

## Revisión

# El $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) como suplemento nutricional (II): mecanismos de acción moleculares y celulares

Rafael Manjarrez-Montes-de-Oca<sup>1,2</sup>, Mateo Torres-Vaca<sup>3</sup>, Javier González-Gallego<sup>2</sup>  
e Ildefonso Alvear-Ordenes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Licenciatura en Cultura Física y Deporte, Facultad de Ciencias de la Conducta, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Toluca, México. <sup>2</sup>Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Universidad de León. León, España, <sup>3</sup>Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UAEMex. Toluca, México.

## Resumen

**Introducción:** En los últimos años el  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) ha sido foco de diversas investigaciones que le atribuyen un efecto sobre la disminución de la proteólisis muscular y un incremento de la masa muscular. Por tanto, se han realizado estudios centrados en los mecanismos celulares y moleculares responsables de dichos efectos.

**Objetivos:** Los objetivos de la presente revisión son: conocer el metabolismo del HMB, así como su absorción y excreción; estudiar la posible toxicidad del HMB; e identificar los mecanismos celulares y moleculares de acción del HMB cuando se utiliza como suplemento nutricional.

**Métodos:** Se utilizaron las bases de datos Web of Science, Pubmed y SportDiscus para realizar la búsqueda de artículos. Los resultados se dividieron en dos partes; en este artículo se presentan los resultados referentes a los mecanismos de acción del HMB.

**Resultados:** No existen suficientes datos que apoyen que la ingesta de HMB incremente la síntesis de colesterol en el músculo. Es posible que existan efectos positivos en el metabolismo muscular a través de la vía mTOR y del sistema ubiquitin-proteasoma, aunque no se conoce su mecanismo de acción. Probablemente, el HMB eleva los niveles sanguíneos de  $\beta$ hidroxibutirato y esto podría explicar sus principales efectos sobre la disminución de la proteólisis muscular.

**Conclusiones:** De acuerdo a nuestros resultados, la posibilidad de justificar la acción del HMB a través de la vía del beta-hidroxibutirato abre una interesante línea de investigación para futuros estudios.

(Nutr Hosp. 2015;31:597-605)

DOI:10.3305/nh.2015.31.2.8437

Palabras clave:  $\beta$ hidroxibutirato. mTOR. Sistema ubiquitin-proteasoma. Cuerpos cetónicos. Ayuda ergogénica.

## $\beta$ -HYDROXY- $\beta$ -METHYLBUTYRATE AS A DIETARY SUPPLEMENT (II): CELL AND MOLECULAR MECHANISM OF ACTION

### Abstract

**Introduction:** In recent years, several investigations have related  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) to a reduced muscle proteolysis and to an increase in muscle mass. Therefore, a number of studies focused on the cellular and molecular mechanisms regulating these effects have been carried out.

**Aims:** The objectives of this review are: to know both HMB metabolism and toxicity, and to identify HMB cellular and molecular mechanisms of action when used as a dietary supplement.

**Methods:** A search was performed in the Web of Science, Pubmed and SportDiscus data bases. Results were divided into two parts; this article presents aspects referring to HMB mechanisms of action.

**Results:** There is insufficient evidence that HMB intake increases muscle cholesterol synthesis. It probably has positive effects on muscle metabolism through both the mTOR and ubiquitin-proteasome pathways, although the mechanism of action is unknown. HMB may increase blood levels of  $\beta$ -hydroxybutyrate and this could explain the main effects of HMB on muscle proteolysis.

**Conclusion:** According to these results, the possibility of justifying the action of HMB through the beta-hydroxybutyrate pathway opens an interesting line of research for future studies.

(Nutr Hosp. 2015;31:597-605)

DOI:10.3305/nh.2015.31.2.8437

Key words:  $\beta$ -hydroxybutyrate. mTOR. Ubiquitin-proteasome system. Ketone Bodies. Ergogenic Aid.

**Correspondencia:** Ildefonso Alvear-Ordenes.  
Instituto de Biomedicina (IBIOMED).  
Universidad de León.  
24071 León (España).  
E-mail: ialvor@unileon.es

Recibido: 26-XI-2014.  
Aceptado: 27-XII-2014.

## Abreviaturas

4E-BP1: Proteína de unión 1 al factor eucarionte de inicio de la traducción 4E.

Akt: Proteína quinasa B.

CK: Creatina quinasa.

CoA: Coenzima A.

HMB:  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato.

HMG-CoA:  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico-1.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LEU: Leucina.

mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos.

OHB: Beta-hidroxibutirato.

PIF: Factor inductor de proteólisis.

S6K1: Quinasa 1 de la proteína ribosomal S6.

UPS: Sistema ubiquitinaproteasoma.

## Introducción

El uso de suplementos nutricionales por parte de los deportistas se ha vuelto muy popular en los últimos años<sup>1-3</sup>. Sin embargo, el empleo de dichos suplementos suele tener poco o nulo respaldo científico e incluso algunos de ellos pueden representar un riesgo para la salud<sup>1,2</sup>. Por tanto, son necesarias más investigaciones sobre sus posibles efectos y los mecanismos responsables.

En la última década, el suplemento nutricional  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB) ha sido foco de diversas investigaciones debido a que se le atribuye un efecto sobre la disminución del daño muscular<sup>4</sup> y el incremento de masa muscular.<sup>5</sup> Por ello, distintos estudios se han centrado en los mecanismos celulares y moleculares que regulan tal efecto, abriendo varias posibilidades de explicación.

Por todo ello resulta de interés el analizar los mecanismos de acción propuestos para el HMB por medio de una revisión de literatura sistematizada, que nos permita conocer y evaluar su utilidad en la salud y el deporte. Los objetivos de la presente revisión son: conocer el metabolismo del HMB, así como su absorción y excreción; identificar la posible toxicidad del HMB; e identificar los posibles mecanismos celulares y moleculares de acción del HMB cuando se utiliza como suplemento nutricional. Esta segunda parte se centra en el último objetivo.

