

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LETICIA ROSSI DARÉ

**Efeito do  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato sobre os músculos da  
mastigação e desenvolvimento e crescimento craniofacial de ratos**

BAURU  
2013

LETICIA ROSSI DARÉ

**Efeito do  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato sobre os músculos da mastigação e desenvolvimento e crescimento craniofacial de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

BAURU  
2013

D246e Daré, Leticia Rossi  
Efeito do  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato sobre os  
músculos da mastigação e desenvolvimento e  
crescimento craniofacial de ratos / Leticia Rossi  
Daré. - Bauru, 2013.  
113 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de  
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a  
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos  
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP  
Protocolo nº: 009/ 2011  
Data: 21/ 06/ 2011

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais **Antonio José** e **Maria José**, pelo imenso apoio e confiança depositados em mim. Obrigada por todos os ensinamentos dados sem a necessidade de grandes discursos. O exemplo de pessoas educadas, humildes, honestas e de bom coração são atitudes demonstradas no dia a dia por vocês. Minha eterna gratidão.

Meus irmãos, **Fernanda** e **Danilo**, pela eterna cumplicidade, amor e confiança que tenho em vocês. Vocês são exemplos de competência e honestidade pra mim. Obrigada por estarem sempre por perto.

Meu noivo, **Daniel** pelo inestimável apoio e incentivo na realização deste trabalho. Obrigada por toda ajuda, companheirismo, paciência, carinho, amizade e lealdade. Você é um exemplo de coragem e competência.

Amo muito vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por ter guiado meus passos e por nunca me deixar sozinha.

Ao Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, agradeço pela confiança depositada em mim desde os primeiros anos de estágio até os dias de hoje. A convivência com uma pessoa tão sábia, humilde e de um caráter apreciável foi um privilegio pra mim. Ensinos profissionais e pessoais que vou levar por toda vida.

Ao Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues por todo apoio, ensinamentos, amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim pelo incentivo, confiança e amizade durante todos os dias.

Ao Prof. José Roberto Lauris pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao amigo e pós-graduando Geraldo Marco Rosa Junior, por toda confiança desde que me apresentou à anatomia, pela lealdade e amizade verdadeira. Por toda ajuda profissional e pelo companheirismo de todo dia.

À Tia Maricó, Tio Adilson, e meu cunhado Alessandro Morelli e demais familiares pelo enorme apoio. Agradeço pela confiança e incentivo que me deram durante todo período do mestrado. Sempre me apoiando e acreditando em mim.

Aos amigos conquistados antes e durante a realização deste trabalho, Cleuber Bueno, Jessica Gonçalves, Karina Puzipe e Luis Henrique Moraes. Agradeço pela imensa amizade criada em um ambiente profissional, mas que quero levar sempre comigo na minha vida pessoal.

Aos estagiários Idvaldo Favaretto Junior e Mizael Pereira, pela grande colaboração durante o tratamento dos animais.

Ao Prof. Dr. João Lopes Toledo Filho e aos funcionários da anatomia Romário, Andre e Daniela.

À Vera Rufino, secretária do departamento por sempre estar pronta a ajudar.

Às companheiras de pós-graduação Melina Bellini, Janete Vaz, Taisa Delecrode, Clarissa, Priscila, Farooque, Daniela Buchaim, Gustavo Toledo pelo incentivo e força pela caminhada durante a realização do mestrado.

Aos amigos da graduação Danielle Tomaz e Bruno Prudente, amizade que levarei para sempre.

Ao Joaquim, Maria Helena e Adriano por me acolher como membro da família e por todo estímulo. E aos demais membros da família pelo incentivo

Às eternas amigas de longa data, Veridiana Oliveira, Mariana Casali e Gabriela Boarato que mesmo sem acompanhar de perto, sempre me incentivaram.

À Natalia Orti, Salete e Geraldo Rosa, Lilian Pisano e Rogerio, Arlete, Leire e Lucas, Luciana e Marcelo pela força e apoio.

À todos familiares, amigos e conhecidos que me apoiaram e incentivaram a prosseguir nesta caminhada.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Meu muito obrigado!

"Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração."

Dalai Lama

## RESUMO

Atualmente está aumentando o número de pessoas que usam suplementos nutricionais com a finalidade de obter melhores resultados nas suas atividades esportivas, perda de gordura, ganhos de massa muscular, ou na plasticidade do corpo. Tal fato merece atenção porque muito pouco é conhecido sobre a segurança ou eficácia destes produtos, e apenas 14% dos usuários buscam orientações com profissional da saúde sobre o uso destas substâncias. Dos mais de 200 suplementos que prometem estes efeitos apenas as suplementações de creatina HMB produzem os resultados prometidos, e o Comitê Olímpico qualifica o uso do HMB como legal. Embora a literatura atual mostre os benefícios no uso da suplementação com HMB, são poucas as informações sobre o seu efeito na morfofisiologia das fibras musculares como, por exemplo, o perfil histoenzimológico e a área dos diferentes tipos de fibras musculares. Baseado nestas informações pensou-se na realização deste trabalho para verificar se o uso de HMB provoca alterações morfológicas e histoenzimológicas nas fibras musculares dos músculos da mastigação; se estes efeitos alterariam o desenvolvimento e crescimento do esqueleto craniofacial; e se os efeitos sobre os componentes do sistema estomatognático seriam semelhantes nos indivíduos ambos os gêneros. Para realização deste estudo foram utilizados 58 ratos com idade de 60 dias, 29 animais de cada gênero, distribuídos nos seguintes grupos: **Grupo Controle Inicial (GCI)** que foram sacrificados no início do experimento; **Grupo Controle Placebo (GCP)** que receberam o mesmo volume do veículo do grupo experimental, e alimentação *ad libitum*; **Grupo Experimental (GE)** que receberam diariamente 0,3g/kg de HMB, por meio de gavagem e mesma quantidade de alimentos que GCP consumiu no dia anterior; **Grupo Experimental *Ad libitum* (GEA)** que receberam a mesma dose da droga, porém tiveram alimentação *ad libitum*. Após o tratamento, foram retiradas amostras dos músculos digástrico (ventre anterior) e masseter (porção superficial), para análise histoenzimológica (m-ATPase com pré-incubações ácida e alcalina) e retirada do esqueleto cefálico para tomadas das medidas craniométricas. Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico. Os resultados permitiram concluir que: o uso diário de 0,3g/kg de HMB, por quatro semanas: a) não provocou alterações morfológicas e histoenzimológicas nas fibras muscular dos músculos da mastigação; b) os resultados foram semelhantes entre os músculos elevadores e abaixadores da

mandíbula; c) não provoca alterações no desenvolvimento e crescimento do esqueleto craniofacial; d) a falta de resultados positivos de alterações nos músculos da mastigação e crescimento craniofacial, sugere existirem um relação entre eles; e) os resultados sobre os componentes do sistema estomatognático foram semelhantes nos indivíduos ambos os gêneros.

Palavras-chave: Músculos mastigatórios. HMB. Crescimento craniofacial. Ratos.

## ABSTRACT

Nowadays is increasing the number of people who use nutritional supplements in order to achieve better results in their sports, fat loss, muscle gains, or the plasticity of the body. This deserves attention because very little is known about the safety or efficacy of such products, and only 14% of users seeking guidance with a health professional regarding the use of these substances. Of the more than 200 supplements that promise these effects only the HMB and creatine supplementation produce the promised effects, and the Olympic Committee qualifies the use of HMB as legal. While the literature shows benefits in the use of HMB supplementation, there is little information on its effect on muscle fibers morphophysiology as, for example, the profile and the area histoenzimológico of different types of muscle fibers. Based on this information, it was thought in performing this work to check whether the use of HMB causes morphological and histoenzimológicas changes in muscle fibers of the muscles of mastication, these effects alter the growth and development of craniofacial skeleton, and if the effects on the components of stomatognathic system would be similar in both genders individuals. For this study we used 58 rats aged 60 days, 29 animals of each gender, divided into four groups: Control Group Home (GCI) which were sacrificed at the beginning of the experiment; Placebo Control Group (GCP) that received the same volume Vehicle experimental group, and fed *ad libitum*; Experimental Group (EG) which received daily 0.3 g / kg of HMB, by gavage and the same amount of food they consumed on the previous day GCP; experimental group ad libitum (GEA) who received the same dose of the drug, but were fed *ad libitum*. After treatment, samples were taken of the digastric (anterior belly) and masseter (superficial part) for analysis histoenzimologic (m-ATPase with pre-incubations acid and alkaline) and removal of the head skeleton to taken the craniometric measures. The results showed that: the daily use of 0.3 g / kg of HMB for four weeks: a) caused no morphological changes and histoenzimológicas muscle fibers in the muscles of mastication; b) the results were similar between muscles elevators and depressors of the jaw; c) does not cause changes in the development and growth of the craniofacial skeleton; d) the lack of positive changes in the masticatory muscles and craniofacial growth, suggests a relationship existed

between them, e) results the components of the stomatognathic system were similar in subjects both genders.

Keywords: Masticatory muscles. HMB. Craniofacial growth. Rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### - FIGURAS

Figura 1 -	Esquemática da estrutura de um músculo esquelético e seus envoltórios conjuntivos.....	28
Figura 2 -	Quadro das relações das diferentes classificações das fibras musculares estabelecido por Myrrege (1977).....	31
Figura 3 -	Caixas individuais com comedouros e bebedouros individuais.....	51
Figura 4 -	Demonstração das caixas individuais, identificadas por grupo.....	51
Figura 5 -	Demonstração dos pacotes de ração pesados separadamente (30g) para cada animal do GCP.....	52
Figura 6 -	Demonstração da aplicação do HMB por meio de gavagem.....	52
Figura 7 -	Criostato marca Leica – Modelo CM 1850 utilizado para obtenção dos cortes congelados.....	54
Figura 8 -	Microscópio óptico (Olympus BX 50) com câmera fotográfica (Olympus DP-71) acoplada e monitores para análise e morfometria das imagens.....	56
Figura 9 -	Esquemática dos pontos craniométricos utilizados como base para tomadas das medidas (Barret e Harris, 1993).....	58

Figura 10 - Demonstração das medidas craniométricas tomadas de cada crânio macerado.....	59
Figura 11 - Fotomicrografia do músculo digástrico de ratos machos corados em HE.....	65
Figura 12 - Fotomicrografia dos músculos masseter de ratos fêmeas submetidos as reações de mATPase e NADH.....	67
Figura 13 - Fotomicrografia dos músculos digástrico de ratos machos submetidos as reações de mATPase e NADH.....	71
Figura 14 - Demonstração dos crânios macerados para posterior tomada das medidas.....	79

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação da quantidade de ração ingerida  
semanalmente pelos ratos machos entre os grupos..... 64

Gráfico 2 - Comparação da quantidade de ração ingerida  
semanalmente pelas ratas fêmeas entre os grupos..... 64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação do peso dos animais dos diferentes grupos.....	63
Tabela 2 -	Comparação da percentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratos <b>machos</b> .....	68
Tabela 3 -	Comparação da porcentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratas <b>fêmeas</b> .....	68
Tabela 4 -	Comparação entre as áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratos <b>machos</b> .....	69
Tabela 5 -	Comparação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratas <b>fêmeas</b> .....	70
Tabela 6 -	Comparação da porcentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos <b>machos</b> .....	72
Tabela 7 -	Comparação da porcentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos <b>fêmeas</b> .....	72
Tabela 8 -	Comparação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos <b>machos</b> .....	73
Tabela 9 -	Comparação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos fêmea.....	74

Tabela 10 – Demonstração da percentagem dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos <b>machos</b> .....	74
Tabela 11 – Demonstração da percentagem dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos <b>fêmeas</b> .....	75
Tabela 12 – Demonstração da <b>área</b> dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos <b>machos</b> .....	75
Tabela 13 – Demonstração da <b>área</b> dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos <b>fêmeas</b> .....	76
Tabela 14 – Demonstração da <b>percentagem</b> dos tipos de fibras no músculo <b>masseter</b> entre os <b>gêneros</b> .....	76
Tabela 15 – Demonstração da <b>percentagem</b> dos tipos de fibras no músculo <b>digástrico</b> entre os gêneros.....	77
Tabela 16 – Demonstração da <b>área</b> dos tipos de fibras no músculo <b>masseter</b> entre os gêneros.....	77
Tabela 17 – Demonstração da <b>área</b> dos tipos de fibras no músculo <b>digástrico</b> entre os gêneros.....	78
Tabela 18 – Comparação das medidas craniométricas entre os grupos e gêneros.....	79

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Músculo estriado esquelético	27
2.2	Anatomia dos músculos masseter e digástrico	28
2.3	Tipos de fibras dos músculos esqueléticos	29
2.4	Tipos de fibras dos músculos da mastigação e supra-hioideos	31
2.4.1	Músculo digástrico	33
2.4.2	Músculo masseter	34
2.5	Esqueleto craniofacial	35
2.6	Beta-Hidroxi Beta-metilbutirato	38
3	OBJETIVOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Animais	49
4.2	Caixas e ração	49
4.3	Administração do HMB	52
4.4	Eutanásia e retirada das amostras musculares	53
4.5	Processamento histológico	53
4.5.1	Congelamento	53
4.5.2	Obtenção dos cortes congelados	54
4.5.3	Técnicas de histoquímica e morfometria	54
4.6	Metodologia para tomada das medidas craniométricas do crânio macerado	56
4.7	Tratamento Estatístico	59
5	RESULTADOS	61
5.1	Peso dos animais	63
5.2	Quantidade de ração ingerida	63
5.3	Caracterização morfológica das fibras submetidas à coloração em HE	65
5.4	Classificação e morfometria das fibras musculares	66
5.5	Crescimento e desenvolvimento craniofacial	78
6	DISCUSSÃO	81

7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	111

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos atletas hoje em dia vivem em busca de suplementos nutricionais a fim de obterem melhores resultados nas suas atividades esportivas, perda de gordura, ganhos de massa muscular e melhor desempenho nas atividades físicas ou na plasticidade do corpo. Por estas razões, a popularidade do uso de suplementos nutricionais entre adolescentes em geral e atletas em particular, está em ascensão (CASTILLO; COMSTOCK, 2007; ZADIK; NEMET; ELIAKIM, 2009).

Estas informações estão levando a indústria de suplemento nutricional a ganhar enorme soma de dinheiro com a venda destas substâncias que supostamente melhoram o desempenho físico, adia a fadiga, melhora a composição corporal e a aparência dos usuários (PORTAL et al., 2010), entretanto, apenas 14% dos usuários consultam um profissional da saúde antes de usá-los (CHLOPICKA; WANDAS; ZACHWIEJA, 2007), mesmo conhecendo muito pouco sobre a sua segurança ou eficácia (CASTILLO; COMSTOCK, 2007; ZADIK; NEMET; ELIAKIM, 2009).

Um estudo sobre o uso dos suplementos nutricionais entre jovens jogadores de voleibol e futebol mostrou que 8% dos meninos e 2% das meninas usam estas substâncias para melhorar o desempenho do exercício e da composição corporal (MASON et al., 2001).

Nos últimos anos, o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) tornou-se um dos suplementos nutricionais mais populares entre aqueles que frequentam academias e ginásios de esporte, inclusive entre os jovens (CHLOPICKA; WANDAS; ZACHWIEJA, 2007).

O HMB é um composto derivado do metabolismo da leucina, e por essa razão também é chamado de metabólico da leucina. Ele apresenta efeitos anabólicos da proteína que podem ser empregados em tratamento de doenças que acarretam perda de peso, tais como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), cirurgia, e doenças crônicas, para aumentar a massa muscular magra (MAY et al., 2002; SMIT; MUKERJI; TISDALE, 2005) e também para aumentar a massa e/ou força muscular no exercício de resistência (JÓWKO et al., 2001; NISSEN; SHARP, 2003).

Os primeiros estudos com HMB, realizados em animais, apontaram efeitos dessa substância sobre o metabolismo muscular, predominantemente, na redução da proteólise (OSTASZEWSKI et al., 1996).

Kovarik et al. (2010) realizaram um estudo para observar o efeito da HMB na musculatura de ratos com septicemia e saudáveis. Os seus resultados mostraram que o tratamento com HMB não teve efeito significativo sobre o metabolismo proteico nos músculos esqueléticos de ratos saudáveis. Já nos animais com septicemia, notaram que esta substância foi eficaz e neutralizou a proteólise total do músculo extensor longo dos dedos (EDL), e diminuiu a proteólise miofibrilar no músculo sóleo, além de inibir a atividade do proteassoma neste músculo.

Isto está de acordo com os efeitos positivos do HMB sobre o metabolismo proteico, descrito em condições de outras proteínas catabólicas (SMITH; MUKERJI; TISDALE, 2005; NUNES et al., 2008).

A musculatura estriada pode ser expandida por mecanismos de hipertrofia ou hiperplasia e está relacionada com células precursoras miogênicas (JOHNSTON et al., 2003).

Sabe-se que existe uma relação entre a atividade de músculos esqueléticos e a morfologia e composição do osso onde ele está fixado (SHAW; STOCK, 2009). Acredita-se que a contração muscular tem o papel mais destacado e dinâmico na carga habitual do tecido ósseo (BURR, 1997; SCHOENAU; FRICKE, 2006). Um exemplo de profunda mudança na relação músculo-esquelética por alteração do recrutamento muscular pode ser observado no braço do jogador de tênis, onde a hipertrofia muscular leva a um aumento na densidade óssea do úmero (KANNUS et al., 1994).

