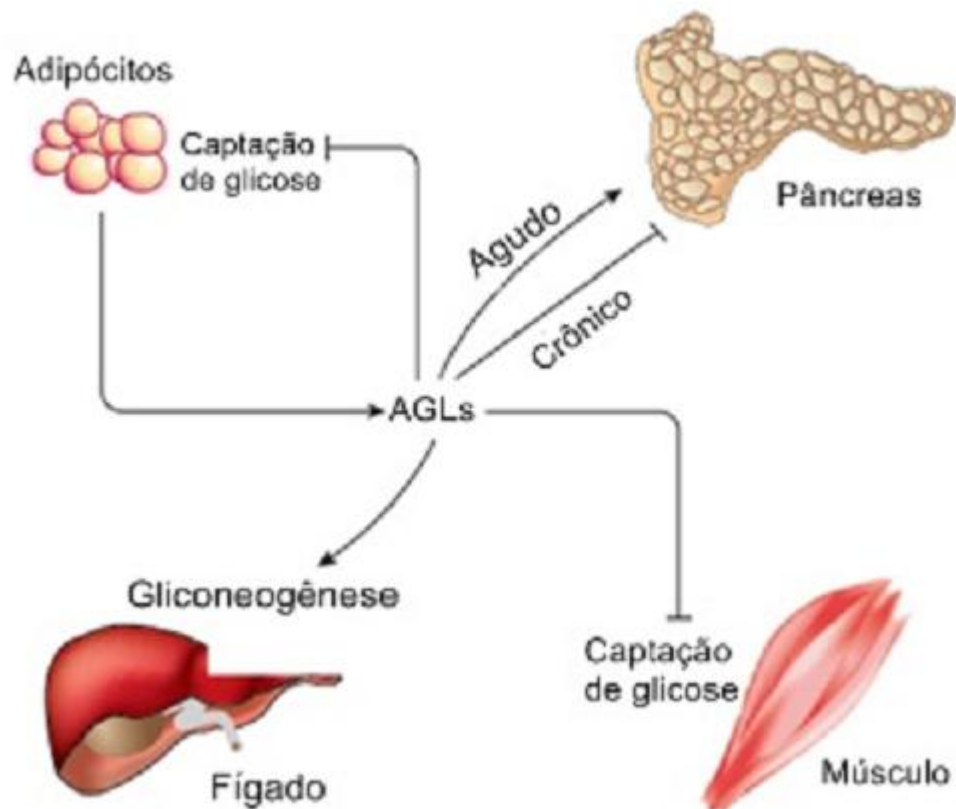


Figura 4: Obesidade como indutor da resistência à insulina (adaptado de ROSEN; SPIEGELMAN, 2006)

Altas concentrações AGL circulante está relacionado com a obesidade e diabetes tipo 2. Estes atuam como substrato no metabolismo energético. Os AGL na circulação reduzem a captação de glicose no tecido adiposo e no músculo e promovem a liberação da mesma pelo fígado, via neoglicogênese (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006). Esta condição também promove a produção de triacilgliceróis, apolipoproteína B e VLDL pelo fígado (MOORADIAN, 2009). Randle et al. (1963) foram os primeiros a propor a existência de competição entre os substratos lipídio e carboidrato, onde o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos reduz a captação e metabolismo da glicose estimulada pela insulina (RANDLE et al., 1963).

Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos modificam o metabolismo da glicose estão associados a alterações na atividade de diferentes proteínas como GLUT-4 (transporte de glicose), hexoquinase (fosforilação da glicose), glicogênio fosforilase (glicogenólise), fosfofrutoquinase (glicólise), piruvato desidrogenase (razão acetil-CoA/CoA) (SILVEIRA et al., 2008). A exposição crônica de ácidos graxos livres causa inibição de proteínas envolvidas na sinalização da insulina,

efeitos estes envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina (BODEN; SHULMAN, 2002). Interessantemente, a exposição aguda de ácidos graxos aumenta a síntese de glicogênio e a oxidação de glicose (HIRABARA et al., 2007). Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo secreta uma série de proteínas bioativas, conhecidas como adipocinas, as quais modulam o balanço energético, apetite, hemostase, pressão sanguínea, metabolismo de glicose e lipídio, sensibilidade à insulina, angiogênese, processo inflamatório e resposta imunitária (TRAYHURN; WOOD, 2004). Interessantemente, a síntese e liberação destas adipocinas encontram-se alteradas em indivíduos obesos, diabéticos tipo 2 e com síndrome metabólica (ANTUNA-PUENTE et al., 2008).

A adiponectina é uma adipocina capaz de aumentar a captação de glicose e oxidação de gordura no músculo, reduzir a produção de glicose hepática, e melhorar a sensibilidade à insulina. Interessantemente, as concentrações de adiponectina encontram-se reduzidas em indivíduos obesos (RABE et al., 2008). A adiponectina também apresenta efeitos anti-aterogênicos por inibir a adesão de monócitos, a transformação de macrófagos em células “espumosas” ou “foam cells” e a ativação de células endoteliais (RONTI et al., 2006). A leptina é outra adipocina importante por regular a ingestão alimentar e o gasto energético, estimular a lipólise e melhorar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos. A ativação do receptor de leptina inibe as vias orexígenas (neuropeptídeo Y - NPY e peptídeo relacionado ao agouti – AgRP) e ativa as vias anorexígenas (pro-opiomelanocortina – POMC e transcrição regulada pela cocaína e anfetamina – CART). As adipocinas resistina, RBP4 (Proteína ligadora de retinol 4), TNF- α e IL-6 possuem ação pró-inflamatória e encontram-se diretamente associadas à resistência à insulina (RONTI et al., 2006; RABE et al., 2008). Portanto, as adipocinas possuem importante papel no desenvolvimento do processo pró-inflamatório e da resistência à insulina em indivíduos obesos e diabéticos tipo 2.

Estudo recente verificou que a ausência de tecido adiposo, condição conhecida como lipodistrofia, também pode causar alterações metabólicas devido à ausência de leptina além de aumentar o depósito de lipídios em outros tecidos como fígado e músculo esquelético o que, conseqüentemente, contribui para o estado de resistência à insulina em ambos tecidos (GAVRILOVA, 2000). O aumento da ingestão alimentar juntamente com a redução de atividade física contribuem para a

hipertrofia dos adipócitos, os quais exercem principal função no armazenamento de triacilgliceróis. Quando a capacidade de armazenamento dos adipócitos é excedida, os lipídios começam a ser armazenado em outros tecidos como músculo esquelético e fígado, fenômeno conhecido como “gordura ectópica”, e seus metabólitos interferem na sinalização da insulina, no transporte e fosforilação da glicose e síntese de glicogênio muscular, além de aumentar a neoglicogênese hepática (BAYS et al., 2004). As células precursoras de adipócitos com baixa capacidade de proliferação e/ou diferenciação apresentam maior susceptibilidade a formar adipócitos de maior tamanho (HEILBRONN et al., 2004).

1.8 Tecido adiposo, insulina e metabolismo de glicose

O tecido adiposo, como a maioria dos tecidos sensíveis a insulina, é capaz de captar glicose com o propósito de fornecer energia às atividades celulares e promover a síntese e estoque de lipídios nos adipócitos. O metabolismo da glicose nos adipócitos pode resultar em três produtos finais: CO₂, glicogênio e TAG (DIGIROLAMO, 1992). A síntese de TAG pelo tecido adiposo normalmente é estimulada pela sinalização da insulina, que promove a absorção da glicose pelas células adiposas através da translocação do transportador de glicose GLUT 4 para a superfície da membrana plasmática. O GLUT 4 é encontrado em vesículas presentes no citoplasma, e é excitado quando estimulado pela ligação da insulina em seu receptor. Recentes estudos evidenciam a translocação dessas vesículas através de microtúbulos e proteínas motoras até a superfície celular, onde se fundirão a membrana expondo o receptor GLUT 4 ao meio extracelular (SALTIEL, 2001).

A insulina é o mais potente hormônio anabólico conhecido. Sua ação promove a síntese e estoque de carboidrato, lipídios e proteínas, ao mesmo tempo que inibe a degradação e liberação na circulação destas substâncias.

A regulação da síntese de glicogênio no tecido adiposo é coordenada pela insulina através da absorção da glicose. A enzima responsável pela síntese do glicogênio (glicogênio sintase) é ativada quando a insulina liga-se ao seu receptor, disparando uma cascata de sinalização que resulta na inibição de PKA, e a ativação da proteína fostatase – 1 (PP1), que contribuirão para a desfosforilação da

glicogênio sintase e sua ativação. A insulina não ativa a PP1 de maneira generalizada na célula, mas sim de forma compartimentalizada aumentando a atividade desta enzima fosfatase principalmente na molécula de glicogênio (BRADY, 1997; NEWGARD, 2000). O aumento da síntese de glicogênio promovido pela insulina é concomitante a diminuição da produção de glicose. Isso acontece pela ação direta da insulina no fígado inibindo a glicogenólise (MICHAEL, 2000). Além disso, a insulina atua diretamente na expressão gênica de algumas enzimas envolvidas na gliconeogênese. Exemplo é a inibição da transcrição da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase que limita um passo na produção de glicose. Também influencia na diminuição do nível de transcrição dos genes que codificam as enzimas frutose 1,6 bifosfato e glicose – 6 – fosfato, ambas envolvidas na produção de glicose (SUTHERLAND, 1996).

1.9 Metabolismo de lipídios e insulina

O metabolismo de lipídios sofre influência significativa da ação da insulina. Pois além de promover a síntese, este hormônio também atua na inibição da degradação destes lipídios. Estas ações metabólicas da insulina estão condicionadas ao aumento da transcrição da proteína SREBP-1. Esta proteína ativa a transcrição de vários genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de colesterol e AG nas células, dentre as quais podemos citar a glucoquinase, que inicia a conversão de glicose em AG, a acetil coA carboxilase, e a ácido graxo sintetase (WATERS, 2000). Alguns modelos de rato com lipodistrofia possuem níveis hepáticos aumentados dessa proteína, que parece estar diretamente relacionado com o aumento na taxa de síntese de lipídios, padrão este observado em modelos genéticos de indução de obesidade e diabetes (SHIMOMURA, 2000).