## Métodos

La búsqueda de artículos fue realizada en las bases de datos: (1) *Web of Science* de la página de búsqueda para ciencias *Web of Knowledge (WoK)*; (2) *Pubmed* para ciencias médicas; y (3) *SportDiscus* para ciencias del deporte. Se incluyeron únicamente trabajos publicados en inglés y no se tomó como criterio de búsqueda el año de publicación.

Se utilizaron los siguientes pasos para buscar y discriminar los artículos a incluir en esta revisión: (1) Se realizó una búsqueda de artículos que incluyeran en su título las siguientes palabras: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, beta-hydroxy-isovalerate,  $\beta$ -hydroxy-isovalerate, 3-hydroxy-isovalerate, supplementation, ingestion, intake y loading. Como resultado de esta búsqueda se obtuvieron 127 referencias publicadas entre los años 1982 y 2014. (2) Dentro de dichas referencias, se seleccionaron aquellas que tuvieran como sujetos de estudio a humanos y algunos estudios en animales que se consideraron de relevancia. (3) Además, se encontraron 5 revisiones y 2 capítulos de libro que abordaban la utilización como suplemento del HMB. Finalmente, los resultados de esta revisión fueron divididos en dos partes según los objetivos. En este artículo se presentan los resultados referentes a los mecanismos de acción del HMB.

## Posibles mecanismos de acción del HMB

El 1996, Nissen y cols.<sup>6</sup> publicaron el primer artículo sobre suplementación de HMB en humanos. En este artículo mostraron que en sujetos sometidos durante tres semanas a entrenamiento de resistencia y una dosis de suplementación de 3 g de HMB al día, se incrementaban la fuerza y la masa muscular (medida como masa libre de grasa). Además, los participantes presentaron después de la suplementación una disminución en: (a) la proteólisis muscular (evaluada como concentración en orina de 3-metilhistidina); (b) la concentración en suero de enzimas relacionadas con daño muscular, principalmente CK y una marcada tendencia en LDH; y (c) la concentración en plasma de aminoácidos esenciales. A partir de estos hallazgos, Nissen y col.<sup>6</sup> establecieron la hipótesis que el HMB podría haber participado en un proceso desconocido que inhibe la proteólisis muscular.

Desde entonces se han postulado varias teorías<sup>7-10</sup> sobre el mecanismo de acción del HMB provenientes de estudios realizados tanto en humanos como en animales y cultivos celulares, de las que destacan: un proceso desconocido asociado a la síntesis de colesterol; un incremento en la síntesis proteica a través de la expresión del IGF-1 (factor de crecimiento insulínico-1) y de la vía de señalización de la proteína mTOR; y, una disminución de la proteólisis del músculo esquelético por la disminución de la actividad y expresión de la vía ubiquitina-proteasoma y caspasas. A continuación se detallan dichas hipótesis.

### *Síntesis del colesterol a partir del HMB*

Con posterioridad al primer artículo<sup>6</sup> sobre suplementación de HMB en humanos; Nissen y Abumrad, en 1997, publicaron una revisión<sup>11</sup> sobre el papel nutri-

cional del HMB. En dicha revisión, los autores analizan los resultados de estudios tanto en humanos como en animales y proponen la posible ruta bioquímica del metabolismo del HMB en mamíferos, indicando que podría ser un precursor del colesterol debido a que en el citosol el HMB es convertido a HMG-CoA y éste, a su vez, puede utilizarse finalmente para la síntesis de colesterol (Fig. 1).

El argumento que sustenta esta teoría es que el colesterol resulta necesario para mantener apropiadamente la función y el crecimiento celular, debido a que está fuertemente involucrado en la síntesis de nuevas membranas celulares y en la reparación de membranas celulares dañadas<sup>11,12</sup>. Además, en el caso específico del músculo, durante periodos de incremento en el estrés celular (como puede ser durante el ejercicio intenso) la demanda de colesterol es mucho mayor que la producción endógena<sup>12</sup>; por lo tanto, al elevar los niveles de HMB por medio de la suplementación se incrementa también la concentración intracelular de HMG-CoA disponible para la síntesis de colesterol<sup>11,12</sup>.

Esto es particularmente importante en el músculo debido a que la síntesis endógena parece ser la mayor (o quizá exclusiva) fuente de colesterol.<sup>11</sup> Otro argumento que apoya dicha hipótesis es que la suplementación de HMB, en estudios realizados en animales, mejora la función del sistema inmunológico y la producción de grasa en la leche durante la lactación; en ambos casos se requiere de nueva síntesis de colesterol en la célula<sup>11,12</sup>. Finalmente, en una revisión de Wilson y cols.,<sup>7</sup> estos autores hacen énfasis en que la inhibición de la síntesis de colesterol puede resultar en una disminución de la función muscular, un mayor daño muscular e incluso la muerte de la célula muscular.

Por otro lado, en contra de esta hipótesis Nissen y cols.,<sup>12</sup> en un estudio multicéntrico, mostraron que después de 6-8 semanas de una suplementación de 3 g/día de HMB se observaba un incremento del 5,8% en el colesterol total y del 7,3% en el colesterol de baja densidad (LDL) con respecto al valor basal. También, en un estudio realizado en personas mayores (5072 años) con hiperlipidemia (> 4,5 de relación coleste-