Encontra-se na literatura também relatos mostrando que a paralisia muscular induz a diminuição da massa cortical e do trabeculado ósseo onde o músculo estava fixado (WARNER et al., 2006; POLIACHIK et al., 2010).

O aparelho mastigatório é considerado o sistema músculo-esquelético adequado para estudar esta relação, uma vez que a mandíbula apresenta pequeno peso e as forças gravitacionais que atuam nela são pequenas e, portanto pode-se considerar que as alterações que ocorrem no tecido ósseo são de origem das cargas diárias das contrações musculares (DE JONG; KORFAGE; LANGENBACH, 2011).

Vários grupos musculares inserem-se na mandíbula, mas os músculos da mastigação, devido as suas forças e a suas relações funcionais com este osso são considerados os mais atuantes na mandíbula.

Matic et al. (2007) e Kim et al. (2008) relatam que paralisia do músculo masseter resulta em atrofia do músculo e subseqüentemente retardo do crescimento da mandíbula.

Outras teorias existentes sobre o crescimento craniofacial mostram uma relação íntima entre os músculos da mastigação e os ossos onde eles estão fixados. Pesquisadores sugerem que as mudanças morfológicas não seriam observadas apenas nas áreas adjacentes a inserção destes músculos, mas que elas ocorreriam em locais de crescimento que afetam o padrão de crescimento rotacional do crânio (CHUANG, 1995).

A literatura consultada mostra trabalhos sobre o efeito do HMB em animais em desenvolvimento, em idosos, em atletas, em indivíduos com doenças, mas não apresenta trabalhos experimentais em jovens, principalmente quando não são submetidos a exercícios físicos. Ela mostra informações sobre aumento da massa e/ou força muscular, identificadas por meios fisiológicos ou de diagnóstico por imagem, mas muito pouco se sabe sobre o efeito do HMB na morfofisiologia das fibras musculares como, por exemplo, o perfil histoenzimológico e a área dos diferentes tipos de fibras musculares e no crescimento craniofacial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

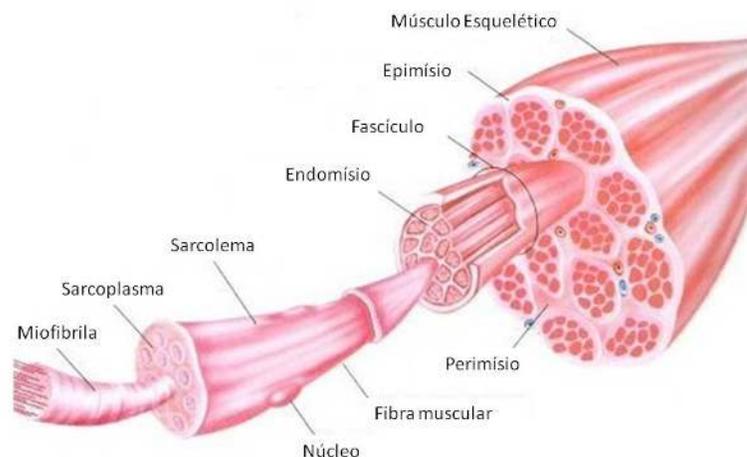
### **2.1 Músculo Estriado Esquelético**

O sistema muscular é responsável pelo movimento do corpo, bem com suas partes. O músculo esquelético representa aproximadamente 40% do total da massa corporal (GUYTON; HALL, 2006).

O músculo esquelético se origina de células pré-mioblásticas que se originam no dermatomiótomo do somito em maturação e começam a se proliferar em mioblastos, posteriormente, os mioblastos se proliferam e se fundem para formar os miotubos, que formarão as fibras musculares (STANDRING, 2010).

O tecido muscular esquelético é composto por feixes de células longas, cilíndricas, multinucleadas e contendo muitos filamentos, as miofibrilas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As miofibrilas são as unidades funcionais dos músculos e suas propriedades bioquímicas e fisiológicas são variadas, sendo um tecido especializado em transformar energia química em energia mecânica, ou seja, no movimento (FERREIRA, 2005). Para isso, são compostas de unidades chamadas sarcômeros, e cada sarcômero é composto por proteínas miofibrilares de miosina (filamento grosso) e de actina (filamento fino). Quando essas proteínas se interagem permite a contração do músculo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido muscular está organizado em grupos de feixes ou fascículos, sendo este conjunto de feixes envoltos por tecido conjuntivo (figura 1). A bainha de tecido conjuntivo que recobre todo o músculo é denominada epimísio. Do epimísio partem finos septos de tecido conjuntivo denominados de perimísio, que dirigem para o interior do músculo, separando-o em feixes e, por último o tecido conjunto invagina para envolver individualmente cada fibra muscular, denominado endomísio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; PIEDADE, 2010). As membranas de tecido conjuntivo são importantes, pois mantém as fibras musculares unidas, proporcionando que a força de contração gerada em cada fibra atue sobre o músculo inteiro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).



Fonte: Baechle e Earle, 2008

Figura 1 – Esquemática da estrutura de um músculo estriado esquelético e seus envoltórios conjuntivos.

## 2.2 Anatomia dos músculos masseter e digástrico

Os músculos da mastigação e supra-hioídeos têm sido muito estudados, pois alterações na sua musculatura podem provocar doenças orais, como a disfunção temporomandibular, e isto provoca um impacto psico-social sobre a qualidade de vida do paciente (SEGU et al, 2003).

As fibras dos músculos da mastigação diferem dos músculos do tronco e membros, pois apresentam uma área bem menor (STARON; HIKIDA, 1992).

Os músculos da mastigação são compostos pelos músculos temporal, masseter, pterigóideo lateral e medial (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

O músculo masseter é um músculo retangular, espesso e é dividido em duas partes, uma superficial e outra profunda, e se estende desde o arco zigomático ao ramo da mandíbula, com exceção do seu processo condilar (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

O músculo digástrico compõe um grupo denominado de supra-hioídeos e unem o osso hioíde ao crânio (RIZZOLO; MADEIRA, 2009). Possui dois ventres musculares, um anterior e outro posterior e situa-se abaixo da mandíbula,

estendendo-se desde o processo mastóide até a base da mandíbula (STANDRING, 2010).

Os músculos supra-hióides são abaixadores e retrusores da mandíbula e, portanto, antagonistas dos músculos elevadores da mandíbula, mas auxiliam na mastigação (RIZZOLO; MADEIRA, 2009).

### **2.3 Tipos de fibras do músculo esquelético**

O músculo esquelético é constituído por diversos tipos de fibras musculares, que são caracterizadas durante o desenvolvimento embrionário e posteriormente são moduladas por fatores neurais e hormonais (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

É de conhecimento geral, que os diferentes músculos esqueléticos de mamíferos variam em cor, desde quase branco até vermelho escuro, e que nas várias espécies animais, alguns músculos esqueléticos contraem mais rapidamente que outros. Durante a última metade do século dezenove, muitos pesquisadores esforçaram-se para explicar estas variações, tanto na coloração como na velocidade de contração das fibras dos músculos esqueléticos, com base nas suas estruturas e funções (CLOSE, 1972).

Ranvier (1880 apud CLOSE, 1972) observou também que: I- os músculos vermelhos contraíam muito mais lentamente do que os músculos brancos; II- os músculos vermelhos eram mais resistentes à fadiga do que os músculos brancos; III- músculo vermelho tinha um suprimento sanguíneo mais amplo do que os brancos. Mas outros pesquisadores (MEYER, 1875; KNOLL, 1891 apud CLOSE, 1972), observaram que alguns músculos vermelhos contraíam mais rapidamente do que alguns músculos brancos, desfazendo a associação de que os músculos vermelhos tinha sempre contração mais lenta do que os brancos. Atualmente afirma-se que todo músculo branco é de contração rápida, mas que nem todo músculo vermelho é de contração lenta.

Com o advento de técnicas histoquímicas mais modernas, tornou possível localizar sistemas de enzimas, e outros constituintes químicos, em nível celular, e isto abriu o caminho para uma correlação direta, da atividade funcional das fibras individuais com a sua morfologia (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). Algumas destas

técnicas demonstraram que a velocidade de contração muscular estava relacionada com a atividade da enzima ATPase miofibrilar (CORNACHIONE et al., 2011).

Usando a técnica da m-ATPase miofibrilar, Dubowitz e Pearce (1960) classificaram as fibras musculares em tipos I e II, de acordo com a sensibilidade do pH, onde as do tipo I eram ácidas estáveis enquanto que as do tipo II eram alcalinas estáveis. Brooke e Kaiser (1970) utilizando pré-incubações (ácidas e alcalinas) conseguiram identificar os subtipos de fibras do tipo II, em IIA e IIB.

Várias outras substâncias foram identificadas nas fibras musculares, dentre elas o succinato desidrogenase e NADH- Tr, que está relacionado diretamente com o metabolismo das fibras. Peter et al. (1972) utilizando a identificação da m-ATPase e do metabolismo, classificaram as fibras musculares em FG (fast twitch glycolytic - fibras de contração rápida e metabolismo glicolítico), FOG (fast twitch glycolytic oxydative - fibras de contração rápida e de metabolismo glicolítico e oxidativo) e SO (slow twitch oxydative - fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo).

Métodos mais modernos para classificar os diferentes tipos de fibras que compõem um músculo têm sido utilizados, como por exemplo, a técnica de imuno-histoquímica para identificar a cadeia pesada da miosina. Como as diferenças na sensibilidade das reações de m-ATPase têm sido mostradas estar relacionada com a cadeia pesada da miosina, não é nenhuma surpresa a existência de uma correlação na classificação das fibras musculares usando-se os métodos de m-ATPase e de imuno-histoquímica, mas este último é mais preciso porque consegue identificar até 11 tipos de fibras enquanto o primeiro apenas sete (PETTE; STARON, 2001).

Outros métodos como eletroforese em gel e “western blot” podem ser usados para determinar o conteúdo de miosinas (KORFAGE; VAN EIJDEN, 2003).

Como já foram identificadas várias enzimas e estruturas morfológicas nas fibras musculares, os autores têm sugerido várias formas de classificação das mesmas, usando apenas enzimas, ou misturando enzimas e estruturas anatômicas, mas cinco são as classificações mais usadas, que Myrhage (1977) procura estabelecer uma relação entre elas, e pode ser visualizada no quadro abaixo (figura 2). Deve ser lembrado que nestas classificações as reações de imuno-histoquímica não foram usadas.

CLASSIFICATION OF MUSCLE FIBRES

	Fast twitching		Slow twitching
Dubowitz & Pearse (1960)	II	(II)	I
Brooke & Kaiser (1970)	IIB	IIA	I
Henneman & Olson (1965)	A	B	C
Burke <i>et al.</i> (1971)	FF	FR	S <sup>1</sup>
Peter <i>et al.</i> (1972)	FG	FOG	SO <sup>2</sup>
	(white)	(red)	(red/intermediate)

<sup>1</sup> FF = fast-fatigable; FR = fast-resistant to fatigue;  
S = slow-very resistant to fatigue.  
<sup>2</sup> FG = fast-glycolytic; FOG = fast-oxidative-glycolytic;  
SO = slow-oxidative.

Figura 2 – Quadro das relações das diferentes classificações das fibras musculares estabelecido por Myrrege (1977).

Sabe-se que os músculos são compostos por diferentes tipos de fibras, mas com predomínio de um tipo específico (MINAMOTO, 2005).

O uso muscular está relacionado com a composição das suas fibras e da área de secção transversal das mesmas (SANO et al, 2007). Entretanto, um músculo se adapta dependendo da demanda funcional a que é submetido, podendo alterar a composição do seu tipo de fibra, ou perfil histoquímico das suas fibras (WESSEL et al, 2005), tais como alterações na carga mecânica, por exercícios ou imobilização (PETTE, 2002). Esta remodelação de seu perfil histoquímico em resposta a demanda funcional é denominada de plasticidade muscular (NETHERLAND et al. 2009).

## 2.4 Tipos de fibras dos músculos da mastigação e supra-hióideos

Os tipos, o tamanho e a percentagem dos vários tipos de fibras e unidades motores são semelhantes entre os músculos do tronco e dos membros, que são

músculos somáticos ou miotômicos, mas diferem dos músculos mandibulares, que são músculos branquioméricos. Essas diferenças têm sido significativas, principalmente em humanos, e muitas vezes têm sido relacionadas às diferentes funções (CARLSOO, 1956; STALBERG et al.,1986), baseado em estudos comparativos com outros mamíferos (TAYLOR; CODY; BOSLEY, 1973; HIRAIWA, 1978; SUZUKI, 1977; GORNIK, 1986).

Diversos estudos têm sido realizados nos músculos da mastigação para investigar as alterações que acometem a musculatura do aparelho estomatognático (YAMADA et al, 2013; KAWAI et al, 2009; MONACO et al, 2010;YOSHIDA et al, 2012).

Segundo a literatura consultada Wachstein e Meisel (1955), foram os primeiros a estudar a tipagem de fibras dos músculos da mastigação, por meio da reação de succinato desidrogenase (SDH), em ratos, coelhos e humanos.

Em 1984, Rokx, Van Willigen e Jansen estudaram as fibras dos músculos da mastigação de ratos, através das reações de m-ATPase e SDH. As fibras foram classificadas como FW (Fast White - rápida branca), FI (Fast Intermediate - rápida intermediária), FR (Fast Red - rápida vermelha) e SR (Slow Red - lenta vermelha). Segundo os autores os 4 tipos de fibras estavam presentes em todos os músculos estudados. As fibras do tipo FW localizavam principalmente na periferia, enquanto que as do tipo SR estavam localizadas na porção central, formando uma área oxidativa juntamente com as fibras do tipo FR e FI.

Andreo (2001) estudou os músculos da mastigação de ratos submetidos ao alcoolismo crônico. Foram retiradas amostras dos músculos digástrico (ventre anterior), masseter e temporal, de ratos normais e alcoolizados, que foram submetidas às reações de m-ATPase, SDH e coloração de HE, para classificação das fibras musculares. Baseado nos resultados obtidos, concluiu que a percentagem e o diâmetro dos tipos de fibras são diferentes entre os músculos elevadores (masseter e temporal) e abaixador (digástrico - ventre anterior) da mandíbula; que nos músculos elevadores da mandíbula as fibras do tipo FG são as predominantes; que o diâmetro menor das fibras do tipo FG é semelhante entre os músculos elevadores da mandíbula, mas maior do que no abaixador; que o álcool teve influência sobre o diâmetro menor das fibras de contração rápida (FG e FOG) nos músculos elevadores e abaixador da mandíbula, o que não ocorreu com as fibras de contração lenta (SO).

Korfage et al. (2006) investigaram a composição do tipo de fibra de coelhos em desenvolvimento e notou que em animais adultos, os músculos masseter e digástrico apresentavam a mesma percentagem de tipos de fibras rápidas, mas essas fibras eram duas vezes maior no músculo masseter do que no músculo digástrico, podendo assim produzir maior força.

#### **2.4.1 - Músculo Digástrico**

Benett et al. (1977), estudando o músculo digástrico de ratos adultos e em crescimento, observaram dois tipos de fibras claramente distintas, onde as fibras de menor diâmetro apresentaram reação mais intensa que as de diâmetro maior, nas reações de mATPase. Segundo os autores as amostras de animais mais jovens sugerem que os mesmos apresentariam um único tipo de fibra muscular.

Kiliaridis e Shyu (1988) num estudo para verificar a influência da consistência dos alimentos sobre os músculos da mastigação de ratos, observaram que no músculo digástrico a área das fibras dos tipos IIA e IIB não sofreram influência da consistência dos alimentos.

Andreo et al. (1994) em estudos com macaco prego encontrou uma concentração elevada de fibras do tipo rápida (81,2%) e parece indicar que o músculo digástrico é utilizado para a aceleração e velocidade nos movimentos da mandíbula.

Monemi et al. (2000) estudando o músculo digástrico de humanos observou que uma parte significativa do ventre posterior deste músculo apresentava fibras híbridas.

Cobos, Segade e Fuentes (2002) em estudo com ratos, encontrou que o ventre posterior do músculo digástrico contém maior percentagem de fibras aeróbicas (83,4%) do que o ventre anterior (67,8%).

### **2.4.2 Músculo Masseter**

O músculo masseter é o músculo da mastigação mais estudado na literatura, quanto ao padrão histoquímico das fibras.

Akagawa, Nikai e Tsuru (1983), verificaram alterações no músculo masseter de ratos wistar machos, induzidas pela hiperfunção, produzida pelo aumento da dimensão vertical. Para isso instalaram coroa metálica sobre os 1<sup>os</sup> e 2<sup>os</sup> molares superiores, diminuindo o espaço funcional livre. Observaram que as fibras do tipo FOG e SO, ou seja, que apresentam metabolismo oxidativo, sofreram alterações no perfil histoenzimológico nas reações do tipo SDH e fosforilase (PHR) já a partir do segundo dia após a colocação da coroa metálica, mas que a partir do 12<sup>o</sup> dia, esses tipos de fibras voltaram a apresentar o padrão semelhante ao do grupo controle. As fibras do tipo FG não apresentaram alterações nas reações durante todo o experimento.

Kiliaridis e Shyu (1988) encontraram no músculo masseter de ratos uma maior frequência de fibras tipo IIB no grupo submetido a uma dieta menos consistente, do que no mesmo músculo dos animais com ração normal.