O fator de transcrição hepático responsivo ao carboidrato (ChSREBP) foi identificado como um indutor da lipogênese através do metabolismo da glicose (YAMASHITA, 2001). ChSREBP localiza-se no citoplasma em situações basais de glicose, porém quando a concentração de glicose plasmática aumenta ChSREBP sofre translocação para o núcleo da célula onde atuará na ativação de enzimas liponeogênicas. A glicose é convertida em piruvato através da via glicolítica e subsequentemente utilizado no ciclo de Krebs na mitocôndria para fornecer energia

em forma de ATP. Porém quando as concentrações deste substrato excedem o seu consumo, este pode ser convertido em glicogênio ou gordura. Enzimas já citadas como ATP citrato-liase, acetil coA carboxilase, e ácido graxo sintetase, atuam em várias etapas para transformar a glicose em ácido palmítico. O Ácido palmítico (C16:0) sofre desaturação pela enzima stearyl-CoA desaturase tornando-se ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), e ácido oléico (C18:1). A esterificação destes AG para formar triacilgliceróis envolve as enzimas diacilglicerol aciltransferases 1 e 2 (DGAT1 e DGAT2). Uma destas enzimas localiza-se no citoplasma e tem papel fundamental na formação de TAG no fígado. Outra localiza-se no retículo endoplasmático onde facilitará a incorporação dos AGs nas moléculas de colesterol (VLDL) (MORRAL, 2007).

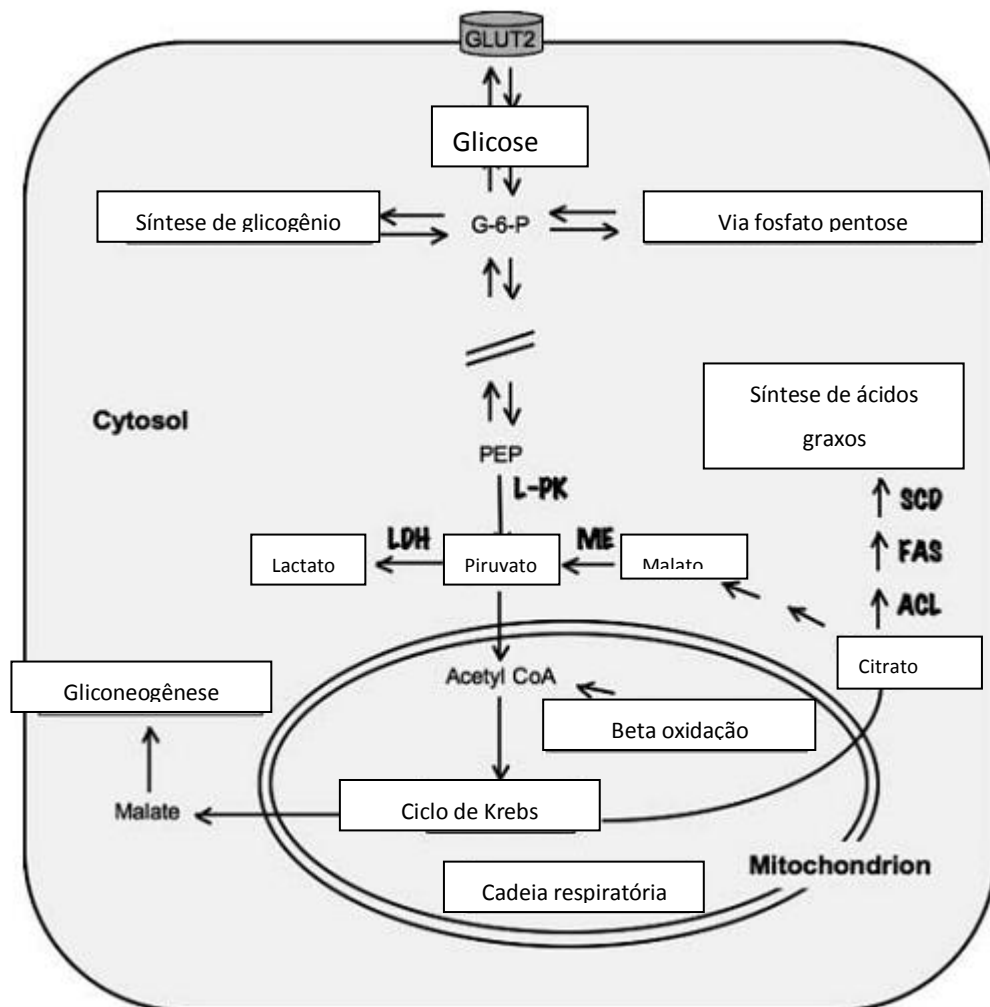


Figura 5: Mecanismos envolvidos na lipogênese e oxidação lipídica. (Adaptado de MORRAL, 2007).

Um estudo conduzido por BLUHER e col. (2002) utilizou modelos genéticos de animais sem o receptor de insulina nos adipócitos, e verificou que esses animais desenvolveram menor quantidade de tecido adiposo, sugerindo que a sinalização da insulina é crítica para o desenvolvimento da obesidade.

1.10 Produção de lactato pelo tecido adiposo

O lactato é produzido principalmente pelo músculo esquelético, porém, estudos já evidenciaram a produção de lactato pelo tecido adiposo (CRANDALL, 1983; THACKER, 1987). O Lactato é o principal precursor gliconeogênico durante situações de déficit energético (CONSOLI, 1990).

A célula adiposa pode variar o padrão de utilização de glicose, ou seja, pode converter a glicose em produtos específicos de acordo com as necessidades, e até condições fisiológicas, como exercício, obesidade, jejum.

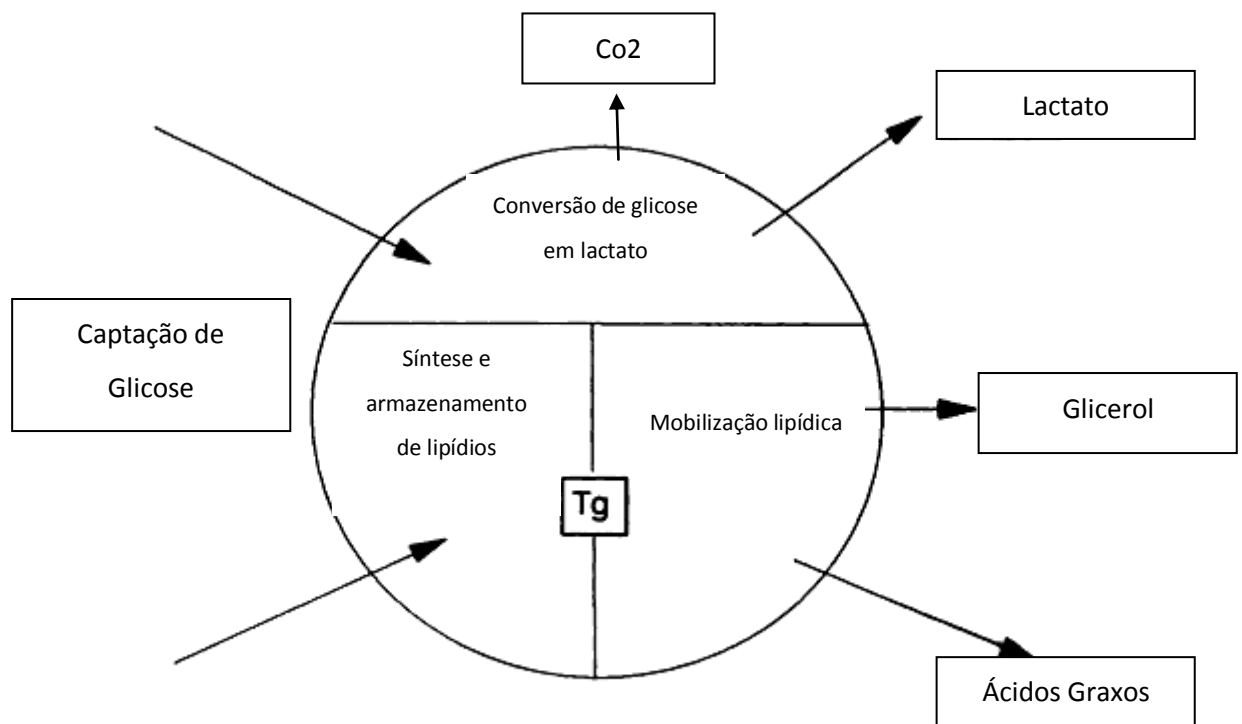


Figura 6: Visão esquemática da utilização da glicose no adipócito. (Adaptado de DIGIROLAMO, 1992)

Adiante, cito algumas evidências que apontam padrões diferenciados de produção de lactato relacionado a situações fisiológicas e experimentais específicas.

O tamanho da célula adiposa pode estar relacionado positivamente com a produção de lactato segundo alguns pesquisadores (NEWBY, 1990; THACKER, 1987). Esses autores verificaram um aumento exponencial na conversão de glicose em lactato em células maiores, acompanhado por uma redução na conversão de glicose em CO₂ e ácidos graxos. Além disso evidenciaram que ao aumentar a concentração de glicose no meio de incubação há um aumento na produção de lactato e piruvato. Experimentos realizados com adipócitos de humanos obesos demonstraram uma taxa de conversão de glicose em lactato de 60 – 70% (MARIN, 1987; KASHIWAGI, 1982).

O padrão nutricional também pode influenciar na produção de lactato pelo tecido adiposo. Ratos que se alimentaram de ração hiperlipídica demonstraram aumento na produção de lactato na ausência de insulina no meio de incubação, porém quando as células foram estimuladas com insulina não houve aumento na produção em relação ao controle (BERNSTEIN, 1981). Situações de restrição parcial ou total de alimento leva a alterações no metabolismo de glicose resultando na elevação da liberação de lactato pelo tecido adiposo. Alguns estudos evidenciaram que a glicose metabolizada a lactato pode aumentar de 5 – 15% em situações metabólicas normais para 50 – 60% em situações de jejum (NEWBY, 1990; THACKER, 1987).