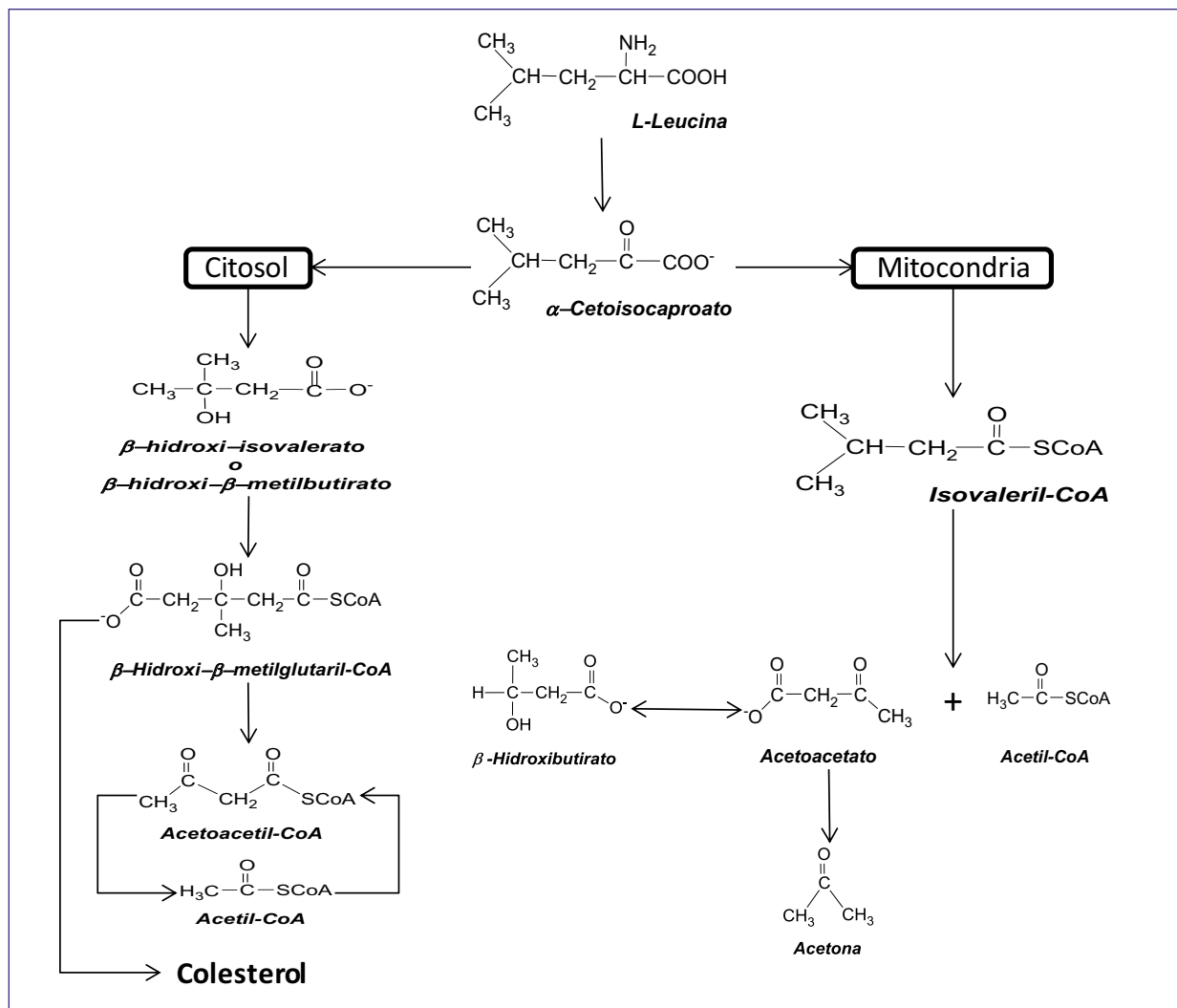


Fig. 1.—Ruta metabólica del HMB (Resumida). Adaptado de Sabourin y Bieber (1983) y Nissen y Abumrad (1997).

rol/HDL-c), que fueron suplementados con 3g /día de HMB y siguieron un programa de entrenamiento (3 días a la semana de ejercicio aeróbico y 2 días entrenamiento de resistencia) durante cuatro semanas, se observó una reducción en los valores de LDL de 172 a 123 mg/dL, mientras que los que sólo ingirieron un placebo no mostraron diferencias significativas. En ambos estudios los autores no ofrecen una explicación a dichos hallazgos. Wilson y cols<sup>7</sup> mencionan que la reducción en el LDL causada por el HMB puede estar relacionada con que este suplemento se comercializa como una sal de calcio, que contiene de 100200 mg de Ca por gramo de HMB, y, por tanto, se entiende que al suplementar 1 g de Ca disminuyen los niveles de colesterol en suero debido a un incremento en la síntesis de ácidos biliares.

### *Estimulación de la síntesis de proteínas*

Otro posible mecanismo de acción propuesto para los beneficios del HMB ha sido la estimulación de la síntesis de proteínas<sup>7-10</sup>. El ejercicio intenso de resistencia incrementa la producción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) en las células del músculo esquelético, como resultado de una sobrecarga mecánica<sup>13</sup>; este factor se libera localmente dentro de las células musculares e interactúa con un receptor, alejado del núcleo, que se encuentra en la superficie de la membrana de la misma célula muscular<sup>13</sup>. La unión del IGF-1 con su receptor inicia una cascada de eventos que llevan a un incremento en el tamaño de la célula muscular<sup>13</sup>. Al comienzo de esta cascada, la señalización se inicia a través de la proteína quinasa B (Akt) y una de las moléculas activadas es el mTOR<sup>13</sup>. El complejo mTOR parece representar una vía común donde convergen varias señales que regulan el recambio de proteínas del músculo<sup>14</sup>.

La proteína mTOR es una molécula grande con muchos dominios regulatorios y existe en dos complejos proteínicos: mTORC1 y mTORC2<sup>14,15</sup>. El complejo-1 del mTOR (mTORC1) está directamente involucrado en el control de la síntesis de proteínas y la hipertrofia<sup>14,15</sup>. Dentro de la mencionada cascada de reacciones, el mTORC1 puede inducir la síntesis de proteínas por medio de la fosforilación de la 4E-BP1 (proteína de unión 1 al factor eucarionte de inicio de la traducción E4) y de la S6K1 (quinasa 1 de la proteína ribosomal S6); esta última, activa la proteína ribosomal S6<sup>13-15</sup>. El mTORC1 también puede regular la biogénesis ribosomal y mitocondrial, suprimir la autofagia e inducir la captación de nutrientes y la síntesis de lípidos<sup>13-15</sup>.