Kowalewski e Miltzow (1990) estudaram as fibras do masseter de ratos, com idade entre 42 e 126 dias. As fibras do tipo IIB foram as mais frequentes e as que apresentaram maior diâmetro. As do tipo IIA apresentaram menor frequência e menor diâmetro.

Tuxen e Kirkeby (1990) investigaram o masseter de várias espécies de animais pelo uso de métodos histoquímicos para a demonstração da mATPase ácido-estável e alcalino-estável. As fibras do tipo I mostraram fraca atividade de ATPase em pH 9.4, as do tipo IM (tipo intermediário, classificada pelos mesmos autores) reagem moderadamente e fibras tipo II reagem fortemente. Além disso, concluiu que o músculo masseter de ratos e camundongos contém somente fibras tipo II, e o masseter de alguns coelhos possuem quantidades iguais de fibras tipo I e II. O masseter de gatos e cães possuem fibras tipo I e II, com o tipo II predominando. O masseter de bovinos contém principalmente fibras tipo I, embora alguns indivíduos contenham um pequeno número de fibras tipo II. O masseter de porcos tem os tipos

I, II e IM. Uma das características dos músculos masseter de humanos são as fibras tipo IM, que são raramente vistas em outros músculos da mastigação. Segundo esses pesquisadores é possível, portanto, utilizar o masseter de porcos como um modelo animal para estudos experimentais, devido às características em comum com o músculo de humanos.

Um dos fatores que altera o perfil histoquímico dos músculos da mastigação é a sua atividade diária, pois ela é uma fonte significativa da carga no sistema mastigatório (SANO et al, 2007).

Kiliaridis (1986) e Vreeke et al. (2011) demonstraram uma diminuição na área de secção transversal e na alteração no tipo de fibras, causada pela redução da demanda funcional nos ratos alimentados com uma dieta mais líquida.

Um estudo em coelhos de diversas idades mostrou que durante o desenvolvimento precoce, quando a sucção transforma-se em mastigação, os músculos da mastigação aumentam o seu número de fibras do tipo lento em relação ao número de fibras do tipo rápido (ANAPOL; HERRING, 2000; KORFAGE et al, 2006; LANGENBACH et al, 2008). Já durante o desenvolvimento tardio, quando a maturação sexual é iniciada, o masseter aumenta o número de fibras do tipo rápida (ENGLISH et al., 1999; EASON et al., 2000), enquanto o digástrico, que está envolvido na abertura da mandíbula, não mostra quaisquer alterações (KORFAGE et al., 2006).

Saito et al. (2002) e Saito et al. (2004) estudando os efeitos da consistência da dieta sobre a alteração do fenótipo das fibras do músculo masseter de ratos, observaram que uma dieta mais líquida facilita o desenvolvimento de fibras do tipo rápida em comparação com uma dieta mais sólida.

Assim, quando não se aplica uma força diária, os músculos também sofrem alterações, como no estudo de Nariyama et al. (2011) que demonstrou a que a deficiência de dentes alteram os músculos masseter e digástrico de ratos.

## **2.5 Esqueleto Craniofacial**

O crescimento ósseo tem sido de grande importância científica, pois é de grande relevância para a prática clínica, principalmente para os dentistas (POSWILLO, 1988).

O esqueleto craniofacial possui um padrão diferenciado de crescimento e maturação (LEWIS; ROCHE; WAGNER, 1985), pois para que haja um crescimento harmônico da face, deve ser lembrado que a morfogênese óssea precisa alcançar o equilíbrio arquitetônico entre todas as partes separadas em crescimento. Isto significa que todas as diferentes partes se reúnem em um todo funcional, em que cada parte complementa as outras e todas crescem e funcionam em conjunto (ENLOW; HANS; OPPIDO, 1998).

Assim, os determinantes genéticos e funcionais do desenvolvimento de um osso (isto é, a origem dos sinais reguladores do crescimento) residem no conjunto de tecidos moles que ligam ou desligam, aceleram ou reduzem as atividades histogênicas dos tecidos conjuntivos osteogênicos (ENLOW; HANS; OPPIDO, 1998). Com isso, o crescimento dos ossos da face e da maxila está associado ao desenvolvimento tanto da base do crânio quanto da mandíbula (KREIA et al., 2011).

O desenvolvimento do sistema craniofacial ocorre em resposta às necessidades funcionais, e a sua ausência pode afetar o seu crescimento (KAWAI et al., 2010). Essas respostas às necessidades funcionais são dadas também pelos músculos que desempenham um papel ativo no processamento de carga contínua diária sobre os ossos, em especial no aparelho mastigatório (DE JONG; KORFAGE; LANGENBACH, 2011).

A ação dos músculos da mastigação sobre o desenvolvimento craniofacial já foi observada entre indivíduos que apresentam distrofia muscular progressiva (IWABUCHI, 1975; MIURA, 1988, MATSUYUKI; KITAHARA; NAKASHIMA, 2006), em experimentos diminuindo a função muscular como, por exemplo, diminuindo a consistência dos alimentos (KILIARIDIS; ENGSTRÖM; THILANDER, 1985; KILIARIDIS; SHYU, 1988; CIOCHON; NISBETT; CORRUCINI, 1997, RAVOSA et al., 2007), por intervenção cirúrgica, produzindo desnervação no músculo masseter (TAKAHASHI, 1988), em desdentados (ENGSTROM; HOLLENDER; LINDOVIST, 1985), em estudos entre tamanho dos músculos da mastigação, força de mordida (RAADSHEER, et al., 1999); ou em trabalhos de hiperfunção destes músculos, como no caso de bruxismo (AHLGREN, et al., 1969; KROGSTAD, DAHL, 1985).

Kiliaridis (1995) estudou a influência da musculatura da mastigação sobre o crescimento craniofacial e notou que a carga mecânica aumentada na mandíbula leva a um aumento do crescimento sutural e aposição óssea, ocasionando um crescimento transversal da maxila e das arcadas dentárias.

He (2004) estudou os efeitos da alteração da função mastigatória no crescimento craniofacial em furões, e percebeu que no sexo feminino o crescimento craniofacial cessa mais rápido do que no sexo masculino. O mesmo já havia sido comprovado por Ingerslev e Solow (1975) que realizou um estudo cefalométrico em humanos e percebeu que os crânios são menores no sexo feminino do que do sexo masculino. Tal fato pode explicado pelas pesquisas de Schaefer et al. (2005) que notou que as alterações faciais no sexo masculino pode estar relacionada com um aumento nos níveis de testosterona na adolescência.

Tsai et al. (2009) e Korfage et al. (2012) estudaram os efeitos da neurotoxina botulínica do tipo A nos músculos masseteres, que comumente são injetadas para fins cosméticos ou para o tratamento de bruxismo, e observaram que o músculo masseter atrofiou e ocasionou uma alteração de crescimento ósseo e no desenvolvimento craniofacial de ratos.

A literatura consultada mostra que vários estudos sugerem uma interdependência entre a morfologia óssea do esqueleto cefálico e as características dos músculos da mastigação (BOYD et al., 1984; VAN SPRONSEN et al., 1997; GRÜNHEID et al., 2009), e as mais comuns são:

- volume e perfil histoenzimológico do músculo masseter com as dimensões verticais na morfologia facial (BOYD et al., 1984; KILIARIDIS, 1995), onde indivíduos de face curta (dimensões verticais menores) apresentam este músculo com grande volume e o oposto é verdadeiro (KILIARIDIS, 1995);
- aumento na função dos músculos da mastigação com o padrão de crescimento anterior de rotação da mandíbula, com ângulo e processos coronóide e condilar bem desenvolvidos. (KILIARIDIS, 1995).

Nas últimas décadas os frequentadores de academias têm usado substâncias como anabolizantes e suplementos nutricionais, para melhorar a força e massa muscular, e a estética.

Barret e Harris (1993) afirmam que os anabolizantes podem estimular a uma hiperfunção de algumas glândulas, como a hipófise, ocasionando um crescimento excessivo do esqueleto craniofacial.

Alguns suplementos tem auxiliado no desenvolvimento facial, como no estudo realizado por Wilcox et al. (2007) onde identificaram que o uso de suplementações de ácido fólico durante a gravidez previne fendas orofaciais.

Um suplemento que tem se tornado comum nos treinamentos é o beta-hidroxi beta-metilbutirato (HMB), pois estudos relatam aumento da força muscular, hipertrofia muscular, e a recuperação muscular, mas estes efeitos ainda são variáveis na literatura (ROWLANDS; THOMSON, 2009).

## **2.6 Beta-Hidroxi Beta-metilbutirato (HMB)**

Dados mostram que 24% dos 309 usuários de 7 academias de São Paulo consumiam, pelo menos, um tipo de suplemento, sendo que 90% o faziam diariamente. Os concentrados proteicos e aminoácidos foram consumidos por 39% da amostra, composta, em sua maioria, por praticantes de treinamento contra-resistência (PEREIRA et al., 2003).

Um estudo sobre mais de 200 suplementos alimentares que prometiam aumento da massa livre de gordura e ganho de força durante o treinamento de contra-resistência, foi realizado por Nissen e Sharp (2003) que concluíram que apenas as suplementações de creatina e beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) realizavam os efeitos prometidos.

Proteínas e aminoácidos como, por exemplo, o HMB, está entre os suplementos que tem se tornados mais populares ultimamente, apesar destas substâncias apresentarem dados clínicos limitados (PORTAL et al., 2011).

O HMB é um derivado do aminoácido leucina, ou seja, aproximadamente 5% da leucina oxidada é convertida em HMB (VAN KOEVERING; NISSEN, 1992). O HMB pode ser produzido no fígado de animais e humanos (NISSEN et al., 2000), mas pode ser encontrado nos alimentos de origem animal e vegetal, como por exemplo, alfafa, toranja (hibridação da laranja, conhecida como grapefruit), peixe bagre e até mesmo no leite materno, estando também disponível comercialmente como um suplemento nutricional (ALVARES; MEIRELLES, 2008).

O HMB foi inicialmente utilizado como forma de atenuar a perda de peso e massa muscular em indivíduos com câncer (AVERSA et al., 2011), aids (CLARK et

al., 2000; MAY et al., 2002), atrofia muscular (ZANCHI et al., 2011) e outras doenças que acometem a perda de massa muscular. Posteriormente a busca por ganho de força e potência por atletas cresceu muito (WILSON; WILSON; MANNINEN, 2008), e passaram a utilizar o suplemento para promover o desempenho físico e a hipertrofia muscular (PITTLER; ERNST, 2004).

A literatura mostra que o HMB pode atuar sobre os músculos de várias maneiras: como efeito anti-catabólico em indivíduos que praticam atividades físicas, principalmente treinos de resistência e em indivíduos com doenças que levam a perda de peso; inibindo a apoptose; protegendo a integridade da membrana celular; ativando a proliferação e diferenciação dos miotubos e produzindo a hipertrofia muscular. O resultado final do uso do HMB depende da via de ativação em que foi desencadeada.

Para que atue como um componente das membranas celulares dos músculos, o HMB deve ser convertido em colesterol. O colesterol é produzido a partir de acetil-CoA (acetil- coenzima A), mediado pela enzima HMG (hidroxi-metil-glutaril)-CoA redutase (BACHHAWAT; ROBINSON; COON, 1956). A maior parte do HMB é convertido para a HMG-CoA, que se transforma no colesterol das células musculares danificadas, que não têm a capacidade de produzir as quantidades de colesterol necessárias para estabilizar o sarcolema. Desta forma a suplementação de HMB pode ser eficaz na reconstrução e reparação da membrana celular (PORTAL et al., 2010).

Outra forma de ação é na inibição da apoptose e da proteólise. Os resultados do estudo realizado por Smith, Mukerji e Tisdale (2005) sugerem que HMB atenua a degradação da proteína através da inibição da via da ubiquitina-proteassoma em células musculares. Atividade ubiquitina é induzida por certos agentes e condições catabólicas, incluindo glicocorticóides, citocinas, a fome, o estresse de oxigênio (esforço), redução de atividade e imobilização. Esta via de sinalização envolve a ativação inicial de caspases 3 e 8, o que leva a um aumento da atividade de NF-KB (fator de transcrição nuclear kappa B), o que induz a degradação proteína pela via da ubiquitina-proteassoma (ELEY et al., 2008; RUSSEL; TISDALE, 2009).

Outro estudo recente demonstrou uma redução no número de mioblastos apoptóticos derivados de células satélites na presença de HMB tal como refletido por uma redução no número de núcleos picnóticos, bem como maiores níveis de

proteínas anti-apoptóticas e os níveis mais baixos de proteínas pró-apoptóticas. (KORNASIO et al., 2009).

Estes dados sugerem que o HMB influencia diretamente na prevenção da apoptose e na degradação de proteínas, aumentando a sobrevivência de células satélites que são cruciais para a regeneração muscular e conseqüentemente inibe a perda de massa muscular (PORTAL et al., 2010).

Além disso, Smith, Mukerji e Tisdale (2005) e Eley et al. (2007) mostraram que o HMB estimula a síntese proteica por fosforilação crescente a partir da proteína alvo da rapamicina em mamíferos – mTOR (Serina Treonina Quinase), membro da via AKT/PI3K que se encontra envolvida no controle da tradução, regulando positivamente a síntese de proteínas.

Proporcionando outra linha de evidência para as ações anabólicas da HMB no músculo, Kornasio et al. (2009) relatou que o HMB promove a proliferação de células miogênicas, diferenciação e fusão acelerada.

Além disso, o HMB aumentou os níveis de IGF-I (fator de crescimento ligado à insulina), que é conhecido por desempenhar um papel central durante a proliferação e diferenciação de mioblastos e hipertrofia muscular.

A literatura mostra vários trabalhos onde é vantajoso o uso do HMB. De acordo com Sleter e Jenkins (2000), o HMB pode regular o metabolismo proteico por desempenhar efeitos sobre os receptores de cortisol, testosterona, hormônio do crescimento, fator de crescimento semelhante à insulina, ou ainda por modular enzimas responsáveis pelo catabolismo muscular.

Holecek et al. (2009) afirmam que o efeito anabólico da proteína HMB em músculo esquelético está relacionada com a inibição da proteólise em proteossoma e alterações na síntese de proteínas nos tecidos viscerais, que podem afetar várias funções importantes e o estado do metabolismo do corpo inteiro.

Aversa et al. (2012) estudou a influência de HMB na atrofia muscular causada por glicocorticóides, e observou que esta substância atenua e previne a perda de massa muscular nestes casos.

Outros trabalhos mostram o uso do HMB para induzir aumento da massa muscular e ganho de força (PINHEIRO et al., 2012; FITSCHEN et al., 2012)

Embora muitas pesquisas indicassem que o uso do HMB apresenta resultados positivos (HOLECEK et al., 2009; KORNASIO et al., 2009; PIMENTEL et

al., 2011), alguns estudos apresentam resultados contraditórios (NUNAN; HOWATSON; VAN SOMEREN, 2010; KIM et al., 2012), e merecem muita atenção.

Estudos revelam que a suplementação do HMB resulta em maior crescimento muscular e concomitante aumento da força somente em indivíduos destreinados (NISSEN et al., 1996a; VUKOVICH; STUBB; BOHLKEN, 2001).

Devido à promessa de aumento da massa e força muscular, tem se observado um número crescente de adolescentes envolvidos em atividade física ou atlética que estão usando suplementos alimentares (HARRISON et al., 2004; CALFEE; FADALE, 2006), porém ainda pouco se sabe sobre os efeitos adversos desses suplementos no organismo (ARAÚJO; ANDREOLO; SILVA, 2002).

3 OBJETIVOS

### 3 OBJETIVOS

Baseado nestas informações esse trabalho teve por objetivo responder as seguintes perguntas:

- a) O uso de HMB provoca alterações morfológicas e histoenzimológicas nas fibras muscular dos músculos da mastigação?
- b) Em caso de positivo, estas alterações seriam semelhantes entre os músculos elevadores e abaixadores da mandíbula?
- c) O uso de HMB provoca alterações no desenvolvimento e crescimento do esqueleto craniofacial?
- d) Em caso positivo de alterações nos músculos da mastigação e crescimento craniofacial, existe uma relação entre elas?
- e) Os efeitos sobre os componentes do sistema estomatognático seria semelhantes nos indivíduos de ambos os gêneros?

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 58 ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com idade de 60 dias, fornecidos pelo Biotério da Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Bauru, que foram distribuídos em quatro grupos, cada grupo foi subdividido em macho e fêmea, sendo eles: **Grupo Controle Inicial – (GCI)**, com cinco animais de cada gênero; **Grupo Controle Placebo – (GCP)**, oito animais de cada gênero; **Grupo Experimental – (GE)**, oito animais de cada gênero; **Grupo Experimental “Ad libitum” – (GEA)** oito animais de cada gênero;

Os animais foram pesados inicialmente e distribuídos de maneira que os grupos fossem formados por animais de pesos semelhantes e a seguir foi realizado um sorteio para identificação dos grupos.

Esta metodologia foi empregada porque se sabe da existência de uma relação entre o peso dos animais e a área dos diferentes tipos histoquímicos de fibras musculares. Com isso evitamos que algum grupo fosse formado por animais que supostamente apresentariam uma área bem maior dos tipos de fibras já no início do experimento, o que poderia colocar em dúvida os resultados obtidos no final do experimento, com relação à possível alteração que poderá ocorrer em algum tipo de fibra muscular.