Como já citado anteriormente, a obesidade está relacionada positivamente com a produção de lactato. Porém, num experimento realizado com indivíduos obesos, onde os mesmos receberam uma carga de glicose oralmente, a produção de lactato mostrou-se diminuída agudamente. Neste estudo os pesquisadores analisaram a sensibilidade à insulina destes indivíduos paralelamente a produção de lactato, e concluíram que a sensibilidade à insulina é inversamente proporcional a produção aguda de lactato, sugerindo que anormalidades no metabolismo de glicose pode estar mais relacionado com a resistência a insulina do que com a obesidade por si só (LOVEJOY, 1992).

Concluindo, o jejum parcial ou total promove a produção de lactato pelo tecido adiposo com a finalidade de estimular a gliconeogênese hepática. Além disso, após as refeições, quando as quantidades de glicose e insulina são alta, a produção

elevada de lactato pode contribuir para a síntese de glicogênio no fígado. Esses dados demonstram claramente mais uma importante função metabólica do tecido adiposo: converter glicose em lactato visando o melhor aproveitamento do metabolismo energético (DIGIROLAMO, 1992).

1.11 β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB) generalidades

O aminoácido de cadeia ramificada leucina modula muitas funções celulares, entre as mais importantes está a inibição de vias de sinalização específicas da proteólise. 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).

O β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB), um dos metabólitos do aminoácido leucina, faz parte de um grupo de suplementos alimentares comercializados com a proposta de promover melhoras na composição corporal como, aumento no percentual de massa magra, e diminuição do percentual de gordura. Nissen e Sharp (2003) destacaram em sua metanálise, que o HMB é um suplemento nutricional com eficácia demonstrada por estudos realizados com indivíduos saudáveis. Esse composto é um dos candidatos a promotor dos efeitos inibitórios da leucina sobre o catabolismo protéico, ao lado do α -cetóisocaproato (KIC). 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.

Parte da oxidação da leucina (5-10%) leva a produção de HMB. Uma outra parte da leucina metabolizada em mamíferos, passa por uma via metabólica característica que possui como seus produtos o acetoacetato e a acetil-CoA. 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 -cetogluturato 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.

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 -cetoglutarato pela enzima transaminase de aminoácido de cadeia ramificada (BCAA). 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 acceptor 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).

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).

Além do uso visando desempenho esportivo, e melhora da composição corporal, outra possível aplicação prática do HMB, seria em condições clínicas. Dados de nosso laboratório demonstraram que a administração de HMB por oito semanas, ocasionou efeitos inibitórios sobre o crescimento tumoral em animais. Outro fato evidenciado neste estudo foi a atenuação da instalação da caquexia oncológica nos indivíduos tratados com HMB, fato evidenciado pela prevenção da perda de peso (NUNES *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado em nosso laboratório, NUNES e colaboradores (2011) verificaram mudanças no perfil imunitário de humanos.

Pacientes infectados com HIV após oito semanas de suplementação com uma mistura contendo HMB, arginina e glutamina, tiveram um aumento significativo de massa magra em comparação com o grupo controle, além disso, apresentaram melhora nos parâmetros analisados do sistema imunitário. (CLARK *et al.*, 2000). SOARES e colaboradores verificaram que ratos submetidos a imobilização da pata traseira, quando suplementados com HMB, resultou na diminuição do dano muscular associado ao aumento do diâmetro da fibra muscular.

2 JUSTIFICATIVA

Uma condição clínica de crescente incidência na população mundial é a obesidade. O desenvolvimento da obesidade está associado com o aparecimento de distúrbios fisiológicos como, diabetes tipo 2, hipertensão, e outras complicações metabólicas (BRAVO, 2006). Fato que demonstra a necessidade de desenvolver novas estratégias direcionadas ao tratamento da obesidade.

Uma característica comum na condição de obesidade é a ineficiência na mobilização dos estoques de ácido graxo e sua oxidação (ACHTEN, 2004). Isso acarreta volume cada vez maior de tecido adiposo armazenado, conduzindo o quadro clínico a situações ainda mais sérias. Sendo assim, intervenções voltadas ao melhor funcionamento do metabolismo lipídico deve ser motivo de investigações futuras.

Um grupo de pesquisadores submeteu ratos à dieta hiperlipídica por oito semanas e constatou um aumento de tecido gorduroso perigonadal e subcutâneo, contribuindo assim para o aumento de 40% no peso corporal. Além disso, esses ratos desenvolveram outras complicações como resistência à insulina, condições inflamatórias no tecido adiposo e gordura hepática. Porém, essas complicações foram amenizadas quando a leucina foi adicionada à dieta dos ratos (MACOTELA, 2011). Segundo NISSEN (1996), os efeitos ergogênicos promovidos pela leucina, podem estar sendo promovidos pelo seu metabólito, o HMB.

Em alguns estudos envolvendo humanos, o HMB exerceu efeito nos parâmetros avaliados de composição corporal, inclusive sobre o percentual de gordura (PANTON, 2000; VUKOVICH, 2001; PORTAL, 2011).

PANTON e colaboradores (2000) demonstraram que a suplementação de HMB associado ao treinamento de força em homens e mulheres, promoveu a diminuição do percentual de gordura (1,1 % +/- 0,2) em relação ao grupo controle. Outro recente estudo investigou os efeitos da suplementação do HMB em jovens atletas de voleibol, e verificou uma diminuição considerável no percentual de gordura, além do aumento da massa magra e nos níveis de força dos atletas (PORTAL, 2011). VUKOVICH e colaboradores (2001), ao investigar trinta e um indivíduos homens e mulheres de 70 anos, verificaram por três métodos diferentes

de análise de composição corporal, que os idosos tiveram melhoras significativas em seu percentual de gordura.

Adipócitos de ratos foram analisados em um ensaio onde foram incubados sob a presença de HMB e resveratrol simultaneamente, apenas HMB, e apenas resveratrol. Os resultados mostraram que o HMB por si só exerceu um efeito modesto, mas significativo sobre a oxidação dos AG (29%), porém quando combinado com o resveratrol, esse efeito aumentou para 91%, sugerindo que as duas substâncias atuam sinergicamente no processo de oxidação de gorduras. Outro parâmetro avaliado, desta vez *in vivo*, foi a sensibilidade a insulina. Neste caso os animais foram suplementados com altas doses de resveratrol e HMB (225 mg/kg e 10 g/kg respectivamente) ou baixas doses (12,5 mg/kg e 2 g/kg respectivamente). Os resultados evidenciaram uma melhora na sensibilidade à insulina nos ratos suplementados com a baixa dosagem dessas substâncias (BRUCKBAUER, 2012).

Contudo, alguns estudos não corroboram os resultados citados acima. Diversos autores ao investigar os efeitos do HMB sobre a composição corporal de indivíduos saudáveis, não identificaram efeitos ergogênicos proveniente da suplementação com o produto.

Um estudo seguindo o modelo placebo duplo-cego conduzido em mulheres idosas, utilizou uma combinação de nutrientes composto por lisina, arginina, e HMB. Após doze semanas de suplementação com este composto foi demonstrado uma melhora na força funcional, síntese protéica, aumento da massa magra, mas não observou-se nenhuma diminuição no percentual de gordura no grupo experimental (FLAKOLL, 2004). KREIDER e colaboradores (2000), estudaram a resposta fisiológica de atletas de futebol americano de alto nível, quando submetidos à suplementação diária de 3g de HMB, e não constataram melhora no perfil antropométrico, e desempenho físico dos atletas.

Estudantes que foram submetidos a 3g de suplementação diária de HMB, associado ao treinamento aeróbico intervalado, obtiveram melhora nos componentes do condicionamento aeróbico quando comparados com grupo controle. Porém, a suplementação não foi suficiente para induzir uma diminuição do percentual de gordura dos estudantes (LAMBOLEY, 2007).

A controvérsia dos estudos citados acima sugere que o assunto está aberto a novas investigações. Novas abordagens metodológicas devem ser adotadas na tentativa de esclarecer o possível efeito ergogênico do HMB sobre o metabolismo do tecido adiposo.

Especula-se que a divergência dos resultados obtidos deve-se a grandes dificuldades metodológicas inerentes aos procedimentos de pesquisa envolvendo humanos. A diversidade de tipos de população (sedentários, atletas, jovens e idosos) utilizadas nos estudos, duração e tipo de treinamento, além de outras variáveis difíceis de serem controladas, como nutrição e descanso, nos levam a ter certa cautela na hora de interpretar os dados (WILSON GJ, 2008).

No que concerne ao nosso conhecimento, até o presente momento não há nenhum estudo na literatura científica que tenha analisado de forma isolada os efeitos do HMB sobre a oxidação lipídica *in vitro*. Essa investigação é passível, pois como citado acima, uma deficiência na mobilização e oxidação de ácidos graxos parece ser uma característica comum nos obesos. O fruto dessas investigações pode possuir potencial aplicação futura no tratamento da obesidade e suas complicações.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB), sobre a lipólise e o metabolismo da glicose em tecido adiposo de ratos;

Objetivos específicos

- Estudar os efeitos do HMB, sobre a atividade lipolítica com e sem o estímulo de adrenalina, no tecido adiposo incubado de ratos sedentários (C), agudamente exercitados (EA) e em jejum (JE).
- Estudar os efeitos do HMB, sobre o metabolismo de glicose estimulado por insulina, no tecido adiposo incubado de ratos nos grupos supracitados.
- Investigar os efeitos do HMB *in vivo* sobre a taxa de decaimento da glicose com e sem o estímulo de insulina nos grupos supracitados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério central do setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, com idade de 3 a 4 semanas e massa corporal entre 250 e 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em sala com temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, sob ciclo de iluminação de 12/12 horas, com livre acesso a água e ração contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos (dieta padrão), (Nuvilab CRI, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR). Os animais foram divididos em três grupos: 10 animais controle (C), 10 animais submetidos a exercício agudo antes do experimento (EA), e 10 animais submetidos a jejum de 12h durante a noite que antecedia os experimentos (JE). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todo procedimento experimental foi aprovado pelo comitê de Ética de Experimentação Animal do SCB (Setor de Ciências Biológicas).