Entre los mecanismos probables de acción de las vías de señalización involucradas en el control del músculo esquelético, la expresión del IGF-1 asociada a la ingesta de HMB ha mostrado una tendencia positiva en un estudio que utilizó cultivos celulares<sup>16</sup> y en otra investigación llevada a cabo en ratas<sup>17</sup>. Kornasio y cols.<sup>16</sup> observaron un aumento del IGF-1 en músculo

esquelético después del tratamiento con HMB en mioblastos de pollos y humanos. El HMB indujo una diferenciación específica de marcadores, incrementando los niveles de mRNA de IGF1, acelerando la fusión celular y disminuyendo la apoptosis. También, mejoró la asociación de la subunidad p85 del P13K con proteínas de tirosina fosforilada y elevó la fosforilación del Akt en los residuos Thr308 y Ser473. Los autores concluyen que estos resultados sugieren una influencia positiva del HMB en la prevención de la pérdida muscular, al menos en cultivos celulares. Gerlinger-Romero y cols.<sup>17</sup>, en un estudio realizado en ratas, observaron un incremento en los niveles del mRNA de la hormona del crecimiento (GH) en la hipófisis, así como en la expresión de dicha hormona después de un mes de suplementación con HMB (320 mg/Kg de peso). Además, estos autores pusieron de manifiesto un aumento en la expresión hepática del mRNA del IGF1 y un incremento en la concentración en suero del IGF1, concluyendo que la suplementación con HMB estimula la actividad del eje GH /IGF-1 en ratas, bajo condiciones normales de nutrición y salud. Estas investigaciones muestran que el HMB está relacionado con la expresión del gen IGF-1 de manera positiva, inclinando la balanza del metabolismo hacia el anabolismo y probablemente influyendo en la interacción entre los mioblastos y los marcadores de diferenciación celular, como factor secundario de regulación miogénica.

Smith y cols.<sup>18</sup>, en un estudio realizado en 2005 en ratones acerca del efecto de la suplementación de HMB sobre la pérdida muscular inducida por cáncer, sugieren una relación entre HMB y mTOR. En dicho estudio, se señala que la suplementación de HMB no sólo atenúa la degradación de proteína, sino que también incrementa su síntesis, mostrando un incremento entre 14 y 32 veces respecto a controles en la relación síntesis/degradación de proteína en el músculo gastrocnemio de ratones portadores del tumor MAC16 para las dosis de 0,25 y 2,5 g de HMB/kg de peso, respectivamente. Los autores sugieren que, aunque el mecanismo de acción de la estimulación de la síntesis de proteína por parte del HMB es desconocido, podría ser similar al del aminoácido ramificado leucina, el cual, se había relacionado previamente con la cascada de reacciones de la vía mTOR para síntesis de proteínas<sup>19</sup>.

Posteriormente, Eley y cols.<sup>20</sup>, publican en 2007 un estudio realizado *in vivo* en ratones portadores del tumor MAC16 e *in vitro* en miotubos de murinos expuestos a un factor inductor de proteólisis (PIF), en el que examinan los mecanismos del efecto estimulador del HMB sobre la síntesis de proteína. En dicha investigación, se demostró que el HMB a concentraciones de 25 y 50  $\mu$ M atenúa de forma efectiva el efecto inhibitorio del PIF en la síntesis de proteínas, que era del 50% después de cuatro horas de haber sido adicionado a los miotubos. El HMB también incrementaba la síntesis de proteínas en los miotubos, a concentraciones de 50  $\mu$ M, un efecto que se inhibía significativamente al agregar rapamicina (inhibidor del mTOR) a una

concentración de 27 nM. Esta situación, según los autores, sugiere que el HMB puede estimular la síntesis de proteínas a través de la vía mTOR/S6K1; además, se observó un resultado similar *in vivo* en el músculo sóleo de ratones portadores del tumor MAC16, en el cual el HMB causó un incremento en la síntesis de proteína que era inhibido por la rapamicina. Se concluye que el HMB atenúa la inhibición inducida por el PIF en la síntesis de proteína a través de múltiples mecanismos que incluyen un incremento en la expresión de la vía mTOR/S6K1, resultando en un incremento de la fosforilación del 4E-BP1 y del complejo activo eIF4G-eIF4E<sup>20</sup>.

Aversa y cols.<sup>21</sup> muestran en 2011 que la administración de HMB atenúa las pérdidas de músculo y de peso corporal observadas en un modelo experimental *in vivo* de caquexia inducida por cáncer (inoculación de células provenientes de ascitis producida por hepatoma Yoshida AH-130) realizado en ratas Wistar. En dicho estudio se dividió a las ratas en dos grupos, un grupo ingirió una dieta estándar y el otro una dieta industrialmente preparada y enriquecida con un 4% de HMB, ambos durante 16 días. Posteriormente, de cada grupo de ratas se seleccionaron dos subgrupos para inocularles las células cancerosas (dieta estándar y dieta enriquecida con HMB) y las ratas fueron sacrificadas ocho días después de la inoculación. Los resultados mostraron que el crecimiento del hepatoma indujo una pérdida significativa de peso corporal en canal (-3 g) del músculo gastrocnemio (0,54% del peso corporal inicial); además, la administración de HMB al grupo que se le inocularon las células cancerosas atenuó significativamente la pérdida de músculo gastrocnemio (0,57 g) y revirtió la pérdida de peso corporal, incrementándolo (14 g) significativamente con respecto al grupo que no consumía HMB y que portaba el tumor. Por otra parte, la administración de HMB aumentó marcadamente las proteínas fosforiladas S6K1 y mTOR, mostrando un mayor aumento en las ratas que portaban el tumor con respecto a los controles. Por tanto, los autores concluyen que el aumento de la fosforilación de dichas moléculas sugiere que los efectos inducidos por la administración de HMB sobre el peso corporal y del músculo gastrocnemio pueden estar siendo mediados por una mejora del anabolismo de las proteínas en el músculo. En este mismo año, Pimentel y cols.<sup>22</sup>, publican un estudio que evalúa los efectos de la suplementación con HMB sobre la hipertrofia del músculo esquelético y de las proteínas involucradas en la señalización de la insulina en ratas sedentarias. En este estudio, se utilizaron ratas Wistar macho a las cuales se les administró, por vía intragástrica, una solución de HMB (320 mg/kg de peso corporal diluidos en 1 mL de agua) o bien sólo agua, dejándoles agua y alimento *ad libitum* y someténdolas a un ciclo luz-oscuridad de 12 hrs, en un entorno controlado durante un mes. Los investigadores registraron un aumento significativo tanto en el peso del músculo extensor largo de los dedos como en el músculo sóleo de las ratas

