

Revisión

El β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) como suplemento nutricional (I): metabolismo y toxicidad

Rafael Manjarrez-Montes-de-Oca^{1,2}, Mateo Torres-Vaca³, Javier González-Gallego² e Ildefonso Alvear-Ordenes²

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

Resumen

Introducción: El β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) es un metabolito de la leucina producido a partir del ácido α -cetoisocaproico. El HMB se utiliza como suplemento nutricional en el deporte desde 1997, atribuyéndosele una disminución de la proteólisis muscular. En los últimos años, se han descrito efectos positivos del HMB en diversas patologías, lo cual aumenta su probable utilidad para la mejora de la salud.

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 abordan el metabolismo y la posible toxicidad del HMB.

Resultados: Diversos estudios relacionan al HMB con el metabolismo del colesterol en el músculo esquelético, probablemente reduciendo la proteólisis, a través del 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A, que se transforma a mevalonato, actuando como precursor en la síntesis de colesterol. Sin embargo, el HMB podría transformarse en beta-hidroxi-butyrate a través del metabolismo del acetoacetato, por medio de la beta-hidroxibutyrate dehidrogenasa. Por otra parte, la forma química más habitual en los suplementos nutricionales es la sal de calcio de HMB y la dosis más utilizada, de 3 g de HMB/día. Los estudios realizados en humanos y en animales muestran que no existen efectos adversos por el consumo de HMB.

Conclusiones: Los efectos metabólicos y la ausencia de toxicidad del HMB lo hacen adecuado para su uso como suplemento nutricional.

(Nutr Hosp. 2015;31:590-596)

DOI:10.3305/nh.2015.31.2.8432

Palabras clave: *Metabolismo. Toxicidad. Leucina. Colesterol. Cuerpos cetónicos.*

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.

β -HYDROXY- β -METHYLBUTYRATE AS A DIETARY SUPPLEMENT (I): METABOLISM AND TOXICITY

Abstract

Introduction: β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) is a leucine metabolite produced from α -ketoisocaproic acid. HMB supplementation has been used as a dietary supplement in sports since 1997, with the aim of decreasing muscle proteolysis. In recent years, positive effects have been reported in different pathologies, which suggests potential health benefits.

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 the results about both HMB metabolism and possible toxicity.

Results: Studies show that HMB is related to cholesterol metabolism in skeletal muscle, which could reduce proteolysis, through hydroxy-methyl-glutaryl-coenzyme A and mevalonate as a precursor in the synthesis of cholesterol. However, HMB could also be transformed from acetoacetate to beta-hydroxybutyrate by beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. The calcium salt of HMB is the most used chemical form in dietary supplements, being the most common dose 3 g of HMB/day. Studies in humans and animals provide evidence that there are no adverse effects associated with HMB supplementation.

Conclusion: Metabolic effects and lack of toxicity of HMB make it an adequate compound to be used as a dietary supplement.

(Nutr Hosp. 2015;31:590-596)

DOI:10.3305/nh.2015.31.2.8432

Key words: *Metabolism. Toxicity. Leucine. Cholesterol. Ketone Bodies.*

Abreviaturas

ALT: Alanina aminotransaminasa.
AST: Aspartato aminotransferasa.
CaOH: Hidróxido de calcio.
CIC: Ácido α -cetoisocaproico.
CoA: Coenzima A.
GGT: γ -glutamiltanspeptidasa.
HMB: β -hidroxi- β -metilbutirato.
HMG-CoA: β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA.
IV-CoA: Isovaleril Coenzima A.
LDH: Lactato Deshidrogenasa.
LEU: Leucina.
MC-CoA: β -metil-crotonil-CoA.
MGCoA: β -metil-gluconil-CoA.
Na-HMB: β -hidroxi- β -metilbutirato de sodio.
NaOH: Hidróxido de sodio.
OHB: β -hidroxibutirato.
UIPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Introducción