4.2 Exercício agudo

Para as sessões de exercício agudo foram utilizadas esteiras para rato do Laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Após período de adaptação na esteira (15 minutos de corrida a 10m/min por dia, durante dois dias) os animais foram submetidos a uma única sessão de exercício. A sessão de exercício consistiu de 60 minutos de corrida a uma velocidade selecionada de 28 m/min, que segundo FATHI (2010) corresponde a intensidade moderada.

Antes do início da sessão os animais eram posicionados em suas respectivas raias na esteira, e só então a esteira era acionada em uma velocidade de 10m/min permanecendo assim por cinco minutos para um período de adaptação.

Durante todo o período de exercício (60 min) a esteira permanecia com velocidade constante (28 m/min), e inclinação de 0°.

Imediatamente após a sessão de exercício os animais foram ortotanasiados para a realização das análises.

4.3 Efeito do HMB sobre a lipólise com e sem o estímulo de adrenalina

O tecido adiposo epididimal foi isolado e cortado em pequenos fragmentos, pesado aproximadamente 100mg, e incubados por 60 minutos a 37° C, sob agitação constante, em tampão Krebs Ringer contendo 1% de albumina bovina, livre de gordura e 5,6 mM de glicose. O tecido foi incubado em duas concentrações diferentes de HMB (1mM e 5mM) na presença ou não de adrenalina (10µg/ml). Logo após a incubação 20µL da amostra foi coletada e transferida para a placa para a realização do ensaio enzimático colorimétrico e a determinação da concentração de glicerol.

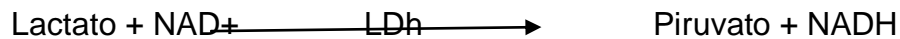
4.4 Mensuração de lactato

Para esta análise o tecido adiposo foi incubado como descrito acima, nas mesmas concentrações de HMB (1mM e 5mM), porém, na presença ou não de insulina (1mU/mL).

A mensuração foi realizada de acordo com o método enzimático descrito por ENGLE & JONES, (1978). Após a incubação foi realizada a desproteinização do soro, adicionando 200 µL de ácido tricloroacético (TCA 25%). Após a desproteinização o soro foi transferido para tubos Eppendorf e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos (Eppendorf modelo 5810R). Da amostra centrifugada coletou-se 250 µL do sobrenadante e foi adicionado 4 µL de indicador universal, o que permite visualizar a neutralização do soro. A neutralização do soro foi visualizada pela a adição de aproximadamente 24 µL de KOH/TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizada pela coloração verde que indica pH de 7,0.

Do volume neutralizado foram coletados 20 µL e transferido para a placa onde foi adicionado mais 200 µL de tampão do ensaio (descrito abaixo). Após 45

minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. O princípio desta mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo o consumo de NAD⁺ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra. Seguindo a reação:



A partir da medida da absorbância, foi calculada a concentração de lactato sérico em $\mu\text{mol/ml}$, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = (\text{DO} / 6,22) \times (\text{V1} / \text{V2}) \times (\text{V3} / \text{V4}) \times (\text{V5} / \text{V6})$$

DO = Densidade ótica da amostra

6,22 = constante

V1 = volume da amostra + tampão ensaio

V2 = volume amostra

V3 = volume soro + TCA

V4 = volume do soro

V5 = volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

V6 = volume do soro desproteinizado

TAMPÃO DE ENSAIO (para 20 ml de água destilada)	
EDTA	0,056 g
Glicina	0,56 g

Hidrato de hidrazina	0,3 ml
LDh	0,08 ml
NAD+	12 mg
pH	8,85

4.5 Teste de tolerância à insulina

Os animais dos grupos JE (n=12), EA (n=12), e C (n=12) foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/Kg). E após a mensuração da glicemia basal, foram administradas soluções intraperitoneal de insulina (0,75 U/Kg) somente (SAMPEY et al., 2011), HMB (300mg/Kg) somente, ou combinação de ambas. A Glicemia foi mensurada nos tempos 4, 8, 12, 16. Os valores da glicemia foram utilizados para calcular a constante de decaimento da glicose (kitt) (BONORA et al., 1989).

4.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado teste de normalidade D'Agostino Pearson para a verificação da distribuição normal. Foi realizada análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni, para comparações de condições de estímulo e sem estímulo e concentrações de HMB. Foi empregado o teste "t" para avaliar a lipólise entre os grupos. A análise de variância de uma via (one way ANOVA), seguida de pós teste de Tukey foi aplicada para avaliar a taxa de decaimento de glicose no teste de tolerância à insulina. O valor de $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância. As análises estatísticas e a confecções dos

gráficos foram realizadas no software graphpad prisma v.5.01 (Graphpad Inc.: La Jolla, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Lipólise grupo controle

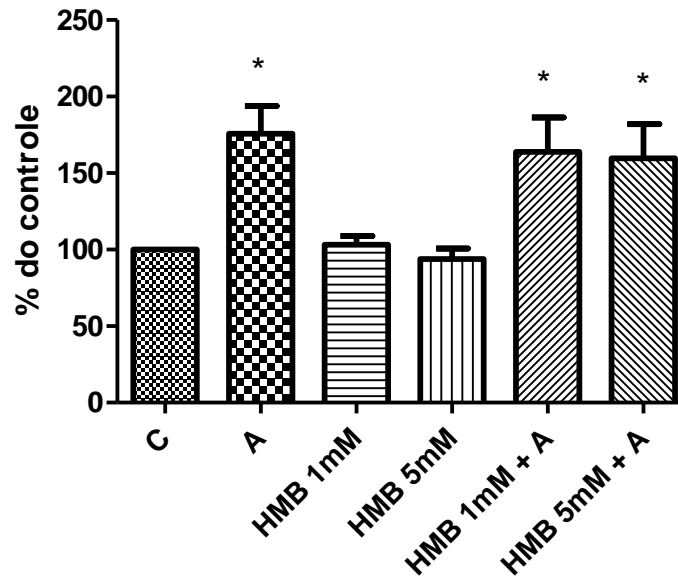


Figura 7: Lipólise tecido adiposo epididimal do grupo C (n=9). * Quando comparado com a situação sem estímulo. (Two way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). $P < 0,05$

Na situação sem estímulo do grupo controle (C), não houve alteração da lipólise. A adição de HMB, em duas concentrações diferentes (1mM e 5mM) ao meio de incubação, sem o estímulo de adrenalina, não foi capaz de provocar mudanças no perfil lipolítico ($p > 0,05$). Quando as duas concentrações de HMB foram testadas no meio de incubação, na presença de adrenalina, a lipólise permaneceu inalterada se comparada à situação de estímulo da adrenalina apenas (A). ($p > 0,05$). O que demonstra que o HMB não exerceu efeito sobre a atividade lipolítica, tanto na situação com estímulo como na sem estímulo.

5.2 Lipólise exercício

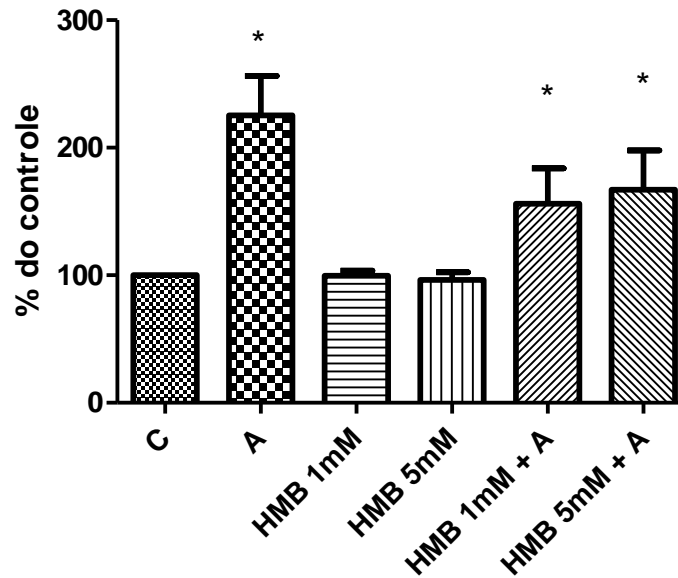


Figura 8: Lipólise tecido adiposo epididimal do grupo JE (n=9). * Quando comparado com a situação sem estímulo. (Two way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). $P < 0,05$.

Na situação sem estímulo do grupo controle (C), não houve alteração da lipólise. A adição de HMB, em duas concentrações diferentes (1mM e 5mM) ao meio de incubação, sem o estímulo de adrenalina, não foi capaz de provocar mudanças no perfil lipolítico ($p > 0,05$). Quando as duas concentrações de HMB foram testadas no meio de incubação, na presença de adrenalina, a lipólise sofreu alguma, porém não significativa redução da lipólise, quando comparada à situação de estímulo da adrenalina apenas (A). ($p > 0,05$). O que demonstra que o HMB não exerceu efeito sobre a atividade lipolítica, tanto na situação com estímulo como na sem estímulo. A situação metabólica pós-exercício parece não ter interferido significativamente, em um possível efeito aditivo ou negativo do HMB sobre a lipólise.