que recibieron el HMB comparado con las que sólo ingirieron agua. Además, al analizar los indicadores de síntesis de proteína en el músculo extensor largo de los dedos, se observó un incremento del 429% en la expresión de mTOR, en las ratas que recibieron el HMB; también se puso de manifiesto que el HMB provocaba un aumento del 470% en la fosforilación de la proteína S6K1. Por otra parte, el tratamiento con HMB causó una elevación del 245% en la insulina y una disminución de glucosa (6%) y de corticosterona (~49%). Finalmente, se elevó en un 65% la relación testosterona/corticosterona en el grupo que ingirió el HMB y se produjo un incremento del 272% en la expresión del receptor de insulina en hígado. Por lo anterior, los autores concluyeron que la administración de HMB causa hipertrofia del músculo esquelético a través del incremento en la expresión del mTOR y por una disminución de las concentraciones de corticosterona en suero, lo que puede explicar los cambios encontrados en la insulina y en la glucosa.

Wilkinson y cols.<sup>23</sup> estudian en 2013 en humanos el efecto de la ingesta de HMB sobre el recambio de proteína muscular y lo comparan con el efecto de la leucina. Con este objetivo, en dos universidades distintas, se llevó a cabo un estudio en paralelo donde dos grupos de hombres jóvenes, físicamente activos, consumieron 3,42 g de una solución saborizada y taponada que contenía 2,42 g de HMB por dosis o bien una solución que contenía 3,42 g de leucina. En el grupo que bebió la solución con HMB se determinó la degradación y la síntesis de proteína muscular mientras que en el grupo que bebió la solución de leucina sólo se determinó la síntesis. Se pidió a los voluntarios que se abstuvieran de realizar ejercicio durante las 72 horas anteriores al estudio y que ayunarán durante la noche anterior bebiendo sólo agua. Dependiendo del tipo de intervención, se les colocó una cánula en la vena antecubital del brazo (HMB y leucina) y una cánula en la vena femoral de la pierna (sólo HMB); posteriormente, se tomaron muestras de sangre (para determinar concentración en plasma de leucina, HMB y aminoácidos esenciales) y una biopsia del músculo vasto lateral del cuádriceps (para determinar el efecto de leucina y del HMB en la señalización del mTORC1) y se procedió a administrarles una infusión continua que utilizaba leucina [1,2-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>] y fenilalanina [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>] como trazadores en su incorporación a las miofibrillas (síntesis de proteína muscular) o dilución arteriovenosa (proteólisis muscular). Durante un período de 2,5 horas se continuaron retirando muestras de sangre y se recogió una biopsia más. Después, los sujetos recibieron el tratamiento (HMB o leucina), se volvieron a recoger muestras de sangre y se realizaron biopsias musculares. Durante la ingesta de HMB y como era de esperar, las concentraciones en plasma aumentaron desde los niveles basales (5,1 μM) a 408 μM de HMB, a los 30 minutos después de su consumo y estos valores se mantuvieron elevados hasta el final del estudio (257 μM, a las 2,5 horas de haber ingerido el HMB). Sin embargo, las concen-

traciones de leucina en plasma se mantuvieron inalteradas durante esta fase del estudio. Por el contrario, con la ingestión de leucina, la concentración de HMB en plasma se mantuvo inalterada hasta las 2,5 horas, en que se incrementó algo con respecto al nivel basal (3,2 a 10,3  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, las concentraciones de leucina en plasma se elevaron desde el nivel basal (142  $\mu\text{M}$ ) a la media hora (495  $\mu\text{M}$ ) y se mantuvieron elevadas hasta la primera hora (375  $\mu\text{M}$ ), regresando desde ese punto a niveles que no se diferenciaban de los basales. Finalmente, la concentración de insulina en plasma permaneció inalterada con la ingesta de HMB (5,9 mU/L), mientras que después de la ingesta de leucina la insulina se elevó de 6 a 10 mU/L después de la primera media hora, retornando posteriormente a los niveles basales. Con respecto a la síntesis de proteína muscular, los efectos del HMB y de la leucina no difirieron estadísticamente, aunque el HMB la incrementó en un 70% y la leucina en un 110%; además, el consumo de HMB redujo significativamente la proteólisis muscular en la pierna, en un ~57%. La fosforilación de la S6K1 aumentó de manera similar en el HMB (~56%) y en la leucina (~45%) después de 30 minutos; sin embargo, después de 90 minutos sólo la ingesta de leucina se mantuvo elevada (~71%) la fosforilación de la S6K1. Tras 30 minutos de haber ingerido el HMB o la leucina, los investigadores encontraron un modesto incremento en la fosforilación de la 4EBP1 (~27% y ~18%, respectivamente), que se mantenía sólo para la leucina después de 90 minutos (~19%). La fosforilación del Akt no se alteró después de la ingesta de HMB; pero después del consumo de leucina se elevó en ~36% a los 30 minutos. Se concluyó que tanto la leucina como el HMB incrementan la señalización anabólica vía mTOR y que el consumo de HMB también atenúa la proteólisis muscular de una forma independiente a la insulina. Por tanto, la suplementación con HMB induciría anabolismo muscular agudo (incrementando la síntesis de proteína muscular y disminuyendo la proteólisis) por una vía distinta y/o un mecanismo adicional independiente a la leucina.

En conclusión, los estudios citados muestran que la suplementación con HMB tiene un efecto directo sobre la vía anabólica del mTOR; sin embargo, no es el único mecanismo que explica los efectos del HMB y posiblemente estos efectos no estén mediados principalmente por rutas anabólicas si no por una disminución en la proteólisis del músculo esquelético como veremos más adelante.

#### *Disminución de la proteólisis del músculo esquelético*

Los seres vivos regulan la expresión de sus genes desde los niveles del mRNA hasta la modificación y vida media de las proteínas<sup>24</sup>. La eliminación selectiva de proteínas es uno de los mecanismos más empleados en el control de procesos celulares, permitiendo limitar la actividad de estas moléculas a momentos específi-

cos de la vida celular; aún, cuando las proteínas están sujetas a un recambio constante, la vida media de cada una es diferente<sup>24</sup>. Normalmente existen dos caminos para la destrucción selectiva de proteínas celulares: la vía vesicular mediada por los lisosomas y la vía citosólica mediada por el sistema ubiquitinaproteasoma (UPS); sin embargo, se ha descubierto que éste último tiene otras funciones además de la degradación y que el fenómeno en su conjunto es más complejo<sup>25-27</sup>.

Entre otras funciones, el UPS participa en la regulación de vías de señalización intercelular; las cuales están involucradas en funciones tan diversas como el control de la apoptosis, la autofagia, el ciclo celular, la regulación transcripcional y la reparación del ADN<sup>25,27</sup>. La degradación de proteínas mediada por el UPS consta de dos pasos principales: la ubiquitinación que consiste en el marcado de una molécula de proteína diana con ubiquitina y la fragmentación de la proteína ubiquitinada por el proteasoma para que los aminoácidos obtenidos sean reutilizados por la célula<sup>28</sup>. La ubiquitinación es una forma importante y común de modificación posttraduccional; se puede definir como una cascada de reacciones catalizada por la enzima activadora de ubiquitina (E1), la conjugación de la enzima de ubiquitina (E2), la ligasa de ubiquitina (E3) y, a veces, un factor de elongación de la cadena de ubiquitina (E4)<sup>28</sup>. La ubiquitinación es el primer paso de la principal ruta del catabolismo proteico; el UPS es un proceso dependiente del ATP con el que la célula destruye proteínas, dañadas o que no necesita, etiquetándolas con la proteína ubiquitina, para que posteriormente el proteasoma las identifique y destruya<sup>24,25</sup>. Este sistema proteolítico ha sido vinculado al HMB a través de la interacción entre el IGF-1 y una ligasa E3 del sistema UPS, con la inhibición de la expresión de esta ruta de catabolismo proteico<sup>9</sup>, favoreciendo procesos opuestos como la síntesis proteica, y la activación y proliferación de células satélites<sup>8</sup>.

La proteólisis del músculo esquelético a través del UPS se incrementa en estados catabólicos como el ayuno, la inmovilización, el envejecimiento, la enfermedad y el ejercicio<sup>10</sup>. Por lo tanto, la inhibición de este sistema proteolítico podría explicar la atenuación de la pérdida de proteínas del músculo. Se ha demostrado que el HMB disminuye la degradación de las proteínas del músculo esquelético tanto *in vitro* como *in vivo*. En 2004, Smith y cols.<sup>29</sup>, por medio de un estudio *in vitro* investigaron el mecanismo de acción del HMB utilizando un factor tumoral de inducción de proteólisis en miotubos de murinos, como modelo del músculo esquelético. Sus resultados sugieren que el HMB atenúa la inducción de la proteólisis, incrementando la expresión genética del UPS y reduciendo así la degradación de proteínas. En 2005, en un estudio realizado en ratones,<sup>18</sup> se puso de manifiesto que la actividad del proteasoma se inhibía por acción del HMB, así como también la expresión de la enzima E2 del UPS; todo lo anterior se traducía en una reducción de la degradación proteica en el músculo gastrocnemio

de los ratones y un estímulo significativo en la síntesis de proteína muscular, que causó un aumento en el peso del músculo sóleo. También se ha demostrado que el HMB disminuye la expresión y la actividad del proteasoma durante estados catabólicos, atenuando así la degradación de proteínas del músculo esquelético a través del sistema UPS en ratas sanas<sup>30</sup> y sépticas<sup>31</sup>. En el estudio ya mencionado anteriormente de Wilkinson y cols.<sup>23</sup> se puso también de manifiesto que en humanos existe una inhibición del UPS bajo la ingestión de HMB. Por tanto, los estudios anteriores parecen sugerir que la inhibición de la vía del UPS puede contribuir a explicar los efectos de la suplementación del HMB.

Otro proceso inhibido por el HMB es la apoptosis mediada por las caspasas, moléculas que inducen la destrucción de células y son comúnmente reguladas en estados catabólicos. En 2008, Eley y cols.<sup>32</sup> realizaron un estudio para conocer el efecto del HMB sobre la inducción de la degradación total de proteínas mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), el interferón-gamma (IFN $\gamma$ ) y la angiotensina II en miotubos de murinos. En comparación con el control, el HMB atenuó la formación de especies reactivas de oxígeno y aumentó la actividad de las caspasas 3 y 8, además de inhibir la degradación de proteínas por medio del TNF- $\alpha$ , el IFN $\gamma$  y la angiotensina II.

### **Relación del HMB con el OHB como probable explicación a la disminución de la proteólisis en el músculo esquelético**

Como se mencionó en la primer parte de esta revisión, en ningún estudio sobre metabolismo del HMB se hace patente su relación con el beta-hidroxibutirato (OHB), aunque al final de la ruta metabólica propuesta por Nissen y Abumrad<sup>11</sup> la transformación final del HMB en el citosol y en la mitocondria daría como origen el acetoacetato y la acetil-coenzima A (Fig. 1). La transformación de acetoacetato a OHB, mediada por la beta-hidroxibutirato dehidrogenasa, es bien conocida<sup>33,34</sup>, y, por ello, cabría esperar que el HMB pueda funcionar como un precursor del OHB.

Otro punto a destacar es que ningún estudio menciona haber evaluado la concentración de cuerpos cetónicos después de haber suplementado con HMB, lo que puede deberse a dos principales razones: que existen diferentes métodos para evaluar acetoacetato y OHB y que sólo el OHB presenta la posibilidad de disminuir la proteólisis muscular. Laffel<sup>33</sup> hace hincapié, en una revisión publicada en 1999 sobre los cuerpos cetónicos, en que la mayor parte de pruebas comerciales de cuerpos cetónicos (en sangre y orina) se basan en medir la reacción del acetoacetato con nitroprusiato (nitroferricianuro) en presencia de un álcali y que sólo algunos de ellos, al adicionar glicina, pueden medir a la acetona aunque en un menor grado, existiendo a la fecha de dicha revisión sólo dos métodos comerciales para determinar OHB. Además, se conoce desde

años atrás<sup>35</sup> que tanto el acetoacetato como el OHB tienen efectos distintos sobre la síntesis de proteínas en el músculo esquelético y que, probablemente, el OHB inhibe la degradación de la proteína muscular<sup>34,35</sup> mientras que el acetoacetato la favorece<sup>33,35</sup>.

Además, con respecto a los posibles mecanismos celulares y moleculares de acción del HMB, como se explicó anteriormente, no parece haber un sustento sólido para asociar el consumo de HMB a la síntesis de colesterol en el músculo esquelético. Sin embargo, tanto para el mecanismo de la vía mTOR como para el sistema UPS parece haber suficiente evidencia, tanto en estudios realizados con animales como en humanos, que muestra que la suplementación con HMB activa el anabolismo en el músculo esquelético a través de dichos mecanismos. Sin embargo, la vía más prometedora sería la disminución de la proteólisis muscular a partir del UPS, aunque el mecanismo no ha sido aún descrito.

El HMB podría estar relacionado con un aumento en la concentración de cuerpos cetónicos y este hecho asociarse con una disminución en la proteólisis muscular debido a que, se conoce que en períodos de ayuno prolongado o bien en ejercicios de baja intensidad pero de duración prolongada, los cuerpos cetónicos juegan un papel fundamental en la obtención de energía. En estas circunstancias, los cuerpos cetónicos actúan como una fuente de energía para el cerebro haciéndolo menos dependiente de la glucosa, lo que disminuiría el uso de aminoácidos ramificados para la obtención de glucosa por medio de la gluconeogénesis en el hígado<sup>35-37</sup>. El papel del OHB en la disminución de la proteólisis muscular es bien conocida<sup>33,35</sup> e incluso ha sido relacionado como un intermediario metabólico de los beneficios de la restricción calórica y del ayuno<sup>34</sup>. Sin embargo, para que estos beneficios se lleven a cabo los sujetos deben de estar suficientemente estresados para que los cuerpos cetónicos tengan un efecto inhibitorio de la degradación de proteína<sup>35</sup>. Lo anterior sería similar a las condiciones utilizadas para el estudio de Wilkinson y cols.<sup>23</sup> que se ha mencionado con anterioridad.

Los niveles normales de cuerpos cetónicos en sangre suelen ser muy bajos (en el orden de micro moles) pero la mayoría de los investigadores<sup>33,34</sup> toman como valor de referencia el rango < 0,5 mM. Sin embargo, después de 12 a 16 horas de ayuno suelen elevarse, llegando a 1-2 mM después de dos días de ayuno y aumentando hasta 6-8 mM con una inanición prolongada (4 semanas). Después de 90 minutos de ejercicio intenso se muestran niveles similares a los del ayuno (1-2 mM) y estos mismos niveles (< 2 mM) se obtienen con una ingesta muy baja de hidratos de carbono y elevada en lípidos (dieta cetogénica)<sup>33,34</sup>. A esta elevación de los cuerpos cetónicos en sangre se le denomina cetosis, la cual puede ser dividida en hipercetonemia y cetoacidosis<sup>33</sup>. Tradicionalmente la cetoacidosis (> 3 mM) ha sido más conocida por estar vinculada a estados patológicos como la diabetes (principalmen-

te), deficiencia de cortisol, deficiencia de hormona del crecimiento, ingestión tóxica de etanol o salicilatos y ciertos errores de nacimiento en el metabolismo<sup>33</sup>. Sin embargo, la hipercetonemia ( $1 < x < 3$  mM o cetosis moderada) y la hipercetonemia moderada (1-2 mM) se han relacionado con efectos inhibitorio de la proteólisis muscular en el ayuno, el ejercicio y regímenes que siguen una dieta cetogénica<sup>34,35</sup>. Además, la hipercetonemia moderada ha demostrado ser una ayuda eficaz en el tratamiento de enfermedades como la epilepsia, el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson<sup>37</sup>. Finalmente, en los últimos años, se ha sugerido que los cuerpos cetónicos (principalmente el OHB) pueden actuar como una vía de señalización que disminuye la autofagia<sup>34</sup>, el proceso catabólico responsable de la degradación de agregados de proteína y de los organelos dañados a través del sistema autofagosoma-lisosoma. La correcta regulación de la autofagia es fundamental para el organismo principalmente bajo condiciones fisiológicas de estrés metabólico como la actividad física y los estados de deficiencia de nutrientes<sup>38</sup>. El papel del OHB en la regulación de la autofagia se realizaría por medio de una señalización a través de receptores extracelulares y de su actuación como un inhibidor endógeno de las enzimas histona-diacetiladas, lo que provocaría un efecto sobre la insulina, el IGF, el FOXO3, el metabolismo de los ácidos grasos, el AMPK y el mTOR, teniendo como resultado final la regulación de la autofagia y, a su vez, la disminución de la proteólisis muscular<sup>34</sup>.