Esse estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (ANEXO A).

### 4.2 Caixas e ração

Os animais foram mantidos em caixas individuais com comedouros e bebedouros individuais (figura 3 e 4). A luminosidade da sala onde os animais foram

mantidos foi controlada por períodos de 12 horas de claro/escuro, por um *timer* e a temperatura foi controlada em torno de 22°C.

Os animais dos GCP e GEA receberam água e ração “*ad libitum*”. A ração dada ao GCP foi previamente pesada (30g) para posterior cálculo do consumo diário (figura 5). Os animais do GE receberam a média da quantidade de ração consumida pelos animais do GCP, no dia anterior. Esta metodologia foi mantida para se evitar que os animais do GE consumissem mais ração do que os animais do grupo controle, e desta maneira teria um ciclo mastigatório maior. Isso porque os músculos estudados fazem parte do grupo de músculos responsáveis pela mastigação ou auxiliares desta, e um ciclo mastigatório maior poderia ser considerado como um exercício físico extra, o que poderia comprometer os resultados obtidos na pesquisa. Já os animais do grupo GEA não tiveram a sua alimentação controlada, assim pudemos comparar o real efeito da droga, ora controlando a alimentação (pelo grupo controle placebo), ora não.



Figura

3 – Caixas individuais com comedouros e bebedouros individuais.



Figura 4 – Demonstração das caixas individuais, identificadas por grupo.



Figura 5 – Demonstração dos pacotes de ração pesados separadamente (30g) para cada animal do GCP.

### 4.3 Administração do HMB

O tratamento com HMB foi realizado por meio de gavagem (sonda intragástrica) na dose de 0,3g/kg de HMB diluído em solução fisiológica, diariamente, por quatro semanas (figura 6). Os animais do GCP receberam o mesmo volume de solução fisiológica nas mesmas condições do GE (HOLECEK et al., 2009).



Figura 6 – Demonstração da aplicação do HMB por meio de gavagem.

#### 4.4 Eutanásia e retirada das amostras musculares

Os animais do GCI foram eutanasiados no início do experimento, e os demais grupos foram eutanasiados após as quatro semanas de tratamento com o suplemento.

A eutanásia foi realizada por meio de dose excessiva de anestésicos, com os valores três vezes maiores do que usada na anestesia normal (0,1 ml/100g de peso do animal) por meio de injeções intra-musculares, de Cloridrato de Xilazina (Anasedan®) associada à Cloridrato de ketamina (Dopalen®).

Dos animais eutanasiados foram retirados os seguintes músculos: masseter (porção superficial) e digástrico (ventre anterior) dos quais foram retiradas amostras que foram usadas nas técnicas de histoquímica, para reações de m-ATPase, NADH-TR e HE.

#### 4.5 Processamento Histológico

As amostras foram submetidas às técnicas de histoquímica e morfometria, para verificar se ocorreram modulações ou alterações nas áreas dos diferentes tipos de fibras que formam estes músculos, e passaram pela metodologia descrita a seguir.

##### 4.5.1 Congelamento

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos (KHAN,1977), a seguir os blocos foram reduzidos a cilindros de aproximadamente 8 mm de comprimento por 3 mm de espessura. Os fragmentos foram envoltos em talco cirúrgico e imersos em nitrogênio líquido durante 2 minutos aproximadamente,

até cessar a efervescência (WERNECK, 1981). As amostras congeladas foram armazenadas em um freezer à -80°C até o momento de serem submetidas às reações histoquímicas.

#### 4.5.2 Obtenção dos cortes congelados

A obtenção dos cortes histológicos seguiu a metodologia de Pullen (1977), onde amostras congeladas foram mantidas por uma hora na câmara de um criostato a -20° C. Após esse tempo, os blocos cilíndricos de tecido muscular congelado foram fixados aos suportes metálicos, por meio de adesivos especiais chamados de O.C.T. (“Optimal Critical Temperature”). Dos blocos foram obtidos cortes de 12 µm de espessura no criostato marca Leica – Modelo CM 1850 (figura 7).



Figura 7 - Criostato marca Leica – Modelo CM 1850 utilizado para obtenção dos cortes congelados

#### 4.5.3 Técnicas de histoquímica e morfometria

Os cortes foram submetidos:

a) à coloração de Hematoxilina e Eosina, conforme metodologia descrita por Behmer (1976) para descrição e observação da morfologia geral e também para verificação do padrão de congelamento do tecido muscular.

b) às reações para Adenosina Trifosfato Miofibrilar (m-ATPase), em pH 9,4 de acordo com Padykula e Herman (1955), com pré-incubação alcalina em pH de 10,3 e a ácida em pH 4,35, conforme descrição de Brooke e Kaiser (1970).

Nas reações de mATPase os diferentes tipos de fibras são classificados quanto à velocidade de contração das mesmas. As fibras S (slow – lentas), por serem ácido estável, apresentam-se com coloração escura em pH ácido. Já em pH alcalino sua coloração se torna mais clara. As fibras F (fast – rápidas), por serem alcalina estável, apresentam-se com coloração escura em pH alcalino. Já em pH ácido sua coloração se torna mais clara.

c) à reação de Nicotinamida Adenina Tetrazólio Reductase (NADH-Tr), foi realizada segundo a metodologia de Pearse (1968), modificada por Dubowitz e Brooke (1973).

A reação de NADH-Tr determina a quantidade de mitocôndrias presentes nas fibras musculares. Quando a fibra apresenta grande quantidade de mitocôndrias, a reação é mais intensa, e a coloração apresenta-se mais escura e as fibras são classificadas como O (oxidativas). Nas fibras em que a quantidade de mitocôndrias é reduzida, a coloração apresenta-se mais clara e as fibras são classificadas como G (glicolítica). Podendo também ter uma quantidade intermediária de mitocôndrias e serem classificadas como oxidativas e glicolíticas.

Unindo-se os dois tipos de reações obtêm-se os seguintes tipos de fibras: FG, FOG e SO.

Com auxílio de um fotomicroscópio Olympus BX 50 (figura 8) foram identificados campos idênticos, obtidos das lâminas resultantes das reações de m-ATPase e NADH-Tr, de cada amostra muscular. De posse destes campos as fibras foram classificadas de acordo com Peter et al. (1972) e as suas frequências foram calculadas. Após a classificação das fibras, as áreas das mesmas foram calculadas com auxílio do programa de análise de imagem Image Pró-Plus - versão 6.2.



Figura 8 – Microscópio óptico (Olympus BX 50) com câmera fotográfica (Olympus DP-71) acoplada e monitores para análise e morfometria das imagens.

#### 4.6 Metodologia para Tomada das Medidas Craniométricas do Crânio Macerado

Após a eutanásia e retirada das amostras musculares os animais foram decapitados, os crânios foram identificados e submetidos à maceração em água corrente para posterior tomada das medidas craniométricas.

Após a maceração, os seguintes pontos (figura 9) e medidas craniométricas (figura 10) foram levadas em consideração:

<b>Pontos de referência craniométrica</b>	
Básio (Ba)	Ponto mais postero-interior da margem anterior do forame magno
Occiptal (Oc)	Ponto mais posterior da crista occiptal externa
Ponto A (A)	Extensão mais posterior da concavidade na face anterior da pré-maxila
Ponto CW	Ponto mais medial na face lateral do osso temporal direito e esquerdo posteriormente ao processo zigomático
Ponto MW	Extensão mais lateral da maxila direita e esquerda anterior ao processo zigomático
Ponto VA	Ponto mais superior na superfície ectocranial do neurocrânio anterior

Vertex (Vt)	Ponto mais superior na superfície do neurocrânio posterior
Ponto PPP	Extensão mais posterior do processo horizontal do osso palatino
Ponto ISS	Ponto central da sincondrose interesfenoidal no plano sagital mediano
Prostion (Pr)	Extensão mais anterior da crista alveolar vestibular da maxila no plano sagital mediano
Ponto Mx	Superfície mais lateral dos molares superiores na sua junção com o rebordo alveolar
Infradental (Id)	Extensão mais anterior da crista vestibular da mandíbula no plano sagital mediano
Ponto MMxM	Intersecção do rebordo maxilar e face mesial do primeiro molar
Ponto DMxM	Intersecção do rebordo maxilar e face distal do terceiro molar
Ponto MMnM	Intersecção do rebordo mandibular e a face mesial do primeiro molar
Ponto DMnM	Intersecção do rebordo mandibular e a face distal do terceiro molar
Gonio (Go)	Ponto mais posterior do contorno ósseo do ângulo gonial da mandíbula
Condilo (Co)	Ponto mais superior-posterior do côndilo mandibular
Côndilo S (CoS)	Ponto mais superior do côndilo mandibular
Ponto MR	Porção mais inferior da mandíbula na região massetérica
Ponto Cr	Ponto mais superior no processo coronóide da mandíbula

Os pontos seguiram a metodologia empregada por Barret e Harris (1993), que estão representados no esquema que segue.

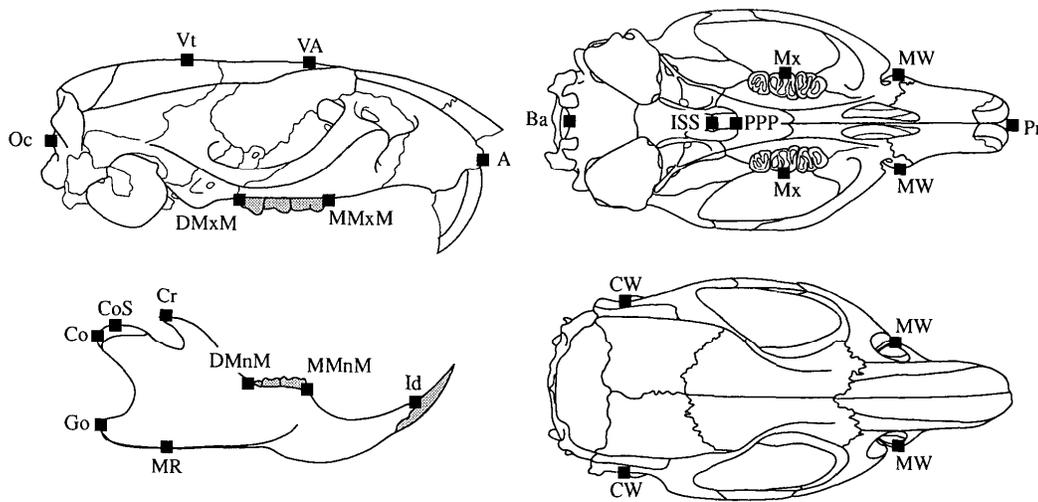


Figura 9 – Esquematisação dos pontos craniométricos utilizados como base para tomadas das medidas (BARRET; HARRIS, 1993).

Seguindo a mesma metodologia citada, os pontos craniométricos serviram de base para medidas lineares:

### **Medidas ântero-posterior**

- 1- comprimento mandíbula - Co - Id
- 2- comprimento total do crânio - OC - A
- 3- comprimento facial - PPP - PR
- 4- comprimento da base do crânio - Ba - ISS

### **Medidas látero-laterais**

- 5- largura do palato - MW - MW
- 6- largura do crânio - CW - CW
- 7- largura zigomática - Z1 - Z2

### **Medidas verticais**

- 8- altura do ramo mandibular - Cós - MR
- 9- altura da face média - VA - DMxM

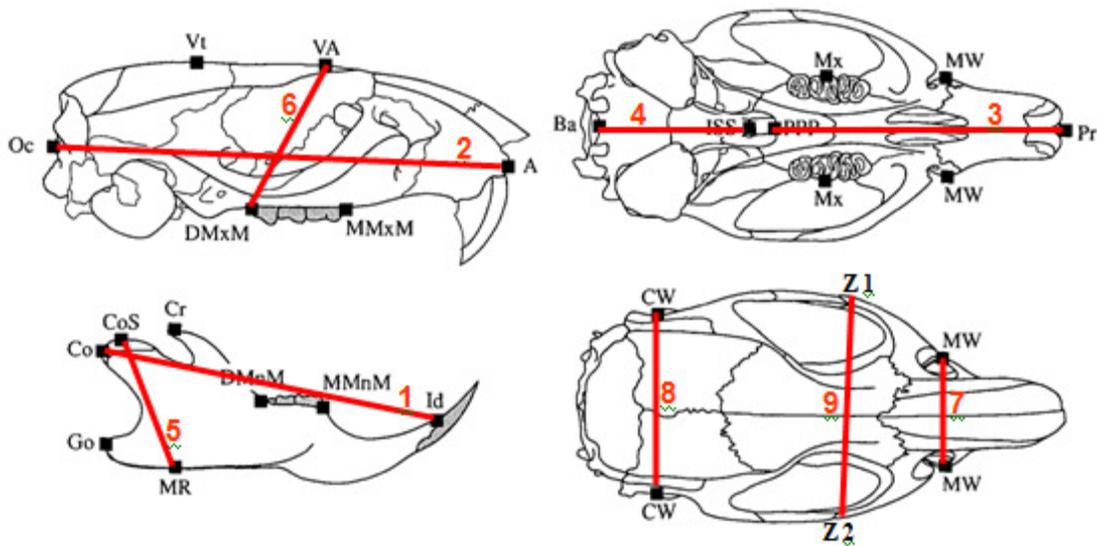


Figura 10 – Demonstração das medidas craniométricas tomadas de cada crânio macerado.

#### 4.7 Tratamento estatístico

Para comparação entre os grupos e gêneros os dados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) a dois critérios, seguido pelo teste de comparações múltiplas (Tukey) quando o primeiro apresentava diferença estatística significativa entre os grupos.

Para comparação entre os tipos de fibras (FG, FOG e SO) no músculo digástrico foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Para comparação das fibras (FG e FOG) do músculo masseter o teste t pareado foi utilizado.

Os dados referentes às medidas craniométricas foram submetidos à Análise de variância a dois critérios e teste de Tukey.

Para todas as análises, valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

Os dados apresentados inicialmente (pesos dos animais e quantidade de ração ingerida) não fazem parte dos objetivos da pesquisa, mas podem apresentar alguma relação com os dados obtidos da área das fibras.

### 5.1 Peso dos animais

Os animais foram pesados no início e no final do experimento, a fim de obter dados quantitativos sobre o ganho de peso. Após análise estatística, os resultados mostraram que não ocorreu diferença significativa entre os grupos e gêneros. Os dados estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 – Comparação do peso dos animais nos diferentes grupos.

<b>Grupos</b>	<b>Gênero</b>	<b>Peso Inicial (g)</b>	<b>Peso Final (g)</b>	<b>Ganho (g)</b>	<b>Ganho (%)</b>
<b>GCI</b>	Macho	209,2	-	-	
	Fêmea	159,4	-	-	
<b>GCP</b>	Macho	230,8	288,1	57,3	19,9
	Fêmea	154,1	182,1	28,0	15,3
<b>GE</b>	Macho	227,6	275,0	47,4	17,3
	Fêmea	157,3	178,0	20,7	11,6
<b>GEA</b>	Macho	228,6	290,1	61,5	21,2
	Fêmea	158,8	193,8	35,0	18,1

### 5.2 Quantidade de ração ingerida

Os animais do GCP serviram de controle para a quantidade de ração dada ao GE, a fim de estabelecer uma relação sem variáveis da quantidade de ciclo

mastigatório de um grupo para outro, tendo a segurança de limitar o viés, e conseguir analisar o efeito isolado do HMB sobre os músculos masseter e digástrico, que estão intimamente ligados a mastigação. Para isso o GE consumiu a mesma quantidade de ração ingerida pelo GCP no dia anterior. Já o GEA teve a alimentação sem restrição, para assim avaliar o efeito do exercício da mastigação associado ao uso do HMB.

A partir dos dados obtidos, a análise estatística mostrou que a quantidade de ração ingerida pelos machos foi significativamente maior do que a ingerida pelas fêmeas. Além disso, o consumo pelo GEA foi significativamente maior quando comparado aos demais grupos. Os dados referentes à alimentação dos machos e das fêmeas estão demonstrados nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

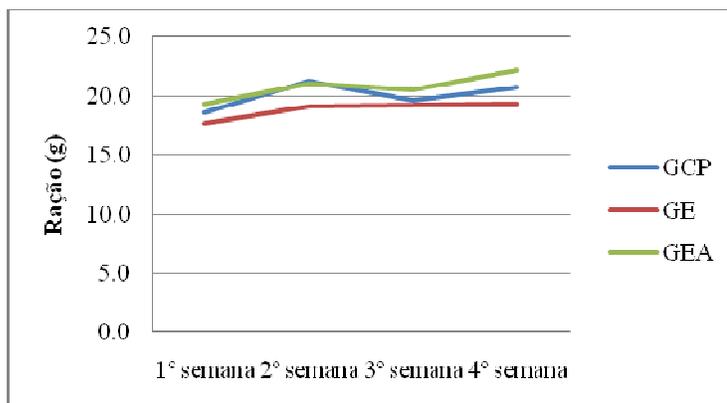


Gráfico 1 – Comparação da quantidade de ração ingerida semanalmente pelos ratos machos entre os grupos.