5.3 Lipólise jejum

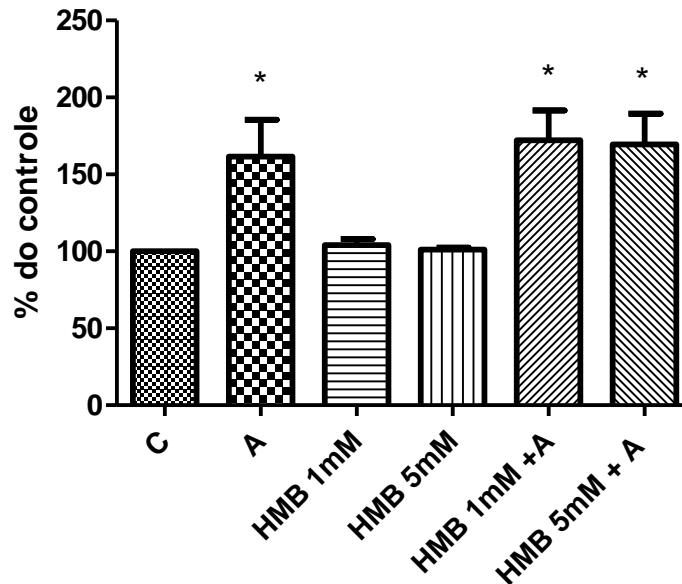


Figura 9: Lipólise tecido adiposo epididimal do grupo JE (n=4). * Quando comparado com a situação sem estímulo. (Two way ANOVA com pós-teste de Bonferroni). $P < 0,05$.

Na situação sem estímulo do grupo controle (C), não houve alteração da lipólise. A adição de HMB, em duas concentrações diferentes (1mM e 5mM) ao meio de incubação, sem o estímulo de adrenalina, não foi capaz de provocar mudanças no perfil lipolítico ($p > 0,05$). Quando as duas concentrações de HMB foram testadas no meio de incubação, na presença de adrenalina, a lipólise permaneceu inalterada se comparada à situação de estímulo da adrenalina apenas (A). ($p > 0,05$). O que demonstra que o HMB não exerceu efeito sobre a atividade lipolítica, tanto na situação com estímulo, como na sem estímulo. A situação metabólica de jejum parece não ter modificado o perfil lipolítico das condições experimentais em relação ao grupo controle.

5.4 Lipólise entre grupos

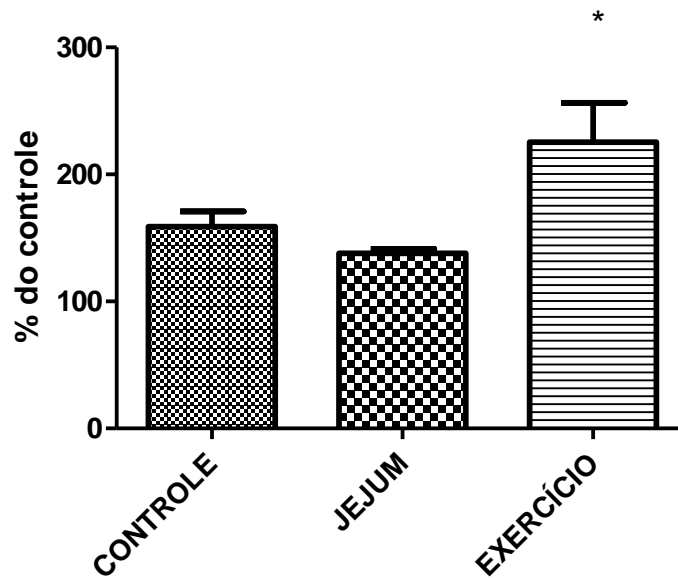
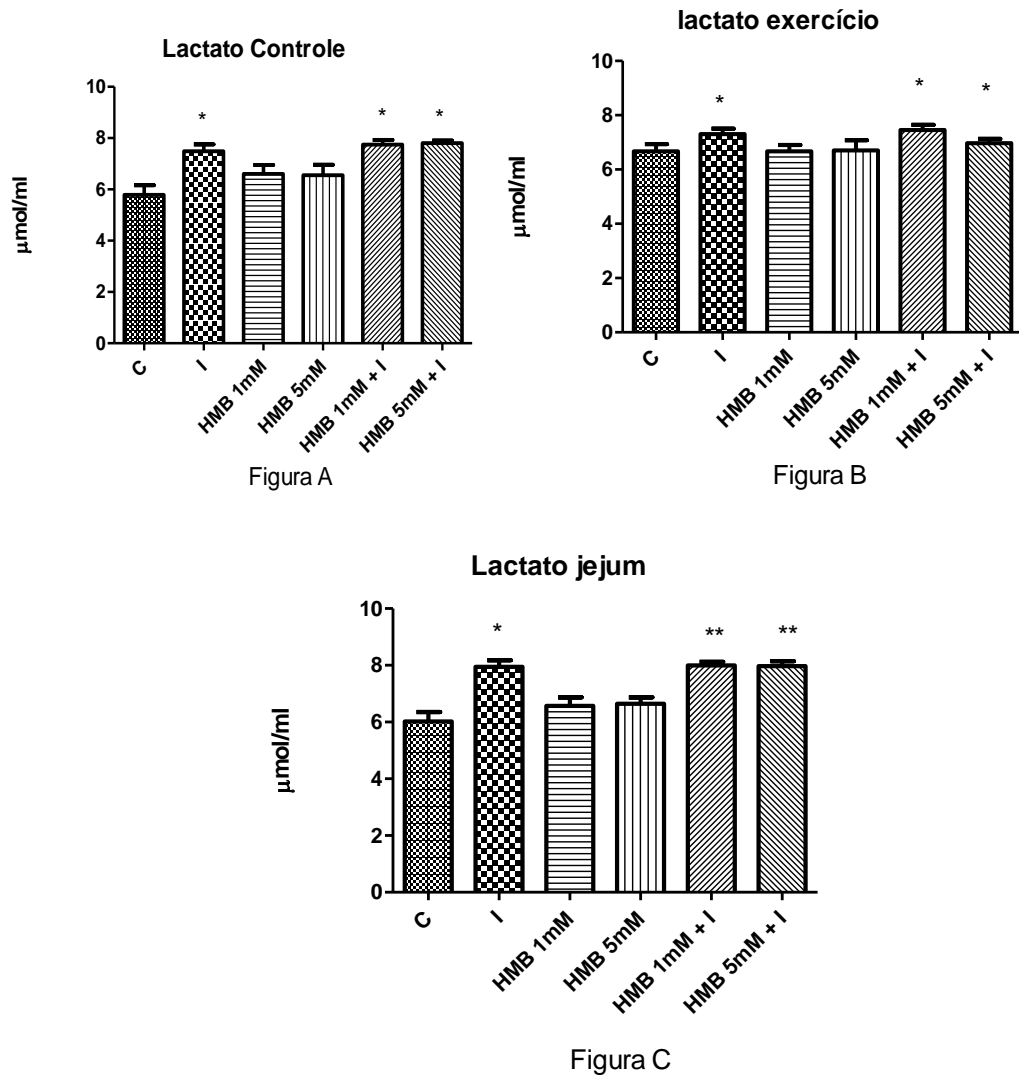


Figura 10: Lipólise com o estímulo da adrenalina e sem o HMB no meio de incubação dos grupos EX, JE, e C. * quando comparado ao grupo controle (teste “t” student) $p < 0,05$.

No grupo exercitado, o exercício agudo parece ter causado um efeito aditivo sobre a atividade lipolítica em comparação aos grupos JE e C. Porém, apenas em comparação ao grupo controle é que a diferença foi significativa (50%, $p < 0,05$).

5.5 Lactato



Figuras 11 A, B e C: Produção de lactato pelo tecido adiposo incubado do grupo C, EA, e JE (n=9). * Quando comparado com grupo controle (one way ANOVA com pós-teste de Tukey) $P < 0,05$. **, quando comparado com seu respectivo grupo sem estímulo da insulina (one way ANOVA com pós-teste de Tukey).

A produção de lactato a partir da glicose pelo tecido adiposo epididimal, está apresentado nos gráficos acima. Nas situações metabólicas, basal (C), jejum (JE), e Exercício agudo (EA), a produção de lactato foi aumentada apenas quando a insulina foi adicionada ao meio de incubação ($p < 0,05$). As diferentes concentrações de HMB (1mM e 5mM) não exerceram efeito algum sobre a produção de lactato, também não interferiram na ação da insulina em estimular a produção de lactato. O

jejum e o exercício agudo não foram capazes de modificar o padrão de produção de lactato apresentado pelo grupo em situação basal.

5.6 Tolerância à insulina

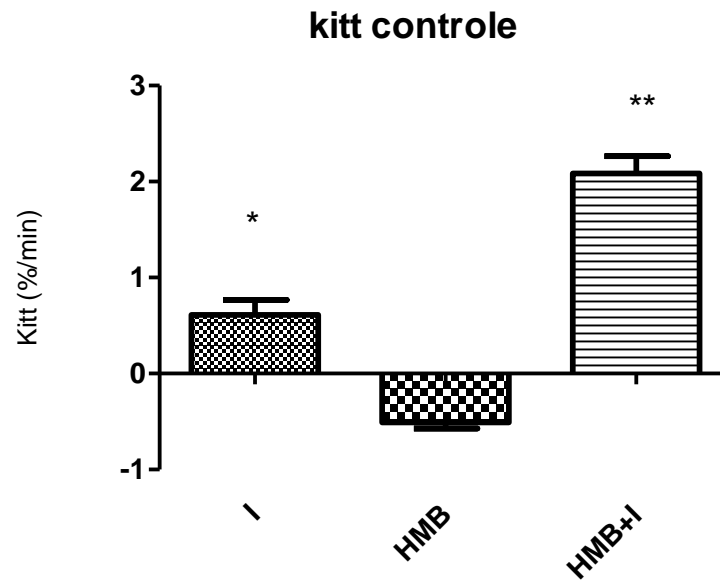


Figura 12: Kitt taxa de decaimento da glicose do grupo C. * Quando comparado à situação sem estímulo de insulina (HMB), ** quando comparada à situação com estímulo da insulina e sem HMB (I) (One way ANOVA com pós-teste de Tukey).

A administração da insulina intraperitoneal nos animais em situação basal provocou taxa de decaimento da glicose com diferença significativa, em relação aos animais do mesmo grupo que receberam apenas injeção de HMB ($p < 0,05$). De maneira interessante, o grupo que recebeu adicionalmente à dose de insulina, a dose de HMB, apresentou maior sensibilidade à insulina ($p < 0,05$).