Los avances en la comprensión del metabolismo humano y la fisiología del ejercicio han demostrado que la manipulación de la ingesta de nutrientes tiene una influencia positiva en el rendimiento deportivo¹. Debido a lo anterior, el uso de suplementos nutricionales en los atletas (profesionales y principiantes) y personas que acuden asiduamente a los gimnasios se ha transformado en una práctica popular, cotidiana y aceptada¹⁻³. El uso agresivo de la mercadotecnia ha llevado a millones de deportistas a utilizar los suplementos nutricionales con la esperanza de incrementar su rendimiento; sin embargo las mejoras prometidas en el rendimiento deportivo por el uso de muchos de estos suplementos tienen frecuentemente poco o nulo respaldo científico; incluso en algunos casos su consumo puede representar un riesgo para la salud^{1,2}. En consecuencia, es necesario una mayor investigación y análisis del uso de los suplementos nutricionales en el ámbito deportivo y de la salud. En la nutrición deportiva, los suplementos nutricionales vinculados al desarrollo y crecimiento muscular (proteínas, aminoácidos y derivados) tienen una gran relevancia debido a que son los que presentan una mayor demanda y consumo entre los deportistas^{2,3}. En un meta-análisis realizado por Nissen y Sharp³, en el que se incluyeron cerca de 250 tipos de suplementos vinculados al desarrollo y crecimiento muscular, únicamente seis de estos suplementos (creatina, β hidroxi β -metilbutirato [HMB], cromo, dehidroepiandrosterona, androstenediona y proteína en polvo) presentaban dos o más artículos científicos en los que se describieran efectos positivos sobre el desarrollo y crecimiento muscular. De dichos suplementos, únicamente la creatina y el HMB mostraron aumentos significativos en masa muscular y fuerza de los sujetos después de un periodo de entrenamiento de resistencia³.

En los últimos años, el HMB ha cobrado importancia como suplemento nutricional debido a que se le atribuyen efectos sobre la disminución del daño muscular⁴ y el incremento del tamaño del músculo⁵, lo cual hace a esta molécula relevante para su estudio en el ámbito de la nutrición clínica y deportiva. Por tanto, reviste interés el analizar la importancia del HMB como suplemento nutricional, por medio de una revisión de literatura sistematizada, que nos permita 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 primera parte se centrará en el metabolismo y la toxicidad del HMB.

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 siguieron 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, β -hydroxy- β -methylbutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, beta-hydroxy-isovalerate, β -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 que hacen referencia al metabolismo y al posible efecto tóxico del HMB.

Leucina y HMB

El β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB; también conocido como β -hidroxi-isovalerato) es un metabolito del aminoácido ramificado leucina (LEU), que se produce a partir del ácido α -cetoisocaproico (CIC)⁶. En estudios *in vitro* se ha observado que, tanto la LEU como el CIC, ayudan a disminuir la pérdida de nitrógeno,

por inhibición directa de la degradación de las proteínas⁷⁻⁹. Sin embargo, en investigaciones realizadas en animales y en humanos, en condiciones normales, estos compuestos no mostraron claramente tener un efecto anabólico, aunque en presencia de estrés o trauma severo (durante periodos de excesiva proteólisis) si se puso de manifiesto una acción anticatabólica. Esto último llevó a sugerir que, tanto la LEU como el CIC, serían solamente activos durante periodos de excesivo catabolismo o que se produciría un metabolito de los mismos en una etapa más avanzada dependiente del entorno metabólico⁶. Con base en lo anterior, estudios realizados con tejido de hígado de ratones¹⁰ y de humanos¹¹, demostraron que la oxidación del CIC por medio de la enzima ácido α -cetoisocaproato oxigenasa producía la formación de HMB. Posteriormente, Van Koevering y Nissen¹² observaron en una serie de ensayos *in vivo*, llevados a cabo en cerdos y corderos jóvenes, que el HMB derivaba del CIC. Además, por medio de moléculas marcadas con isotopos radiactivos, comprobaron que en los cerdos el 100% del HMB provenía del CIC. En posteriores estudios, Nissen y col.⁶ mostraron que 1,5 o 3 g de HMB al día pueden prevenir parcialmente la proteólisis muscular (disminución del 20% de la 3-metilhistidina excretada en orina) y/o daño muscular (disminución de un 20-60% de las enzimas lactato deshidrogenasa y creatina quinasa en plasma) inducidos por medio de entrenamiento de resistencia, generando mayores ganancias musculares. Esto justificó el interés sobre el estudio de HMB como un suplemento nutricional con un amplio potencial de uso.