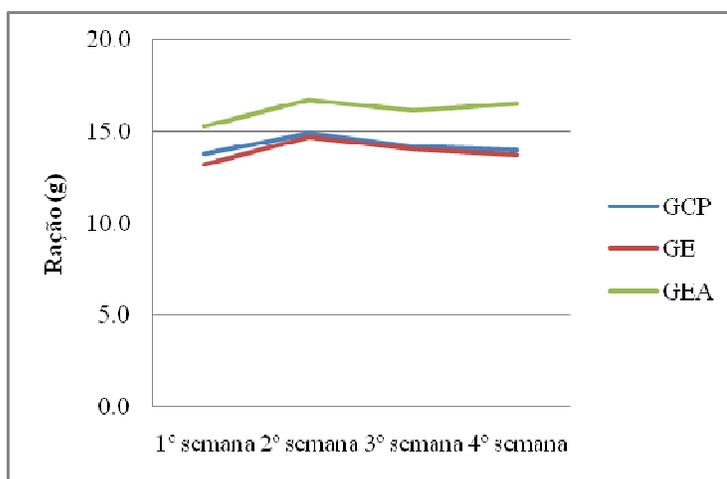


Gráfico 2 – Comparação da quantidade de ração ingerida semanalmente pelas ratas fêmeas entre os grupos.

### 5.3 Caracterização morfológica das fibras submetidas à coloração em HE

Nas observações histológicas em cortes transversais pôde-se observar o padrão fascicular normal em ambos os músculos, com a arquitetura histológica organizada pela presença dos envoltórios conjuntivos, perimísio e endomísio delimitando cada fascículo e fibra muscular, respectivamente. As fibras apresentaram formato poligonal característico, com núcleos periféricos. O padrão descrito acima foi semelhante entre os gêneros. Além disso, as reações em HE foram utilizadas para observar o nível do congelamento das amostras musculares (figura 11).

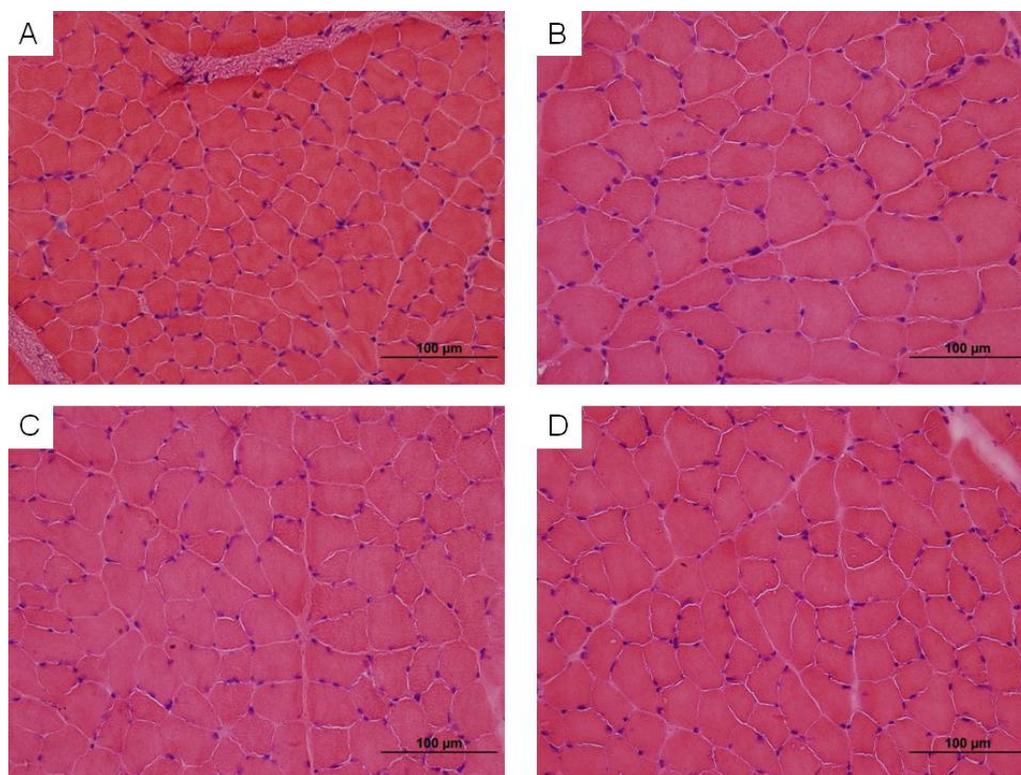


Figura 11 – Fotomicrografia do músculo digástrico de ratos machos corados em HE. Sendo A) GCI; B) GCP; C) GE; D) GEA.

## 5.4 Classificação e morfometria das fibras musculares

### Músculos Masseter e Digástrico

Para análise dos dados referentes à área e a frequência dos tipos de fibras musculares, observou-se primeiramente o desenvolvimento do animal no decorrer do experimento, por meio da comparação entre os grupos GCI e GCP. A seguir compararam-se os grupos GCP, GE e GEA para observar o efeito da suplementação do HMB e da quantidade de alimentos ingeridos (ciclo mastigatório).

### Músculo Masseter

Os resultados das reações histoenzimológicas do músculo masseter foram semelhantes entre os grupos e gêneros, e estão representados na figura 12.

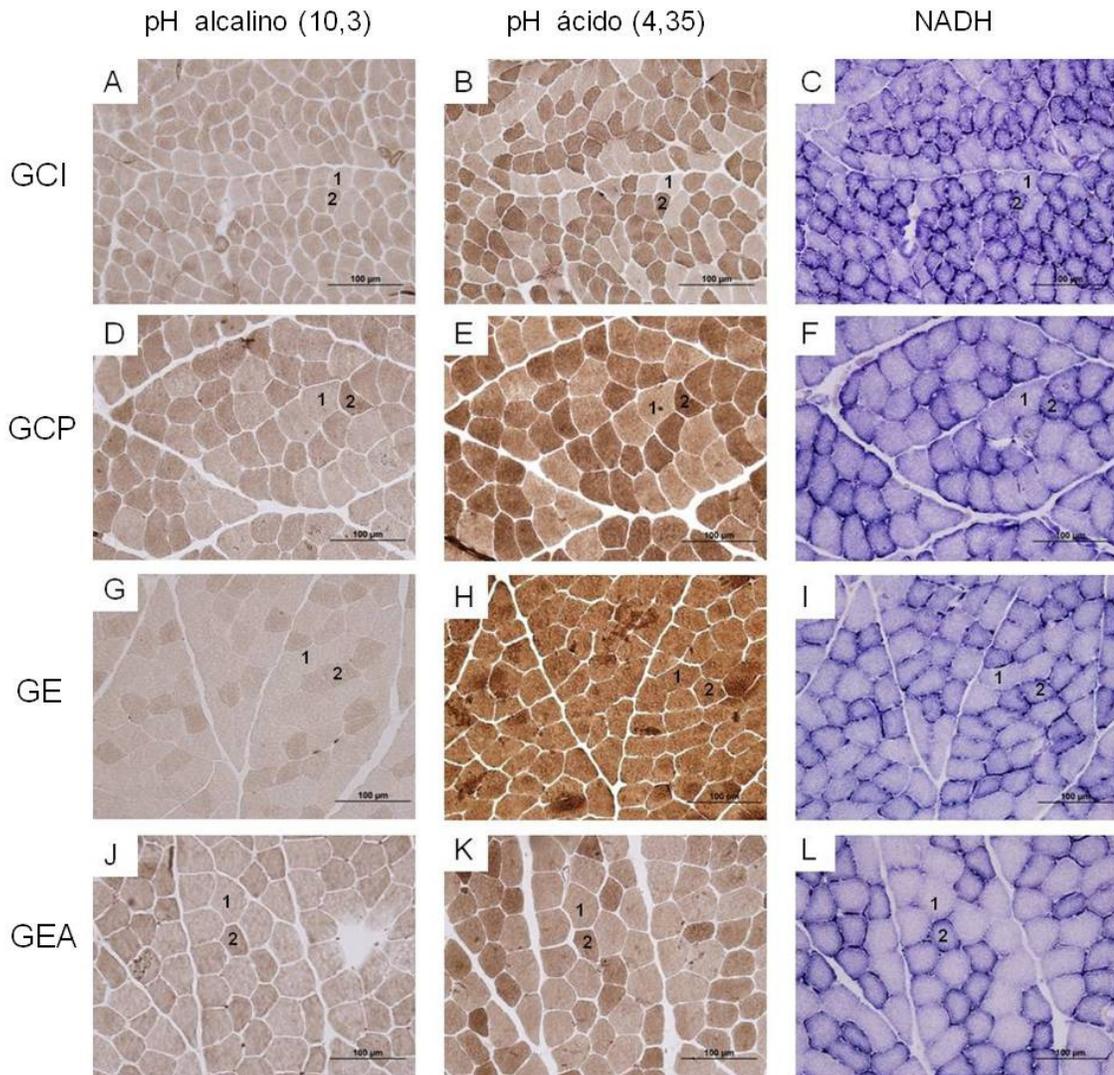


Figura 12 - Fotomicrografia dos músculos masseter de ratos fêmeas submetidos às reações de mATPase e NADH. A – C: GCI; D – F: GCP; G – I: GE; J – L: GEA. Sendo 1= FG e 2= FOG.

Os dados sobre a frequência dos diferentes tipos de fibras no músculo masseter, dos gêneros macho e fêmea estão representados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Comparação da percentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratos **machos**.

Grupos	% FG		% FOG	
	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	30,72 <sup>ac</sup>	5,54	69,28 <sup>ac</sup>	5,54
GCP	34,83 <sup>a</sup>	5,51	65,17 <sup>a</sup>	5,51
GE	24,55 <sup>bc</sup>	4,64	75,45 <sup>bc</sup>	4,64
GEA	23,52 <sup>b</sup>	2,75	76,48 <sup>b</sup>	2,75

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados apresentados na tabela acima mostram que:

a) Nota-se que não há a presença de fibras do tipo SO no músculo masseter.

b) Durante o desenvolvimento dos animais (entre GCI e GCP).

- Não ocorreu alteração na frequência de nenhum dos tipos de fibras.

c) Efeito da suplementação do HMB e quantidade de alimentos ingeridos.

- Entre os grupos em que houve a suplementação de HMB (GE e GEA) os dados não apresentaram diferença estatística entre eles;

- Na comparação entre os grupos experimentais com o GCP, ocorreu uma diminuição de fibras FG e um aumento de fibras do tipo FOG.

Tabela 3 – Comparação da percentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratas **fêmeas**.

Grupos	% FG		% FOG	
	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	27,3 <sup>ac</sup>	4,18	72,69 <sup>ac</sup>	4,18
GCP	31,07 <sup>a</sup>	4,56	68,93 <sup>a</sup>	4,56
GE	26,36 <sup>bc</sup>	2,66	73,64 <sup>bc</sup>	2,66
GEA	23,64 <sup>b</sup>	2,37	76,36 <sup>b</sup>	2,37

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados das frequências dos diferentes tipos de fibras no músculo masseter dos animais do gênero feminino apresentaram um comportamento semelhante ao do masculino.

Os dados sobre a área dos diferentes tipos de fibras no músculo masseter, dos gêneros macho e fêmea estão representados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Comparação entre as áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratos **machos**.

Grupos	FG		FOG	
	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	1121,44 <sup>a</sup>	215,17	908,11 <sup>a</sup>	118,78
GCP	1643,17 <sup>b</sup>	185,76	1186,23 <sup>b</sup>	130,63
GE	1625,06 <sup>b</sup>	346,59	1212,52 <sup>b</sup>	206,70
GEA	1898,55 <sup>b</sup>	305,99	1346,47 <sup>b</sup>	177,10

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados apresentados na tabela acima mostram que:

a) Durante o desenvolvimento dos animais (entre GCI e GCP).

- Houve um aumento na área dos tipos FG e FOG.

b) Efeito da suplementação do HMB e quantidade de alimentos ingeridos (GCP, GE e GEA).

- Tanto a área das fibras dos tipos FG quanto às do tipo FOG não apresentaram diferenças significativas estatisticamente entre os grupos.

Tabela 5 – Comparação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo masseter de ratas **fêmeas**.

Grupos	FG		FOG	
	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	1053,05 <sup>a</sup>	124,04	825,52 <sup>a</sup>	118,66
GCP	1487,68 <sup>b</sup>	332,77	1153,77 <sup>b</sup>	227,38
GE	1606,35 <sup>b</sup>	191,80	1225,46 <sup>b</sup>	162,15
GEA	1528,66 <sup>b</sup>	254,77	1148,23 <sup>b</sup>	193,59

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados das áreas dos diferentes tipos de fibras no músculo masseter dos animais do gênero feminino apresentaram um comportamento semelhante ao do masculino.

### **Músculo Digástrico**

Os resultados das reações histoenzimológicas do músculo digástrico foram semelhantes entre os grupos e gêneros, e estão representados na figura 13.

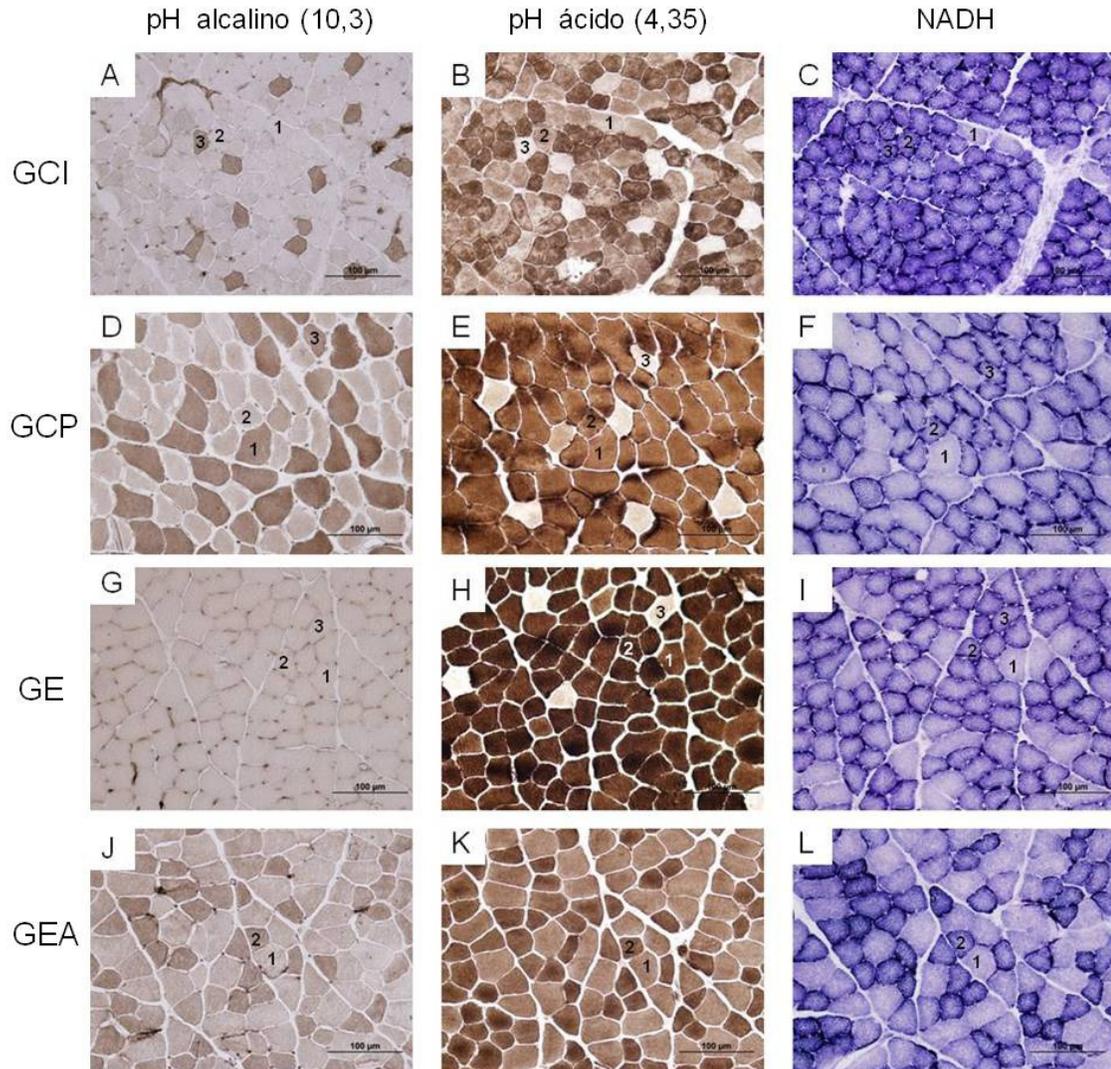


Figura 13 - Fotomicrografia dos músculos digástrico de ratos machos submetidos às reações de mATPase e NADH. Sendo, A – C: GCI; D – F: GCP; G – I: GE; J – L: GEA. Sendo 1 = Fibras do tipo FG; 2 = fibras do tipo FOG e 3 = fibras do tipo SO.

Os dados sobre a porcentagem dos diferentes tipos de fibras no músculo digástrico dos gêneros macho e fêmea estão representados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 – Comparação da percentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos **machos**.

Grupos	% FG		% FOG		% SO	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	21,27 <sup>a</sup>	3,44	70,91 <sup>a</sup>	2,87	7,82 <sup>a</sup>	4,58
GCP	19,37 <sup>a</sup>	2,17	76,65 <sup>b</sup>	3,98	3,98 <sup>b</sup>	2,77
GE	23,25 <sup>a</sup>	3,47	76,30 <sup>b</sup>	3,27	0,45 <sup>b</sup>	0,79
GEA	20,71 <sup>a</sup>	4,28	77,47 <sup>b</sup>	3,74	1,82 <sup>b</sup>	2,65

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados apresentados na tabela acima mostram que:

a) Durante o desenvolvimento dos animais (entre GCI e GCP).