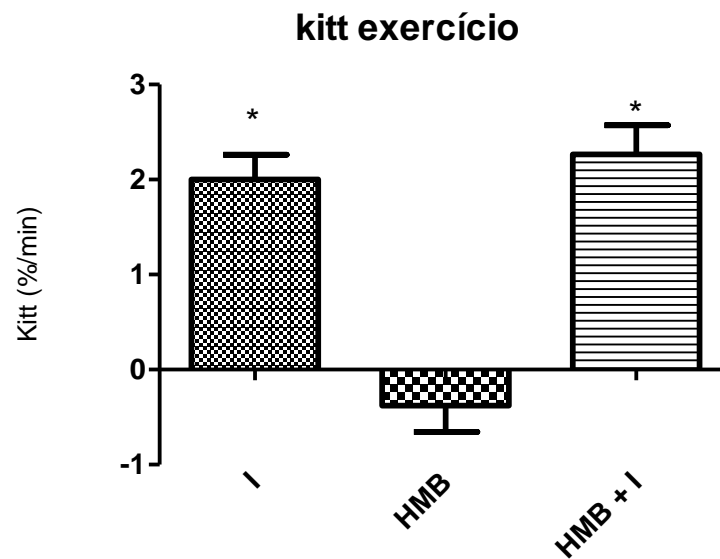


Figura 13: Kitt taxa de decaimento da glicose do grupo EX. * Quando comparado à situação sem estímulo da insulina (HMB) (One way ANOVA com pós teste de Tukey)

O grupo exercitado agudamente apresentou sensibilidade elevada à insulina nas duas condições onde houve o estímulo com insulina. Administrada de forma isolada, ou em combinação do HMB, a insulina promoveu o aumento da taxa de decaimento da glicose em relação aos animais que receberam apenas injeção de HMB ($p < 0,05$). Neste grupo (EA), não houve diferença significativa na taxa de decaimento entre os animais que receberam apenas insulina e insulina combinado com HMB ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Lipólise

A obesidade pode ser considerada uma condição patológica geralmente acompanhada por distúrbios fisiológicos como hipertensão, resistência à insulina, e uma série de complicações de origem metabólica. A ineficiência em mobilizar e oxidar lipídios parece ser uma característica comum em indivíduos obesos (ACHTEN, 2004). Sendo assim, investigar possíveis intervenções com a proposta de otimizar o metabolismo lipídico é de grande relevância para o meio científico. Além disso, a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na mobilização e oxidação lipídica deve ser aprofundada.

Uma intervenção considerada no tratamento da obesidade é a abordagem nutricional através de suplementos alimentares. E com a crescente população de obesos, muitos suplementos estão sendo direcionados comercialmente ao emagrecimento. Visto que a obesidade tornou-se um problema de saúde pública de âmbito mundial, muitos pesquisadores voltaram seus esforços científicos para testar a eficácia desses suplementos alimentares (BRUCKBAUER, 2012; VUCKOVICH, 2001; ZEMEL, 2012; WILSON, 2012).

O metabólito da leucina β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB), vem ganhando destaque entre os suplementos alimentares mais estudados, pois sua provável eficácia como inibidor das vias de sinalização da proteólise, e como um possível agente promotor da hipertrofia, tem sido demonstrada por muitos estudos (NISSEN, 2003). Em grande parte destes estudos envolvendo humanos, a gordura corporal é um dos parâmetros avaliados, porém os dados são conflitantes (WILSON, 2008), indicando a necessidade de maiores investigações relacionadas aos efeitos do HMB sobre o metabolismo de lipídios.

Vários estudos envolvendo humanos verificaram a interferência do HMB nos parâmetros antropométricos, sendo um deles, o percentual de gordura. Mas os dados são contraditórios. Panton e colaboradores (2000) conduziram um estudo envolvendo 39 homens e 36 mulheres, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos, onde um deles recebeu suplementação diária de 3g de HMB e o outro placebo. O grupo que recebeu suplementação diária de HMB, além de melhorar a

força de membros superiores (7,5 +/- 0,6 kg), e aumentar a massa livre de gordura (1,4 +/- 0,2 kg), também obteve redução em seu percentual de gordura (1,1 +/- 0,2 %).

Um grupo de adultos de 70 anos foi beneficiado em vários parâmetros avaliados, quando foi submetido a um programa de exercício e a suplementação de 3g diárias de HMB. A diminuição do percentual de gordura foi verificado no grupo suplementado em relação ao grupo placebo (HMB: -0,66; placebo: 0,03; $p=0,05$)(VUKOVICH, 2001).

O percentual de gordura de ratos de várias idades foi avaliado ao término de um período de suplementação de 16 semanas de HMB. Os animais considerados de meia idade (60 semanas), quando na condição controle, aumentaram o percentual de gordura em 49%, o que não aconteceu no mesmo grupo suplementado com HMB. Além disso, no grupo de ratos considerado idoso (86 semanas), foi verificado uma diminuição de 56% no percentual de gordura em comparação com o mesmo grupo na condição controle (WILSON, et al., 2012).

Contudo, alguns estudos não corroboram com os resultados citados acima. Diversos autores ao investigar os efeitos do HMB sobre a composição corporal de indivíduos saudáveis, não identificaram efeitos ergogênicos proveniente da suplementação com o produto (FLAKOLL, 2004; KREIDER, 1996; LAMBOLEY, 2007).

Um estudo seguindo o modelo placebo duplo-cego conduzido em mulheres idosas, utilizou uma combinação de nutrientes composto por lisina, arginina, e HMB. Após doze semanas de suplementação com este composto foi demonstrado uma melhora na força funcional, síntese protéica, aumento da massa magra, mas não observou-se nenhuma diminuição no percentual de gordura no grupo experimental (FLAKOLL, 2004). KREIDER e colaboradores (1996) estudaram a resposta fisiológica de atletas de futebol americano de alto nível, quando submetidos à suplementação diária de 3g de HMB, e não constataram melhora no perfil antropométrico, e desempenho físico dos atletas.

Estudantes que foram submetidos a 3g de suplementação diária de HMB, associado ao treinamento aeróbico intervalado, obtiveram melhora nos componentes do condicionamento aeróbico quando comparados com grupo controle. Porém, a

suplementação não foi suficiente para induzir uma diminuição do percentual de gordura dos estudantes (LAMBOLEY, 2007).

A controvérsia observada nos estudos anteriores, provavelmente ocasionada por dificuldades metodológicas, motivou nosso laboratório a investigar os efeitos do HMB sobre o metabolismo do tecido adiposo, em animais e *in vitro*.

Neste estudo, o tecido adiposo dos animais foi incubado na presença de duas concentrações diferentes de HMB (1mM e 5mM), com, ou sem o estímulo da adrenalina, e sob a interferência de três estados metabólicos distintos, basal (C), jejum (JE) e exercício agudo (EA).

Nossos experimentos demonstraram que o HMB em duas concentrações diferentes (1mM e 5mM) não exerceu efeito aditivo sobre a lipólise do tecido adiposo incubado. Analisando os estudos que encontraram resultados diferentes, ou seja, que o HMB interferiu positivamente sobre o metabolismo do tecido adiposo, podemos constatar que os estudos utilizaram modelos crônicos de exposição ao HMB (WILSON, 2012, BRUCKBAUER, 2012), expondo os tecidos ao HMB tempo suficiente para que ocorra a biogênese mitocondrial, e dessa forma contribuir para metabolismo lipídico.

Em contraste com os dados apresentados acima, onde o HMB não interferiu na lipólise, num estudo conduzido por DONATO e col. (2005), ratos submetidos à restrição calórica, que receberam suplementação de leucina (5,91g/ Kg de ração) durante 6 semanas, tiveram sua massa gordurosa diminuída. Talvez, a interferência positiva da leucina (ou de seu metabólito, HMB) sobre a lipólise, deve-se ao fato de o tecido ser exposto à substância de maneira crônica, e dessa forma aumentar a biogênese mitocondrial, o que contribuiria para oxidação lipídica (BRUCKBAUER, 2012; SUN, 2009).

Uma das respostas fisiológicas promovidas pelo exercício agudo é a ativação da via simpático-adrenal, ocasionando na descarga de catecolaminas no sangue. As catecolaminas por sua vez irão estimular a hidrólise de TAG nas gotículas lipídicas no adipócito, liberando AGL e glicerol que serão usados no metabolismo energético (OGASAWARA, 2010). Essa resposta fisiológica é mediada pela transdução de sinais através de receptores beta-adrenérgicos do tipo 1,2, e 3. A cascata lipolítica inicia com a ativação da enzima adenilil-ciclase que ao estimular a produção de AMPc ativará a proteína-quinase A (PKA) que terá como alvo duas

proteínas que exercem papel fundamental na lipólise, a HSL e Perilipina A (HOLM, 2000). Um estudo conduzido por OGASAWARA (2004), demonstrou que a produção intracelular de AMPc em adipócitos epididimal aumentou consideravelmente logo após (0h), e três horas após o exercício agudo, mas sofreu uma redução significativa 24h após o exercício. Além disso, OGASAWARA (2006), também verificou que a expressão dos receptores beta-adrenérgicos do tipo 2 na membrana celular, está associado aos níveis de AMPc intracelular. Esses resultados sugerem que o exercício agudo pode gerar mudanças fisiológicas e bioquímicas na cascata lipolítica logo após o exercício.

Dados obtidos em nossos experimentos corroboram os estudos citados acima. A figura 10 demonstra o efeito aditivo do exercício sobre a lipólise. Na situação de exercício agudo, a lipólise foi significativamente aumentada em relação ao grupo JE e C. (EA: 225%, JE: 161%, C 175%). A taxa lipolítica foi 50% maior no grupo EA comparando com o grupo C, diferença que foi significativa ($p < 0,05$). Uma possível explicação para o fato constatado acima, é de que efeito estimulante das vias simpático adrenais causado pelo exercício, possa ter se somado ao efeito estimulante da adrenalina no meio de incubação.