Metabolismo del HMB

En 1997, Nissen y Abumrad¹³ presentan la probable ruta metabólica del HMB a partir del aminoácido LEU, que puede provenir de la dieta (fuente exógena) o bien de la proteólisis muscular (fuente endógena)¹³. En el citosol y la mitocondria de las células musculares, la LEU es transaminada a CIC (Fig. 1a). Sin embargo, la mayor parte del metabolismo del CIC se realiza en el hígado; aproximadamente el 90% del CIC es oxidado, de forma irreversible a isovaleril coenzima A (IV-CoA) en la mitocondria de las células hepáticas, por medio del complejo de la deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (Fig. 1b). Posteriormente, el IVCoA se deshidrogena enzimáticamente a β -metil-crotonil-CoA (MC-CoA) (Fig. 1c), el cual, en presencia de biotina, es carboxilado enzimáticamente y se transforma en β -metil-gluconil-CoA (MGCoA) (Fig. 1d). El MG-CoA se hidrata enzimáticamente para formar β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Fig. 1e). Finalmente, se produce una degradación del HMG-CoA a acetoacetato y acetyl-CoA (Fig. 1f)¹³⁻¹⁵.

Aproximadamente el 10% restante del CIC es oxidado a HMB, en presencia de oxígeno molecular y hierro¹⁶, por medio de la enzima CIC dioxigenasa, en

el citosol de las células hepáticas^{11,13,14} (Fig. 1g). En este punto, el HMB puede tener dos posibles destinos: a) su excreción a través de la orina o, b) su conversión a β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). En 1983, Sauborin y Bieber¹¹ proponen que la transformación del CIC a HMB, por medio de la enzima CIC dioxigenasa, podría prevenir la excesiva acumulación de CIC (el cual es potencialmente tóxico) y dado que el HMB es un metabolito de característica más polar, éste se excretaría en la orina (Fig. 1h).

El complejo HMB-CoA puede carboxilarse y formar directamente HMG-CoA (Fig. 1i); o bien, puede deshidratarse y generar MC-CoA (β -metil-crotonil-CoA), el cual a su vez se transforma en MG-CoA y, finalmente, en HMG-CoA^{13,14} (Fig. 1j). Éste puede degradarse de forma reversible a acetoacetyl-CoA y acetyl-CoA (Fig. 1k). En 1997, Nissen y Abumrad¹³ propusieron que el HMGCoA podría transformarse enzimáticamente a mevalonato por medio de la HMG-CoA reductasa y así actuar como precursor en la síntesis de colesterol (Fig. 1l). Sin embargo, esto último no ha sido comprobado y sólo tiene base en el argumento de que, en estudios *in vivo*, se ha demostrado que el carbono proveniente de la LEU se incorpora al colesterol¹⁷; pero se desconoce qué porcentaje de carbono proviene directamente del HMB¹³.

Finalmente, y como ya fue mencionado, el paso del MC-CoA a MGCoA está limitado a la presencia de biotina, por lo que cuando existe deficiencia de esta vitamina se produce un aumento en paralelo de los niveles de HMB y de la concentración de ácido metilcrotónico, resultante de la baja actividad de la enzima MC-CoA carboxilasa. Por ello, se ha sugerido que el ácido metilcrotónico pudiera ser hidratado por medio de la enol-CoA hidrasa y formar así HMB (Fig. 1m), ya que esta enzima se encuentra incluida dentro del metabolismo de la isoleucina. Sin embargo, también se ha propuesto que el aumento en HMB asociado al del ácido metilcrotónico puede deberse, simplemente, a la inhibición resultante de la modulación de varias enzimas durante la vía metabólica de retorno al CIC.