## Conclusiones

Los objetivos de la segunda parte de esta revisión se centraron en identificar los posibles mecanismos celulares y moleculares de acción del HMB en relación a su posible utilización como suplemento nutricional. La hipótesis de que el HMB estimula la síntesis de colesterol debe ser descartada, pues no se ha podido confirmar en estudios posteriores a su propuesta. Sin embargo, es muy probable que el HMB tenga un efecto positivo en el metabolismo muscular, a través de la vía mTOR y del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Aunque no se conoce el mecanismo responsable de dichos efectos, el HMB podría incrementar los niveles sanguíneos de beta-hidroxibutirato y su elevación explicar los efectos principales del HMB sobre la disminución de la proteólisis muscular, abriendo una interesante línea de investigación para futuros estudios.

## Referencias

1. Molinero O, Marquez S. Use of nutritional supplements in sports: risks, knowledge, and behavioural-related factors. *Nutr Hosp* 2009; 2: 128-134.
2. Sanchez Oliver A, Miranda Leon MT, Guerra-Hernandez E. Prevalence of protein supplement use at gyms. *Nutr Hosp* 2011; 26: 1168-1174.

3. 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: 651-659.
4. Howatson G, van Someren KA. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 2008; 38: 483-503.
5. Bishop D. Dietary supplements and team-sport performance. *Sports Med* 2010; 40: 995-1017.
6. Nissen S, Sharp R, Ray M, Rathmacher JA, Rice D, Fuller JC, Jr, et al. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol* 1996;81: 2095-2104.
7. 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* 2008; 5: 1.
8. Zanchi NE, Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, de Sigueira Filho MA, Felitti V, Lira FS, et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. *Amino Acids* 2011; 40: 1015-1025.
9. Fitschen PJ, Wilson GJ, Wilson JM, Wilund KR. Efficacy of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation in elderly and clinical populations. *Nutrition* 2013; 29: 29-36.
10. Wilson JM, Fitschen PJ, Campbell B, Wilson GJ, Zanchi N, Taylor L, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). *J Int Soc Sports Nutr* 2013; 10: 6.
11. Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite beta-hydroxy beta-methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem* 1997; 8: 300-311.
12. Nissen SL. Beta-Hydroxy-Beta-Methylbutyrate. En: Driskell AJ, ed. *Sports nutrition: fats and proteins*. Boca Raton: CRC Press; 2007: 221-241
13. Booth FW, Neuffer PD. Molecular Mechanisms of Adaptations to Training. En: Maughan RJ, ed. *Olympic textbook of science in sport*. Chichester: Wiley-Blackwell; 2009: 202-206.
14. Panzhinskiy E, Culver B, Ren J, Bagchi D, Nair S. Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in muscle growth. In: Bagchi D, Nair S, Sen CK, eds. *Nutrition and enhanced sports performance: muscle building, endurance, and strength*. San Diego: Academic Press Elsevier; 2013: 217-223.
15. Rasmussen BB, Volpi E. Muscle biology and mTORC1 Signaling in aging. En: Cruz-Jentoft AJ, Morley JE, eds. *Sarcopenia*. Chichester: Wiley-Blackwell; 2012: 22-24.
16. Kornasio R, Riederer I, Butler-Browne G, Mouly V, Uni Z, Havelly 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: 755-763.
17. Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, Giannocco G, Nunes MT. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMBeta) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. *Growth Horm IGF Res* 2011; 21: 57-62.
18. 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: 277-283.
19. Yoshizawa F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 417-422.
20. 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: E923-931.
21. 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: 713-720.
22. Pimentel GD, Rosa JC, Lira FS, Zanchi NE, Ropelle ER, Oyama LM, et al. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMBeta) supplementation stimulates skeletal muscle hypertrophy in rats via the mTOR pathway. *Nutr Metab* 2011; 8: 1.



23. Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, Phillips BE, Crossland H, Williams J, et al. Effects of leucine and its metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol* 2013; 591: 2911-2923.
24. Hernández-Fernández RA. La vía ubiquitina-proteasoma ¿destruir o construir? ese es el dilema. *Rev Haban Cienc Med* 2013; 12: 22-34.
25. Zamudio-Arroyo JM, Peña-Rangel MT, Riesgo-Escovar JR. La Ubiquitinación: Un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP Rev Esp Cienc Químico-Biol* 2012; 15: 133-141.
26. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 2121-2129.
27. Wang Y, Qin ZH. Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 585-594.
28. Wang X, Pattison JS, Su H. Post-translational modification and quality control. *Circ Res* 2013; 112: 367-381.
29. Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer Res* 2004; 64: 8731-8735.
30. 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: 255-259.
31. 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: 311-319.
32. 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: E1417-1426.
33. Laffel L. Ketone bodies: A review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15: 412-426.
34. Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25: 42-52.
35. Thompson JR, Wu G. The effect of ketone bodies on nitrogen metabolism in skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B* 1991; 100: 209-216.
36. Coffman DD, Cramer R, Mochel WE. Syntheses by free-radical reactions. V. A New Synthesis of Carboxylic Acids. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2882-2887.
37. Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF, Jr. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life* 2001; 51: 241-247.
38. Vainshtein A, Grumati P, Sandri M, Bonaldo P. Skeletal muscle, autophagy, and physical activity: the menage a trois of metabolic regulation in health and disease. *J Mol Med* 2014; 92: 127-137.