6.2 Metabolismo da glicose

O lactato é produzido principalmente pelo músculo esquelético, porém, estudos já evidenciaram a produção de lactato pelo tecido adiposo (CRANDALL, 1983; THACKER, 1987). O Lactato é o principal precursor gliconeogênico durante situações de déficit energético (CONSOLI, 1990).

A célula adiposa pode variar o padrão de utilização de glicose, ou seja, pode converter a glicose em produtos específicos de acordo com as necessidades, e até condições fisiológicas, como exercício, obesidade, jejum.

Um dos objetivos da presente pesquisa foi verificar se o HMB, em concentrações diferentes, seria capaz de interferir na produção de lactato pelo tecido adiposo, em condições fisiológicas diferentes, como, exercício agudo, jejum e basal.

NEWBY (1990) e THACKER (1987), evidenciaram que situações de restrição parcial, ou total de alimento, leva a alterações no metabolismo de glicose resultando na elevação da liberação de lactato pelo tecido adiposo. Estes estudos

demonstraram que a glicose metabolizada a lactato pode aumentar de 5 – 15% em situações metabólicas normais, para 50 – 60% em situações de jejum. Dados similares não foram observados em nosso experimento, apesar de produção de lactato ter sido ligeiramente maior no grupo jejum ($p>0,05$).

Uma situação fisiológica que não foi testada em nossos experimentos, foi a obesidade. A produção de lactato em indivíduos obesos mostrou-se diminuída agudamente, quando receberam uma carga de glicose oralmente. Nestes estudos os pesquisadores analisaram a sensibilidade à insulina destes indivíduos, paralelamente a produção de lactato, e concluíram que a sensibilidade à insulina é inversamente proporcional a produção aguda de lactato, sugerindo que anormalidades no metabolismo de glicose pode estar mais relacionado com a resistência a insulina do que com a obesidade por si só (LOVEJOY, 1992). Uma de nossas hipóteses experimentais, é que o HMB, pudesse restaurar, ou aumentar a sensibilidade do tecido à insulina. Hipótese que foi confirmada nos testes *in vivo* (kitt, figura 12), porém não *in vitro* (figura 11 A,B e C). Novos estudos, utilizando indivíduos obesos, são necessários para que se possa verificar a interferência do HMB sobre o metabolismo da glicose nesta condição fisiológica.

As figuras 11 A, B e C demonstram que a insulina estimulou significativamente a produção de lactato ($p<0,05$) nos três grupos experimentais (EA, JE e C). A adição de HMB ao meio de incubação, em duas concentrações diferentes (1 e 5mM), não alterou a produção de lactato pelo tecido adiposo nas condições com e sem estímulo. Recentemente, um grupo de pesquisadores avaliaram os efeitos do HMB, e da combinação de HMB e resveratrol, sobre a ativação da SIRT 1 (*silent information regulator transcription*) em meio de cultura de adipócitos. Constatou-se que o HMB isoladamente exerceu pouco, ou nenhum efeito sobre a ativação da SIRT 1, porém a ativação aumentou em 50%, quando a combinação HMB e resveratrol foi utilizada (BRUCKBAUER, 2012). A SIRT 1 pertence a uma classe de proteína desacetilase dependente de NAD⁺, que estão envolvidas na regulação do metabolismo energético e sobrevivência celular. A ativação da SIRT 1 está relacionada com a estimulação da biogênese mitocondrial, assim como a ativação de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e da glicose. O HMB e o resveratrol têm sido sugerido como possíveis ativadores da SIRT 1, e

dessa forma tornaram-se foco de estudo no tratamento de doenças metabólicas, como resistência à insulina e diabetes (BRUCKBAUER, 2012).

Corroborando com os dados do estudo citado acima, nossos dados demonstraram que o HMB, isoladamente, não exerceu efeito sobre o metabolismo da glicose do tecido adiposo incubado. Futuramente, novas investigações são necessárias com o intuito de testar a combinação do HMB e resveratrol no meio de incubação, e desta forma verificar se agem de maneira sinérgica no metabolismo da glicose e produção de lactato.

Quando a interferência do HMB sobre o metabolismo da glicose foi testada de maneira *in vivo*, este mostrou potencializar a ação da insulina (figura 12), pois a administração de HMB e insulina, simultaneamente, obteve uma taxa de decaimento da glicose 240% maior, do que quando a insulina foi administrada sem o HMB ($p < 0,05$). Esse efeito potencializador do HMB sobre a ação da insulina, e consequentemente a captação da glicose e produção de lactato, não foi observado nos testes *in vitro* (figura 11). Uma possível explicação para o fato de o HMB mostrar-se potencializador da ação da insulina, apenas nos testes *in vivo*, seja que nesta metodologia, outros tecidos periféricos sensíveis à insulina e ao HMB, como músculo e fígado, atuem de maneira sinérgica para restabelecer a glicemia aos valores basais. Já nos testes *in vitro*, apenas um tecido (TA), contribuiu para o restabelecimento da glicemia. Além disso, o músculo pode ser mais responsivo à ação do HMB do que o tecido adiposo. Um dado obtido por BRUCKBAUER e col.(2012), corrobora esta hipótese. Esse grupo de pesquisadores, avaliou o efeito da dieta rica em Leucina sobre a absorção de glicose e palmitato no músculo e no tecido adiposo, e concluíram que a absorção de glicose foi significativamente maior, apenas no músculo.

CONCLUSÃO

O HMB não exerceu efeito aditivo sobre lipólise, em tecido adiposo incubado de ratos, em três situações metabólicas: basal (C), exercitado agudamente (EA) e jejum (JE).

Também não foi capaz de interferir sobre a produção de lactato do tecido adiposo incubado, o que demonstra que o HMB não promoveu a sensibilidade da insulina no tecido analisado.

O HMB administrado em combinação com a insulina, via intraperitoneal, promoveu uma taxa de decaimento da glicose mais acentuada, quando comparada com a situação sem o HMB deste mesmo grupo (C), esse efeito não foi observado nos outros grupos (EA e JE). Esse resultado demonstra um possível efeito do HMB sobre o metabolismo da glicose *in vivo*.

O grupo EA apresentou perfil lipolítico aumentado quando comparado com grupo controle e jejum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTEN, J.; JEUKENDRUP, A. E. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 20, n. 7-8, p. 716-27, 2004.

ANTUNA-PUENTE, B.; B. FEVE; S. FELLAHI; J. P. BASTARD. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab**, v.34, n.1, Feb, p.2-11. 2008.

BERNSTEIN, R. S.; ZIMMERMAN, K. S.; CARNEY, A L. Absence of impaired glucose utilization in adipocytes from rats fed a carbohydrate-free, high protein diet. **The Journal of nutrition**, v. 111, n. 2, p. 237-43, 1981.

BODEN, G.; G. I. SHULMAN. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. **Eur J Clin Invest**, v.32 Suppl 3, Jun, p.14-23. 2002.

BRADY, M. J.; NAIRN, A. C.; SALTIEL, A. R. The Regulation of Glycogen Synthase by Protein Phosphatase 1 in 3T3-L1 Adipocytes. , v. 272, n. 47, p. 29698-29703, 1997.

BRASAEMLE, D L; RUBIN, B.; HARTEN, I. A; et al. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38486-93, 2000.

BRASAEMLE, DAWN L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 12, p. 2547-59, 2007.

BRAVO, P. E.; MORSE, S.; BORNE, D. M.; AGUILAR, E. A; REISIN, E. Leptin and hypertension in obesity. **Vascular health and risk management**, v. 2, n. 2, p. 163-9, 2006.

BRUCKBAUER, A.; ZEMEL, M. B.; THORPE, T. et al. Synergistic effects of leucine and resveratrol on insulin sensitivity and fat metabolism in adipocytes and mice. **Nutrition & metabolism**, v. 9, n. 1, p. 77, 2012.

CLARK, R. H., FELEKE, G., DIN, M. 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.** 24:133–139. 2000.

CONSOLI, A.; NURJHAN, N.; REILLY, J. J.; BIER, D. M.; II, J. E. G. Mechanism of Increased Gluconeogenesis in Noninsulin-dependent Diabetes Mellitus. , v. 86, n. December, p. 2038-2045, 1990.

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

FLAKOLL, P.; SHARP, R.; BAIER, S. et al. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 20, n. 5, p. 445-51, 2004.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

GUILHERME, A.; J. V. VIRBASIUŠ; V. PURI; M. P. CZECH. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.5, May, p.367-77. 2008.

HAEMMERLE, G.; LASS, A.; ZIMMERMANN, R. et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5774, p. 734-7, 2006.

HEILBRONN, L.; S. R. SMITH; E. RAVUSSIN. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.28 Suppl 4, Dec, p.S12-21. 2004.

HIRABARA, S. M.; L. R. SILVEIRA; F. ABDULKADER; C. R. CARVALHO; J. PROCOPIO; R. CURI. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. **J Cell Physiol**, v.210, n.1, Jan, p.7-15. 2007.

HOLECEK, M., MUTHNY, T., KOVARIK, M., SISPERA, L. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. **Food and Chemical Toxicology** 47: p. 255–259. 2009.

HOLM, C.; ØSTERLUND, T.; LAURELL, H.; CONTRERAS, J. A. MOLECULAR MECHANISMS REGULATING HORMONE-SENSITIVE LIPOLEASE AND LIPOLYSIS., 2000.

KAHN, S. E.; R. L. HULL; K. M. UTZSCHNEIDER. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.840-6. 2006.
KIDO, Y.; J. NAKAE; D. ACCILI. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.3, Mar, p.972-9. 2001.

KOPPO, K.; LARROUY, D.; MARQUES, M. A; et al. Lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue during exercise in lean and obese humans. Roles of insulin and natriuretic peptides. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 299, n. 2, p. E258-65, 2010.

KREIDER, R. B., FERREIRA, M., GREENWOOD, M., WILSON, M., GRINDSTAFF, P., PLISK, S., REYNARDY, J., CANTLER, E., ALMADA, A. L. Effects of Calcium β -HMB Supplementation During Training on Markers of Catabolism, Body Composition, Strength and Sprint Performance. **Journal of Exercise Physiology**. v. 3, n 4. 2000.

LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 5, p. 275-97, 2009. Elsevier Ltd.

LAMBOLEY, C. R. H.; ROYER, D.; DIONNE, I. J. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on aerobic-performance components and body composition in college students. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 17, n. 1, p. 56-69, 2007.

LOVEJOY, J.; NEWBY, F. D.; GEBHART, S. S. P.; DIGIROLAMO, M. Insulin Resistance in Obesity Is Associated With Elevated and Diminished Lactate Appearance Following Intravenous Basal Lactate Levels Glucose and Insulin. , v. 41, n. 1, p. 22-27, 1992.

MACOTELA, Y.; EMANUELLI, B.; BÂNG, A. M. et al. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21187, 2011.

MENDES, R.R., TIRAPEGUI, J. Efeitos da suplementação do β -Hidroxi- β -Metilbutirato (HMB) sobre o ganho de massa muscular: Uma revisão dos aspectos atuais. **Alim. Nutr.** 13: p. 177 – 192. 2002.

MICHAEL, M D; KULKARNI, R. N.; POSTIC, C. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Molecular cell**, v. 6, n. 1, p. 87-97, 2000.

MICHAEL, M DODSON; PERONI, O. D.; UEKI, K. et al. Protects against Obesity and Obesity-Related Glucose Intolerance. , v. 3, p. 25-38, 2002.

MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v.5, n.3, Mar, p.150-9. 2009.

MORRAL, N.; EDENBERG, H. J.; WITTING, S. R. et al. Effects of glucose metabolism on the regulation of genes of fatty acid synthesis and triglyceride secretion in the liver. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 7, p. 1499-510, 2007.

MUOIO, D. M.; DOHM, G. L.; TAPSCOTT, E. B.; COLEMAN, R. A. Leptin opposes insulin ' s effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob / ob mice. , p. 913-921, 2010.

NAVALTA, J. W.; MCFARLIN, B. K.; LYONS, T. S. et al. Exercise-induced lymphocyte apoptosis attributable to cycle ergometer exercise in endurance-trained individuals. **Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme**, v. 34, n. 4, p. 603-8, 2009.

NEWGARD, C. B.; BRADY, M. J.; DOHERTY, R. M. O.; SALTIEL, A. R. Organizing Glucose Disposal. , v. 3, p. 1967-1977, 1967.

NIELSEN, T. S.; VENDELBO, M. H.; JESSEN, N. et al. Fasting, but not exercise, increases adipose triglyceride lipase (ATGL) protein and reduces G(0)/G(1) switch gene 2 (G0S2) protein and mRNA content in human adipose tissue. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 8, p. E1293-7, 2011.

NISSEN, S. L.; ABUMRAD, N. N. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 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. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 94, n. 2, p. 651-9, 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.; LOMAX, A. R.; NOAKES, P. S. et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate modifies human peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in vitro. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 27, n. 1, p. 92-9, 2011. Elsevier Ltd.

NUNES, E. A.; KUCZERA, D.; ALISSON, G. et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor- κ B expression. , v. 28, p. 487-493, 2008.

O'CONNOR, D. M., CROWE M. J., Effects of six weeks of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and HMB/Creatine supplementation on strength, power, and anthropometry of highly trained athletes. **Journal of Strength and Conditioning Research**. 21(2): p. 419-423, 2007.

OGASAWARA, J.; NOMURA, S.; RAHMAN, N. et al. Hormone-sensitive lipase is critical mediators of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 400, n. 1, p. 134-9, 2010. Elsevier Inc.

OGASAWARA, J.; SAKURAI, TAKUYA; RAHMAN, N. et al. Acute exercise alters Galphai2 protein expressions through the ubiquitin-proteasome proteolysis pathway in rat adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 323, n. 3, p. 1109-15, 2004.

OGASAWARA, J.; SANPEI, M.; RAHMAN, N. et al. Beta-adrenergic receptor trafficking by exercise in rat adipocytes: roles of G-protein-coupled receptor kinase-2, beta-arrestin-2, and the ubiquitin-proteasome pathway. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 2, p. 350-2, 2006.

PANTON, L. B.; RATHMACHER, J. A.; BAIER, S.; NISSEN, S. Nutritional Supplementation of the Leucine During Resistance Training. , v. 9007, n. 00, p. 734-739, 2000.

PEREIRA-LANCHA, L. O.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; LANCHA, A. H. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models.

Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy, v. 5, p. 75-87, 2012.

PIROLA, L.; A. M. JOHNSTON; E. VAN OBBERGHEN. Modulation of insulin action. **Diabetologia**, v.47, n.2, Feb, p.170-84. 2004.

PORTAL, S.; ZADIK, Z.; RABINOWITZ, J. et al. The effect of HMB supplementation on body composition, fitness, hormonal and inflammatory mediators in elite adolescent volleyball players: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 9, p. 2261-9, 2011.

RABE, K.; M. LEHRKE; K. G. PARHOFER; U. C. BROEDL. Adipokines and insulin resistance. **Mol Med**, v.14, n.11-12, Nov-Dec, p.741-51. 2008.

RANDLE, P. J.; P. B. GARLAND; C. N. HALES; E. A. NEWSHOLME. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, n.7285, Apr 13, p.785-9. 1963.

RONTI, T.; G. LUPATTELLI; E. MANNARINO. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.64, n.4, Apr, p.355-65. 2006.

ROSEN, E. D.; B. M. SPIEGELMAN. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v.444, n.7121, Dec 14, p.847-53. 2006.

ROWLANDS, D. S., THOMSON, J. S. Effects of β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance training, on Strength, Body Composition and Muscle damage in Trained and Untrained young men: A Meta-Analysis. **J. Strength Cond. Res.** 23(3), p. 836-846, 2009.

ROWLANDS, D. S., THOMSON, J. S., WATSON, P. E. Effects of nine weeks of β -Hydroxy- β Methylbutyrate (HMB) supplementation on Strength and Body Composition in Resistance Trained Men. **J. Strength Cond. Res.** 23(3): p. 827-835, 2009.

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.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C RONALD. glucose and lipid metabolism. , v. 414, n. December, p. 799-806, 2001.

SCHOISWOHL, G.; SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R. et al. Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 3, p. 490-9, 2010.

SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; HAEMMERLE, G. et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40236-41, 2006.

SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R. E. et al. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular cell**, v. 6, n. 1, p. 77-86, 2000.

SILVEIRA, L. R.; J. FIAMONCINI; S. M. HIRABARA; J. PROCOPIO; T. D. CAMBIAGHI; C. H. PINHEIRO; L. R. LOPES; R. CURI. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. **J Cell Physiol**, v.217, n.1, Oct, p.1-12. 2008.

SLATER, G., JENKINS, D., LOGAN, P., LEE, H., VUKOVICH, M., RATHMACHER, J. A., HAHN, A. G. β -Hydroxy- β -Methylbutyrate (HMB) supplementation does not affect Changes in Strength or Body Composition During resistance Training in Trained Men. **Int. J of Sports Nutr. and Exerc. Metab.** 11: p. 384-396, 2001.

SOARES, J. M., PÓVOAS, S., NEUPARTH, M. J., DUARTE, J. A. The effects of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB) on muscle atrophy induced by immobilization. **Med Sci Sports Exerc.** 33: p. 140. 2001.

SUTHERLAND, C.; O'BRIEN, R. M.; GRANNER, D. K. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 351, n. 1336, p. 191-9, 1996.

TALANIAN, J. L.; TUNSTALL, R. J.; WATT, M. J. et al. Adrenergic regulation of HSL serine phosphorylation and activity in human skeletal muscle during the onset of exercise. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 291, n. 4, p. R1094-9, 2006.

TRAYHURN, P.; I. S. WOOD. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v.92, n.3, Sep, p.347-55. 2004.

VUKOVICH, M. D.; SLATER, G.; MACCHI, M. B. et al. beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 12, n. 11, p. 631-639, 2001.

VUKOVICH, M. D.; STUBBS, N. B.; BOHLKEN, R. M. Body Composition in 70-Year-Old Similarly to That of Young Adults 1. , p. 2049-2052, 2001.

WATERS, K. M.; NTAMBIS, J. M. Insulin and Dietary Fructose Induce Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene Expression in Liver of Diabetic Mice*. ,1994.

WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat , genetic predisposition , and obesity : lessons from. , v. 67, n. 2, 1998.

WILSON, G. J.; WILSON, J. M.; MANNINEN, A. H. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. **Nutrition & metabolism**, v. 5, p. 1, 2008.

WILSON, J. M.; GRANT, S. C.; LEE, S.-R. et al. Beta-hydroxy-beta-methyl-butyrate blunts negative age-related changes in body composition, functionality and myofiber dimensions in rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 18, 2012. BioMed Central Ltd.

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.

ZANCHI, N. E., ROMERO, F. G., FERREIRA L. G., SIQUEIRA FILHO M. A., FELITTI, V., LIRA, F. S., SEELAENDER, M., LANCHETA JR. A. H. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. **Amino Acids**. 40: p. 1015–1025. 2011.

ZECHNER, R.; KIENESBERGER, P. C.; HAEMMERLE, G.; ZIMMERMANN, R.; LASS, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 1, p. 3-21, 2009.

ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R.; EICHMANN, T. O. et al. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell metabolism**, v. 15, n. 3, p. 279-91, 2012. Elsevier Inc.

ZEMEL, M. B.; BRUCKBAUER, A. Effects of a leucine and pyridoxine-containing nutraceutical on fat oxidation, and oxidative and inflammatory stress in overweight and obese subjects. **Nutrients**, v. 4, n. 6, p. 529-41, 2012.

ZHAO, J., TIAN, Y., XU, J., LIU, D., WANG, X., ZHAO, B. Endurance exercise is a leptin signaling mimetic in hypothalamus of Wistar rats. **Lipids in Health and Disease**. 10: p. 225. 2011

ZIMMERMANN, R.; STRAUSS, J. G.; HAEMMERLE, G. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5700, p. 1383-6, 2004.