- A percentagem das fibras FG não se alterou, a das fibras do tipo FOG aumentou e as do tipo SO diminuiu.

b) Efeito da suplementação do HMB e quantidade de alimentos ingeridos (GCP, GE e GEA)

- Não houve alteração na percentagem de nenhum dos tipos de fibras.

Tabela 7 – Comparação da percentagem dos tipos de fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos **fêmeas**.

Grupos	% FG		% FOG		% SO	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	21,36 <sup>a</sup>	9,42	72,16 <sup>a</sup>	4,40	6,48 <sup>a</sup>	5,15
GCP	17,12 <sup>a</sup>	3,08	80,68 <sup>b</sup>	1,99	2,20 <sup>b</sup>	1,87
GE	21,34 <sup>a</sup>	4,88	76,16 <sup>b</sup>	3,02	2,50 <sup>b</sup>	2,95
GEA	20,74 <sup>a</sup>	3,40	77,78 <sup>b</sup>	4,29	1,48 <sup>b</sup>	1,73

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados da tabela acima mostram que os animais do gênero feminino apresentaram um comportamento semelhante ao do masculino, quanto à percentagem dos diferentes tipos de fibras

Os dados sobre a área dos diferentes tipos de fibras no músculo digástrico, dos gêneros macho e fêmea estão representados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 – Comparação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos **machos**.

Grupos	FG		FOG		SO	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	1123,92 <sup>a</sup>	191,82	803,30 <sup>a</sup>	108,59	660,47 <sup>a</sup>	382,67
GCP	1656,12 <sup>b</sup>	229,27	1076,93 <sup>b</sup>	110,03	992,03 <sup>a</sup>	121,76
GE	1749,52 <sup>b</sup>	201,98	1148,41 <sup>b</sup>	129,16	400,85 <sup>a</sup>	631,14
GEA	1402,08 <sup>a</sup>	130,01	977,44 <sup>c</sup>	92,50	961,11 <sup>a</sup>	172,25

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados apresentados na tabela acima mostram que:

a) Durante o desenvolvimento dos animais (entre GCI e GCP).

- Ocorreu um aumento das áreas das fibras dos tipos FG e FOG com o aumento da idade.

b) Efeito da suplementação do HMB e quantidade de alimentos ingeridos (GCP, GE e GEA)

- Nos animais dos grupos que consumiram a mesma quantidade de ração (GCP e GE) não ocorreu diferença em nenhum dos tipos de fibras;

- Entre os grupos que receberam a suplementação de HMB (GE e GEA) ocorreu uma diminuição na área tanto das fibras do tipo FG como nas do tipo FOG.

Tabela 9 – Comparação da área ( $\mu\text{m}^2$ ) das fibras musculares entre os grupos no músculo digástrico de ratos **fêmea**.

Grupos	FG		FOG		SO	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
GCI	1046,26 <sup>a</sup>	208,50	791,93 <sup>a</sup>	203,43	515,87 <sup>a</sup>	357,29
GCP	1613,00 <sup>b</sup>	259,55	1093,13 <sup>b</sup>	140,01	761,77 <sup>a</sup>	387,38
GE	1567,66 <sup>b</sup>	473,59	1059,93 <sup>b</sup>	189,19	900,02 <sup>a</sup>	179,59
GEA	1346,02 <sup>a</sup>	194,80	915,54 <sup>c</sup>	90,22	730,99 <sup>a</sup>	151,85

Comparação vertical (percentagem do mesmo tipo de fibra entre os grupos).  
 Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Os dados da Tabela acima mostram que os animais do gênero feminino apresentaram um comportamento semelhante ao do masculino, quanto à área dos diferentes tipos de fibras.

### Comparação Masseter x Digástrico

Tabela 10 – Demonstração da percentagem dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos **machos**.

Grupo	Músculo	% FG		% FOG		% SO	
		Média	DP	Média	D.P.	Média	DP
GCI	Masseter	30,72	5,54	69,28	5,54	-	-
	Digástrico	21,27	3,44	70,91	2,87	7,82	4,58
GCP	Masseter	34,83	5,51	65,17	5,51	-	-
	Digástrico	19,37	2,17	76,65	3,98	3,98	2,77
GE	Masseter	24,55	4,64	75,45	4,64	-	-
	Digástrico	23,25	3,47	76,30	3,27	0,45	0,79
GEA	Masseter	23,52	2,75	76,48	2,75	-	-
	Digástrico	20,71	4,28	77,47	3,74	1,82	2,65

Tabela 11 – Demonstração da percentagem dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos **fêmeas**.

Grupo	Músculo	% FG		% FOG		% SO	
		Média	DP	Média	D.P.	Média	DP
GCI	Masseter	27,31	4,18	72,69	4,18	-	-
	Digástrico	21,36	9,42	72,16	4,40	6,48	5,15
GCP	Masseter	31,07	4,56	68,93	4,56	-	-
	Digástrico	17,12	3,08	80,68	1,99	2,20	1,87
GE	Masseter	26,36	2,66	73,64	2,66	-	-
	Digástrico	21,34	4,88	76,16	3,02	2,50	2,95
GEA	Masseter	23,64	2,37	76,36	2,37	-	-
	Digástrico	20,74	3,40	77,78	4,29	1,48	1,73

 Tabela 12 – Demonstração da **área** dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos **machos**.

Grupo	Músculo	FG		FOG		SO	
		Média	DP	Média	D.P.	Média	DP
GCI	Masseter	1121,44	215,17	908,11	118,78	-	-
	Digástrico	1123,92	191,82	803,30	108,59	660,47	382,67
GCP	Masseter	1643,17	185,76	1186,23	130,63	-	-
	Digástrico	1656,12	229,27	1076,93	110,03	992,03	121,76
GE	Masseter	1625,06	346,59	1212,52	206,70	-	-
	Digástrico	1749,52	201,98	1148,41	129,16	400,85	631,14
GEA	Masseter	1898,55	305,99	1346,47	177,10	-	-
	Digástrico	1402,08	130,01	977,44	92,50	961,11	172,25

Tabela 13 – Demonstração da **área** dos diferentes tipos de fibras entre os músculos nos ratos **fêmeas**.

Grupo	Músculo	FG		FOG		SO	
		Média	DP	Média	D.P.	Média	DP
GCI	Masseter	1053,05	124,04	825,52	118,66		
	Digástrico	1046,26	208,50	791,93	203,43	515,87	357,29
GCP	Masseter	1487,68	332,77	1153,77	227,38		
	Digástrico	1613,00	259,55	1093,13	140,01	761,77	387,38
GE	Masseter	1606,35	191,80	1225,46	162,15		
	Digástrico	1567,66	473,59	1059,93	189,19	900,02	179,59
GEA	Masseter	1528,66	254,77	1148,23	193,59		
	Digástrico	1346,02	194,80	915,54	90,22	730,99	151,85

### Comparação Macho x Fêmea

Tabela 14 – Demonstração da **percentagem** dos tipos de fibras no músculo **masseter** entre os **gêneros**.

Grupo	Gênero	% FG		% FOG	
		Média	DP	Média	D.P.
GCI	Macho	30,72	5,54	69,28	5,54
	Fêmea	27,31	4,18	72,69	4,18
GCP	Macho	34,83	5,51	65,17	5,51
	Fêmea	31,07	4,56	68,93	4,56
GE	Macho	24,55	4,64	75,45	4,64
	Fêmea	26,36	2,66	73,64	2,66
GEA	Macho	23,52	2,75	76,48	2,75
	Fêmea	23,64	2,37	76,36	2,37

Tabela 15 – Demonstração da **percentagem** dos tipos de fibras no músculo **digástrico** entre os **gêneros**.

Grupo	Gênero	% FG		% FOG		% SO	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
GCI	Macho	21,27	3,44	70,91	2,87	7,82	4,58
	Fêmea	21,36	9,42	72,16	4,40	6,48	5,15
GCP	Macho	19,37	2,17	76,65	3,98	3,98	2,77
	Fêmea	17,12	3,08	80,68	1,99	2,20	1,87
GE	Macho	23,25	3,47	76,30	3,27	0,45	0,79
	Fêmea	21,34	4,88	76,16	3,02	2,50	2,95
GEA	Macho	20,71	4,28	77,47	3,74	1,82	2,65
	Fêmea	20,74	3,40	77,78	4,29	1,48	1,73

 Tabela 16 – Demonstração da **área** dos tipos de fibras no músculo **masseter** entre os gêneros.

Grupo	Gênero	FG		FOG	
		Média	DP	Média	D.P.
GCI	Macho	1121,44	215,17	908,11	118,78
	Fêmea	1053,05	124,04	825,52	118,66
GCP	Macho	1643,17	185,76	1186,23	130,63
	Fêmea	1487,68	332,77	1153,77	227,38
GE	Macho	1625,06	346,59	1212,52	206,70
	Fêmea	1606,35	191,80	1225,46	162,15
GEA	Macho	1898,55	305,99	1346,47	177,10
	Fêmea	1528,66	254,77	1148,23	193,59

Tabela 17 – Demonstração da área dos tipos de fibras no músculo **digástrico** entre os gêneros.

Grupo	Gênero	FG		FOG		SO	
		Média	DP	Média	D.P.	Média	D.P.
<b>GCI</b>	<b>Macho</b>	<b>1123,92</b>	<b>191,82</b>	<b>803,30</b>	<b>108,59</b>	<b>660,47</b>	<b>382,67</b>
	Fêmea	1046,26	208,50	791,93	203,43	515,87	357,29
<b>GCP</b>	<b>Macho</b>	<b>1656,12</b>	<b>229,27</b>	<b>1076,93</b>	<b>110,03</b>	<b>992,03</b>	<b>121,76</b>
	Fêmea	1613,00	259,55	1093,13	140,01	761,77	387,38
<b>GE</b>	<b>Macho</b>	<b>1749,52</b>	<b>201,98</b>	<b>1148,41</b>	<b>129,16</b>	<b>1202,54</b>	<b>252,05</b>
	Fêmea	1567,66	473,59	1059,93	189,19	900,02	179,59
<b>GEA</b>	<b>Macho</b>	<b>1402,08</b>	<b>130,01</b>	<b>977,44</b>	<b>92,50</b>	<b>961,11</b>	<b>172,25</b>
	Fêmea	1346,02	194,80	915,54	90,22	730,99	151,85

### 5.5 Crescimento e Desenvolvimento Craniofacial

Todas as medidas analisadas a partir dos crânios macerados (figura 14) apresentaram diferença estatística significativa entre os gêneros, onde sempre as medidas das fêmeas foram menores que dos machos.

Na comparação entre os grupos, o GCI apresentou as medidas significativamente menores do que os demais grupos, em ambos os gêneros.

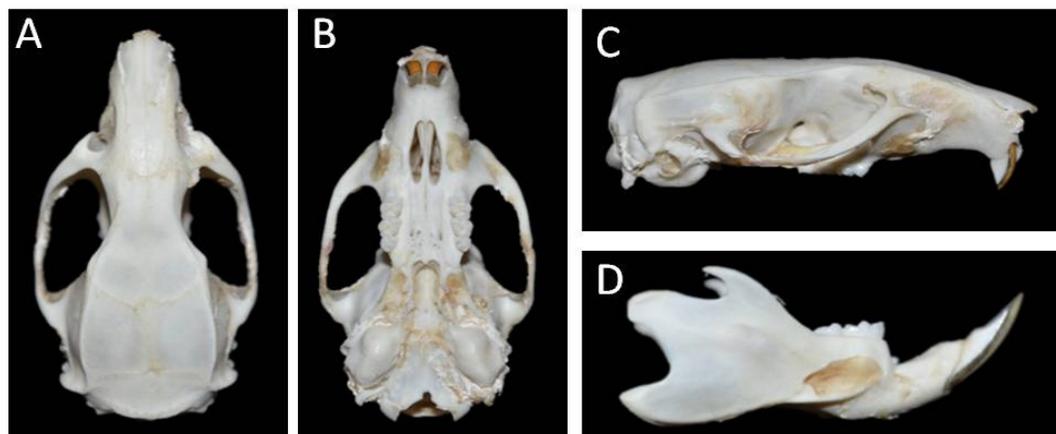


Figura 14 – Demonstração dos crânios macerados para posterior tomada das medidas. Em A - Vista superior do crânio; B - vista inferior do crânio ou basal; C - vista lateral do crânio e D - vista lateral da mandíbula.

Os dados sobre as medidas craniométricas, dos gêneros macho e fêmea estão representados na tabela 18.

Tabela 18 – Comparação das medidas craniométricas entre os grupos e gêneros.

Grupos	Gênero	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
GCI	Macho	23,42 <sup>a</sup>	41,81 <sup>a</sup>	24,58 <sup>a</sup>	14,75 <sup>a</sup>	8,50 <sup>a</sup>	15,01 <sup>a</sup>	19,84 <sup>a</sup>	11,03 <sup>a</sup>	13,03 <sup>a</sup>
	Fêmea	22,14 <sup>A</sup>	39,92 <sup>A</sup>	23,52 <sup>A</sup>	13,89 <sup>A</sup>	7,71 <sup>A</sup>	14,67 <sup>A</sup>	18,38 <sup>A</sup>	10,30 <sup>A</sup>	12,39 <sup>A</sup>
GCP	Macho	24,82 <sup>b</sup>	43,55 <sup>b</sup>	24,64 <sup>b</sup>	16,05 <sup>b</sup>	9,52 <sup>b</sup>	15,66 <sup>b</sup>	22,10 <sup>b</sup>	12,35 <sup>b</sup>	13,64 <sup>b</sup>
	Fêmea	23,38 <sup>B</sup>	40,98 <sup>B</sup>	23,18 <sup>B</sup>	15,11 <sup>B</sup>	8,39 <sup>B</sup>	14,93 <sup>B</sup>	20,51 <sup>B</sup>	11,08 <sup>B</sup>	13,14 <sup>B</sup>
GE	Macho	24,84 <sup>b</sup>	43,60 <sup>b</sup>	24,52 <sup>b</sup>	16,34 <sup>b</sup>	9,41 <sup>b</sup>	15,56 <sup>b</sup>	22,37 <sup>b</sup>	12,38 <sup>b</sup>	13,75 <sup>b</sup>
	Fêmea	23,16 <sup>B</sup>	40,92 <sup>B</sup>	23,11 <sup>B</sup>	15,17 <sup>B</sup>	8,48 <sup>B</sup>	14,90 <sup>B</sup>	20,46 <sup>B</sup>	11,13 <sup>B</sup>	13,04 <sup>B</sup>
GEA	Macho	24,73 <sup>b</sup>	43,27 <sup>b</sup>	24,61 <sup>b</sup>	16,21 <sup>b</sup>	9,32 <sup>b</sup>	15,62 <sup>b</sup>	22,10 <sup>b</sup>	12,30 <sup>b</sup>	13,70 <sup>b</sup>
	Fêmea	23,53 <sup>B</sup>	41,24 <sup>B</sup>	23,20 <sup>B</sup>	15,21 <sup>B</sup>	8,54 <sup>B</sup>	14,83 <sup>B</sup>	20,88 <sup>B</sup>	11,24 <sup>B</sup>	13,16 <sup>B</sup>

Comparação vertical (mesma medida entre os grupos).

a, b – Letras minúsculas indicam comparação entre machos nos diferentes grupos (vertical)

A, B – Letras maiúsculas indicam comparação entre fêmeas nos diferentes grupos (vertical)

Letras iguais indicam que não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Lembrando que: M1-comprimento mandíbula; M2- comprimento total do crânio; M3- comprimento facial; M4- comprimento da base do crânio; M5- largura do palato; M6- largura do crânio; M7- largura zigomática; M8- altura do ramo mandibular; M9- altura da face média.



## 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

Ratos e camundongos são amplamente utilizados como modelo animal em muitos estudos para investigar função, hipertrofia e atrofia muscular como substitutos para os seres humanos (ICHINOSEKI-SEKINE et al., 2012). Os ratos têm a vantagem de serem pequenos, de fácil manipulação e alimentação, e principalmente de padronização da experimentação. Além disso, os ratos são usados para vários experimentos abordando o funcionamento e a capacidade adaptável do sistema mastigatório (SANO et al., 2007).

A utilização de ambos os gêneros nesta pesquisa, foi um diferencial, pois se pôde comparar se a resposta muscular, bem como se o desenvolvimento craniofacial seria o mesmo entre machos e fêmeas, frente ao uso do HMB.

Apesar da maioria dos trabalhos experimentais não utilizar o gênero feminino, por apresentar interferências hormonais (SILVA; CECANHO, 2009), porém alguns pesquisadores trabalham com fêmeas, como foi o caso de Kim e colaboradores (2012) que analisaram o efeito do HMB sobre a sarcopenia, apenas em ratas idosas, por ser o gênero e a idade que apresentam maior incidência da doença nos seres humanos.

A importância de estudar ambos os gêneros, como no caso deste trabalho, deve-se ao fato do aumento da frequência das mulheres nas academias ou ginásios de esporte, e na diferença como eles podem reagir ao mesmo tipo de estímulo. No uso de anabolizantes, por exemplo, as fêmeas apresentam maior sensibilidade aos anabólicos esteróides, devido aos baixos níveis endógenos quando comparado com ratos machos (GEBHARDT; PANCHERZ, 2003).