Un punto importante en el metabolismo del HMB es que en ningún estudio se ha hecho patente su relación con los cuerpos cetónicos (beta-hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) aunque se mencionó en el posible metabolismo del HMB, propuesto por Nissen y Abumrad¹³ (ver Fig. 1f y 1k), en el cual la transformación final en el citosol y en la mitocondria daría como origen el acetoacetato y la acetyl-coenzima A. La conversión de acetoacetato a beta-hidroxibutirato (OHB) es bien conocida y se encuentra regulada por la beta-hidroxibutirato dehidrogenasa (Fig. 1n)^{18,19}. Es por ello que, cabría esperar que el HMB funcionara como un precursor de los cuerpos cetónicos, incrementando así su concentración en sangre^{20,21}. Además, es interesante mencionar que la diferencia química entre el HMB y el OHB radica solamente en un grupo metilo por lo cual ambas moléculas compartirían una base estructural similar (Fig. 1n).

Absorción y excreción del HMB

Aunque no se conoce con exactitud la producción endógena del HMB en humanos, se ha estimado, a

partir de estudios realizados en cerdos, que un hombre de 70 kg puede producir de 0,2 a 0,4 g de HMB al día, dependiendo de la ingesta diaria de LEU¹⁴. Por otra parte, en un estudio²² realizado para conocer la

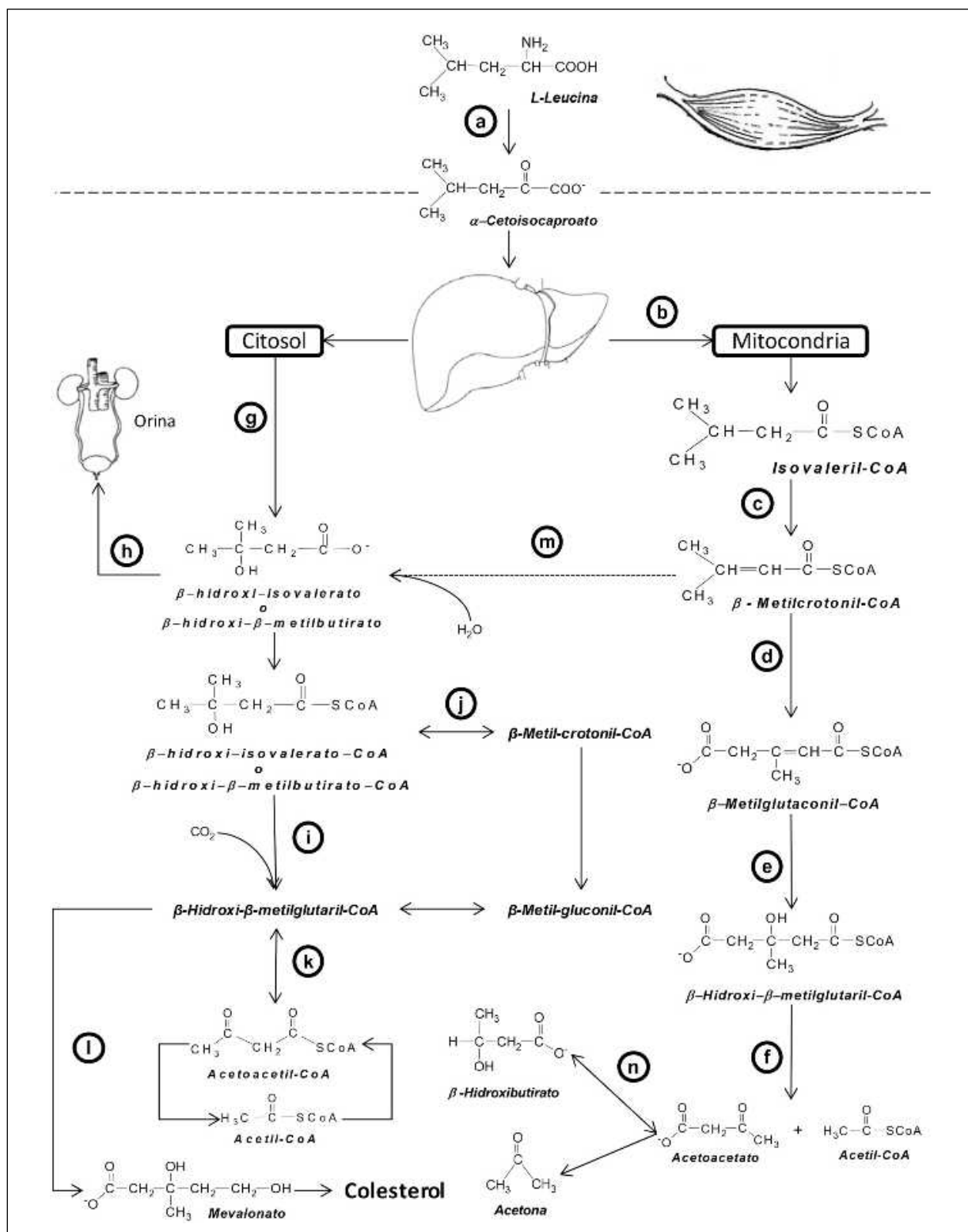


Fig. 1.—Ruta metabólica del HMB. Adaptado de Sabourin y Bieber (1983) y Nissen y Abumrad (1997).

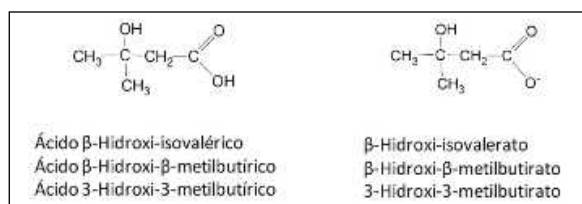


Fig. 2.—Representación de la forma ácida y la base conjugada del HMB.

cinética química a través de la suplementación de 1 g de HMB, se demostró que, tras la suplementación, los niveles basales de HMB en plasma (~2 nmol/L) alcanzaron un pico máximo de concentración de 115 nmol / L, después de dos horas de haber sido ingerido; finalmente, tras de 9 horas de la ingestión los niveles de HMB en plasma regresaron a los valores basales. En dicho estudio, los autores señalan además que el 14% de dicha dosis fue excretada en la orina. En la misma investigación, pero en un ensayo distinto, se observó que con una dosis de 3 g de HMB, el pico máximo de concentración en plasma era de ~480 nmol / L y que se alcanzaba después de una hora de haber ingerido la dosis; también mostraron resultados utilizando una mezcla de 3 g de HMB + 75 g de glucosa, pero en este caso el pico máximo de concentración fue ~350 nmol / L, alcanzándose, aproximadamente, a las dos horas de la ingestión. Tanto para la dosis de 3 g de HMB como para la que incluye la glucosa, la concentración de HMB, en plasma regresaba al valor basal después de 9 horas²². Estos resultados sugieren que el alto consumo de glucosa retarda la absorción del HMB, muy probablemente debido a su efecto sobre la velocidad del vaciamiento gástrico, como han sugerido diversos autores²².

Forma química y toxicidad del HMB como suplemento nutricional

Como hemos señalado, el HMB es la base conjugada del ácido β-hidroxi-β-metilbutírico (Fig. 2), también llamado ácido β-hidroxi-isovalérico²³, cuya nomenclatura UIPAC es ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico.

El HMB no tiene isómeros, por lo tanto no existe en las formas *levo* y *dextro*²³.

En laboratorio, el ácido β-hidroxi-β-metilbutírico puede sintetizarse a partir de la 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona²³ por oxidación alcalina de diacetona-alcohol con hipoclorito de sodio; dicha reacción se realiza siguiendo el procedimiento previamente descrito por Coffman, Cramer y Mochel²⁴. Una vez obtenido el ácido, este puede ser neutralizado con hidróxido sódico o hidróxido cálcico para formar una sal soluble en agua²⁵ (Fig. 3), aunque es posible la obtención de otras sales no tóxicas de metales alcalinos y de metales alcalino-terráneos²³. La sal de sodio del HMB (β-hidroxi-β-metilbutirato de sodio, Na-HMB) y la sal de calcio (β-hidroxi-β-metilbutirato de calcio, Ca-HMB) comienzan a ser solubles en agua, tanto en el estómago como en el intestino²³; sin embargo, se utiliza más el Ca-HMB. Dicha preferencia, meramente comercial, se debe a que el Na-HMB es más higroscópico que el Ca-HMB; por tanto, puede mantenerse más tiempo seco, sin formar grumos y con una consistencia de polvo finamente dividido, aumentando la estabilidad del producto^{26,27}.

Por otra parte, la seguridad del consumo del HMB ha sido comprobada en ratas por un estudio²⁸ en el que se evaluó la toxicidad de Ca-HMB siguiendo los protocolos estandarizados para evaluar la toxicidad de productos nutricionales. En dicho trabajo, Baxter y col.²⁸ sometieron a un grupo de 160 animales a un seguimiento durante 90 días; los animales se dividieron en cuatro grupos (cada uno de 40 ratas) dependiendo de su dieta: (a) control, (b) consumo bajo, (c) consumo medio y (d) consumo alto, los cuales corresponden respectivamente al 0, 1, 2 y 5% del total del alimento como Ca-HMB. Los autores no observaron efectos adversos para ninguna de las concentraciones de la dieta en observación clínica, peso corporal, consumo de alimento, química clínica y perfil hematológico; tampoco se observaron cambios en el peso absoluto o relativo de los órganos de los animales estudiados o en las observaciones micro y macroscópicas de los mismos. Además, se determinó que la dosis asociada a un consumo alto (5% del total de la dieta) sería equivalente a 3.493 mg / kg / día para los machos y de 4.163 mg / kg / día

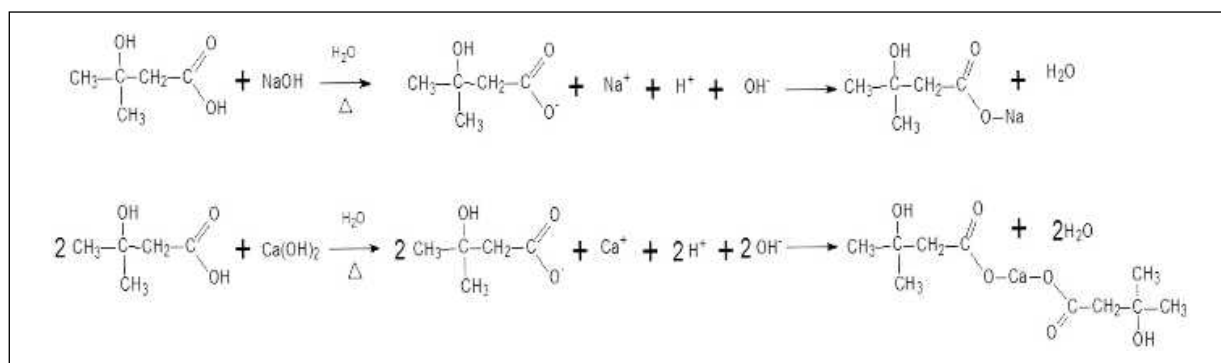


Fig. 3.—Formación de sales hidrosolubles de HMB con Na y Ca.

para las hembras. Asimismo y en una revisión previa, Wilson y col.²⁹ señalaron que utilizando animales no se han observado efectos adversos con la ingesta de HMB en un amplio rango de volumen suplementado (8 a 5.000 mg/kg/día) y variando considerablemente los períodos de suplementación (1 a 16 semanas). Además, al extrapolar estos datos a humanos, los mismos autores²⁹ indican que a la dosis máxima (5.000 mg/kg/día) equivaldría a un consumo diario de 450 g de HMB para un hombre de 90 kg de peso corporal. Lo que evidentemente sugiere que la suplementación con HMB no implica ningún riesgo para la salud.

Finalmente, en estudios realizados en humanos^{6,30-33}, tampoco se observan efectos adversos con posterioridad a la ingesta de HMB en los marcadores asociados a la función renal y hepática, ni en los índices hematológicos. Nissen y col.⁶, señalan que dosis de 1,5 y 3 g día de HMB durante 3 semanas no afectan la concentración en plasma de creatinina, electrolitos (Na, K, Cl, P), enzimas (GGT, ALT o AST), ni el recuento de células blancas y rojas. Asimismo, Kreider y col.³⁰ no encontraron cambios en LDH, ALT y AST con dosis de 3 y 6 g de HMB al día durante 4 semanas. Gallagher y col.³¹, al comparar los efectos de la suplementación de ~3 y ~6 g de HMB al día, durante 8 semanas, no observaron modificaciones en la concentración de enzimas en sangre (LDH, fosfatasa alcalina, ALT y AST), biometría hemática, glucosa, hemoglobina, urea y perfil lipídico (triglicéridos, HD, LDL, VLDL y colesterol total); tampoco detectaron cambios de concentración en orina (glucosa, proteínas y cetona). Por último, Nissen y col.³², analizaron los datos relacionados con la seguridad de la suplementación de HMB de nueve investigaciones en las que se utilizó una dosis de 3 g/día, durante 3 a 8 semanas, en distintas poblaciones (jóvenes y adultos, hombres y mujeres, entrenados y no entrenados). En dichos estudios no se detectaron cambios significativos en la concentración sanguínea de bilirrubinas, enzimas (fosfatasa alcalina, LDH, ALT, AST, GGT), hierro, glucosa, ácido úrico, urea, creatinina, electrolitos (Na, K, Cl, P), proteína, albúmina y globulina, ni tampoco en la biometría hemática de los sujetos. En consecuencia, los datos presentados sugieren que el HMB, a las dosis previamente publicadas (entre 3 y 6 g/día, hasta 8 semanas), no muestra peligrosidad para su consumo como suplemento nutricional.

Conclusiones

Los objetivos de la primera parte de esta revisión fueron conocer el metabolismo del HMB, así como su absorción y excreción, e identificar la toxicidad del HMB como suplemento nutricional.

Con respecto al metabolismo, investigaciones realizadas por distintos autores relacionan al HMB con la síntesis de colesterol en el músculo esquelético. El incremento de la concentración de colesterol en la

membrana celular la haría más flexible, lo cual reduciría la proteólisis. Sin embargo, no se ha tenido en cuenta que el HMB podría transformarse en el cuerpo cetónico beta-hidroxibutirato el cual está vinculado a la disminución de la proteólisis muscular en estados de estrés asociados al ayuno o al deporte.

Por otra parte, la forma química más utilizada en los suplementos nutricionales es la sal de calcio de HMB, a una dosis de 3 g de HMB/día. En lo que se refiere a la toxicidad del HMB no se ha descrito en ningún estudio realizado en humanos o en animales, la existencia de efectos adversos tras la ingesta de tres gramos al día de HMB, en su forma de sal de calcio. Además, trabajos realizados en ratas muestran que incluso dosis mayores no provocarían toxicidad²⁸.

En conclusión, las características metabólicas y de toxicidad del HMB lo hacen idóneo para su uso como suplemento nutricional, por tanto, en la segunda parte de esta revisión se presentarán los mecanismos de acción celulares y moleculares propuestos para el HMB.

Referencias

1. Molinero O, Marquez S. Use of nutritional supplements in sports: risks, knowledge, and behavioural-related factors. *Nutr Hosp* 2009; 24: 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. Sapir DG, Stewart PM, Walser M, Moreadith C, Moyer ED, Imbembo AL, et al. Effects of alpha-ketoisocaproate and of leucine on nitrogen metabolism in postoperative patients. *Lancet* 1983; 1: 1010-1014.
8. Bruzzone P, Siegel JH, Chiarla C, Wiles CE, 3rd, Placko R, Goodarzi S. Leucine dose response in the reduction of urea production from septic proteolysis and in the stimulation of acute-phase proteins. *Surgery* 1991; 109: 768-778.
9. Frexes-Steed M, Lacy DB, Collins J, Abumrad NN. Role of leucine and other amino acids in regulating protein metabolism in vivo. *Am J Physiol* 1992; 262: E925-935.
10. Sabourin PJ, Bieber LL. Purification and characterization of an alpha-ketoisocaproate oxygenase of rat liver. *J Biol Chem* 1982; 257: 7460-7467.
11. Sabourin PJ, Bieber LL. Formation of beta-hydroxyisovalerate by an alpha-ketoisocaproate oxygenase in human liver. *Metabolism* 1983; 32: 160-164.
12. Van Koeveering M, Nissen S. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *Am J Physiol* 1992; 262: E27-31.
13. Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem* 1997; 8: 300-311.
14. Nissen SL. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. En: Driskell AJ, ed. *Sports nutrition: fats and proteins* Boca Raton: CRC Press; 2007.

15. Pinheiro CHJ, Guimaraes-Ferreira L, Gerlinger-Romero F, Curi R. An overview on beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) Supplementation in skeletal muscle function and sports performance. En: Bagchi D, Nair S, Sen CK, eds. *Nutrition and enhanced sports performance: Muscle building, endurance, and strength* San Diego: Academic Press Elsevier; 2013: 455-463.
16. Sabourin PJ, Bieber LL. The mechanism of alpha-ketoglutarate oxygenase. Formation of beta-hydroxyisovalerate from alpha-ketoglutarate. *J Biol Chem* 1982; 257: 7468-7471.
17. Rosenthal J, Angel A, Farkas J. Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle. *Am J Physiol* 1974; 226: 411-418.
18. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15: 412-426.
19. Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25: 42-52.
20. Landaas S. Accumulation of 3-hydroxyisobutyric acid, 2-methyl-3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in ketoacidosis. *Clin Chim Acta* 1975; 64: 143-154.
21. Yu WM, Kuhara T, Inoue Y, Matsumoto I, Iwasaki R, Morimoto S. Increased urinary excretion of beta-hydroxyisovaleric acid in ketotic and non-ketotic type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1990; 188: 161-168.
22. Vukovich MD, Slater G, Macchi MB, Turner MJ, Fallon K, Boston T, et al. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 631-639.
23. Nissen SL, Inventor; Iowa State University Research Foundation, Inc. (Ames, IA), assignee. Method of enhancing immune response of mammals. 1991.
24. 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.
25. Nissen SL, Flakoll PJ, Abumrad NN, Inventors; Iowa State University Research Foundation Inc. (Ames, IA), Vanderbilt University (Nashville, TN), assignee. Method of promoting nitrogen retention in humans. 1994.
26. Baxter J, Phillips R, Dowlati L, Goehring K, Johns P. Direct determination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) in liquid nutritional products. *Food Anal Methods* 2011; 4: 341-346.
27. Fuller JC, Jr., Sharp RL, Angus HF, Baier SM, Rathmacher JA. Free acid gel form of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) improves HMB clearance from plasma in human subjects compared with the calcium HMB salt. *Br J Nutr* 2011; 105: 367-372.
28. Baxter JH, Carlos JL, Thurmond J, Rehani RN, Bultman J, Frost D. Dietary toxicity of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (CaHMB). *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 1731-1741.
29. 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.
30. Kreider RB, Ferreira M, Wilson M, Almada AL. Effects of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. *Int J Sports Med* 1999; 20: 503-509.
31. Gallagher PM, Carrithers JA, Godard MP, Schulze KE, Trappe SW. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate ingestion, part II: Effects on hematology, hepatic and renal function. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 2116-2119.
32. Nissen S, Sharp RL, Panton L, Vukovich M, Trappe S, Fuller JC, Jr. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr* 2000; 130: 1937-1945.
33. Rathmacher JA, Nissen S, Panton L, Clark RH, Eubank May P, Barber AE, et al. Supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB), arginine, and glutamine is safe and could improve hematological parameters. *J Parent Ent Nutr* 2004; 28: 65-75.