Estudos mostram a existência de mais de 200 suplementos alimentares que prometem efeitos semelhantes ao do HMB, mas escolheu-se esta substância para esta pesquisa porque trabalhos científicos mostram que apenas a creatina e o beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB) realizavam os efeitos prometidos (NISSEN; SHARP, 2003). Outro motivo é que o uso do HMB na dose de 3g/dia não influencia a testosterona urinária, mantendo os níveis de epitestosterona normais (SLATER; Jenkins, 2000). Tal fato não qualifica o HMB como administração exógena de testosterona ou de precursor desta, não sendo assim considerado substância a ser

barrada pelo doping. Além disso, o Comitê Olímpico qualifica o HMB como substância legal (ALVARES; MEIRELLES, 2008).

Com relação ao efeito do HMB no ganho de peso, nesta pesquisa esta substância não produziu diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e experimentais, de maneira semelhante ao encontrado por outros pesquisadores (GERLINGER-ROMERO et al., 2011). Hao et al. (2011) que trabalharam com ratos jovens e adultos, normais e submetidos à imobilização, também observaram que não ocorreu diferença corporal entre os animais dos dois grupos no período experimental.

A literatura mostra estudos sobre o efeito do HMB nos músculos de animais em crescimento (MOORE; FERKET; MOZDZIAK, 2005), na musculatura de seres humanos acometidos por várias doenças (AVERSA et al., 2011; ZANCHI et al., 2011), em seres humanos jovens (ROWLANDS; THOMSON, 2009; PORTAL et al., 2011) e idosos (HSIEH et al., 2010; FITSCHEN et al., 2012) que não praticavam atividades físicas e passaram a praticá-las simultaneamente associado ao uso desta substância. Apesar disso a literatura consultada apresenta poucos dados sobre o efeito do HMB na musculatura de animais jovens que levam uma vida normal sem praticar exercícios como foi o caso deste estudo, o que dificulta a descrição deste capítulo.

As lâminas coradas com HE foram usadas para observar o nível do congelamento das amostras musculares, que nesta pesquisa mostraram que esta metodologia conservou bem as estruturas musculares, onde se pode notar o contorno bem definido das fibras musculares, posição do núcleo e ausência de cristais de gelo. Tais imagens foram semelhantes às encontradas na literatura (GARCIA et al., 2010).

Os músculos esqueléticos apresentam uma composição heterogênea de tipos de fibras que apresentam diferentes propriedades fisiológicas (KAWAI et al., 2010), que não são imutáveis. As fibras musculares têm a capacidade de se adaptar, de acordo com a demanda funcional, e mudar de um tipo de fibra para outro (ROY; BALDWIN; EDGERTON, 1991; PETTE, 2002). Além disso, a composição do tipo de fibra de determinado músculo está relacionada com sua atividade diária (LANGENBACH et al., 2008).

Tanto o masseter quanto o ventre anterior do digástrico usados nesta pesquisa apresentam uma heterogeneidade na composição do tipo de fibra. Esta

heterogeneidade pode refletir a função do músculo e demonstrar o papel complexo de ambos durante a função mastigatória (SANO et al., 2007).

Nos músculos da mandíbula, grandes mudanças na composição do tipo de fibra podem ser observadas, principalmente durante o desenvolvimento pós-natal (BREDMAN et al., 1992; ANAPOL; HERRING, 2000; KORFAGE; VAN WESSEL; LANGENBACH, 2006).

Considerando-se os diferentes tipos de fibras presentes na região superficial do músculo masseter, notou-se neste trabalho, em ambos os gêneros, a presença apenas das fibras de contração rápida FG e FOG, coincidindo com os achados de outros pesquisadores (SUZUKI 1977; ROKX; VAN WILLIGEN; JANSEN, 1984; ANDREO et al., 2005; KAWAI et al., 2007; SANO et al., 2007).

Em relação à área, as fibras do tipo FG foram maiores do que as do tipo FOG no músculo masseter de todos os grupos estudados, em ambos os gêneros, nesta pesquisa, corroborando com pesquisas anteriores (KOWALEWSKI; MILTZOW, 1990; ANDREO, 2001).

Os dados deste trabalho mostraram uma tendência da área das fibras dos tipos FG e FOG serem maiores no GEA do que nos animais dos demais grupos. Desta forma, algumas dúvidas persistem:

1) se o experimento fosse realizado por um período maior esta tendência se tornaria diferença estatisticamente significativa? Alguns pesquisadores têm mencionado a necessidade de se estudar o efeito do HMB por períodos mais longos de utilização (PORTAL et al., 2010; PIMENTEL et al., 2011).

2) esta tendência poderia ser explicada pela maior ingestão de ração e conseqüentemente de uma maior quantidade de aminoácidos? Trabalhos científicos mostram que a disponibilidade aumentada de aminoácido resultou no aumento das taxas de síntese de proteína muscular, tanto nos idosos e em jovem (WELLE et al., 1994; VOLPI et al., 1998; VOLPI et al., 1999).

3) tal fato ocorreu porque os animais deste grupo comeram mais do que os animais dos outros grupos, realizando maior quantidade de ciclos mastigatório, que poderiam ser consideradas como maior atividade física?

Com relação à frequência dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo masseter desta pesquisa, o tipo FOG foi sempre maior do que a do tipo FG, em ambos os sexos, mas estes dados não coincidem com pesquisas anteriores (KOWALEWSKI; MILTZOW, 1990; ANDREO et al., 2005).

Neste estudo quando se compara o músculo masseter dos GCI e GCP não observou-se mudanças no perfil fenotípico das fibras. Porém com a suplementação do HMB, ocorreu uma alteração das fibras do tipo FG para o tipo FOG, sugerindo que há uma influência do HMB na modulação desses tipos de fibras.

Foram poucas as informações encontradas na literatura consultada sobre a histoenzimologia das fibras do ventre anterior do músculo digástrico, o que dificulta a discussão dos dados deste trabalho.

No músculo digástrico, observou-se, nos animais de ambos os gêneros, que este é formado por fibras de contração rápida e de contração lenta (FG, FOG e SO), corroborando com os dados de trabalhos anteriores (BENETT; JEFFERY; WEBER, 1977; KILIARIDIS; SHYU, 1988; ANDREO et al., 2004).

Neste estudo, observou-se que as fibras de contração rápida apresentaram áreas maiores do que as de contração lenta, sendo que as do tipo FG foram maiores do que as do tipo FOG, em ambos os gêneros, coincidindo com dados de Andreo et al. (2004).

Observando-se a área das fibras de contração rápida (FG e FOG) no músculo digástrico, em ambos os sexos, nota-se que elas apresentaram um comportamento diferente do que no músculo masseter, apresentando uma diminuição no GEA. Tal fato poderia ser explicado porque estes tipos de fibras estão melhores adaptados para produção de força e que no ventre anterior do músculo digástrico elas seriam menos solicitadas por ele ser um abaixador da mandíbula enquanto que o masseter é um elevador da mandíbula?

Com relação à percentagem dos diferentes tipos de fibras encontradas no músculo digástrico dos animais desta pesquisa, notou-se que as fibras de contração rápida foram predominantes e entre elas as do tipo FOG foram encontradas com maior frequência.

Durante o desenvolvimento normal, neste trabalho, o músculo digástrico apresentou uma mudança na composição de suas fibras, com um aumento de fibras do tipo rápidas e diminuição de fibras lentas. Sugere-se que a mudança dos tipos de fibras ocorreu entre fibras FOG e SO, já que a percentagem de fibras do tipo FG permaneceu a mesma.

Nos demais grupos estudados não se observaram diferenças entre eles, nas frequências dos diferentes tipos de fibras. Estas observações sugerem que, no

período de suplementação, o HMB não interferiu na modulação dos tipos de fibras. Tais fatos puderam ser observados com os animais de ambos os gêneros.

Com relação ao desenvolvimento craniofacial os dados mostraram que as medidas no gênero masculino são sempre maiores do que as do feminino, coincidindo com os dados de Ingerslev e Solow (1975).

Os dados desta pesquisa mostraram que o uso do HMB não interferiu em nenhuma das medidas que avalia o crescimento craniofacial em nenhum dos gêneros. Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos estudando o efeito de suplementos nutricionais no desenvolvimento craniofacial, o que inviabilizou a discussão dos dados deste trabalho. Os dados que mais se aproximaram foram de Barret e Harris (1993), que usaram anabolizantes e observaram um crescimento excessivo do esqueleto cefálico, mas deve ser lembrado que o HMB não é anabolizante o que dificulta a comparação dos dados.

Vários trabalhos mostram o efeito dos músculos da mastigação sobre o desenvolvimento craniofacial (IWABUCHI, 1975; MIURA, 1988; MATSUYUKI; KITAHARA; NAKASHIMA, 2006). Como nesta pesquisa o uso do HMB não mostrou efeito positivo ou negativo sobre a área dos diferentes tipos de fibras dos músculos da mastigação, que está relacionada com a produção de força, e nem nas medidas que avaliaram o crescimento craniofacial, estes dados permitem sugerir a existência desta relação (força dos músculos da mastigação X desenvolvimento craniofacial).

7 CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÃO

Baseados nos dados deste trabalho julga-se poder concluir que o uso diário de 0,3g/kg de HMB, por quatro semanas:

a) não provocou alterações morfológicas e histoenzimológicas nas fibras dos músculos da mastigação;

b) demonstrou resultados semelhantes entre os músculos elevadores e abaixadores da mandíbula;

c) não provoca alterações no desenvolvimento e crescimento do esqueleto craniofacial;

d) mostrou que a falta de resultados positivos de alterações nos músculos da mastigação e no crescimento craniofacial sugere existir uma relação entre eles;

e) os resultados sobre os componentes do sistema estomatognático foram semelhantes nos indivíduos de ambos os gêneros.

## REFERÊNCIAS

## REFERENCIAS

Ahlgren J, Omnell KÅ, Sonesson B, Toremalm N. Bruxism and hypertrophy of the masseter muscle. *ORL*. 1969;31(1):22-9.

Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. Changes in the pattern of SDH and PhR staining in fibres of rat masseter muscle following long-term functional stretch. *Arch Oral Biol*. 1983;28(5):447-51.

Alvares TS, Meirelles CM. Efeitos da suplementação de beta-hidroxi-beta-metilbutirato sobre a força ea hipertrofia:[revisão]; Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation on strength and hypertrophy:[review]. *Rev nutr*. 2008;21(1):49-61.

Anapol F, Herring SW. Ontogeny of histochemical fiber types and muscle function in the masseter muscle of miniature swine. *Am J Phys Anthropol*. 2000;112(4):595-613.

Andreo J, Pai V, Navarro J, Oliveira J. Fiber types distribution in the digastric muscle of tufted capuchin monkey (*Cebus apella*). *Anat Histol Embryol*. 1994;23(3):226-31.

Andreo J. Histoenzimologia dos músculos da mastigação de ratos (*Rattus norvegicus*) alcoolizados. 2001: Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2001.

Andreo JC, dos Santos NB, Moraes LHR, Andreo MB, Andreo TB, Andreo CB, Rodrigues AC. Effect of ethanol in the Digastric muscle in rats (*Rattus Norvegicus*): An histoenzimologic evaluation. *Salusvita*. 2004; 23(3):371-86.

Andreo JC, Santos NB, Moraes L, Andreo M, Andreo T, Andreo C, et al. Is there morphological difference between branquiomeric and somitic muscles submitted to the alcohol consumption! An experimental study in rats (*Rattus norvegicus*). *J Appl Oral Sci*. 2005;13(3):296-304.

Araújo L, Andreolo J, Silva MS. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. *Rev Bras Ciên e Mov Brasília v*. 2002;10(3):13-8.

Aversa Z, Bonetto A, Costelli P, Minero VG, Penna F, Baccino FM, et al.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. *Int J Oncol.* 2011;38(3):713.

Aversa Z, Alamdari N, Castellero E, Muscaritoli M, Fanelli FR, Hasselgren PO.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) prevents dexamethasone-induced myotube atrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(4):739-43.

Bachhawat BK, Robinson WG, Coon MJ. Enzymatic Carboxylation of  $\beta$ -Hydroxyisovaleryl Coenzyme A. *J Biol Chem.* 1956;219(2):539-50.

Baechle TR, Earle RW. *Essentials of strength training and conditioning.* Champaign: Human Kinetics, 2008.

Barrett RL, Harris EF. Anabolic steroids and craniofacial growth in the rat. *Angle Orthod.* 1993;63(4):289-98.

Behmer OA. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica:* EDART/USP; 1976.

Bennet JH, Jeffery PK, Weber WV. The histochemistry of the jaw muscles of the mature and maturing rat (proceeding). *J Physiol.* 1977; 270(1):26-7.

Boyd SB, Gonyea WJ, Finn RA, Woodard CE, Bell WH. Cody chemical study of the masseter muscle in patients with vertical maxillary excess. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984; 42:75-83.

Bredman J, Weijs W, Korfage H, Brugman P, Moorman A. Myosin heavy chain expression in rabbit masseter muscle during postnatal development. *J Anat.* 1992;180(Pt 2):263.

Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch Neurol.* 1970;23(4):369.

Burr DB. Muscle Strength, Bone Mass, and Age-Related Bone Loss. *J Bone Miner Res.* 1997;12(10):1547-51.

Calfee R, Fadale P. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. *Pediatrics.* 2006;117(3):577-89.

Carlsoo S. An electromyographic study of the activity, and an anatomic analysis of the mechanics of the lateral pterygoid muscle. *Acta Anat.* 1956;26(4):339.

Castillo EM, Comstock RD. Prevalence of use of performance-enhancing substances among United States adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 2007;54(4):663-75.

Chlopicka J, Wandas P, Zachwieja Z. Dietary supplements selected by young people exercising in fitness rooms in Kraków and environs. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2007;58(1):185-9.

Chuang SY. The relationship between masticatory function and craniofacial morphology. *Gaexiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi.* 1995;11(8):458-69.

Ciochon RL, Nisbett R, Corruccini R. Dietary consistency and craniofacial development related to masticatory function in minipigs. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1997;17(2):96-102.

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

Close R. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 1972;52(1):129-97.

Cobos A, Segade L, Fuentes I. Muscle fibre types in the suprahyoid muscles of the rat. *J Anat.* 2002;198(3):283-94.

Cornachione AS, Benedini-Elias PCO, Polizello JC, Carvalho LC, Mattiello-Sverzut AC. Characterization of Fiber Types in Different Muscles of the Hindlimb in Female Weanling and Adult Wistar Rats. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44(2):43-50.

De Jong W, Korfage J, Langenbach G. The role of masticatory muscles in the continuous loading of the mandible. *J Anat.* 2011;218(6):625-36.

Dubowitz V, Brooke M. Muscle biopsy: a modern approach. London, Saunders, 1973.

Dubowitz V, Pearse AGE. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochem Cell Biol.* 1960;2(2):105-17.

Eason JM, Schwartz G, Shirley K, English AW. Investigation of sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle showing different effects of androgen deprivation in adult and young adult animals. *Arch Oral Biol.* 2000;45(8):683-90.

Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. Signaling pathways initiated by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):923-31.

Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(6):1417-26.

English AW, Eason J, Schwartz G, Shirley A, Carrasco DI. Sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle: myosin heavy chain composition of neuromuscular compartments. *Cells Tissues Organs.* 1999;164(4):179-91.

Engström C, Hollender L, Lindqvist S. Jaw morphology in edentulous individuals: a radiographic cephalometric study. *J Oral Rehabil.* 1985;12(6):451-60.

Enlow DH, Hans MG, Oppido T. Noções básicas sobre crescimento facial: Santos; 1998.

Ferreira AT. Fisiologia da Contração Muscular. Anais do V Simpósio Brasileiro de Hipertermia Maligna. 2005.

Fitschen PJ, Wilson GJ, Wilson JM, Wilund KR. Efficacy of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation in elderly and clinical populations. *Nutrition.* 2012.

Garcia BC, Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Pastre CM, Camargo RCT, Souza TA, et al. Effects of diet supplemented with omega-3 in soleus muscle of rats submitted to swimming: histological and morphometric analysis. *Rev Bras Med Esp.* 2010;16(5):363-7.

Gebhardt A, Pancherz H. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(4):435-40.

Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, Giannocco G, Nunes M. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMB) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. *Growth Horm IGF Res.* 2011;21(2):57-62.

Gorniak, G.C. Architecture of the masticatory apparatus in Eastern Raccoons (*Procyon lotor lotor*). *Am J Anat.* 1986; 176(3):333-51.

Grünheid T, Langenbach GEJ, Korfage JAM, Zentner A, Van Eijden TMGJ. The adaptive response of jaw muscles to varying functional demands. *Eur J Orthodo.* 2009; 31:596–612.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*: Elsevier Brazil; 2006.

Hao Y, Jackson JR, Wang Y, Edens N, Pereira SL, Alway SE.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(3):701-15.

Harrison R, Holt D, Pattison D, Elton P. Are those in need taking dietary supplements? A survey of 21 923 adults. *Br J Nutr.* 2004;91(4):617-24.

He T. Craniofacial morphology and growth in the ferret: effects from alteration of masticatory function. *Swed Dent J Suppl.* 2004(165):1-72.

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 Chem Toxicol.* 2009;47(1):255-9.

Hsieh LC, Chow CJ, Chang WC, Liu TH, Chang CK. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on protein metabolism in bed-ridden elderly receiving tube feeding. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010;19(2):200-8.

Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Kakigi R, Ogura Y, Sugiura T, Naito H. Fiber-type specific expression of  $\alpha$ -actinin isoforms in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419(2):401-4.

Ingerslev C, Solow B. Sex differences in craniofacial morphology. *Acta Odontol Scand.* 1975;33(2):85-94.

Iwabuchi T. Abnormality of occlusion observed among the patients of dystrophia musculorum progressive *Med J Mutual Aid Ass.* 1975;24:50-7.

Johnston IA, Manthri S, Smart A, Campbell P, Nickell D, Alderson R. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J Exp Biol.* 2003;206(19):3425-35.

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

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

Kannus P, Haapasalo H, Sievänen H, Oja P, Vuori I. The site-specific effects of long-term unilateral activity on bone mineral density and content. *Bone.* 1994;15(3):279-84.

Kawai N, Tanaka E, Langenbach GEJ, Van Wessel T, Brugman P, Sano R, et al. Daily jaw muscle activity in freely moving rats measured with radio-telemetry. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(1):15-20.

Kawai N, Sano R, Korfage JAM, Nakamura S, Tanaka E, Van Wessel T, et al. Functional characteristics of the rat jaw muscles: daily muscle activity and fiber type composition. *J Anat.* 2009;215(6):656-62.

Kawai N, Sano R, Korfage JAM, Nakamura S, Kinouchi N, Kawakami E, et al. Adaptation of rat jaw muscle fibers in postnatal development with a different food consistency: an immunohistochemical and electromyographic study. *J Anat.* 2010;216(6):717-23.

Khan M. The histoenzymology of striated muscle fibres: an overview. *Cell Mol Biol Incl Cyto Enzymol.* 1977;22(3-4):383-93.

Kiliaridis S, Engström C, Thilander B. The relationship between masticatory function and craniofacial morphology I. A cephalometric longitudinal analysis in the growing rat fed a soft diet. *The Eur J Orthod.* 1985;7(4):273-83.

Kiliaridis S. Masticatory muscle function and craniofacial morphology. An experimental study in the growing rat fed a soft diet. *Swed Dental J Suppl.* 1986;36:1-55.

Kiliaridis S, Shyu B. Isometric muscle tension generated by masseter stimulation after prolonged alteration of the consistency of the diet fed to growing rats. *Arch Oral Biol.* 1988;33(7):467-72.

Kiliaridis S. Masticatory muscle influence on craniofacial growth. *Acta Odontol Scand.* 1995;53(3):196-202.

Kim JY, Kim ST, Cho SW, Jung HS, Park KT, Son HK. Growth effects of botulinum toxin type A injected into masseter muscle on a developing rat mandible. *Oral Dis.* 2008;14(7):626-32.

Kim JS, Park YM, Lee SR, Masad IS, Khamoui AV, Jo E, et al.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate did not enhance high intensity resistance training-induced improvements in myofiber dimensions and myogenic capacity in aged female rats. *Mol Cells.* 2012; 34(5):439-48.

Knoll P. Über protoplasmarme und protoplasmareiche muskulatur. *Denkschr akad wiss wien Math-nat kl.* 1891;58:633-700 apud Close R. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 1972;52(1):129-97.

Korfage J, Van Eijden T. Myosin heavy chain composition in human masticatory muscles by immunohistochemistry and gel electrophoresis. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(1):113-9.

Korfage J, Van Wessel T, Langenbach G, Ay F, Van Eijden T. Postnatal transitions in myosin heavy chain isoforms of the rabbit superficial masseter and digastric muscle. *J Anat.* 2006;208(6):743-51.

Korfage J, Wang J, Lie S, Langenbach GEJ. Influence of botulinum toxin on rabbit jaw muscle activity and anatomy. *Muscle Nerve*. 2012;45(5):684-91.

Kornasio R, Riederer I, Butler-Browne G, Mouly V, Uni Z, Halevy O.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation, differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(5):755-63.

Kovarik M, Muthny T, Sispera L, Holecek M. Effects of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate treatment in different types of skeletal muscle of intact and septic rats. *J Physiol Biochem*. 2010;66(4):311-9.

Kowalewski R, Miltzow M. Postnatal development of the masticatory muscles of the Wistar rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout). A histochemical study. *Anat Anz*. 1990;170(3-4):205-11.

Kreia TB, de Bittencourt Neto AC, Retamoso LB, dos Santos-Pinto A, Tanaka O. Tendência de crescimento facial em Ortodontia e Ortopedia Funcional dos Maxilares. *RGO*. 2011;59:97-102.

Krogstad O, Dahl BL. Dento-facial morphology in patients with advanced attrition. *Eur J Orthod*. 1985;7(1):57-62.

Langenbach G, Van Wessel T, Brugman P, Korfage J, van Eijden T. Is fiber-type composition related to daily jaw muscle activity during postnatal development? *Cells Tissues Organs*. 2008;187(4):307-15.

Lewis AB, Roche AF, Wagner B. Pubertal spurts in cranial base and mandible. *Angle Orthod*. 1985;55(1):17-30.

Mason MA, Giza M, Clayton L, Lonning J, Wilkerson RD. Use of nutritional supplements by high school football and volleyball players. *Iowa Orthop J*. 2001;21:43-48.

Matic DB, Yazdani A, Wells RG, Lee TY, Gan BS. The effects of masseter muscle paralysis on facial bone growth. *J Surg Res*. 2007;139(2):243-52.

Matsuyuki T, Kitahara T, Nakashima A. Developmental changes in craniofacial morphology in subjects with Duchenne muscular dystrophy. *The European J Orthod*. 2006;28(1):42-50.

May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg.* 2002;183(4):471-9.

Meyer E. Ueber rothe und blasse quergestreifte muskeln. *Arch Anat Physiol.* 1875:217-32.

Minamoto VB. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão; Classification and adaptation of muscle fibers: a review. *Fisioter Pesqui.* 2005;12(3):50-5.

Miura H. Dysfunction of masticatory muscles of the patients with progressive muscular dystrophy (Duchenne type), and their changes during a period of 3 years. *J Iwate Med Ass.* 1988; 40:619-36.

Monaco A, Spadaro A, Cattaneo R, Giannoni M. Effects of myogenous facial pain on muscle activity of head and neck. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(8):767-73.

Monemi M, Liu JX, Thornell LE, Eriksson PO. Myosin heavy chain composition of the human lateral pterygoid and digastric muscles in young adults and elderly. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21(4):303-12.

Moore D, Ferket P, Mozdziak P. The effect of early nutrition on satellite cell dynamics in the young turkey. *Poult Sci.* 2005;84(5):748-56.

Myrhage R. Microvascular supply of skeletal muscle fibre. *Acta Orthop Scand* 1977:166.

Nariyama M, Kota Y, Kaneko S, Asada Y, Yamane A. Association between the lack of teeth and the expression of myosins in masticatory muscles of microphthalmic mouse. *Cell Biochem Funct.* 2011.

Netherland J, Botsko M, Egan JE, Saxon AJ, Cunningham CO, Finkelstein R, et al. Factors affecting willingness to provide buprenorphine treatment. *J Subst Abuse Treat.* 2009;36(3):244-51.

Nissen S, Panton L, Wilhelm R, Fuller Jr J. Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation on strength and body composition of

trained and untrained males undergoing intense resistance training. *FASEB J.* 1996a;10(3):287.

Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher J, Rice D, Fuller J, et al. Effect of leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol.* 1996;81(5):2095-104.

Nissen S, Sharp R, Panton L, Vukovich M, Trappe S, Fuller J.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr.* 2000;130(8):1937-45.

Nissen SL, Sharp RL. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *J Appl Physiol.* 2003;94(2):651-9.

Nunan D, Howatson G, van Someren KA. Exercise-induced muscle damage is not attenuated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate and alpha-ketoglutaric acid supplementation. *J Strength Cond Res.* 2010;24(2):531-7.

Nunes EAA, Kuczera D, Brito GAP, Bonatto SJR, Yamazaki RK, Tanhoffer RA, et al.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-kappaB expression. *Nutr Res.* 2008;28(7):487-93.

Ostaszewski P, Kostiuk S, Balasinska B, Papet I, Glomot F, Nissen S. The effect of leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy-  $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on muscle protein synthesis and protein breakdown in chick and rat muscle. *J Anim Sci.* 1996;74(suppl 1):138.

Padykula HA, Herman E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatas. *J Histochem Cytochem.* 1955;3(3):170-95.

Pearse AGE. *Histochemistry. Theoretical and applied.* 1968;1:1-759.

Pereira RF, Lajolo FM, Hirschbruch MD. Consumo de suplementos por alunos de academias de ginástica em São Paulo; Supplement consumption among fitness center users in São Paulo, Brazil. *Rev Nutr.* 2003;16(3):265-72.

Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochem.* 1972;11(14):2627-33.

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001;115(5):359-72.

Pette D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol.* 2002;27(4):423-48.

Piedade MCB. Avaliação estrutural, estereológica e biomecânica do efeito da aplicação do ultrassom no reparo de lesão lacerativa experimental do gastrocnêmio de rato. Universidade de São Paulo; 2010.

Pimentel G, Rosa J, Lira F, Zanchi N, Ropelle E, Oyama L, et al.  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway. *Nutr Metab.* 2011;8(1):11.

Pinheiro CHJ, Gerlinger-Romero F, Guimarães-Ferreira L, de Souza-Jr AL, Vitzel KF, Nachbar RT, et al. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2012:1-7.

Pittler MH, Ernst E. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(4):529-36.

Poliachik SL, Bain SD, Threet DW, Huber P, Gross TS. Transient muscle paralysis disrupts bone homeostasis by rapid degradation of bone morphology. *Bone.* 2010;46(1):18-23.

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

Portal S, Zadik Z, Rabinowitz J, Pilz-Burstein R, Adler-Portal D, Meckel Y, 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. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111(9):2261-9.

Poswillo D. The aetiology and pathogenesis of craniofacial deformity. *Development*. 1988;103(Supplement):207-12.

Pullen A. The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat*. 1977;123(Pt 2):467.

Raadsheer M, Van Eijden T, Van Ginkel F, Prahl-Andersen B. Contribution of jaw muscle size and craniofacial morphology to human bite force magnitude. *J Dent Res*. 1999;78(1):31-42.

Ranvier LA, Renaut JL. Leçons d'anatomie générale sur le système musculaire: Progrès médical; 1880. apud Close R. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 1972;52(1):129-97.

Ravosa MJ, Kunwar R, Stock SR, Stack MS. Pushing the limit: masticatory stress and adaptive plasticity in mammalian craniomandibular joints. *J Exp Biol*. 2007; 210(4):628-41.

Rizzolo RJC, Madeira M. Anatomia facial com fundamentos de anatomia geral. 3 ed. São Paulo: Sarvier., 2009.

Rokx J, Van Willigen J, Jansen H. Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat. *Arch Oral Biol*. 1984;29(1):25-31.

Rowlands DS, Thomson JS. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation during resistance training on strength, body composition, and muscle damage in trained and untrained young men: A meta-analysis. *J Strength Cond Resh*. 2009;23(3):836-46.

Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. The Plasticity of Skeletal Muscle: Effects of Neuromuscular Activity. *Exerc Sport Sci Rev*. 1991;19(1):269-312.

Russell S, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate of muscle protein degradation induced by lipopolysaccharide. *Mol Cell Biochem*. 2009;330:171-9.

Saito T, Ohnuki Y, Yamane A, Saeki Y. Effects of diet consistency on the myosin heavy chain mRNAs of rat masseter muscle during postnatal development. *Arch Oral Biol*. 2002;47(2):109-15.

Saito T, Fukui K, Akutsu S, Nakagawa Y, Ishibashi K, Nagata J, et al. Effects of diet consistency on the expression of insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors and IGF binding proteins during the development of rat masseter muscle soon after weaning. *Arch Oral Biol.* 2004;49(10):777-82.

Sano R, Tanaka E, Korfage J, Langenbach G, Kawai N, Van Eijden T, et al. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *J Anat.* 2007;211(4):464-70.

Schaefer K, Fink B, Mitteroecker P, Neave N, Bookstein FL. Visualizing facial shape regression upon 2nd to 4th digit ratio and testosterone. *Coll Antropol.* 2005;29(2):415-9.

Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447-531.

Schoenau E, Fricke O. Interaction between muscle and bone. *Horm Res Paediatr.* 2006;66(1):73-8.

Segu M, Lobbia S, Canale C, Collesano V. Quality of life in patients with temporomandibular disorders. *Minerva Stomatol.* 2003;52(6):279-88.

Shaw CN, Stock JT. Habitual throwing and swimming correspond with upper limb diaphyseal strength and shape in modern human athletes. *Am J Phys Anthropol.* 2009;140(1):160-72.

Silva HCFP, Cecanho R. Cephalometric changes produced by locally applied anabolic steroid in Wistar rats. *Arch Oral Biol.* 2009;54(4):389-95.

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

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

Stålberg E, Andreassen S, Falck B, Lang H, Rosenfalck A, Trojaborg W. Quantitative analysis of individual motor unit potentials: a proposition for standardized terminology and criteria for measurement. *J Clin Neurophysiol.* 1986;3(4):313-48.

Standring S. *Gray's anatomia: a base anatômica da prática clínica.* 40 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Staron R, Hikida R. Histochemical, biomedical, and ultrastructural analyses of single human muscle fibers, with special reference to the C-fiber population. *J Histochem Cytochem.* 1992;40:563–8.

Suzuki A. A comparative histochemical study of the masseter muscle of the cattle, sheep, swine, dog, guinea pig and rat. *Histochemistry.* 1977; 51:121-31.

Takahashi I. Effects of denervation of the masseter muscle on craniofacial growth in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Nihon Kyosei Shika Gakkai Zasshi.* 1988;47(1):197-213.

Taylor A, Cody F, Bosley M. Histochemical and mechanical properties of the jaw muscles of the cat. *Exp Neurol.* 1973;38(1):99-109.

Tsai CY, Chiu WC, Liao YH, Tsai CM. Effects on craniofacial growth and development of unilateral botulinum neurotoxin injection into the masseter muscle. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135(2):142. e1-6.

Tuxen A, Kirkeby S. An animal model for human masseter muscle: histochemical characterization of mouse, rat, rabbit, cat, dog, pig, and cow masseter muscle. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;48(10):1063-7.

Van Koevering M, Nissen S. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1992;262(1):27-31.

Van Spronsen PH, Koolstra JH, van Ginkel FC, Weijs WA, Valk J, Prahl-Andersen B. Relationships between the orientation and moment arms of the human jaw muscles and normal craniofacial morphology. *Eur J Orthod.* 1997; 19:313–328.

Volpi E, Ferrando AA, Yeckel CW, Tipton KD, Wolfe RR. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J Clin Invest.* 1998;101(9):2000-7.

Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE, Wolfe RR. Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1999;277(3):513-20.

Vreeke M, Langenbach GEJ, Korfage JAM, Zentner A, Grünheid T. The masticatory system under varying functional load. Part 1: structural adaptation of rabbit jaw muscles to reduced masticatory load. *Eur J Orthod.* 2011;33(4):359-64.

Vukovich MD, Stubbs NB, Bohlken RM. Body composition in 70-year-old adults responds to dietary  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate similarly to that of young adults. *J Nutr.* 2001;131(7):2049-52.

Wachstein M, Meisel E. Succinic dehydrogenase activity in myocardial infarction and in induced myocardial necrosis. *Am J Pathol.* 1955;31(2):353-65.

Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone.* 2006;38(2):257-64.

Welle S, Thornton C, Statt M, McHenry B. Postprandial myofibrillar and whole body protein synthesis in young and old human subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1994;267(4):599-604.

Werneck L. O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. *Rev Bras Clin Terap.* 1981;10(Especial).

Wessel T, Langenbach G, Korfage J, Brugman P, Kawai N, Tanaka E, et al. Fibre-type composition of rabbit jaw muscles is related to their daily activity. *Eur J Neurosci.* 2005;22(11):2783-91.

Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConnaughey DR, Åbyholm F, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *Bmj.* 2007;334(7591):464.

Wilson GJ, Wilson JM, Manninen AH. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: A review. *Nutr Metab (Lond)*. 2008;5:1.

Yamada A, Kajii Y, Sakai S, Tsujimura T, Nakamura Y, Ariyasinghe S, et al. Effects of chewing and swallowing behavior on jaw opening reflex responses in freely feeding rabbits. *Neurosci Lett*. 2013.

Yoshida E, Lobbezoo F, Fueki K, Naeije M. Effects of delayed-onset muscle soreness on masticatory function. *Eur J Oral Sci*. 2012.

Zadik Z, Nemet D, Eliakim A. Hormonal and metabolic effects of nutrition in athletes. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22(9):769-78.

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

ANEXO

## ANEXO A – Comitê de Ética



### Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73  
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

*Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais*  
Fone: (14)3235-8356  
e-mail: [mferrari@fob.usp.br](mailto:mferrari@fob.usp.br)

**CEEPA-Proc. Nº 009/2011**

Bauru, 28 de junho de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito do  $\beta$ -hidroxi-  $\beta$ -metilbutirato (HMB) sobre os músculos da mastigação e desenvolvimento e crescimento craniofacial de ratos**, de autoria de Leticia Rossi Daré, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **21 de junho de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet  
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

**Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas