**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE**

VITOR DE SALLES PAINELLI

**Efeitos de 12 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade
sobre as concentrações intramusculares de carnosina**

São Paulo

2017

VITOR DE SALLES PAINELLI

Efeitos de 12 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade sobre as concentrações intramusculares de carnosina

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano

Orientador: Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior

São Paulo

2017

Nome: PAINELLI, Vitor de Salles

Título: Efeitos de 12 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade sobre as concentrações intramusculares de carnosina.

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família, em especial, meus pais, Sérgio e Cinira, pelas valiosas lições de caráter e perseverança que me formaram como homem. Também agradeço ao meu irmão, Gustavo, pela amizade e companheirismo ao longo dos anos.

Agradeço à minha namorada Caroline, por todo o carinho, cumplicidade, respeito, atenção e amor compartilhados desde o início de nosso relacionamento e que se mantêm até hoje; bem como pela paciência em me ajudar a suportar todo o desgaste físico e emocional inerentes a este trabalho; e por sempre me estimular e motivar a continuar evoluindo.

Agradeço a todos os colegas da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE) que tanto colaboraram para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço a Vinicius, Bryan, Rafael, Johnny, Giovana, Luana, Renatão, Diogo, Carol, Thiago, Fabi, Yamaguchi, Lívia, Alan, Mari Capitani, Aninha, Carlão, Wagner, Igor, Aline e Ayane, pela confiança no meu trabalho.

Agradeço aos alunos Mariana Franchi, Kleiner Nemézio, Ana Jéssica e Isabel Andrade, bem como ao Dr. Luiz Riani, pela inestimável e imprescindível ajuda no recrutamento de voluntários para a pesquisa, colaboração durante a execução das sessões experimentais e análises das amostras do estudo.

Agradeço a todos os voluntários que participaram deste estudo, por aguentar 3 longos e árduos meses de intervenção, testes físicos e biópsias musculares. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Agradeço a todos os pesquisadores da EEFE que colaboraram imensamente na realização desse estudo, intelectualmente e financeiramente, com destaque aos professores Bruno Gualano e Guilherme Giannini Artioli. Também agradeço aos professores Hamilton Roschel, Rômulo Bertuzzi e Emerson Franchini por auxiliarem com os espaços físicos e materiais disponibilizados para o estudo.

Agradeço também aos pesquisadores Craig Sale e Roger Charles Harris, cuja contribuição intelectual foi de fundamental relevância para o andamento deste estudo.

Agradeço ao orientador Antonio Herbert Lancha Junior, que gentilmente me recebeu em seu laboratório no momento em que decidi ingressar na vida acadêmica, e desde então, tem me apoiado incondicionalmente.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (número do processo: 2013/04806-0) pelo auxílio financeiro, sem o qual este estudo não poderia ter sido conduzido.

"Só sei que nada sei... mas o fato de saber isso me coloca em vantagem sobre aqueles que acham alguma coisa" **(Sócrates)**

"Educai as crianças e não será necessário punir os homens" **(Pitágoras)**

RESUMO

PAINELLI, V. S. **Efeitos de 12 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade sobre as concentrações intramusculares de carnosina**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

INTRODUÇÃO: A carnosina é um dipeptídeo com capacidade tamponante presente no músculo esquelético, que pode ser obtido pela ingestão de carnes. Estudos transversais relatam que atletas engajados em exercícios de alta intensidade possuem um maior conteúdo de carnosina muscular (CarnM) comparados a destreinados, sugerindo que o treinamento pode modular a CarnM, apesar da ausência de estudos longitudinais.

OBJETIVO: Investigar os efeitos do treinamento intermitente (TI) de alta intensidade sobre a CarnM e seus genes associados. **MÉTODOS:** Vinte homens saudáveis e vegetarianos (eliminando a influência da dieta) foram pareados pelo consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$), e aleatoriamente designados a um grupo Controle (C, N=10) ou Treinado (T, N=10). O grupo T realizou TI em cicloergômetro 3 dias por semana durante 12 semanas, com progressão do volume (6-12 séries) e intensidade (140-170% do limiar de lactato [LL]). O grupo C manteve a rotina habitual. Antes e após a intervenção, biópsias musculares foram realizadas para a determinação da CarnM, da expressão de genes relacionados à CarnM e da capacidade tamponante muscular *in vitro* ($\beta m_{invitro}$). Foram realizados teste de Wingate e $VO_{2máx}$ para a avaliação do trabalho total (TT), do $VO_{2máx}$, dos limiares ventilatórios (LV) e do LL. Foi conduzido o Modelo Misto para análise dos dados. **RESULTADOS:** Um efeito de interação foi observado para CarnM ($F = 4.72$; $P=0.04$), com aumentos significantes para o grupo T (Pré: 15.8 ± 5.7 e Pós: 20.6 ± 5.3 mmol/kg músculo seco; +36.0%, $P=0.01$) e nenhuma alteração no grupo C (Pré: 14.3 ± 5.3 e Pós: 15.0 ± 4.9 mmol/Kg músculo seco; +6.3%, $P=0.99$). Houve melhora no TT, LV, LL, $VO_{2máx}$ e $\beta m_{invitro}$ no grupo T (todos $P < 0.05$), mas sem mudanças no grupo C ($P > 0.05$). Não houve alteração na expressão gênica das enzimas e transportadores avaliados nos grupos T ou C. **CONCLUSÃO:** Este estudo sugere que o TI pode aumentar a CarnM, sem alterar os seus genes. Tal aumento, associado ao da $\beta m_{invitro}$, pode ajudar a explicar o potente efeito deste tipo de treino sobre a aptidão física e cardiorrespiratória.

Palavras-chave: carnosina, tamponamento, treinamento, desempenho.

ABSTRACT

PAINELLI, V. S. **Effects of 12 weeks of high-intensity intermittent training on muscle carnosine concentrations**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

INTRODUCTION: Carnosine is a dipeptide with buffering capacity present within the skeletal muscle, which can be obtained by meat ingestion. Cross-sectional studies report that athletes engaged in high-intensity exercises have a greater muscle carnosine (MCarn) content compared to their untrained counterparts, suggesting that exercise training can modulate MCarn, despite of the absence of longitudinal studies.

OBJECTIVE: To investigate the effects of high-intensity intermittent training (HIIT) on CarnM and its associated genes. **METHODS:** Twenty healthy and vegetarian men (eliminating dietary influences) were matched by maximal oxygen uptake (VO_{2max}), and randomly assigned to a Control (C, N = 10) or Trained (T, N = 10) group. The T group performed HIIT on cycle ergometer 3 days per week for 12 weeks, with progressive volume (6-12 series) and intensity (140-170% lactate threshold [LT]). The C group kept their usual routine. Prior to the intervention, muscle biopsies were performed for MCarn determination, expression MCarn-related genes and the muscle buffering capacity *in vitro* ($\beta m_{in vitro}$). Wingate and VO_{2max} tests were performed to evaluate total work done (TWD), VO_{2max} , ventilatory thresholds (VT) and LT. The Mixed Model was conducted for data analysis. **RESULTS:** An interaction effect was observed for MCarn ($F = 4.72$, $P = 0.04$), with significant increases for the T group (Pre: 15.8 ± 5.7 and Post: 20.6 ± 5.0 mmol.kg⁻¹ dry muscle; +36%; $P = 0.01$), but not in C (Pre: 14.3 ± 5.3 and Post: 15.0 ± 4.9 mmol.kg⁻¹ dry muscle; +6.3%, $P = 0.99$). There was no change in the gene expression of the enzymes and transporters evaluated in the T or C groups. There was an improvement in TWD, VT, LT, VO_{2max} and $\beta m_{in vitro}$ in the T group (all $P < 0.05$), but no changes in C ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** This study suggests that HIIT can increase MCarn without altering its genes. This increase, associated with $\beta m_{in vitro}$, may help to explain the potent effect of this type of training on physical and cardiorespiratory fitness.

Keywords: carnosine, buffering, training, performance.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Ilustração da agulha de Bergstrom e seringa para a sucção da amostra muscular.....	29
Figura 2 - Ilustração do procedimento de <i>immunoblotting</i> , também conhecido como <i>Western Blotting</i> (na ilustração, a eletroforese - passo imediatamente anterior à 'transferência' já ocorreu), utilizado para mensurar a expressão de uma determinada proteína.....	35
Figura 3 - Esquematização dos principais sistemas de regulação do equilíbrio ácido-base por meio de proteínas transportadoras, o chamado tamponamento dinâmico.....	38
Figura 4 - Esquematização da atuação do bicarbonato intra e extracelular na no equilíbrio ácido-base, e dos transportadores e enzimas responsáveis pela regulação dos níveis de bicarbonato nestes meios.....	45
Figura 5 - Ilustração da via de digestão e absorção intestinal da carnosina e de seus aminoácidos constituintes.....	54
Figura 6 - Ilustração da via de transporte e síntese da carnosina e de seus aminoácidos constituintes no músculo esquelético.....	57

Figura 7 - Desintoxicação do 4-hydroxy- <i>trans</i> -2,3-nonenal (HNE) pela carnosina através da formação do Aduto de Michael.....	65
Figura 8 - Atenuação da produção de radicais hidroxila pela carnosina nas reações de Fenton e de Haber-Weiss.....	65
Figura 9 - Ilustração do cálculo do limiar de lactato pelo método D _{máx} , de acordo com Bishop <i>et al.</i> (1998).....	88
Figura 10 - Curva típica de titulação com ácido clorídrico (HCl) para um homogenato de músculo esquelético (vasto lateral) de humano.....	93
Figura 11: Ilustrações dos procedimentos realizados durante o processo de dissecação e pesagem das fibras musculares isoladas.....	97
Figura 12: Ilustrações da balança de fibra de quartzo.....	98
Figura 13: Ilustração de um gel de SDS-poliacrilamida para a tipagem das fibras musculares isoladas.....	100

Figura 14: Cromatograma resultante da injeção de 1 μ M de carnosina....	103
Figura 15: Cromatograma resultante da injeção de 5 μ M de carnosina....	103
Figura 16: Cromatograma resultante da injeção de 10 μ M de carnosina...	103
Figura 17: Cromatograma resultante da injeção de 25 μ M de carnosina...	104
Figura 18: Cromatograma resultante da injeção de 50 μ M de carnosina...	104
Figura 19: Ilustração dos géis denaturantes de agarose a 1%, para avaliação qualitativa da integridade do RNA nas amostras de 1 a 15 (Painel A), 16 a 30 (Painel B) e 31 a 39 (Painel C) ...	108
Figura 20 - Trabalho total realizado antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta no trabalho total realizado pelos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B).....	113

Figura 21 - Potência média durante cada série do teste de Wingate pré- (barras brancas) e pós-intervenção (barras pretas) nos grupos Treinado (PAINEL A) e Controle (PAINEL B).....	114
Figura 22 - Potência pico durante cada série do teste de Wingate pré- (barras brancas) e pós-intervenção (barras pretas) nos grupos Treinado (PAINEL A) e Controle (PAINEL B).....	115
Figura 23 - Tempo até a exaustão antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta no tempo até a exaustão dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B).....	116
Figura 24 - Distância total antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta na distância total percorrida pelos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B).....	117
Figura 25 - Potência máxima adquirida no teste progressivo máximo antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta na potência máxima realizada pelos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B)..	118

Figura 26 - Consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) atingido no teste progressivo máximo antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta no consumo máximo de oxigênio dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B)..... 119

Figura 27 - Tempo para atingir o 1° limiar ventilatório (1° LV) durante o teste progressivo máximo antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta no tempo para atingir o 1° LV dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B)..... 120

Figura 28 - Tempo para atingir o 2° limiar ventilatório (2° LV) durante o teste progressivo máximo antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta no tempo para atingir o 2° LV dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B)..... 121

Figura 29 - Concentração plasmática de lactato atingida ao final do teste progressivo máximo antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta na concentração de lactato plasmático dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B)..... 122

- Figura 30 - Potência necessária para atingir o limiar de lactato antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta na potência referente ao limiar de lactato dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B). 123
- Figura 31 - Gordura corporal antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas) (PAINEL A); Variação absoluta na gordura corporal dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta) (PAINEL B). 124
- Figura 32 - Capacidade tamponante intramuscular *in vitro* ($\beta m_{in vitro}$ em mmol H⁺. kg⁻¹ de músculo seco. unidade de pH⁻¹) nos grupos Treinado (barras pretas) e Controle (barras brancas), antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de intervenção..... 126
- Figura 33 - Concentração intramuscular de carnosina (em mmol.kg⁻¹ de músculo seco) nos grupos Treinado e Controle, antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de intervenção. 127
- Figura 34 - Expressão gênica da carnosinase (CNDP II), beta-alanina transaminase (ABAT), transportador da taurina (TauT), transportador de prótons/aminoácidos 1 (PAT 1) e carnosina-sintase (CARNS). Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio-padrão das mudanças ("*fold change*") no período PÓS, com os níveis no período PRÉ-intervenção de ambos os grupos arbitrariamente estabelecidos em 1. 129

Figura 35 - Expressão gênica do transportador histidina/peptídeos 1 (PHT1).
 Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio-padrão das
 mudanças ("*fold change*") no período PÓS, com os níveis no
 período PRÉ-intervenção de ambos os grupos arbitrariamente
 estabelecidos em 1. 130

Figura 36 - Correlação entre o tempo de treinamento físico e a variação
 .....absoluta da capacidade tamponante muscular *in vitro*
 .....($\beta m_{in vitro}$ - em mmol H⁺.kg⁻¹ músculo seco. unidade de pH⁻¹) 133

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Componentes da defesa tamponante intracelular, com os valores de pKa mensurados numa determinada temperatura.....	29
Tabela 2 - Sumário dos estudos investigando os efeitos do treinamento físico sobre o conteúdo muscular de carnosina.....	75
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados na análise de PCR em tempo real.....	107
Tabela 4 - Características dos participantes.....	112
Tabela 5 - Média do consumo alimentar dos participantes.....	125
Tabela 6 - Conteúdo de carnosina (em mmol.kg ⁻¹) dos diferentes tipos de fibra muscular isolada dos grupos Controle (CTRL) e Treinado (TR), antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de intervenção.....	128
Tabela 7 - Variação absoluta (em mmol.kg ⁻¹) no conteúdo de carnosina dos grupos Controle (CTRL) e Treinado (TR) entre os diferentes tipos de fibra muscular isolada.....	128

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
a. <i>Sistemas de Defesa Contra a Acidose em Exercícios de Alta</i> <i>Intensidade: Regulação e Adaptação ao Treinamento Físico .....</i>	22
1. <i>Defesa Intracelular.....</i>	25
I. <i>Fosfatos e Resíduos Histidínicos.....</i>	25
II. <i>Transportador Sódio/Bicarbonato (NBC).....</i>	34
III. <i>Transportador Sódio/Hidrogênio (Na⁺/H⁺).....</i>	37
IV. <i>Transportador Monocarboxilato (Co-transportador</i> <i>Lactato/H⁺).....</i>	40
2. <i>Defesa Extracelular.....</i>	43
3. <i>Considerações Finais.....</i>	48
b. <i>Metabolismo da Carnosina no Músculo Esquelético: Digestão,</i> <i>Síntese e Potenciais Funções.....</i>	50
1. <i>Digestão, Absorção, Transporte e Síntese da Carnosina</i> <i>no Tecido Muscular.....</i>	53
I. <i>Digestão e Absorção.....</i>	53
II. <i>Transporte e Síntese.....</i>	56
2. <i>Potenciais Funções da Carnosina no Músculo Esquelético.....</i>	62
I. <i>Tamponante.....</i>	62
II. <i>Antioxidante.....</i>	64
III. <i>Reguladora da Liberação e Sensibilidade do Cálcio</i> <i>no Aparato Contrátil.....</i>	67
3. <i>Considerações Finais.....</i>	70
c. <i>Carnosina Muscular: Uma Defesa Adaptativa ou Estimativa de</i> <i>Talento? - Efeitos do Treinamento Físico.....</i>	71

3. OBJETIVOS.....	82
a. <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>82</i>
b. <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>82</i>
 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 83
a. <i>Seleção da Amostra.....</i>	<i>83</i>
b. <i>Local e Duração do Estudo.....</i>	<i>84</i>
c. <i>Desenho Experimental.....</i>	<i>84</i>
d. <i>Avaliação da Capacidade Física e do Consumo Máximo de Oxigênio.....</i>	<i>85</i>
e. <i>Coletas Sanguíneas e Avaliação do Lactato Plasmático.....</i>	<i>87</i>
f. <i>Avaliação do Desempenho Intermitente de Membros Inferiores.....</i>	<i>89</i>
g. <i>Avaliação da Composição Corporal .....</i>	<i>90</i>
h. <i>Biópsia Muscular por Agulha de Sucção.....</i>	<i>91</i>
i. <i>Determinação da Capacidade Tamponante Muscular In Vitro.....</i>	<i>92</i>
j. <i>Análise da Concentração Intramuscular Total de Carnosina.....</i>	<i>93</i>
k. <i>Análise da Concentração Intramuscular de Carnosina por Tipo de Fibra.....</i>	<i>96</i>
1. <i>Dissecação e Pesagem das Fibras Musculares Isoladas.....</i>	<i>96</i>
2. <i>Tipagem das Fibras Musculares Isoladas.....</i>	<i>98</i>
3. <i>Determinação da Carnosina nos Diferentes Tipos de Fibras Musculares Isoladas.....</i>	<i>100</i>
l. <i>Expressão Gênica de Enzimas e Transportadores Relacionados a Carnosina.....</i>	<i>104</i>
m. <i>Treinamento Físico.....</i>	<i>108</i>
n. <i>Análise da Dieta.....</i>	<i>109</i>
o. <i>Análise Estatística.....</i>	<i>110</i>
 5. RESULTADOS.....	 111
a. <i>Amostra.....</i>	<i>111</i>
b. <i>Desempenho Intermitente de Membros Inferiores.....</i>	<i>112</i>
c. <i>Capacidade Física.....</i>	<i>115</i>

d. <i>Consumo Máximo de Oxigênio e Limiares Ventilatórios.....</i>	118
e. <i>Concentração Máxima de Lactato Plasmático e Potência Referente ao Limiar de Lactato.....</i>	121
f. <i>Peso e Composição Corporal.....</i>	124
g. <i>Consumo Alimentar.....</i>	125
h. <i>Capacidade Tamponante Muscular In Vitro.....</i>	126
i. <i>Conteúdo Total de Carnosina Muscular.....</i>	127
j. <i>Conteúdo de Carnosina por Tipo de Fibra Muscular Isolada.....</i>	127
k. <i>Expressão Gênica de Enzimas e Transportadores Relacionados à Carnosina no Músculo Esquelético.....</i>	129
 6. DISCUSSÃO.....	131
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O treinamento intermitente de alta intensidade é um potente estímulo para melhorar a capacidade anaeróbica e a tolerância aos esforços de alta intensidade (TABATA, NISHIMURA, KOUZAKI, HIRAI, OGITA, MIYACHI & YAMAMOTO, 1996), e vem sendo amplamente empregado para fins de otimização do desempenho físico, e mais recentemente, da saúde (GIBALA, LITTLE, MACDONALD & HAWLEY, 2012). As melhoras promovidas pelo treinamento intermitente de alta intensidade parecem ser, pelo menos em parte, uma consequência da capacidade aprimorada do músculo esquelético em lidar com o acúmulo rápido de íons H^+ . Tal melhora, por sua vez, é provocada por um aumento da capacidade de tamponamento físico-químico das células musculares, bem como pela maior capacidade de remoção de íons H^+ (JUEL, 2008). Evidências provenientes de estudos transversais indicam uma maior capacidade de tamponamento muscular em atletas que participam de esportes que exigem esforços de alta intensidade em comparação com atletas que participam de esportes onde os esforços são de menor intensidade, ou mesmo comparados a indivíduos destreinados (PARKHOUSE & MCKENZIE, 1984; PARKHOUSE, MCKENZIE, HOCHACHKA & OVALLE, 1985). Estudos longitudinais também já demonstraram melhorada capacidade de tamponamento físico-químico muscular após o emprego de programas de treinamento de alta intensidade, mas não de intensidade moderada (EDGE, BISHOP & GOODMAN, 2006a). No entanto, as adaptações intracelulares do músculo esquelético que poderiam ajudar a explicar o aumento da capacidade de tamponamento físico-químico ainda não são completamente conhecidas e/ou compreendidas. Plausivelmente, o aumento do conteúdo muscular de carnosina poderia explicar tal efeito.

A saber, a carnosina (β -alanyl-L-Histidina) é um dipeptídeo encontrado em diversos tecidos, tais como o cardíaco e o cerebral (HARRIS, DUNNETT & GREENHAFF, 1998). Porém, é no músculo esquelético de animais vertebrados em que ele está presente em altas concentrações (aproximadamente 20 mmol/kg de músculo seco em humanos) (HILL, HARRIS, KIM, HARRIS, SALE, BOOBIS, KIM & WISE, 2007). A carnosina é sintetizada *in situ* a partir dos aminoácidos L-histidina e beta-alanina, em uma reação catalisada pela enzima carnosina-sintase (também chamada de carnosina-sintetase). Ela pode ser encontrada em diversos tipos de

carne (principalmente de peixes), e portanto, pode ser obtida por meio da dieta, mas não é absorvida em sua forma íntegra para a corrente sanguínea, já que a enzima carnosinase, presente no lúmen intestinal e no plasma sanguíneo, rapidamente hidrolisa o dipeptídeo (ASATOOR, BANDO, LANT, MILNE & NAVAB, 1970; HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2005).

Diversas ações fisiológicas têm sido associadas à carnosina no músculo esquelético, tais como a de antioxidante (BOLDYREV, KOLDOBSKI, KURELLA, MALTSEVA & STVOLINSKI, 1993), reguladora do cálcio e do acoplamento excitação-contração (DUTKA, LAMBOLEY, McKENNA, MURPHY & LAMB, 2012), protetora de proteínas contra a glicação agindo como um peptídeo-sacrifício (HIPKISS, MICHAELIS & SYRRIS, 1995) e na prevenção de ligações proteína-proteína reagindo com grupos proteína-carbonil (HIPKISS, 2000). Porém, sua função mais bem atribuída e indiscutível é a de tamponamento do pH, devido à sua constante de dissociação de ácidos possuir um valor de 6.83, o que a torna um excelente tampão dentro da variação fisiológica do pH muscular (ABE, 2000).

Uma importante evidência apontando o papel da carnosina como tampão intracelular é a predominância deste dipeptídeo em fibras musculares do tipo II comparadas às fibras do tipo I. No músculo de equinos, por exemplo, DUNNETT & HARRIS (1997) observaram valores médios de carnosina nas fibras do tipo I, IIa e IIb de 27.27 ± 5.89 , 89.69 ± 10.27 e 96.62 ± 12.93 mmol/kg de músculo seco, respectivamente. Uma distribuição similar da carnosina tem sido observada em humanos onívoros, os quais consomem carnosina por meio da dieta. Provenientemente de biópsias musculares do músculo vasto lateral, HARRIS e colaboradores (1998) relataram que o conteúdo muscular de carnosina em fibras musculares do tipo II é aproximadamente o dobro do conteúdo deste dipeptídeo em fibras do tipo I nesta população (23.2 vs. 10.5 mmol/kg de músculo seco). Destaca-se que indivíduos vegetarianos, isto é, não consomem carnosina na dieta, possuem um conteúdo de carnosina 26% menor no músculo gastrocnêmio comparados à indivíduos onívoros (EVERAERT, MOOYAART, BAGUET, ZUTINIC, BAELDE, ACHTEN, TAES, DE HEER & DERAVE, 2011).

Ainda apoiando a hipótese da ação tamponante da carnosina, estudos transversais têm mostrado que atletas bem treinados engajados em atividades de alta intensidade, tais como remadores e corredores velocistas, possuem maior

conteúdo muscular de carnosina comparados à corredores maratonistas e indivíduos destreinados (PARKHOUSE, MCKENZIE, HOCHACHKA & OVALLE, 1985). Adicionalmente, KIM e colegas (2006) relataram concentrações musculares de carnosina de aproximadamente 34 mmol/kg de músculo seco em patinadores velocistas. Além disso, foi demonstrado que fisiculturistas possuem as maiores concentrações musculares de carnosina já observadas na população humana (TALLON, HARRIS, BOOBIS, FALLOWFIELD & WISE, 2005), com valores individuais chegando a alcançar 50.87 mmol/kg de músculo seco. Além de apoiar a ação tamponante da carnosina, tais estudos sugerem que o treinamento físico a longo prazo seja capaz de promover um aumento da capacidade tamponante muscular, em particular, do conteúdo intramuscular de carnosina.

Os poucos estudos longitudinais investigando esta hipótese, entretanto, têm encontrado dificuldade em prová-la. SUZUKI e colaboradores (2004), por exemplo, demonstraram um aumento de cerca de 100% no conteúdo intramuscular de carnosina em homens sedentários após 8 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade realizado uma vez por semana (3 séries de 30 segundos em cicloergômetro, totalizando 24 séries no estudo ou 12 minutos de exercício). Por outro lado, os outros 4 estudos existentes na literatura não foram capazes de confirmar tal aumento. KENDRICK e colegas (2008) não observaram qualquer diferença no conteúdo muscular de carnosina após 10 semanas de treinamento de força, conduzido 4 vezes por semana. Destaca-se que dos 4 dias de treino por semana no estudo anterior (KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE, 2008), apenas 2 foram destinados ao treinamento do grupamento muscular onde a carnosina foi avaliada (músculo vasto lateral), em intensidades que permitiam ao voluntários realizar 2 a 3 séries de 10 a 20 repetições, caracterizando um baixo volume e intensidade do treino. Semelhantemente, KENDRICK *et al.* (2009) e MANNION *et al.* (1994) não observaram qualquer aumento de carnosina muscular após 4 e 16 semanas, respectivamente, de treinamento isocinético conduzido 3 vezes por semana. Por fim, BAGUET e seu grupo (2011) não observaram concentrações aumentadas de carnosina no músculo após 5 semanas de treinamento intermitente, executando o mesmo protocolo de treino realizado por SUZUKI *et al.* (2004).

Embora as evidências acima possam sugerir que o treinamento físico não modula o conteúdo muscular de carnosina, é importante notar que nenhum destes

estudos controlou a variável interveniente mais importante no que diz respeito à concentração intramuscular de carnosina: a ingestão dietética de carnosina e de seu aminoácido constituinte, a beta-alanina (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2005). Além disso, especula-se que os estudos anteriores possam não ter empregado protocolos de treinamento com intensidade (MANNION, JAKEMAN & WILLAN, 1994; KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE, 2008) e/ou duração (KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE, 2009; BAGUET, EVERAERT, DE NAEYER, EYNGOUDT, STEGEN, BEECKMAN, ACHTEN, VANHEE, VOLKAERT, PETROVIC, TAES & DERAIVE, 2011) suficientes para induzirem uma diminuição do pH intramuscular, limitando a possibilidade de aumento da concentração de carnosina intramuscular. Outro aspecto relevante em relação a estes estudos é a falta de medida de carnosina nos diferentes tipos de fibra muscular, em específico, em fibras do tipo II, o que aumentaria consideravelmente a sensibilidade da análise.

Levando-se em consideração todos os itens acima discutidos, fica evidente que somente um estudo com participantes vegetarianos, submetidos a um programa de treinamento físico de alta intensidade com duração e volume adequados para o aumento da capacidade tamponante muscular, e que inclua a análise de carnosina por tipo de fibra muscular, poderá responder de forma mais clara se o treinamento físico pode de fato aumentar o conteúdo muscular de carnosina (HARRIS, WISE, PRICE, KIM, KIM & SALE, 2012). Portanto, o objetivo deste estudo será investigar os efeitos de um programa de treinamento intermitente de alta intensidade, realizado três vezes por semana durante 12 semanas, sobre as concentrações intramusculares (total e por tipo de fibra) de carnosina em participantes vegetarianos. A nossa hipótese é que o protocolo de treinamento físico empregado será eficaz em aumentar as concentrações de carnosina dos participantes vegetarianos, principalmente nas fibras musculares do tipo II.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.a. Sistemas de Defesa Contra a Acidose em Exercícios de Alta Intensidade: Regulação e Adaptação ao Treinamento Físico

Sabe-se que a fadiga muscular é um dos principais fatores que influenciam o rendimento esportivo. Apesar das diversas definições vigentes de fadiga muscular, é universalmente aceito que a mesma pode ser caracterizada como a incapacidade do músculo esquelético de manter a uma determinada tensão ou de manter o exercício físico a uma dada intensidade (SAHLIN, 1992). Embora a fadiga muscular seja estudada há diversos anos, até hoje ela permanece um fenômeno complexo, incompletamente compreendido e multifatorial, já que as causas para a sua ocorrência podem variar de acordo com o tipo, intensidade e duração do exercício físico em questão. No que diz respeito aos exercícios físicos de alta intensidade e curta duração, evidências indicam papel particularmente relevante de alguns eventos no surgimento da fadiga muscular, tais como o acúmulo de íons potássio (K^+) no interstício da célula muscular, a diminuição da liberação ou da recaptção dos íons cálcio (Ca^{2+}) no retículo sarcoplasmático, a depleção de substratos energéticos, e o acúmulo de metabólitos no interior da célula muscular (FITTS, 1994).

Ainda existe controvérsia sobre a participação de cada um dos fatores supracitados no desenvolvimento da fadiga muscular. Porém, o acúmulo de alguns metabólitos, em especial, os íons H^+ (gerando uma queda do pH intramuscular, isto é, uma "acidose muscular"), tem se destacado como a principal causa da fadiga muscular neste tipo de exercício. Estudos já demonstraram que os valores de pH intramuscular podem diminuir de ~7.1 até 6.5 após uma série de exercício físico intenso até a exaustão (AHLBORG, BERGSTROM, EKELUND, GUARNIERI, HARRIS, HULTMAN & NORDESJO, 1972). Dentre os mecanismos pelos quais a acidose pode afetar o desempenho físico, destacam-se: 1) a competição dos íons H^+ com os íons Ca^{2+} pelo sítio de ligação da troponina, prejudicando a capacidade da maquinaria contrátil de operar efetivamente (DONALDSON, HERMANSEN &

BOLLES, 1978; FABIATO & FABIATO, 1978); 2) inibição da ressíntese de fosforilcreatina (HARRIS, EDWARDS, HULTMAN, NORDESJO, NYLIND & SAHLIN, 1976); e 3) inibição de enzimas-chave da via glicolítica (SUTTON, JONES & TOEWS, 1981), limitando o processo de produção de energia para a contração muscular.

O corpo humano possui mecanismos bem regulados para a manutenção do pH intra e extracelular dentro dos valores fisiológicos, consistindo nos tampões químicos intracelulares e sanguíneos, no tamponamento dinâmico, e na regulação respiratória e renal. Devido à duração relativamente curta dos exercícios de alta intensidade, os tampões químicos intracelulares e os sanguíneos, bem como o tamponamento dinâmico, representam a principal linha de defesa contra o acúmulo imediato de íons H^+ . Com isso, a capacidade tamponante destes sistemas tem sido determinada como o fator limitante e de maior relevância para o sucesso durante eventos esportivos desta magnitude (PARKHOUSE & McKENZIE, 1984).

A defesa intracelular é constituída principalmente por fosfatos, proteínas, peptídeos e aminoácidos, os quais exercem seu efeito tampão no citosol, onde o pH é mais próximo da constante de acidez ou constante de dissociação de ácidos (pK_a) destas substâncias. Além disso, pode-se mencionar o tamponamento dinâmico, isto é, o transporte ativo de H^+ para fora da célula ou para outro compartimento intracelular (por exemplo, a mitocôndria) como outro agente da regulação ácido-base (JUEL, 1997). O tamponamento sanguíneo, por sua vez, é realizado principalmente pelo bicarbonato (HCO_3^-), o qual tem a capacidade de se ligar aos íons H^+ livres e ser convertido H_2CO_3 , e imediatamente dissociado em dióxido de carbono e água (JUEL, 2008).

Mesmo à luz da existência dos mecanismos de defesa acima mencionados, salienta-se que todos estes sistemas de tamponamento possuem limitada abrangência de ação. Assim, apesar da harmonia entre eles, fica claro que conforme a duração do exercício de alta intensidade se prolonga, a taxa de produção de H^+ pode exceder a taxa de depuração destes íons, o que em última instância levará à acidose muscular anteriormente mencionada, portanto, à perda de desempenho físico. A 1) caracterização destes sistemas de tamponamento; 2) dos mecanismos que regulam a ação destes sistemas sobre o equilíbrio do pH muscular; e 3) como estes sistemas podem ser modulados pelo treinamento físico podem auxiliar cientistas e fisiologistas do esporte num melhor entendimento sobre como tais

sistemas podem proteger a célula muscular contra a acidose muscular, e portanto, serão o foco desta revisão.

2.a.1. DEFESA INTRACELULAR

2.a.1.I. FOSFATOS E RESÍDUOS HISTIDÍNICOS

Conforme destacado na introdução desta revisão, a defesa tamponante no meio intracelular apresenta-se como um fator de vital importância e como a primeira linha de defesa para o controle da homeostase do pH muscular durante exercícios físicos de alta intensidade (JUEL, 1997). Com o intuito de exercer este controle, a célula muscular utiliza-se principalmente de fosfatos inorgânicos, bicarbonato, e resíduos e dipeptídeos que contém histidina (ABE, 2000) (ver Tabela 1), os quais serão aqui contemplados individualmente.

Mas antes de adentrarmos a caracterização de tais compostos, deve-se ressaltar que, até hoje, cientistas e fisiologistas do exercício encontram grandes dificuldades em quantificar a defesa tamponante intracelular, de forma que o número de opções em potencial para tal fim é bastante restrito. Na verdade, a melhor medida disponível nesse sentido é o índice de capacidade tamponante muscular (β), o qual pode ser obtido 1) através da titulação de um homogenato de músculo esquelético com uma quantidade fixa de ácido ou base [neste caso, chamado de capacidade tamponante muscular *in vitro* (β_{vit})]; ou 2) permitindo uma "auto-titulação" do músculo mediante a acidose metabólica proveniente de um exercício fatigante, e em seguida, mensurando a mudança na concentração de lactato intramuscular relativo à mudança no pH do homogenato muscular [neste caso, chamado de capacidade tamponante muscular *in vivo* (β_{vivo})] (HULTMAN & SAHLIN, 1980). Na teoria, esperar-se-ia um menor valor de β_{vit} se comparado à β_{vivo} , já que esta última medida não contempla apenas o tamponamento físico-químico, mas também a contribuição de reações metabólicas que levam ao consumo de íons H^+ e, possivelmente, o efluxo de H^+ e lactato do músculo em atividade (MANNION, JAKEMAN & WILLAN, 1993). Para que tenha significância fisiológica, a variação do pH onde a capacidade tamponante muscular é avaliada deveria estar o máximo possível pareada com a variação do pH sofrida pelo músculo esquelético. Conforme já mencionado, em vertebrados, esta variação parece ficar entre ~7.1, no repouso, e ~6.5, após um exercício supramáximo (AHLBORG, BERGSTROM, EKELUND,

GUARNIERI, HARRIS, HULTMAN & NORDESJO, 1972). Uma desvantagem deste ensaio de capacidade tamponante reside no fato de que, durante o seu preparo para a execução do método, as amostras musculares são liofilizadas; conseqüentemente, todo o bicarbonato é removido da amostra, e assim, a medida da capacidade tamponante não inclui a contribuição deste composto. Além disso, durante o processo de homogeneização e trituração das amostras musculares, a integridade dos compartimentos celulares é destruída, fato que inevitavelmente resultará em uma série de alterações metabólicas, principalmente com a subsequente incubação das amostras a 37 °C. Dentre estas alterações, destaca-se a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, engatilhando um *turnover* acelerado do ATP devido à ação da adenosina trifosfatase dependente de cálcio (PÖRTNER, BOUTILIER, TANG & TOEWS, 1990). Tal alteração está acoplada à utilização do metabolismo anaeróbio, resultando numa rápida e quase completa (> 95%) depleção de fosforilcreatina e ATP (SPRIET, SODERLUND, THOMSON & HULTMAN, 1986; THOMSON & SETO, 1989), e em última instância, induzindo a um acúmulo de fosfatos inorgânicos. Tais alterações metabólicas também resultariam na estimulação da glicólise, mas esta via é inibida em decorrência da adição de um tampão de fluoreto de sódio ao processo de homogeneização. Assim, este acúmulo de fosfatos inorgânicos estaria disponível para contribuir com o tamponamento físico-químico, e portanto, tem-se por estabelecido que o atual método de mensuração da capacidade tamponante muscular superestima esta medida (PÖRTNER, 1990). Apesar de suas limitações, conforme veremos ao longo desta revisão, este método vem sendo amplamente empregado e é o que possuímos de melhor na literatura para tal fim.

Tabela 1: Componentes da defesa tamponante intracelular, com os valores de pKa mensurados numa determinada temperatura.

<i>Substrato</i>	<i>pKa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
Ortofosfato Inorgânico	6,88	20
Hidrogenofosfato/ Dihidrogenofosfato	7,1 - 7,2	25
Anel Imidazol	6,5	25
L-Histidina	6,21	20
Carnosina	6,83 - 7,01	20
Anserina	7,15	20
Balenina	6,93	20
Bicarbonato	6.5	20
Fosforilcreatina	4.5	-----

Nota: Os valores contidos nesta tabela foram adaptados de BATE-SMITH (1938), EDSALL (1958), ABE & OKUMA (1991) e ABE (2000).

Os fosfatos são nutrientes não-metálicos cuja essencialidade está relacionada a uma série de vias metabólicas. Dentre elas, destacam-se as vias de produção de energia, tal qual na formação e hidrólise de ATP, bem como na fosforilação oxidativa e na composição da fosforilcreatina (KREIDER, 1999). Além disso, os fosfatos estão envolvidos nos processos de tamponamento de íons H^+ , tanto no meio intra quanto no extracelular. No entanto, dada a elevada concentração de fosfatos no meio intracelular e a reduzida concentração no meio extracelular, sua contribuição para a capacidade tamponante total é bastante significativa no meio intra e provavelmente desprezível no meio extra (KATZ, SWAIN PORTMAN & BALABAN, 1988).

O sistema de tamponamento dos fosfatos é composto por 3 principais componentes: o ortofosfato inorgânico (PO_4^-), o hidrogenofosfato (HPO_4^-) e o dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) (BATE-SMITH, 1938). Este tamponamento realizado pelo ortofosfato, HPO_4^- e $H_2PO_4^-$ só é possível pois estes compostos possuem uma pKa em torno de 7,2. A pKa, por sua vez, é a constante de dissociação de ácidos, e é ótima quando cai dentro da variação fisiológica do pH de um determinado meio. Em se tratando do músculo esquelético, conforme destacado na introdução, os valores de pH podem variar de ~7.1 em repouso até ~6.5 após uma série intensa de exercício (AHLBORG, BERGSTROM, EKELUND, GUARNIERI, HARRIS, HULTMAN & NORDESJO, 1972; COSTILL, BARNETT, SHARP, FINK & KATZ, 1983; COSTILL, VERSTAPPEN, KUIPERS, JANSSEN & FINK, 1984).

Com isso, quando íons H^+ livres são adicionados a estas substâncias, eles podem ser aceito por qualquer uma delas, atenuando a queda do pH e seus efeitos adversos sobre a contração muscular (VANDER, SHERMANN & LUCIANO, 1994). Assim, devido à variação fisiológica do pH intracelular e ao valor de pKa dos fosfatos, é de se esperar que estas substâncias exerçam importante função no processo de tamponamento, mas que devido à sua pKa, a contribuição dos mesmos para o tamponamento tenda a cair a conforme a queda do pH muscular fica acentuada. O fato é que até hoje não existem estudos na literatura que tenham mensurado a real contribuição dos fosfatos para o tamponamento intramuscular, ressaltando a necessidade de investigações nesse sentido.

Outro componente de extremo valor no sistema de regulação do pH intracelular em humanos é a carnosina. A carnosina é um dipeptídeo citoplasmático, formado pelo aminoácido proteogênico histidina e pelo aminoácido não-essencial

beta-alanina (DERAVE, EVERAERT, BEECKMAN & BAGUET, 2010). A carnosina é um membro da família dos DCH (Dipeptídeos Contendo Histidina), sendo os outros membros dessa família a anserina e a balenina. Estes três dipeptídeos podem ser encontrados no músculo estriado cardíaco e no sistema nervoso central de vertebrados e invertebrados; porém, é no músculo esquelético destes animais em que eles podem ser encontrados em altas concentrações (HARRIS & SALE, 2012). A carnosina é o único membro da família dos DCH presente nos seres humanos. Amostras do músculo vasto lateral, obtidas por meio da técnica de biópsia muscular por agulha de sucção (ver Figura 1), apontam que a concentração da carnosina pode variar de 12 até 60 mmol/kg de músculo seco, tornando o dipeptídeo uma das moléculas de maior abundância no músculo esquelético junto à fosforilcreatina e ao ATP (SALE, ARTIOLI, GUALANO, SAUNDERS, HOBSON & HARRIS, 2013).

Figura 1: Ilustração da agulha de Bergstrom e seringa para a sucção da amostra muscular.

Apesar de diversas funções já terem sido atribuídas à carnosina e aos seus análogos, sua atuação na regulação do equilíbrio ácido-básico, isto é, agindo como tampão, é a mais indiscutível. Tal função é atribuída à carnosina e aos outros resíduos contendo histidina devido ao valor de pKa da cadeia lateral destes

compostos (chamada de "anel imidazol") ser muito próximo à variação fisiológica do pH muscular, possibilitando que um dos dois nitrogênios de sua cadeia lateral seja protonado, levando à uma diminuição da concentração de íons H^+ livres, e portanto, contribuindo para atenuar a queda do pH muscular (ABE, 2000). Estima-se que a contribuição da carnosina para a capacidade tamponante muscular total seja de 9,2% em músculos mistos, e que esta contribuição para o tamponamento em fibras musculares isoladas do tipo I e II seja igual a 6,4% e 11,9%, respectivamente (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006).

Tendo em vista a importância e mecanismo de ação dos fosfatos e dos resíduos contendo histidina na regulação do pH intracelular em repouso e durante o exercício, torna-se relevante a melhor compreensão dos fatores que podem influenciar as concentrações destes compostos no tecido muscular. No que diz respeito à carnosina e aos resíduos contendo histidina, sabe-se que o tipo de fibra muscular, especificamente, fibras do tipo II, é determinante de um maior conteúdo de carnosina, corroborando com o papel tamponante da carnosina e seus análogos, dada a predominância do metabolismo glicolítico neste tipo de fibra (HILL, HARRIS, KIM, HARRIS, SALE, BOOBIS, KIM & WISE, 2007). Além disso, atualmente é conhecido que fatores como o vegetarianismo, o envelhecimento e o gênero feminino podem levar à diminuição destes compostos no músculo esquelético (EVERAERT, MOOYAART, BAGUET, ZUTINIC, BAELE, ACHTEN, TAES, DE HEER & DERAIVE, 2011; BAGUET, EVERAERT, ACHTEN, THOMIS & DERAIVE, 2012). Já foi muito bem demonstrado por um estudo seminal conduzido pelo pesquisador Roger Harris que o principal fator limitante para a síntese muscular de carnosina é a ingestão pela dieta da própria carnosina e de um de seus aminoácidos constituintes, a beta-alanina (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006). Considerando-se que a obtenção destes nutrientes só pode ocorrer por meio da ingestão de carnes (encontram-se no músculo esquelético) (JONES, SMITH & HARRIS, 2011), é esperado que indivíduos com dietas vegetarianas possuam menor conteúdo muscular de carnosina. Por outro lado, ainda não se sabe ao certo o motivo do envelhecimento e do gênero feminino também gerarem tal efeito, embora presume-se que o baixo nível circulante do hormônio testosterona ocasionado por estes fatores possa ter participação nesse sentido (PENAFIEL, RUZAF, MONSERRAT & CREMADES, 2004). Sendo menos

estudados os fatores que podem influenciar as concentrações de fosfatos no músculo esquelético, apenas estima-se que hormônios como o cortisol, o estrógeno, o paratormônio e a 1,25-dihidroxitamina D3 possam ter papel importante na regulação dos níveis circulantes de fosfatos, e assim, nos níveis teciduais (AVIOLI, 1988; BURNETT, GUNAWARDENE, BRINGHURST, JUPPNER, LEE & FINKELSTEIN, 2006). Em adição, muita atenção vem sendo recentemente administrada ao possível papel da manipulação dietética de fosfato de cálcio ou de sódio sobre a regulação dos estoques intramusculares de fosfato, ainda que a literatura atual apenas tenha se dedicado a avaliar o efeito destas estratégias nutricionais sobre a concentração sanguínea destes compostos (FUKUDA, SMITH, KENDALL & STOUT, 2010; BUCK, WALLMAN, DAWSON & GUELF, 2013).

Ainda não existem estudos examinando se o treinamento pode influenciar as concentrações de fosfatos inorgânicos dentro da célula muscular, sendo esse, portanto, um tópico muito interessante a ser investigado por futuros estudos na área de fisiologia aplicada à atividade motora. Por outro lado, estudos transversais já demonstraram que atletas bem treinados engajados em atividades de alta intensidade, tais como remadores e corredores velocistas, possuem maior conteúdo muscular de carnosina comparados aos indivíduos sedentários ou aerobiamente treinados (PARKHOUSE, MCKENZIE, HOCHACHKA & OVALLE, 1985). Adicionalmente, KIM, KIM, HARRIS, HARRIS, SALE & WISE (2006) relataram concentrações musculares de carnosina de aproximadamente 34 mmol/kg de músculo seco em patinadores velocistas. Além disso, foi demonstrado que fisiculturistas possuem as maiores concentrações musculares de carnosina observadas na população humana (TALLON, HARRIS, BOOBIS, FALLOWFIELD & WISE, 2005), com valores individuais chegando a alcançar 50.87 mmol/kg de músculo seco. Em conjunto, os resultados destes estudos transversais sugerem que o treinamento físico em longo prazo pode modular positivamente as concentrações intramusculares de carnosina. Contudo, até o momento, apenas um estudo longitudinal foi capaz de confirmar esta hipótese e demonstrar a eficácia de um programa de treinamento sobre o aumento das concentrações de carnosina muscular. SUZUKI, ITO & TAKAHASHI (2004) demonstraram um aumento de cerca de 100% no conteúdo intramuscular de carnosina em homens sedentários após 8 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade realizado uma vez por semana (3 séries de 30 segundos em cicloergômetro, totalizando 24 séries no

estudo ou 12 minutos de exercício). Por outro lado, os outros 4 estudos existentes na literatura não foram capazes de confirmar tal aumento. KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE (2008) não observaram qualquer diferença no conteúdo muscular de carnosina após 10 semanas de treinamento de força, conduzido 4 vezes por semana. Destaca-se que dos 4 dias de treino por semana neste estudo, apenas 2 foram destinados ao treinamento do grupamento muscular onde a carnosina foi avaliada (músculo vasto lateral), em intensidades que permitiam ao voluntários realizar 2 a 3 séries de 10 a 20 repetições, caracterizando um baixo volume e intensidade do treino. Semelhantemente, KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE (2009) e MANNION, JAKEMAN & WILLAN (1994) não observaram qualquer aumento de carnosina muscular após 4 e 16 semanas, respectivamente, de treinamento isocinético conduzido 3 vezes por semana. Por fim, BAGUET, EVERAERT, DE NAEYER, REYNGOUDT, STEGEN, BEECKMAN, ACHTEN, VANHEE, VOLKAERT, PETROVIC, TAES & DERAIVE (2011) não observaram concentrações aumentadas de carnosina muscular após 5 semanas de treinamento intermitente, executando o mesmo protocolo de treino realizado por SUZUKI, ITO & TAKAHASHI (2004).

Embora as evidências provenientes dos estudos longitudinais acima mencionados refutem as sugestões dos estudos transversais e indiquem que o treinamento físico não é capaz de modular o conteúdo muscular de carnosina, é importante notar que nenhum destes estudos controlou a variável interveniente mais importante no que diz respeito à concentração intramuscular de carnosina: a ingestão dietética de carnosina e de seu aminoácido constituinte, a beta-alanina (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006). Além disso, especula-se que os estudos anteriores possam não ter empregado protocolos de treinamento com intensidade (MANNION, JAKEMAN & WILLAN, 1994; KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE, 2008) e/ou duração (KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE, 2009; BAGUET, EVERAERT, DE NAEYER, REYNGOUDT, STEGEN, BEECKMAN, ACHTEN, VANHEE, VOLKAERT, PETROVIC, TAES & DERAIVE, 2011) suficientes para induzirem uma diminuição do pH intramuscular, limitando a possibilidade de aumento da concentração de carnosina intramuscular.

Desta maneira, ainda que o tamponamento intracelular apresente-se como um importante meio de defesa contra a acidose muscular gerada por exercícios de

alta intensidade - sendo os fosfatos e os DCH as principais linhas de defesa deste meio - diversas questões sobre esse assunto ainda permanecem sem resposta. Dentre as principais perguntas a serem respondidas, destacam-se 1) a exata contribuição de cada componente da defesa tamponante intracelular para o tamponamento muscular total; 2) a existência de outros fatores que podem influenciar a concentração dos tampões químicos intracelulares; 3) e o possível papel do treinamento físico na regulação desse sistema e de seus substratos.

2.a.1.II. TRANSPORTADOR SÓDIO/BICARBONATO (NBC)

Conforme mencionado no tópico anterior, a maior parte do tamponamento intracelular consiste da ação dos fosfatos inorgânicos e dos resíduos de histidina presentes em proteínas intrínsecas e em dipeptídeos citoplasmáticos, tais como a carnosina. Apesar de não terem sido enaltecidos anteriormente, parte do tamponamento intracelular é realizada por íons bicarbonato presentes no meio intracelular, os quais possuem a capacidade de se ligar aos íons H^+ no sarcoplasma, atenuando a diminuição do pH e os efeitos da acidose muscular sobre a produção de energia e a contração muscular (VAUGHAN-JONES & SPITZER, 2002). Semelhantemente aos fosfatos inorgânicos, ainda não há conhecimento sobre a magnitude da contribuição dos íons bicarbonato para o tamponamento muscular total. Contudo, é especulado que esta contribuição seja pequena, dada a baixa concentração destes íons no meio intracelular quando comparados ao meio extracelular (GUARIGLIA, ARDUINI, DEL CANALE, FIACCADORI, COFFRINI, MORI, RENI & VITALI, 1983; ROTHE, 1984; GUARIGLIA, ANTONUCCI, COFFRINI, DEL CANALE, FIACCADORI, RENI, VITALI, ARDUINI & BORGHETTI, 1985). Enquanto os fosfatos e os DCH possuem mecanismos melhor elucidados acerca de sua síntese e absorção para dentro do tecido muscular, a existência de bicarbonato no meio intracelular permanece até hoje um fato difícil de ser explicado, já que diversos autores sugerem que o sarcolema é impermeável a este íon (COSTILL, BARNETT, SHARP, FINK & KATZ, 1983; COSTILL, VERSTAPPEN, KUIPERS, JANSSEN & FINK, 1984; KATZ, COSTILL, KING, HARGREAVES & FINK, 1984), gerando dificuldade na explicação de como o bicarbonato pode penetrar na célula muscular, e mais dúvidas quanto à exata magnitude de contribuição desta molécula para o tamponamento intracelular.

Por outro lado, por meio da técnica de *immunoblotting* (ver Figura 2), a qual permite avaliar a expressão de determinadas proteínas num determinado tecido, estudos recentes foram capazes de identificar no músculo esquelético de humanos duas isoformas de co-transportadores de sódio/bicarbonato (NBC's), chamadas NBC1 e NBC2 (KRISTENSEN, KRISTENSEN & JUEL, 2004). Conforme seu próprio nome indica, a principal função destas isoformas é atuar no influxo de íons sódio e bicarbonato para dentro da célula muscular. A ação destas isoformas vem sendo

caracterizada como o mecanismo responsável de entrada do bicarbonato na célula muscular.

Figura 2: Ilustração do procedimento de *immunoblotting*, também conhecido como *Western Blotting* (na ilustração, a eletroforese - passo imediatamente anterior à 'transferência' já ocorreu), utilizado para mensurar a expressão de uma determinada proteína.

A sensibilidade deste sistema de transporte às alterações no pH intramuscular está bem exemplificada no estudo de Juel e colaboradores (JUEL, LUNDBY, SANDER, CALBET & VAN HALL, 2003). Os autores levaram moradores acostumados a viver ao nível do mar para viverem durante 8 semanas numa altitude de 4100 metros, e mediante a extração de amostras de tecido muscular antes e após esse período, avaliaram a expressão proteica das NBC's. Como os autores não se utilizaram de anticorpos específicos às isoformas acima mencionadas, a expressão proteica de NBC's foi avaliada como um todo. Interessantemente, em comparação aos níveis pré-intervenção, foi observado um aumento de 47 a 69% na expressão de NBC's no músculo esquelético dos participantes. Em virtude da diminuição da disponibilidade de oxigênio em grandes altitudes, é de conhecimento geral que o músculo esquelético passa a depender de fontes anaeróbias para a

produção de energia (GREEN, SUTTON, WOLFEL, REEVES, BUTTERFIELD & BROOKS, 1992). Assim, este aumento da expressão dos NBC's pode indicar uma adaptação ao novo metabolismo predominante, possivelmente indicando a importância deste sistema de transporte para a entrada de bicarbonato na célula muscular, e portanto, para a regulação ácido-base intracelular. Este sistema de transporte, entretanto, foi apenas identificado via transferências de *Western blot*, enquanto a sua real eficiência e contribuição para a regulação do pH intramuscular ainda não foram quantificadas; tampouco a regulação das isoformas específicas deste sistema de transporte no músculo esquelético humano foi descrita, ressaltando a relevância e necessidade de mais estudos neste sentido.

2.a.1.III. TRANSPORTADOR SÓDIO/HIDROGÊNIO (Na^+/H^+)

O sistema de transporte sódio/hidrogênio (Na^+/H^+) é apontado com um dos mais clássicos sistemas de transporte reguladores do pH intracelular, e está presente em diversos tipos de células. No músculo esquelético, ele é representado pela isoforma NHE1, e pode ser encontrado de forma mais abundante em fibras do tipo II (JUEL, 2000).

O mecanismo de ação deste transportador é bastante simples, e conforme o seu nome indica, consiste num co-transporte de íons H^+ e íons Na^+ . O sentido de tal transporte, entretanto, é inverso (Figura 3). Enquanto os íons H^+ são transportados do interior da célula muscular para o exterior, os íons Na^+ são transportados do meio extracelular para o meio intracelular (PUTNEY, DENKER & BARBER, 2002). Estudos já demonstraram que o NHE1 tem sua ativação aumentada quando o pH do citosol atinge valores mais baixos, demonstrando a sensibilidade deste transportador à acidose intracelular. Contudo, no músculo esquelético, sob valores normais de pH, sabe-se que este sistema de transporte já está operando com 50% de sua capacidade (JUEL, 1998). Até hoje, o motivo desta alta sensibilidade do NHE1 aos valores normais do pH muscular não é clara. Apesar disso, pode-se atestar que as alterações na atividade deste transportador estão relacionadas com a necessidade de manutenção de um pH neutro mediante a liberação de íons H^+ da via metabólica. Mais estudos avaliando a ativação do NHE1 em repouso e durante esforços intensos são necessários para concluirmos sua real importância em ambas as situações.

Figura 3: Esquemática dos principais sistemas de regulação do equilíbrio ácido-base por meio de proteínas transportadoras, o chamado tamponamento dinâmico.

Ainda que não completamente compreendido, alguns estudos já demonstraram a capacidade do NHE1 em se adaptar ao treinamento físico. Num dos primeiros estudos avaliando os efeitos modulatórios do treinamento físico sobre a expressão deste transportador no músculo esquelético, JUEL (2000) submeteu roedores a um período de treinamento de corrida em esteira por 3 semanas. Por meio da técnica de *immunoblotting*, o autor observou que o conteúdo de NHE1 aumentou 29 e 36% em fibras oxidativas e glicolíticas, respectivamente, em comparação aos ratos que permaneceram sem treinar, comprovando a influência do treinamento físico sobre a expressão do NHE1. Consequentemente, uma maior expressão de NHE1 na célula muscular induzida pelo treinamento físico pode resultar numa melhorada capacidade tamponante deste sistema, portanto, do músculo esquelético. Interessantemente, a modulação deste transportador parece obedecer o princípio da especificidade do treinamento. A exemplo disto, IAIA, THOMASSEN, KOLDING, GUNNARSSON, WENDELL, ROSTGAARD, NORDSBORG, KRUSTRUP, NYBO, HELLSTEN & (2008) recrutaram corredores treinados aerobiamente e designaram metade deles a um grupo controle, o qual

manteria uma rotina de treino similar àquela já realizada (45 km/semana), enquanto a outra metade mudaria a rotina de treino aeróbio para uma rotina de menor volume, porém de maior intensidade (treino intermitente, 3 a 4 vezes por semana - 8 a 12 tiros "*all out*" de 30 segundos, a 95% $VO_{2máx}$, com 3 minutos de intervalo entre os tiros). Após 4 semanas de treinamento, os autores detectaram um aumento de 30% no conteúdo muscular de NHE1 no grupo que treinou intermitentemente em comparação ao período basal, enquanto o grupo que manteve a rotina de treino aeróbio não teve qualquer alteração estatisticamente significativa na expressão deste transportador. Numa ligeira comparação com o estudo de JUEL (2000), estes resultados nos permitem concluir que a magnitude de aumento no conteúdo muscular de NHE1 após um período semelhante de treinamento físico de alta intensidade ocorre de forma bastante similar em humanos e roedores. Além disso, fica evidente que o aumento do conteúdo muscular de NHE1 é restrito ao tipo de treinamento físico realizado. Neste caso, quanto maior a intensidade do treinamento, maior o "ambiente acidótico" gerado dentro da célula muscular durante a sessão de treinamento, maior a adaptação do NHE1.

2.a.1.IV. TRANSPORTADOR MONOCARBOXILATO (CO-TRANSPORTADOR LACTATO/H⁺)

Embora o transportador NHE1 exerça um importante papel no efluxo de íons H⁺ para fora da célula muscular, o mesmo não é considerado o único sistema de transporte responsável por esta função. Nesse sentido, o outro sistema que assume a responsabilidade restante no transporte de íons H⁺ para fora do citosol é o transportador monocarboxilato, representado pela sigla MCT (do inglês *monocarboxylate transporter*).

Este sistema de transporte é mediado por duas proteínas, a MCT1 e a MCT4, as quais co-transportam íons H⁺ e lactato do meio intracelular para o meio extracelular (JUEL, 1997). Tal transporte segue uma relação estequiométrica de 1 íon lactato para 1 íon H⁺ (ver Figura 3). Enquanto a isoforma MCT1 é encontrada predominantemente em fibras oxidativas, a isoforma MCT4 é encontrada em todos os tipos de fibra muscular (PILEGAARD, TERZIS, HALESTRAP & JUEL, 1999a). Similarmente ao NHE1, o princípio por trás da ação do MCT é baseado no gradiente de concentração dos íons lactato e H⁺: quanto maior a concentração destes íons no meio intracelular, maior é a atividade do MCT, portanto, maior é a taxa de transporte destes íons para o meio extracelular (JUEL, 2008). A exemplo, estudos prévios já demonstraram que durante exercícios de alta intensidade o MCT é responsável por aproximadamente 70 a 75% do efluxo total de prótons (MESSONNIER, KRISTENSEN, JUEL & DENIS, 2007), e 70 a 80% do efluxo total de íons lactato (JUEL, 1997), e com isso, vem sendo apontado ao longo dos anos como o sistema de transporte mais importante de regulação do pH intracelular.

Particularmente interessante, trabalhos anteriores foram capazes de detectar a presença da isoforma MCT1 na membrana mitocondrial, o que permite que os íons lactato e H⁺ entrem na mitocôndria (HASHIMOTO, HUSSIEN & BROOKS, 2006). Dessa forma, oferecendo um espaço para a diluição destes íons, a mitocôndria também pode contribuir para retardar a queda do pH sarcoplasmático, sugerindo uma relevante participação desta organela para o processo de tamponamento intracelular. Além disso, a descoberta da existência de um complexo enzimático de oxidação de lactato (isto é, a Lactato Desidrogenase) na membrana mitocondrial

interna apoia a hipótese de que as mitocôndrias também podem tomar parte na depuração de lactato intracelular, assim sendo, este metabólito pode ser oxidado e ser utilizado como substrato energético (BROOKS, DUBOUCAUD, BROWN, SICURELLO & BUTZ, 1999). Embora o potencial papel do lactato como substrato energético durante o exercício físico venha sendo alvo de investigação ao longo de anos recentes (PINTO, DE SALLES PAINELLI, LANCHETA JR & ARTIOLI, 2014), esta revisão não se aprofundará neste assunto.

Ainda no tocante à atividade e aos possíveis mecanismos de ação do MCT, em um estudo transversal conduzido no início da década de 90 com humanos de diferentes estados de treinamento, isto é, consistindo de indivíduos sedentários até atletas bem treinados em modalidades de alta intensidade e curta duração, foi demonstrado que a capacidade do MCT em transportar íons lactato e H^+ através do sarcolema é significativamente maior no músculo dos indivíduos altamente treinados em comparação aos destreinados (PILEGAARD, BANGSBO, RICHTER & JUEL, 1994). Mediante tal resultado, é possível especular o treinamento físico *per se* possui um papel modulador sobre a capacidade e expressão deste transportador. Dois estudos iniciais foram conduzidos com o intuito de abordar esta questão. No primeiro deles, foi relatado um aumento de 18% no conteúdo muscular da isoforma MCT1 após homens jovens e fisicamente ativos serem submetidos a apenas 7 dias de treinamento físico, realizado 2 horas por dia em cicloergômetro, a 65% $VO_{2máx}$ (BONEN, McCULLAGH, PUTMAN, HULTMAN, JONES & HEIGENHAUSER, 1998).

Posteriormente, num estudo mais robusto e completo, PILEGAARD e colaboradores investigaram os efeitos de 8 semanas de um programa de treinamento físico de alta intensidade sobre o conteúdo muscular das isoformas MCT1 e MCT4, bem como sobre a capacidade destes transportadores (PILEGAARD, DOMINO, NOLAND, JUEL, HELLSTEN, HALESTRAP & BANGSBO, 1999b). O protocolo de treinamento consistiu na realização do exercício extensão de joelho unilateral num cicloergômetro modificado, com a perna não treinada servindo como controle. O protocolo foi conduzido progressivamente, aumentando a frequência de treino (a qual variou de 3 a 5 dias na semana), o volume de séries (2 a 4 séries), o tempo de execução das séries (30 a 60 segundos) e a intensidade das séries (50 a 120 N). Como principais resultados, os autores verificaram que o conteúdo muscular das duas isoformas MCT1 e MCT4 estava aumentado em 70 e 33%, respectivamente, em comparação ao conteúdo destas proteínas no músculo vasto

lateral da perna controle. Os autores também verificaram que estes aumentos estavam associados com uma maior capacidade de transporte destas proteínas na perna treinada em comparação à perna não treinada.

Embora o supramencionado destaque em apenas 2 estudos os efeitos positivos do treinamento físico sobre a modulação da expressão e capacidade do MCT, tais efeitos vem sendo demonstrados consistentemente na literatura, tanto em humanos (DUBOCHAUD, BUTTERFIELD, WOLFEL, BERGMAN & BROOKS, 2000; BURGOMASTER, CERMAK, PHILLIPS, BENTON, BONEN & GIBALA, 2007) quanto em animais (KITAOKA, MACHIDA, TAKEMASA & HATTA, 2011a; KITAOKA, MASUDA, MUKAI, HIRAGA, TAKEMASA & HATTA, 2011b). Com isso, pode-se concluir que a capacidade das isoformas MCT1 e MCT4 em co-transportar íons lactato e H^+ para fora da célula muscular pode ser efetivamente melhorada com o treinamento físico, e que o aumento da densidade/expressão destas proteínas no sarcolema possui fundamental relevância no efluxo destes íons, por consequência, na atenuação da acidose muscular durante exercícios de alta intensidade.

2.a.2. DEFESA EXTRACELULAR

Similarmente ao que ocorre no meio intracelular, alguns fosfatos, tais como o HPO_4^- e o H_2PO_4^- , também aparecem como componentes do sistema de defesa extracelular. Ao considerarmos o valor de pKa do HPO_4^- e do H_2PO_4^- (7,1 - 7,2), esperar-se-ia uma maior contribuição destes compostos para o tamponamento extracelular conforme o plasma sanguíneo se acidifica. Porém, sob condições normais, as concentrações plasmáticas de fosfatos variam de 0.75 até 1.35 mmol/L (TREMBLAY, GALLOWAY & SEXSMITH, 1994). Mediante tão baixa concentração de fosfatos no plasma, é esperado que a contribuição destes compostos para o tamponamento extracelular, em termos quantitativos, chegue a ser insignificante. Algumas proteínas, tais como a hemoglobina, presentes de forma dispersa no sangue ou no interior das hemácias, também podem atuar no processo de tamponamento dos íons H^+ , pois contêm grupos ionizáveis em suas cadeias laterais (OHE & KAJITA, 1980), em específico, os anteriormente mencionados resíduos de histidina contendo o anel imidazol, os quais têm a capacidade de aceitar prótons. Porém, diferentemente do meio intracelular, o pH sanguíneo possui variação fisiológica normal de ~7.4 em repouso até ~7.1 após esforços de alta intensidade (DE SALLES PAINELLI, SILVA, OLIVEIRA Jr, OLIVEIRA, BENATTI, RABELO, GUILHERME, LANCHETA Jr & ARTIOLI, 2014). Com isso, considerando-se a pKa do anel imidazol presente nos resíduos de histidina e a variação fisiológica do pH sanguíneo, embora as proteínas sanguíneas sejam atuantes no tamponamento extracelular, é possível afirmar que estas moléculas possuem uma baixa relevância neste processo.

Assim, apesar dos sistemas de defesa acima citados, as altas concentrações de HCO_3^- no espaço intersticial e no sangue caracterizam o principal mecanismo de tamponamento extracelular (Figura 4). Especificamente, os íons HCO_3^- possuem a capacidade de aceitar os íons H^+ livres, levando à formação de um ácido fraco chamado ácido carbônico, e posteriormente, à formação de água e dióxido de carbono (LEE, 1955). A anidrase carbônica, encontrada predominantemente no citosol das hemácias, é a enzima responsável por catalisar este processo

inversamente, isto é, levando à formação de ácido carbônico a partir de água e dióxido de carbono; e especula-se que a sua atividade enzimática provavelmente seja o fator limitante para tornar o processo acima citado suficientemente rápido para funcionar *in vivo* (SWENSON, 2003).

Neste ponto, nota-se uma harmonia entre os processos de tamponamento extracelular e o tamponamento dinâmico: o tamponamento dos íons H^+ pelo HCO_3^- no sangue favorecerá um maior desequilíbrio no gradiente intra/extracelular de íons H^+ . Esta diferença no gradiente intra/extracelular de íons H^+ implicará num maior efluxo de íons H^+ para fora da célula muscular via tamponamento dinâmico (isto é, por meio da ação dos transportadores, MCT e Na^+/H^+) (MAINWOOD & WORSLEY-BROWN, 1975; ROTHE, 1984; WETZEL, HASSE, PAPADOPOULOS, VOIPIO, KAILA & GROS, 2001). Em concordância com este mecanismo, estudos anteriores já demonstraram que a inibição da anidrase carbônica extracelular por meio da administração de acetazolamida diminui o efluxo de íons H^+ para fora da célula muscular (KOWALCHUK, J.M.; SMITH, S.A.; WEENING, B.S.; MARSH, G.D.; PATERSON, 2000). Com isso, uma maior depuração dos íons H^+ via ambos os mecanismos favoreceria um atraso ainda maior no aparecimento da acidose muscular, e em última instância, da fadiga muscular durante esforços de alta intensidade.

Curiosidade à parte, os recentes esforços e avanços na área de fisiologia aplicada ao exercício físico proporcionaram a identificação de algumas isoformas da anidrase carbônica na membrana sarcoplasmática; especificamente as isoformas CAIV e CAXIV, com seus centros ativos orientados para o meio extracelular (DECKER, SENDER & GROS, 1996; WETZEL, SCHEIBE, HELLMANN, HALLERDEI, SHAH, WAHEED, GROS & SLY, 2007). Embora mais estudos sejam necessários para elucidar o real papel e atividade destas isoformas da anidrase carbônica presentes no sarcolema, pressupor-se-ia um papel similar às isoformas comumente encontradas nas hemácias, ou seja, uma alta atividade das isoformas CAIV e CAXIV poderia favorecer um maior aparecimento dos íons H^+ fora da célula muscular, onde estes seriam tamponados, logo, induzindo uma maior diferença no gradiente intra/ extracelular de prótons, e assim, aumentando o tamponamento dinâmico de íons H^+ através da membrana sarcoplasmática (ver Figura 4) (ROTH & BROOKS, 1990). Todavia, conforme já mencionado, o mecanismo de ação envolvendo tais isoformas requer maiores esclarecimentos.

Figura 4: Esquematização da atuação do bicarbonato intra e extracelular na no equilíbrio ácido-base, e dos transportadores e enzimas responsáveis pela regulação dos níveis de bicarbonato nestes meios.

As evidências na literatura indicando um possível papel do treinamento físico sobre a modulação da capacidade tamponante extracelular não são recentes. Estudos transversais conduzidos no final da década de 40, como o de KJELLBERG, RUDHE & SJÖSTRAND (1949), já demonstravam que os níveis totais de hemoglobina no sangue eram maiores em homens e mulheres altamente treinados quando comparados a indivíduos sedentários pareados por sexo e idade. Tais resultados observados em estudos transversais são apoiados por estudos longitudinais mais recentes que observaram efeitos positivos do treinamento físico sobre os níveis sanguíneos de hemoglobina (HOLMGREN, MOSSFELDT, SJÖSTRAND & STRÖM, 1960; MAIRBAURL, 2013). Muito provavelmente estes elevados níveis sanguíneos de hemoglobina representam uma adaptação à maior demanda por oxigênio pelo tecido muscular que ocorre durante as sessões de

treino. Porém, não se pode excluir a premissa de que o aumento destes níveis também represente uma maior necessidade de tamponamento extracelular durante as sessões de treino.

Adicionalmente, estudos recentes têm se dedicado a investigar os possíveis efeitos do treinamento físico sobre a expressão gênica da anidrase carbônica no músculo esquelético. Até onde se tem conhecimento, apenas dois estudos conduzidos com humanos estão disponíveis na literatura neste sentido. Curiosamente, ambos os estudos foram conduzidos comparando-se a resposta da expressão gênica da isoforma CAIII da anidrase carbônica ao treinamento em hipóxia vs. o treinamento em normóxia. O primeiro deles recrutou e designou corredores habituados a treinarem longas distâncias ao nível do mar a um de dois grupos (ZOLL, PONSOT, DUFOUR, DOUTRELEAU, VENTURA-CLAPIER, VOGT, HOPPELER, RICHARD & FLUCK, 2006). Enquanto um dos grupos manteve seu treino usual (5 vezes por semana) durante 6 semanas (treino em normóxia), o outro grupo também manteve volume e intensidade de treino semelhante, à exceção de que 2 das 5 sessões de treino semanais eram realizadas no laboratório sob condições que simulassem uma altitude de 3000 metros (treino em hipóxia). Os autores observaram um aumento de 74% na expressão gênica muscular da isoforma CAIII no grupo cuja rotina de treino foi submetida à hipóxia, enquanto nenhuma diferença estatisticamente significativa foi notada no outro grupo.

Com objetivos idênticos ao estudo acima mencionado, FAISS e colaboradores investigaram os efeitos de um programa de treino intermitente com duração de 4 semanas, realizado 2 vezes por semana em cicloergômetro, sobre a expressão gênica muscular da isoforma CAIII (FAISS, LEGER, VESIN, FOURNIER, EGDEL, DERIAZ & MILLET, 2013). Para este fim, os autores aleatoriamente designaram homens moderadamente treinados em ciclismo a um grupo que realizou as sessões de treino em hipóxia, numa altitude simulada de 3000 metros, ou a um grupo que as realizou em normóxia. Após as 4 semanas de treino, os autores observaram um aumento de 35% na expressão gênica muscular da isoforma CAIII. O grupo que treinou em normóxia, entretanto, não obteve quaisquer alterações neste parâmetro.

Nota-se que ambos os estudos acima citados observaram efeitos positivos do treinamento físico realizado em hipóxia sobre a expressão gênica muscular da isoforma CAIII da anidrase carbônica. Entretanto, levando-se em consideração apenas os grupos que realizaram o treinamento em normóxia, nenhuma alteração foi

observada, sugerindo que as alterações observadas nos grupos que treinaram em hipóxia se devem principalmente à ausência de oxigênio, ou seja, à predominância do metabolismo anaeróbio glicolítico, ao invés do treinamento físico *per se*. Por outro lado, poder-se-ia especular que os protocolos de treino aplicados podem não ter sido apropriados ou de suficiente intensidade, volume e duração para gerar a requerida adaptação no tecido muscular à presença de oxigênio. Por fim, embora a sensibilidade da isoforma CAIII da anidrase carbônica ao treinamento físico em hipóxia esteja clara nos dois estudos mencionados, diferentemente das isoformas anteriormente mencionadas (CAIV e CAXIV), não existem estudos de caracterização e localização celular da isoforma CAIII no músculo esquelético de humanos; e mediante esta ausência de justificativa teórica para o uso de tal isoforma, a mesma tem recebido duras críticas (PADILLA, HAMILTON, LUNDGREN, McKENZIE & MICKLEBOROUGH, 2007). De qualquer forma, ressalta-se a importância de mais estudos esclarecendo o papel do treinamento físico sobre os parâmetros associados à capacidade tamponante extracelular, em específico, da expressão gênica e proteica da anidrase carbônica.

2.a.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acúmulo de íons H^+ no interior da célula muscular, gerando uma acidose muscular, é apontado como uma das principais causas da fadiga durante exercícios físicos de alta intensidade. Em virtude da curta duração dos exercícios de alta intensidade, as defesas dentro e próximas ao músculo esquelético contra o acúmulo de tais íons passam a ter fundamental importância para o desempenho físico-esportivo. Com isso, esta revisão se dedicou a caracterizar os sistemas de defesa responsáveis pelo tamponamento imediato dos íons H^+ , os mecanismos de ação destes sistemas e o efeito do treinamento físico sobre a atividade dos mesmos.

A partir do revisado, concluímos que os fosfatos, o bicarbonato e os aminoácidos/proteínas/dipeptídeos, bem como os transportadores de Na^+/H^+ e de lactato/ H^+ constituem predominantemente a linha de defesa do músculo esquelético contra o acúmulo de íons H^+ no sarcoplasma da célula muscular. Devido à pK_a destes compostos, os mesmos possuem a capacidade de aceitar os íons H^+ no sarcoplasma e serem protonados desta maneira, diminuindo a quantidade de íons H^+ livres, e contribuindo dessa maneira para um atraso no início da fadiga muscular durante os exercícios de alta intensidade. A magnitude da contribuição de alguns destes compostos para o tamponamento intracelular, tais como os fosfatos e o bicarbonato, ainda requer maiores esclarecimentos, sendo essa uma interessante avenida a ser trilhada. Nessa mesma linha, destaca-se a importância da realização de estudos melhor controlados examinando se o treinamento físico pode ter alguma influência sobre a modulação da expressão e da capacidade de alguns destes sistemas de defesa.

Já os transportadores NHE1 e MCT são responsáveis por contribuírem com o tamponamento dos íons H^+ "lançando-os" do meio intracelular para o meio extracelular, num fenômeno conhecido por "tamponamento dinâmico". Ambos os transportadores têm sua atividade significativamente aumentada conforme o gradiente intra/extracelular de íons H^+ aumenta. Além disso, a partir do revisado, é possível concluir que o treinamento físico possui efeitos positivos sobre a modulação da expressão e capacidade de ambos os transportadores.

Já no meio extracelular, embora os fosfatos e os resíduos de histidina presentes em proteínas plasmáticas exerçam um importante papel, sem dúvida, os

íons bicarbonato constituem a principal defesa sanguínea dada a capacidade destes íons em aceitarem os íons H^+ , diminuindo a concentração dos mesmos neste meio. Tal efeito contribui para o aumento do gradiente intra/extracelular de íons H^+ , assim, também contribuindo para um aumento do tamponamento dinâmico via NHE1 e MCT. Os efeitos do treinamento físico sobre a capacidade dos tampões químicos sanguíneos, entretanto, é um outro aspecto merecedor de atenção em estudos futuros.

2.b. METABOLISMO DA CARNOSINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO: DIGESTÃO, SÍNTESE E POTENCIAIS FUNÇÕES

Conforme mencionado anteriormente, o corpo humano, em específico, o músculo esquelético, possui alguns mecanismos de defesa bem postados contra o aparecimento e acúmulo de íons hidrogênio (H^+) que comumente ocorre durante exercícios de alta intensidade. A linha de defesa intracelular, isto é, a primeira linha de defesa contra o acúmulo de íons H^+ é composta por fosfatos, uma pequena parcela de bicarbonato e principalmente por resíduos de histidina presentes em peptídeos e proteínas. Apesar de cada um destes sistemas de defesa receberem a devida atenção quanto à sua atividade e relevância durante a realização de esforços de alta intensidade, o estudo do metabolismo e função da carnosina tem recebido especial destaque em anos recentes.

A carnosina (β -alanyl-L-Histidina), por sua vez, é um dipeptídeo citoplasmático encontrado em diversos tecidos excitáveis, tais como o cardíaco e o cerebral. Porém, é no músculo esquelético de animais vertebrados e invertebrados em que ele está presente em altas concentrações. Neste mesmo tecido, a carnosina é sintetizada a partir dos aminoácidos L-histidina e beta-alanina, em uma reação catalisada pela enzima carnosina-sintase (BAUER & SCHULZ, 1994).

Diversas ações fisiológicas têm sido associadas à carnosina no músculo esquelético, tais como antioxidante (BOLDYREV, KOLDOBSKI, KURELLA, MALTSEVA & STVOLINSKI, 1993), reguladora do cálcio e do acoplamento excitação-contração (LAMONT & MILLER, 1992), protetora de proteínas contra glicação agindo como um peptídeo-sacrifício (HIPKISS, MICHAELIS & SYRRIS, 1995) e na prevenção de ligações proteína-proteína reagindo com grupos proteína-carbonil (HIPKISS, 2000). Porém, sua função mais bem atribuída e indiscutível é a de tamponamento do pH (ABE, 2000).

E é especialmente devido à função tamponante da carnosina que este dipeptídeo tem recebido especial atenção no campo do esporte e fisiologia do exercício. Isso se deve ao fato da acidose muscular, isto é, o acúmulo de íons H^+ , ser apontado como uma das principais causas da fadiga muscular durante exercícios de alta intensidade (FITTS, 1994), já que o acúmulo destes íons teria a capacidade de interferir nos processo contráteis e de produção de energia

(FABIATO & FABIATO, 1978; SUTTON, JONES & TOEWS, 1981). Com isso, diversos estudos vêm surgindo na literatura ao longo dos últimos anos com o objetivo de investigar os efeitos ergogênicos de um conteúdo muscular aumentado de carnosina (SALE, ARTIOLI, GUALANO, SAUNDERS, HOBSON & HARRIS, 2013).

Apesar da destacada função tamponante, conforme mencionado, outras funções tem sido atribuídas à carnosina no músculo esquelético, as quais se destacam principalmente a função antioxidante e anti-glicante. Tais funções recebem especial destaque ao considerarmos alguns pontos. Dentre eles, foi demonstrado recentemente que o aumento da idade está associado com uma diminuição no conteúdo muscular de carnosina (EVERAERT, MOOYAART, BAGUET, ZUTINIC, BAELE, ACHTEN, TAES, DE HEER & DERAIVE, 2011;. BAGUET, EVERAERT, ACHTEN, THOMIS & DERAIVE, 2012). Seguindo este exemplo, estudos já verificaram que ocorre uma queda de 63% na concentração muscular de carnosina entre os 10 e os 70 anos de idade (STUERENBURG & KUNZE, 1999). Similarmente, estudos conduzidos com a denervação experimental do músculo esquelético, um procedimento comumente utilizado em modelos animais para simular acidentes ou doenças neuromusculares, mostraram que este procedimento resulta em uma diminuição acentuada do conteúdo muscular de dipeptídeos contendo histidina (TELEPNEVA, 1963). Estes dados são apoiados por estudos transversais em seres humanos, os quais já observaram uma diminuição das concentrações musculares de carnosina em pacientes com esclerose lateral amiotrófica (STUERENBURG, 2000), uma doença caracterizada pela degeneração de motoneurônios. Em adição, um estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostrou que pacientes diabéticos do tipo II possuem um conteúdo de carnosina diminuído no músculo gastrocnêmio quando comparados a indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade (GUALANO, EVERAERT, STEGEN, ARTIOLI, TAES, ROSCHEL, ACHTEN, OTADUY, JUNIOR, HARRIS & DERAIVE, 2011).

Uma diminuição das concentrações de carnosina com o aumento da idade ou em doenças neuromusculares poderia ser um fator causador de alterações estruturais e/ou de uma deterioração funcional no músculo esquelético mediante um declínio dos efeitos protetores antioxidantes e anti-glicantes deste dipeptídeo. Tais efeitos podem trabalhar em sinergia com mecanismos atroficos e patológicos específicos, o que abre margem para uma justificativa em também se estudar os

possíveis efeitos terapêuticos da carnosina. Os estudos investigando o potencial terapêutico da carnosina já foram iniciados. Contudo, a maior parte das evidências apresentando efeitos positivos de um conteúdo aumentado de carnosina muscular no combate e tratamento dos efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre o processo de envelhecimento e doenças neuromusculares provem de estudos com animais, ressaltando a importância do surgimento de testes clínicos em humanos (BOLDYREV, ALDINI & DERAIVE, 2013).

Mediante a importância e destaque que a carnosina tem recebido no campo das ciências do esporte e da medicina, a compreensão e entendimento da síntese, metabolismo e principais funções deste dipeptídeo são fundamentais para profissionais destas áreas, e portanto, serão os objetivos desta revisão.

2.b.1. DIGESTÃO, ABSORÇÃO, TRANSPORTE E SÍNTESE DA CARNOSINA NO TECIDO MUSCULAR

2.b.1.I. DIGESTÃO E ABSORÇÃO

Encontrada primordialmente na carne, a carnosina pode ser obtida pela dieta. Apesar disso, os dados referentes à concentração de carnosina em diferentes tipos de carne, bem como a influência de diferentes formas de cozimento sobre a concentração deste dipeptídeo são limitados.

A exemplo disto, por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC), a qual possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras (tais como amostras sanguíneas, de urina, e no caso, de tecido muscular), CARNEGIE, ILIC, ETHERIDGE & COLLINS (1983) observaram concentrações de 333 miligramas de carnosina a cada 100 gramas de bife de alcatra de vaca. Similarmente e utilizando-se da mesma técnica, PLOWMAN & CLOSE (1988) relataram concentrações de 341 miligramas de carnosina a cada 100 gramas de acém de vaca.

Concentrações ainda maiores deste dipeptídeo já foram observadas no músculo peitoral de frangos e de perus, chegando a alcançar valores aproximados de 1,2 e 1,0 gramas de carnosina a cada 100 gramas de tecido (JONES, SMITH & HARRIS, 2011). Por outro lado, nenhum destes estudos fornece justificativas teóricas para a escolha e análise dos músculos em questão ou informações de como as amostras de músculo foram adquiridas e armazenadas. Mais recentemente, PARK, VOLP & DECKER (2005) relataram concentrações de 124 miligramas de carnosina a cada 100 gramas de carne moída cru; interessante, os autores também mostraram neste mesmo estudo que o cozimento da carne moída até 74 °C não alterou significativamente a concentração tecidual de carnosina, sugerindo que altas temperaturas parecem não ser um fator limitante para a desnaturação deste dipeptídeo. Até onde se sabe, este é o único estudo na literatura a comparar a influência de diferentes formas de preparo da carne sobre o conteúdo tecidual de carnosina.

Uma vez ingerida através da dieta, similarmente aos outros peptídeos e aminoácidos, a digestão da carnosina ocorrerá no jejuno proximal, local em que seu transporte ocorrerá através das microvilosidades da membrana plasmática ou da chamada borda em escova (FRENHANI & BURINI, 1999) (ver Figura 5). O carreador PepT1 constitui o principal transportador responsável pela absorção intestinal de quaisquer di e tripeptídios, e apresenta maior afinidade por peptídios com cadeias laterais alifáticas e grandes (FEI, KANAI, NUSSBERGER, GANAPATHY, LEIBACH, ROMERO, SINGH, BORON & HEDGER, 1994). O mecanismo de transporte quantitativamente mais eficiente e predominante utilizado por tal carregador é o chamado transporte ativo (MATTHEWS & ADIBI, 1976), onde há o gasto de ATP para a execução deste processo.

Figura 5: Ilustração da via de digestão e absorção intestinal da carnosina e de seus aminoácidos constituintes.

Embora existam evidências indicando que o transporte de dipeptídios pelo PepT1 é tão eficiente que a sua absorção supera a sua hidrólise pelas peptidases da borda em escova (SLEISENGER & KIM, 1979), a carnosina parece ser a "exceção à regra", já que a enzima carnosinase, a qual é secretada pelo fígado e possivelmente pelo cérebro (TEUFEL, SAUDEK, LEDIG, BERNHARDT, BOULARAND, CARREAU, CAIRNS, CARTER, COWLEY, DUVERGER, GANZHORN, GUENET, HEINTZELMANN, LAUCHER, SAUVAGE & SMIRNOVA, 2003), e está presente no lúmen intestinal e no plasma sanguíneo, rapidamente hidrolisa o dipeptídeo em seus aminoácidos constituintes, a beta-alanina e a histidina (ASATOOR, BANDO, LANT, MILNE & NAVAB, 1969; ASATOOR, BANDO, LANT, MILNE & NAVAB, 1970). Por outro lado, também existem evidências, tanto em humanos (GARDNER, ILLINGWORTH, KELLEHER & WOOD, 1991; PARK, VOLP & DECKER, 2005) quanto em animais (MATTHEWS, ADDISON & BURSTON, 1974), sugerindo que a carnosina pode ser absorvida no intestino de forma intacta via PepT1, e que a biodisponibilidade deste dipeptídeo pode durar horas no sangue até que ele seja completamente hidrolisado. Tais evidências, entretanto, possuem grandes divergências metodológicas quanto à forma de administração de carnosina (forma sólida vs. solúvel) e de processamento das amostras (sob altas vs. baixas temperaturas), deixando a hipótese de que "a alta atividade da carnosinase presente no lúmen intestinal e no plasma hidrolisa completamente o dipeptídeo" como a mais bem aceita atualmente na literatura.

2.b.1.II. TRANSPORTE E SÍNTESE

Em virtude do que foi mencionado, mediante a rápida e completa hidrólise da carnosina pela enzima carnosinase, fica claro que a síntese de carnosina no tecido muscular é dependente da captação de seus aminoácidos constituintes pelo músculo esquelético, já que a histidina é um aminoácido essencial e a beta-alanina tem sua síntese endógena restrita aos hepatócitos (MATHEWS & TRAUT, 1987).

Enquanto o transporte da histidina para dentro da célula muscular ocorre via as isoformas 1 e 2 do transportador peptídeo/histidina (isto é, PHT1 e PHT2) e já é bem caracterizado (DANIEL & KOTTRA, 2004; EVERAERT, DE NAEYER, TAES & DERAIVE, 2013; SMITH, CLEMENÇON & HEDIGER, 2013), a captação de beta-alanina pelo músculo esquelético vem recebendo mais atenção. Nesse sentido, estudos conduzidos com cultura de células embrionárias do músculo esquelético de frangos já apresentaram a existência de um transporte estequiométrico de beta-alanina para dentro das células musculares envolvendo este aminoácido, cloreto e sódio, numa proporção 1:1:2, respectivamente (BAKARDJIEV & BAUER, 1994). A proteína responsável por este transporte, a TauT, também é responsável pelo transporte do aminoácido taurina para dentro das células musculares (ver Figura 6). Além da TauT, recentemente descobriu-se a existência de uma outra proteína também responsável pelo transporte da beta-alanina para dentro da célula muscular, a isoforma 1 do transportador de H⁺/aminoácidos (do inglês, *proton-assisted amino acid transporter 1* - PAT1), um transportador não-dependente de cloreto e sódio (ANDERSON, HOWARD, WALTERS, GANAPATHY & THWAITES, 2009). Apesar disso, devido ao fato de apenas a expressão gênica da TauT ser estimulada e inibida pelo tratamento com beta-alanina e pela orquidectomia, respectivamente, esta proteína tem sido apontada como o transportador dominante na captação de beta-alanina pelo músculo esquelético (EVERAERT, DE NAEYER, TAES & DERAIVE, 2013).

Figura 6: Ilustração da via de transporte e síntese da carnosina e de seus aminoácidos constituintes no músculo esquelético.

Uma vez captada e transportada para dentro da célula muscular, com a adição de Mg^{2+} e ATP, a beta-alanina se ligará à histidina e ambas serão condensadas em carnosina, numa reação catalisada pela enzima carnosina-sintase (KALYANKAR & MEISTER, 1959). Neste ponto, é importante ressaltar que a enzima carnosina-sintase exibe afinidade muito maior para a histidina do que para a beta-alanina. Prova disto é a sua constante de equilíbrio (chamada de Km), a qual possui um valor aproximado de 16,8 μM para a histidina (HORINISHI, GRILLO & MARGOLIS, 1978) e de 1 a 2,3 mM para a beta-alanina (NG & MARSHALL, 1978), apontando a necessidade de uma maior quantidade de beta-alanina para que a reação ocorra. Por outro lado, as concentrações plasmáticas e intramusculares de histidina são substancialmente superiores às concentrações de beta-alanina (DUNNETT & HARRIS, 1997). A exemplo, as concentrações plasmáticas de beta-alanina em jejum são menores do que 0,5 $\mu mol/L$ (HARRIS, DUNNETT & GREENHAFF, 1998). Consequentemente, tem sido proposto que o ponto limitante para a síntese de carnosina no músculo esquelético é a disponibilidade de beta-alanina para a célula muscular.

Investigando tal hipótese, Harris e colaboradores (2005), conduziram um elegante estudo de modo a investigar se o aumento da disponibilidade de beta-alanina, via suplementação, seria capaz de aumentar o conteúdo intramuscular de carnosina. Antes de avaliar os efeitos crônicos de tal intervenção, os autores conduziram um subestudo agudo de farmacocinética, de forma a avaliar o comportamento plasmático de três diferentes doses de beta-alanina (10, 20 e 40 miligramas por quilograma de peso corporal - mg/kg). Foi observado que todas as doses induziram um aumento significativo da concentração plasmática de beta-alanina, com uma notável dose-resposta. Entretanto, a maior dose (40 mg/kg), a qual resultou no maior pico de beta-alanina no sangue, esteve relacionada com sintomas intensos de parestesia (sintoma neurológico caracterizado pela sensação de “formigamento” da pele), os quais se iniciaram cerca de 20 minutos após a ingestão do aminoácido, e duraram cerca de 1 hora. A dose intermediária, de 20 mg/kg, também levou a sintomas semelhantes, porém muito menos intensos e até certo ponto suportáveis. Paralelamente, o pico sanguíneo de beta-alanina em resposta à dose intermediária também foi moderado. A dose de 10 mg/kg produziu o menor pico de beta-alanina no sangue. Apesar disso, nenhum efeito colateral foi relatado, indicando que esta é a dose máxima tolerável.

Após os resultados do subestudo de farmacocinética, em um outro subestudo, os autores investigaram os efeitos crônicos (4 semanas) da dose máxima tolerável (10 mg/kg) sobre o conteúdo muscular de carnosina (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2005). Neste subestudo, os autores dividiram os participantes em I) um grupo suplementado com placebo; II) um grupo suplementado com a dose máxima tolerável numa baixa frequência diária de administração (4 vezes por dia, totalizando aproximadamente 3.2 gramas de beta-alanina por dia - g/d); e III) um grupo suplementado com a dose máxima tolerável numa alta frequência diária de administração (8 vezes por dia, totalizando aproximadamente 6.4 g/d). Em resumo, os resultados mostraram que ambos protocolos foram efetivos no aumento da concentração intramuscular de carnosina. Porém, o esquema de maior dose total diária tendeu a ser mais efetivo do que o de menor dose total diária (aumento de aproximadamente 60% e 40%, respectivamente, no conteúdo muscular de carnosina). Igualmente importante, os autores também demonstraram que nenhuma das doses induziu qualquer efeito

colateral sobre a saúde, avaliada através de marcadores bioquímicos e hematológicos no sangue.

O aumento de carnosina muscular com as doses acima mencionadas tem sido frequentemente confirmado em estudos subsequentes ao de Harris e colaboradores (2005) (para revisões sobre o assunto, ver ARTIOLI, GUALANO, SMITH, STOUT & LANCHI Jr, 2010; DERAIVE, EVERAERT, BEECKMAN & BAGUET, 2010; SALE, ARTIOLI, GUALANO, SAUNDERS, HOBSON & HARRIS, 2013). Por exemplo, HILL, HARRIS, KIM, HARRIS, SALE, BOOBIS, KIM & WISE (2007) demonstraram aumentos de 60 a 80% no conteúdo muscular de carnosina após a administração de 6.4 g/d de beta-alanina durante 4 e 10 semanas, respectivamente. Além de confirmar os resultados de HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE (2005), estes dados também sugerem uma possível dose-resposta para o aumento de carnosina muscular em virtude da quantidade total de beta-alanina ingerida ao longo do tempo. Estudos futuros são necessários para investigar a veracidade desta hipótese, bem como a sua segurança.

Por fim, a literatura ainda não chegou a um consenso quanto ao exato período de *washout* (ou "limpeza") da carnosina após o término da suplementação de beta-alanina. Atualmente, apenas 2 estudos se dedicaram a investigar este assunto. Interessantemente, ambos os estudos se utilizaram da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para a avaliação do conteúdo muscular de carnosina. A vantagem no uso desta técnica reside no fato da mesma não ser invasiva, eliminando qualquer risco ou desconforto associados à biópsia muscular, utilizada atualmente como método padrão-ouro para a mensuração de carnosina muscular. Apesar desta vantagem, não há dados consistentes na literatura sobre a reprodutibilidade da ressonância magnética, tampouco sobre a sua acurácia na quantificação da carnosina muscular, ressaltando a atual carência na literatura de um estudo que valide a ressonância magnética como método para a mensuração de carnosina muscular.

Mesmo em vista desta limitação, BAGUET, REYNGOUDT, POTTIER, EVERAERT, CALLENS, ACHTEN & DERAIVE (2009) recrutaram homens fisicamente ativos e os submeteram a um regime de 5 a 6 semanas de suplementação de 4,8 g/d de beta-alanina ou placebo. Imediatamente antes e após a suplementação, e 9 semanas após o término da suplementação, os participantes

foram submetidos à ressonância magnética para a avaliação do conteúdo muscular de carnosina nos músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial anterior. Como principais resultados, em comparação ao conteúdo inicial nestes 3 músculos, os autores observaram aumentos de 39, 23 e 27% no conteúdo muscular de carnosina, respectivamente. Além disso, após as 9 semanas do término da suplementação, os autores observaram que as concentrações de carnosina nestes músculos retornaram a valores muito próximos dos valores basais, num índice de declínio de 2 a 4% por semana.

Num estudo subsequente e com objetivos semelhantes, STELLINGWERFF, ANWANDER, EGGER, BUEHLER, KREIS, DECOMBAZ & BOESCH (2012) avaliaram os efeitos de 2 protocolos diferentes de suplementação de beta-alanina sobre o conteúdo muscular de carnosina e *washout* da mesma 8 semanas após o término da suplementação. Para este propósito, 30 participantes fisicamente ativos foram recrutados e designados a um de três grupos: Grupo Placebo, Grupo Dose-Alta (3,2 g/dia durante 4 semanas; 1,6 g/d durante as 4 semanas seguintes) e Grupo Dose-Baixa (1,6 g/dia durante 4 semanas; 1,6 g/d durante as 4 semanas seguintes). Imediatamente antes e após as 8 semanas de suplementação, bem como 8 semanas após o término da suplementação, o conteúdo muscular de carnosina foi avaliado nos músculos gastrocnêmio e tibial anterior por meio da ressonância magnética. Similarmente ao estudo anterior, os autores observaram que a dose-alta e a dose-baixa proporcionaram aumentos de 21,9 e 30,3% no conteúdo de carnosina do músculo tibial anterior, respectivamente; além disso, ambos os protocolos de suplementação induziram aumentos de 35,5 e 44,5% na concentração de carnosina no músculo gastrocnêmio, respectivamente. Adicionalmente, após o cessamento da suplementação, a taxa de declínio da carnosina muscular para ambos os músculos avaliados foi de 2 a 3% por semana.

Apesar desta taxa de declínio da carnosina muscular ser semelhante à observada no estudo anterior (BAGUET, REYNGOUDT, POTTIER, EVERAERT, CALLENS, ACHTEN & DERAIVE, 2009), após as 8 semanas de interrupção da suplementação, os níveis de carnosina muscular ainda permaneceram com aproximadamente 40% do aumento induzido pela suplementação, sugerindo que o tempo para o completo *washout* da carnosina muscular estaria por volta de 15 a 20 semanas após o término da suplementação. Até hoje o real motivo para a divergência de resultados entre estes estudos permanece obscura, dado que ambos

administraram quantidades totais de beta-alanina semelhantes durante o período de suplementação, apesar dos protocolos diferentes. Pressupor-se-ia que a ausência de conhecimento sobre os dados de reprodutibilidade e acurácia da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio possa ser um fator causando confusão e divergência neste sentido, ressaltando novamente a importância e necessidade de estudos investigando a validade desta técnica, bem como o exato período de *washout* da carnosina muscular e os fatores que podem alterá-lo.

2.b.2. POTENCIAIS FUNÇÕES DA CARNOSINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

2.b.2.I. TAMPONANTE

Experimentos iniciais investigando os potenciais papéis fisiológicos da carnosina demonstraram que quando ela se encontrava em grandes concentrações em amostras isoladas do músculo sartório de sapos, estas amostras de músculo se tornavam mais resistentes à fadiga quando estimuladas eletricamente (SEVERIN, KIRZON & KAFTANOVA, 1953). Tais resultados levaram alguns autores a crer que a carnosina pudesse ter um papel relacionado ao sistema fosfagênio, atuando como um doador de fosfato para a resíntese de ATP durante as contrações musculares (GOODALL, 1956). Entretanto, nunca foi detectada uma forma fosforilada da carnosina (CAIN, DELLUVA & DAVIES, 1958) ou uma enzima responsável por sua clivagem dentro do músculo esquelético (CAIN, INFANTE & DAVIES, 1962), fazendo com que este possível mecanismo de ação perdesse sua força.

Alguns anos depois, estudos conduzidos com a técnica de ressonância magnética nuclear demonstraram que a carnosina era constituída por 3 grupos ionizáveis: um grupo carboxílico, um grupo amina e uma cadeia lateral (esta última, conhecida como anel imidazol) (TANOKURA, TASUMI & MIYAZAWA, 1976; ASHIKAWA & ITOH, 1979). Tais estudos mostraram que estes grupos possuem valores de pKa de 2.77, 9.66 e 6.83, respectivamente. A pKa, por sua vez, é a constante de dissociação de ácidos e é ideal quando cai em valores próximos ou dentro da variação fisiológica do pH muscular (6.5 - 7.1). De todas as cadeias laterais de todos aminoácidos e proteínas, apenas o anel imidazol da histidina possui valor de pKa (6.1) próximo da variação fisiológica do pH muscular, já permitindo este aminoácido atuar como um tampão intramuscular. Porém, a condensação de histidina com o aminoácido beta-alanina leva à já conhecida formação de carnosina, e conforme mencionado acima, o valor de pKa de seu anel imidazol é elevado para 6.83, tornando a carnosina um tampão ainda melhor dentro da variação fisiológica do pH muscular. Dessa forma, o tamponamento do pH vem sendo a mais bem atribuída e indiscutível função da carnosina, pelo menos no que diz respeito ao tecido muscular (ARTIOLI, GUALANO, SMITH, STOUT & LANCH

JR, 2010). Nos outros tecidos onde a carnosina se encontra, a confirmação de sua função tamponante ainda carece de maiores investigações.

Estudos transversais têm apoiado indiretamente o potencial papel da carnosina como tampão intracelular. Especificamente, tem sido observado que as espécies animais que possuem as maiores concentrações intramusculares deste dipeptídeo são 1) aquelas que dependem do metabolismo anaeróbio para a sobrevivência, seja para a caça ou para a fuga; e 2) aquelas cujos músculos são expostos a frequentes situações de hipóxia, como as baleias (ABE, 2000). Uma outra importante evidência apoiando o papel da carnosina como tampão intracelular é a predominância deste dipeptídeo em fibras musculares do tipo II, as chamadas "fibras glicolíticas", quando comparadas às fibras do tipo I. No músculo de equinos, por exemplo, DUNNETT & HARRIS (1997) observaram valores médios de carnosina nas fibras do tipo I, IIa e IIb de 27.27 ± 5.89 , 89.69 ± 10.27 e 96.62 ± 12.93 mmol/kg de músculo seco, respectivamente. Uma distribuição similar da carnosina tem sido observada em humanos onívoros, os quais consomem carnosina por meio da dieta. Provenientemente de biópsias musculares do músculo vasto lateral, HARRIS, DUNNETT & GREENHAFF (1998) relataram que o conteúdo muscular de carnosina em fibras musculares do tipo II é aproximadamente o dobro do conteúdo deste dipeptídeo em fibras do tipo I nesta população (23.2 vs. 10.5 mmol/kg de músculo seco).

Conforme já discutido, a função tamponante da carnosina passa a ter especial importância durante esforços de alta intensidade, onde a acidose muscular é um fator limitante para o desempenho físico (FITTS, 1994), de forma que diversos estudos já surgiram na literatura com o intuito de avaliar os efeitos ergogênicos de um conteúdo muscular de carnosina aumentado (SALE, ARTIOLI, GUALANO, SAUNDERS, HOBSON & HARRIS, 2013). Apesar dos recentes avanços no conhecimento sobre este dipeptídeo e de sua função tamponante tida como indiscutível, não existem estudos que tenham avaliado a influência de um conteúdo muscular elevado de carnosina sobre o comportamento do pH muscular durante ou após um exercício físico intenso.

2.b.2.II. ANTIOXIDANTE

Existem diversos estudos que mostram que a carnosina pode ter outras funções importantes nos tecidos excitáveis, tais como o músculo esquelético e o cérebro, além de atuar no equilíbrio ácido-básico, agindo por exemplo como um poderoso agente antioxidante. BOLDYREV, DUPIN, PINDEL & SEVERIN (1988) foram os primeiros a relatar que a carnosina possui propriedades de proteção à membrana plasmática. Especificamente, os autores demonstraram que a carnosina pode diminuir as taxas de peroxidação lipídica da membrana, conforme determinado pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os mecanismos pelos quais a carnosina pode contribuir para a defesa contra o estresse oxidativo podem incluir uma interação direta com as espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, tem sido demonstrado que, em concentrações fisiológicas no músculo, a carnosina pode interagir e sequestrar os radicais peroxil (KOHEN, YAMAMOTO, CUNDY & AMES, 1988) e os ânions superóxido (PAVLOV, REVINA, DUPIN, BOLDYREV & YAROPOLOV, 1993). Além disso, tem sido demonstrado que o 4-hidroxinonenal (HNE) e o malonildialdeído (MDA), os quais são compostos carbonil tóxicos gerados pela interação das espécies reativas de oxigênio com os ácidos graxos poliinsaturados, são "desintoxicados" pela carnosina através da formação do aduto de Michael (Figura 7), que envolve o grupo amino primário do aminoácido beta-alanina da carnosina, ou através dos resíduos de histidina, os quais poderiam reagir com os compostos carbonil do HNE e do MDA para formar compostos diméricos (HIPKISS, 2000; ALDINI, CARINI, BERETTA, BRADAMANTE & FACINO, 2002).

Figura 7: Desintoxicação do 4-hydroxy-*trans*-2,3-nonenal (HNE) pela carnosina através da formação do aduto de Michael.

A carnosina também podem exercer sua ação antioxidante através da quelação de metais (KOHEN, YAMAMOTO, CUNDY & AMES, 1988). Tem sido demonstrado que a carnosina e os seus análogos são eficientes agentes queladores do cobre e de outros metais de transição (KANG, KIM, CHOI, KWON, WON & KANG, 2002). Tal ação passa a ter considerável relevância ao considerarmos que o músculo esquelético humano contém um terço do cobre total no corpo. Assim, a quelação de cobre pode ter sua relevância biológica destacada ao considerarmos que os metais de transição são conhecidos por promover a produção de radicais livres, tais como a formação de radicais hidroxila através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (KANG, KIM, CHOI, KWON, WON & KANG, 2002) (Figura 8).

Figura 8: Atenuação da produção de radicais hidroxila pela carnosina nas reações de Fenton e de Haber-Weiss.

Sem dúvida, os efeitos antioxidantes da carnosina acima mencionados causam empolgação devido à possibilidade da aplicação terapêutica deste dipeptídeo em doenças neuromusculares as quais possuem o estresse oxidativo como "gatilho" complicador. Por outro lado, é importante exercer cautela nesse sentido considerando-se que a maior parte das evidências demonstrando o potencial antioxidante da carnosina provem de estudos conduzidos em culturas de células, ressaltando a necessidade de estudos na literatura que mensurem as propriedades antioxidantes deste dipeptídeo no músculo esquelético de humanos.

2.b.2.III. REGULADORA DA LIBERAÇÃO E SENSIBILIDADE DO CÁLCIO NO APARATO CONTRÁTIL

Embora não tenha sido mencionada anteriormente em qualquer ponto desta revisão, a possibilidade da carnosina também atuar como reguladora da sensibilidade do íon cálcio no aparato contrátil tem recebido atenção em anos recentes.

As primeiras evidências de que a carnosina poderia regular as concentrações de cálcio no sarcoplasma vieram de estudos *in vitro* (BATRUKOVA & RUBTSOV, 1997). Especificamente, os autores mostraram que o aumento de carnosina no meio de cultura de células do músculo esquelético de coelhos potencializava a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, o que se dava pela ativação dos canais de liberação de cálcio do receptor de Rianodina. Interessantemente, neste mesmo estudo, o mesmo efeito de potencialização da liberação de cálcio não foi induzido pela beta-alanina ou pela L-histidina, indicando que apenas a carnosina, e não seus aminoácidos constituintes, são capazes de potencializar a liberação de cálcio (BATRUKOVA & RUBTSOV, 1997). Evidências semelhantes deste efeito potencializador da carnosina na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático também já foram demonstradas em um estudo com fibras musculares isoladas provenientes do músculo vasto lateral de humanos (ZAPATA-SUDO, SUDO, LIN & NELSON, 1997). Anos depois, tais resultados, entretanto, não foram igualmente observados em fibras musculares isoladas de ratos (DUTKA & LAMB, 2004). Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa apresentou resultados contraditórios ao seu estudo inicial. Utilizando-se de fibras musculares isoladas do vasto lateral de humanos, os autores demonstraram que, em concentrações fisiológicas, a carnosina pode proporcionar a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático em fibras do tipo I, mas não em fibras do tipo II (DUTKA, LAMBOLEY, MCKENNA, MURPHY & LAMB, 2012).

Embora o papel da carnosina em potencializar a liberação de íons cálcio dos retículos sarcoplasmáticos seja controverso, parece haver algum consenso de que a carnosina pode aumentar a sensibilidade dos íons cálcio no aparato contrátil. Nesse sentido, DUTKA & LAMB (2004) demonstraram que concentrações fisiológicas de

carnosina (4-16 mM) podem melhorar a sensibilidade dos íons cálcio ao aparato contrátil em fibras musculares do músculo extensor longo dos dedos (EDL) em ratos, e que esta sensibilidade ocorre de uma forma dose-dependente, confirmando trabalhos anteriores de LAMONT & MILLER (1992) sobre o músculo sartório de sapos. Mais recentemente, tais observações também foram confirmadas em fibras musculares isoladas do músculo vasto lateral de humanos (DUTKA, LAMBOLEY, MCKENNA, MURPHY & LAMB, 2012).

É bem estabelecido que alterações na liberação ou recaptção dos íons cálcio pelo retículo sarcoplasmático durante a contração muscular têm impacto sobre o desempenho mecânico contrátil e sobre o desenvolvimento da fadiga muscular (LAMB, 2002). Em músculos fadigados, existe uma estreita relação entre o declínio da força e o declínio das concentrações sarcoplasmáticas de íons cálcio (FAVERO, PESSAH & KLUG, 1993). À medida que a concentração de cálcio diminui, há diminuição da interação deste íon com o seu sítio de ligação na troponina, resultando em um decréscimo do número de pontes cruzadas actina-miosina, e portanto, levando à incapacidade da maquinaria contrátil de operar efetivamente. Como consequência, observa-se redução na produção de força durante as contrações, e o músculo começa a entrar em fadiga (FITTS, 1994). Com isso, poder-se-ia especular que os efeitos ergogênicos provenientes de um conteúdo aumentado de carnosina muscular também poderiam ser atribuídos aos efeitos da carnosina sobre a liberação de íons cálcio no retículo sarcoplasmático e à sensibilidade deste íon no aparato contrátil.

Embora tal hipótese seja tentadora de ser aceita, a mesma necessita de maiores investigações para confirmá-la ao considerarmos alguns pontos. O primeiro deles: se o efeito sobre a liberação e sensibilidade do íon cálcio representa o principal mecanismo de ação da carnosina, esperar-se-ia efeitos ergogênicos de um conteúdo aumentado de carnosina muscular sobre uma vasta gama de tarefas e exercícios físicos; contrariamente a esta ideia, uma recente revisão quantitativa dos estudos nesse sentido até então disponíveis usando a meta-análise mostrou que os exercícios de alta intensidade com duração de 60 a 240 segundos parecem ser os esforços exclusivamente beneficiados com concentrações musculares aumentadas de carnosina (HOBSON, SAUNDERS, BALL, HARRIS & SALE, 2012). Em segundo lugar, conforme já discutido, sabe-se que os íons H^+ produzidos durante esforços de alta intensidade podem competir com os íons cálcio pelo sítio de ligação da

troponina, limitando a capacidade da maquinaria contrátil do músculo esquelético em operar efetivamente (DONALDSON, HERMANSEN & BOLLES, 1978). Assim, é possível que qualquer melhora no manejo dos íons cálcio no músculo esquelético pode ocorrer subsequentemente ao efeito tamponante da carnosina, ou seja, devido a um efeito indireto. Por fim, e talvez mais importante, o mecanismo bioquímico o qual explica como um elevado conteúdo de carnosina muscular intermedeia uma melhora no manejo dos íons cálcio ainda necessita ser esclarecido.

2.b.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao crescente interesse no dipeptídeo carnosina, um número excessivo de estudos vem sendo publicado na literatura investigando o metabolismo, os mecanismos de ação e os potenciais efeitos ergogênicos e terapêuticos deste dipeptídeo.

Os resultados até agora disponibilizados desvendam grande parte do comportamento do metabolismo da carnosina no músculo esquelético, bem como da digestão, absorção, transporte e síntese deste dipeptídeo. A maioria das evidências nesse sentido, entretanto, provem de estudos em cultura de células ou em modelos animais, ressaltando a necessidade de pesquisas investigando e englobando todos aspectos acima mencionados em humanos.

Além disso, esta mesma necessidade pode ser estendida para estudos investigando as potenciais funções da carnosina no músculo esquelético. O valor de pK_a da carnosina indica a obrigatoriedade deste dipeptídeo em atuar como um tampão dentro da variação fisiológica do pH. Sua possível ação como antioxidante certamente é vista com bons olhos sob um ponto de vista terapêutico. No entanto, testes clínicos em humanos são necessários para apoiar ou refutar esta função. Apesar da sua possível função como reguladora da liberação e sensibilidade do íon cálcio no aparelho contrátil receber especial atenção em anos recentes, é possível que este seja um efeito secundário à sua função tamponante.

Embora os resultados até agora produzidos indiquem que a carnosina pode ser um nutriente útil e importante, ainda há muito trabalho a ser feito estudando os efeitos ergogênicos e os potenciais efeitos terapêuticos deste enigmático dipeptídeo.

2.c. CARNOSINA MUSCULAR: UMA DEFESA ADAPTATIVA OU UMA ESTIMATIVA DE TALENTO? - EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO

Ao longo dos tópicos anteriormente mencionados, foi extensivamente discutido e deixado em evidência a importância do corpo possuir mecanismos bem regulados de manutenção do pH intra e extracelular dentro dos valores fisiológicos, dado que oscilações bruscas nesta variável podem levar ao comprometimento de diversas funções vitais no organismo (JUEL, 2008). A exemplo disto, durante o exercício físico de alta intensidade, sabe-se que tais alterações podem levar à piora/interrupção dos processos contráteis e de produção de energia, logo, à perda de desempenho durante este tipo de atividade, isto é, à fadiga (SAHLIN, 1992; FINSTERER, 2012).

Mediante estas alterações nos níveis de pH muscular e à alta demanda energética requerida para a contração muscular durante exercícios de alta intensidade, fica óbvia a impossibilidade da manutenção desta intensidade elevada por longos períodos de tempo. Devido a esta imediata importância em se exercer a regulação do pH muscular num curto espaço de tempo, é esperado que as principais defesas contra as alterações do pH muscular necessariamente estejam no interior da célula muscular. Dentre estas defesas, especial atenção tem sido dada à carnosina nos últimos anos.

A carnosina é um dipeptídeo citoplasmático, sintetizado a partir dos aminoácidos beta-alanina e histidina. Apesar de ambos os aminoácidos serem fundamentais para que a síntese muscular de carnosina ocorra, a beta-alanina é apontada como o fator limitante para o processo de síntese do dipeptídeo neste tecido (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006). Diversas funções já foram atribuídas à carnosina no músculo esquelético, atuando como agente antioxidante (BOLDYREV, KOLDOBSKI, KURELLA, MALTSEVA & STVOLINSKI, 1993), anti-glicante (REDDY, GARRETT, PERRY & SMITH, 2005) e regulador no acoplamento excitação-contração (DUTKA, LAMBOLEY, MCKENNA, MURPHY & LAMB, 2012). Contudo, devido ao fato da sua cadeia lateral possuir uma pKa de 6.83, a função mais bem atribuída à carnosina é a

de agente regulador do equilíbrio ácido-base, isto é, tamponante (TANOKURA, TASUMI & MIYAZAWA, 1976; SALE, ARTIOLI, GUALANO, SAUNDERS, HOBSON, HARRIS, 2013).

Diversos estudos transversais têm apoiado o potencial papel da carnosina como agente regulador do equilíbrio ácido-base. Especificamente, tem sido observado que as espécies animais que possuem maiores concentrações intramusculares deste dipeptídeo são 1) aquelas que dependem do metabolismo anaeróbico para a sobrevivência, seja para a caça ou para a fuga; e 2) aquelas cujos músculos são expostos a frequentes situações de hipóxia (condição que sabidamente resulta em acidose intramuscular), como as baleias (ABE, 2000). A exemplo do mencionado, a concentração muscular de carnosina no músculo esquelético de cães de caça, animais acostumados a realizar *sprints* de alta intensidade e curta duração, é de aproximadamente 33.0 $\mu\text{mol/g}$ de músculo seco (HARRIS, MARLIN, DUNNETT, SNOW & HULTMAN, 1990), enquanto a concentração deste dipeptídeo no músculo bíceps femoral de porcos, os quais não estão acostumados a fazer movimentos de grandes intensidades, é de aproximadamente 15.4 $\mu\text{mol/g}$ de músculo seco (OKUMA & ABE, 1992). As baleias-de-minke, mamíferos acostumados a passar longos períodos em hipóxia, possuem concentrações de carnosina muscular de aproximadamente 68.5 $\mu\text{mol/g}$ de músculo seco (KOOYMAN, CASTELLINE & DAVIS, 1981). Já os humanos, considerados uma espécie 'sedentária', possuem concentrações de carnosina no músculo vasto lateral que podem variar entre mulheres e homens de 17.5 ± 4.8 até 21.3 ± 4.2 $\mu\text{mol/g}$ de músculo seco, respectivamente (MANNION, JAKEMAN, DUNNETT, HARRIS & WILLAN, 1992). Todos estes dados apoiam, de certa forma, o papel tamponante da carnosina e indicam que as elevadas concentrações deste dipeptídeo encontradas no músculo esquelético de algumas espécies podem significar uma adaptação ao metabolismo glicolítico requerido para as atividades de sobrevivência destas espécies.

Também apoiando a regulação do equilíbrio ácido-base como a principal função da carnosina muscular, estudos já demonstraram que as concentrações deste dipeptídeo são 2 a 3 vezes maiores em fibras musculares do tipo II comparadas às do tipo I. No músculo glúteo médio de camelos, por exemplo, DUNNETT & HARRIS (1997) observaram valores médios de carnosina nas fibras do tipo I, IIa e IIb de 27 ± 6 , 90 ± 10 e 97 ± 13 mmol/kg de músculo seco,

respectivamente. Similarmente, ao avaliar o conteúdo de carnosina por tipo de fibra muscular, SEWELL, HARRIS, MARLIN & DUNNETT (1992) observaram concentrações médias nas fibras do tipo I, IIa e IIb de 54 ± 15 , 85 ± 15 e 180 ± 15 $\mu\text{mol/g}$ de músculo seco, respectivamente, no músculo glúteo médio de cavalos 'puro-sangue' ingleses. Em humanos, estudos com biópsia do músculo vasto lateral mostraram que o conteúdo de carnosina em fibras do tipo II é aproximadamente o dobro do conteúdo deste dipeptídeo em fibras do tipo I (23.2 vs. 10.5 mmol/kg de músculo seco) (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006). Sabe-se que o metabolismo predominante em fibras musculares do tipo II é o glicolítico. Com isso, as elevadas concentrações de carnosina observadas nestas fibras em comparação às fibras do tipo I também apoiam o papel tamponante da carnosina e podem significar uma adaptação deste dipeptídeo ao metabolismo predominante em fibras do tipo II.

Incentivados por esses resultados, e ainda buscando apoiar a hipótese de ação tamponante da carnosina, estudos transversais têm mostrado que atletas bem treinados engajados em atividades de alta intensidade, tais como remadores e corredores velocistas, possuem maior conteúdo muscular de carnosina comparados à corredores maratonistas e indivíduos destreinados (PARKHOUSE, MCKENZIE, HOCHACHKA & OVALLE, 1985). Adicionalmente, KIM, KIM, HARRIS, HARRIS, SALE & WISE (2006) relataram concentrações musculares de carnosina de aproximadamente 34 mmol/kg de músculo seco em patinadores velocistas. Além disso, foi demonstrado que fisiculturistas possuem as maiores concentrações musculares de carnosina observadas na população humana (TALLON, HARRIS, BOOBIS, FALLOWFIELD & WISE, 2005), com valores individuais chegando a alcançar 50.87 mmol/kg de músculo seco. Tais estudos novamente apoiam a ação tampão da carnosina e sugerem que o treinamento físico a longo prazo seja capaz de promover um aumento do conteúdo intramuscular de carnosina.

Com isso, a necessidade da realização de estudos longitudinais investigando a veracidade desta hipótese ganhou extrema importância e atenção no campo da fisiologia do exercício (para um resumo destes estudos, ver Tabela 1). Ao que a literatura indica, MANNION, JAKEMAN & WILLAN (1994) foram os primeiros a avaliar se o treinamento físico seria capaz de aumentar o conteúdo muscular de carnosina. Os autores recrutaram 33 homens fisicamente ativos e os randomizaram em 3 diferentes grupos experimentais: 1) um grupo que teve a musculatura do

quadríceps femoral isocineticamente treinada a uma velocidade de 4.19 radianos por segundo; 2) um outro grupo que teve esta mesma musculatura treinada a 1.05 radianos por segundo; 3) ou um grupo controle, o qual não executou qualquer treinamento. O treinamento físico foi realizado 3 vezes por semana, durante 16 semanas. Antes e após o período experimental, os participantes foram submetidos ao procedimento de biópsia muscular do vasto lateral, para a avaliação da capacidade tamponante e da carnosina musculares. Além disso, nestes mesmos pontos no tempo, foram mensuradas a potência média e trabalho total por meio de um teste *all-out* realizado em cicloergômetro. Como principais resultados, ambos os grupos treinados melhoraram a potência média e o trabalho total no teste em cicloergômetro em comparação ao período pré-treino e ao grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos treinados. Porém, não foram observados aumentos significantes na carnosina ou na capacidade tamponante muscular com o treinamento físico. Estes resultados contrariam os resultados apresentados pelos estudos transversais e indicam que o treinamento físico não tem a capacidade de modular as concentrações musculares de carnosina. Por outro lado, dado que o protocolo de treinamento executado não induziu alterações na capacidade tamponante muscular, e sendo o tamponamento a principal função da carnosina, especular-se-ia que a intensidade aplicada durante o treinamento pode não ter sido apropriada o suficiente para induzir alterações significantes na carnosina muscular.

Tabela 2: Sumário dos estudos investigando os efeitos do treinamento físico sobre o conteúdo muscular de carnosina.

Referência	Amostra / Perfil	Natureza do treino	Duração do treino	Resultado
Mannion et al. (1994)	33 homens jovens / fisicamente ativos	Isocinético	16 semanas	Sem alterações
Suzuki et al. (2004)	6 homens jovens / sedentários	Intermitente	8 semanas	~100% de aumento
Kendrick et al. (2008)	26 homens jovens / fisicamente ativos	Força	10 semanas	Sem alterações
Kendrick et al. (2009)	14 homens jovens / fisicamente ativos	Isocinético	4 semanas	Sem alterações
Baguet et al. (2011)	20 homens jovens / fisicamente ativos	Intermitente	5 semanas	Sem alterações
Edge et al. (2013)	12 mulheres jovens / fisicamente ativas	Intermitente	5 semanas	Sem alterações

Subsequentemente, SUZUKI, ITO, TAKAHASHI & TAKAMATSU (2004) recrutaram 6 homens jovens e sedentários, e os submeteram a um período de treinamento de 8 semanas. As sessões de treino consistiam da execução de 3 séries de 30 segundos em cicloergômetro, e eram realizadas 2 vezes por semana; totalizando 48 séries no estudo ou 24 minutos de exercício. Antes e após o período de treino, os participantes foram submetidos a um teste de Wingate, para avaliação da potência média, e a uma biópsia do músculo vasto lateral, para avaliação da carnosina muscular. Em comparação ao período pré-treino, os autores observaram um significativo aumento da potência média no teste de Wingate. Em adição, os autores demonstraram um surpreendente aumento de cerca de 100% no conteúdo

intramuscular de carnosina, com a média dos valores pós-treino atingindo 47.4 mmol/kg de músculo seco.

Embora o estudo de SUZUKI e colaboradores (2004) seja o primeiro estudo na literatura a demonstrar um efeito positivo do treinamento físico sobre a modulação do conteúdo muscular, os valores de carnosina pós-treino encontrados pelos autores são tão altos quanto os valores observados por TALLON, HARRIS, BOOBIS, FALLOWFIELD & WISE et al. (2005) em fisiculturistas, causando dificuldade na crença em tais resultados considerando o baixo volume de exercício empregado ao longo do período de treino. Considerando que a dieta japonesa é bastante rica em dipeptídeos contendo histidina (JONES, SMITH & HARRIS, 2011), é possível que os participantes tenham aumentado substancialmente o consumo alimentar de tais compostos durante o período de treino. Além disso, mediante a pobre descrição da metodologia utilizada para a mensuração de carnosina muscular no artigo em questão, não se pode excluir a possibilidade de que os autores tenham cometido erros na análise das amostras.

Um outro estudo a investigar esta mesma temática foi conduzido por KENDRICK e colaboradores (KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE, 2008). Os autores submeteram estudantes de educação física a 10 semanas de treinamento de força, conduzido 4 vezes por semana. Antes e após o período de treinamento, biópsias do músculo vasto lateral foram realizadas para a avaliação da concentração intramuscular de carnosina. Em concordância com os resultados de MANNION, JAKEMAN & WILLAN (1994), não foram observadas alterações significantes da carnosina muscular após o período de treinamento. Contudo, apesar da alta frequência semanal de treino aplicada no estudo, dos 4 dias semanais de treino, apenas 2 foram destinados ao treinamento da musculatura do quadríceps, grupamento muscular onde a carnosina foi avaliada. Ainda, a intensidade aplicada pelos autores permitia aos voluntários realizar 2 a 3 séries de 10 a 20 repetições, caracterizando um baixo volume e intensidade do treino, e portanto, inapropriados para gerarem potenciais adaptações na carnosina muscular.

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisa conduziu um outro estudo com objetivos similares, mas alterando a natureza do treinamento empregado (KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE, 2009). Neste estudo, 14 estudantes de educação física foram recrutados e submetidos a um programa de treinamento isocinético com duração de 4 semanas. Interessantemente, os autores

adotaram um desenho experimental onde apenas uma das pernas dos participantes realizava o treinamento no dinamômetro isocinético, enquanto a perna contralateral permanecia sem treinar e era utilizada como controle. Cada sessão de treino consistia na realização de 10 séries de 10 extensões de joelho máximas a 180° por segundo, com 1 minuto de descanso entre as séries. Nas duas primeiras semanas do período de treinamento eram realizadas 3 sessões por semana, enquanto nas duas semanas seguintes eram realizadas 4 sessões por semana. Os participantes foram submetidos ao procedimento de biópsia do músculo vasto lateral antes e após o período de treinamento para a avaliação dos níveis musculares de carnosina. Com o intuito de aumentar a sensibilidade da análise, além da avaliação da carnosina no "músculo inteiro", os autores ainda realizaram a análise de carnosina por tipo de fibra muscular. Apesar disso, não foram verificadas quaisquer alterações significantes no conteúdo de carnosina, tanto no "músculo inteiro" quanto nas fibras musculares isoladas.

Por fim, o estudo longitudinal mais recente com o objetivo de investigar os efeitos do treinamento físico sobre o conteúdo muscular de carnosina foi conduzido por BAGUET, EVERAERT, DE NAEYER, REYNGOUDT, STEGEN, BEECKMAN, ACHTEN, VANHEE, VOLKAERT, PETROVIC, TAES & DERAIVE (2011). Os autores recrutaram homens jovens que seguiam uma dieta onívora e os designaram aleatoriamente ou a um grupo que manteria uma dieta onívora padronizada ou a um grupo que passaria a receber uma dieta vegetariana padronizada. Após a designação, os participantes foram submetidos a um programa de treinamento intermitente com duração de 5 semanas, realizado 3 dias por semana, cujo protocolo foi bastante similar ao executado por SUZUKI, ITO, TAKAHASHI & TAKAMATSU (2004). Os participantes foram submetidos à espectroscopia de ressonância magnética nos músculos gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior para avaliação do conteúdo muscular de carnosina em resposta ao treinamento. Após 5 semanas, não foram observados quaisquer efeitos da intervenção nos músculos gastrocnêmio e tibial anterior. Um aumento não significativo (+11%) da carnosina muscular foi observado no grupo que foi submetido à dieta onívora padronizada, enquanto uma diminuição não significativa neste parâmetro (-9%) foi observada no grupo que foi submetido à dieta vegetariana, sugerindo que quaisquer eventuais mudanças da carnosina muscular estariam relacionadas à dieta, e não ao treinamento físico *per se*. Com isso, em mais um estudo não foram observados efeitos significantes do

treinamento físico sobre as concentrações intramusculares de carnosina. Todavia, cabe lembrar que, conforme destacado em tópicos anteriores da seção de revisão de literatura desta tese, a ressonância magnética utilizada neste estudo permanece um método não validado para a mensuração de carnosina muscular, cuja acurácia e reprodutibilidade ainda carecem de serem avaliadas. Apesar da limitação, resultados desencorajadores também foram observados posteriormente com um protocolo de treinamento intermitente de 5 semanas aplicado em mulheres fisicamente ativas e avaliando a carnosina muscular por cromatografia líquida de alta eficiência (EDGE, EYNON, MCKENNA, GOODMAN, HARRIS & BISHOP, 2013).

Os estudos conduzidos até este momento não ajudam a explicar os resultados observados nos estudos transversais anteriormente citados; isto é, como atletas altamente treinados em modalidades de alta intensidade possuem maiores níveis musculares de carnosina em comparação a indivíduos não treinados. Na verdade, tais evidências sugerem que o treinamento físico não possui qualquer efeito modulador sobre o conteúdo muscular de carnosina e que, ao invés da contração muscular, outros fatores poderiam exercer um maior efeito sobre a modulação da carnosina muscular. Dentre eles, conforme já destacado, a dieta, em específico, a ingestão de um dos aminoácidos constituintes da carnosina, a beta-alanina, parece ser o principal fator limitante para a síntese muscular de carnosina. A exemplo, diversos são os estudos que já demonstraram que 4 a 10 semanas de suplementação de beta-alanina aumentam significativamente a carnosina muscular em aproximadamente 40 a 60%, respectivamente (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006; HILL, HARRIS, KIM, HARRIS, SALE, BOOBIS, KIM & WISE, 2007; STELLINGWERFF, ANWANDER, EGGER, BUEHLER, KREIS, DECOMBAZ & BOESCH, 2012). O aumento do consumo de alimentos de fonte animal, por exemplo, por meio da realização de dietas hiperproteicas, é uma estratégia comumente executada por atletas engajados em modalidades de alta intensidade na tentativa de otimizar o processo de hipertrofia muscular (PHILLIPS, 2004). Sabe-se que diversos alimentos de fonte animal, tais como a carne de peixe, de boi e de aves possuem grandes concentrações de carnosina (JONES, SMITH & HARRIS, 2011); sendo a dieta, portanto, um importante fator auxiliando na explicação dos altos níveis de carnosina muscular observados em atletas.

Alguns estudos conduzidos em modelos animais tem sugerido que hormônios anabólicos, como a testosterona, também podem ter papel determinante na modulação da carnosina muscular. Apoiando esta sugestão, PENAFIEL, RUZAF, MONSERRAT & CREMADES (2004) demonstraram que roedores machos possuem um conteúdo muscular de carnosina 3 a 4 vezes maior do que as fêmeas. Interessantemente, o conteúdo de carnosina muscular nas fêmeas pode ser elevado ao nível dos machos por meio da administração exógena de testosterona. Por fim, em ambos os gêneros, o conteúdo de carnosina é reduzido em aproximadamente 40% após o procedimento cirúrgico de gonadectomia (PENAFIEL, RUZAF, MONSERRAT & CREMADES, 2004). Estudos transversais em humanos têm observado uma significativa associação entre o envelhecimento e a redução das concentrações musculares de carnosina, e portanto, também têm apoiado a ação moduladora da testosterona sobre a carnosina muscular (EVERAERT, MOOYAART, BAGUET, ZUTINIC, BAELDE, ACHTEN, TAES, DE HEER & DERAIVE, 2011; BAGUET, EVERAERT, ACHTEN, THOMIS & DERAIVE, 2012). É de geral conhecimento que atletas tendem a fazer uso de esteroides anabólicos durante alguns momentos de suas carreiras com o intuito de otimizar os ganhos de força muscular, massa muscular e desempenho físico (SJOQVIST, GARLE & RANE, 2008; GRAHAM, DAVIES, GRACE, KICMAN & BAKER, 2008; HARMER, 2010), auxiliando dessa maneira na explicação dos elevados níveis de carnosina muscular presentes em atletas bem treinados. Mesmo assim, estudos longitudinais em humanos são necessários para confirmar a real influência da testosterona sobre o conteúdo muscular de carnosina.

Apesar do potencial papel dos fatores externos acima mencionados (regulação hormonal e dieta) na modulação do conteúdo muscular de carnosina em atletas, evidências têm sugerido que a genética também pode ter semelhante e relevante influência. Um recente estudo exploratório recrutou 235 indivíduos, dentre os quais se incluíam 154 indivíduos sedentários e 81 atletas. O grupo de atletas ainda foi dividido em: 1) atletas velocistas ou "de explosão" (n = 35), os quais estavam incluídos judocas, ginastas e nadadores de distâncias curtas; e 2) atletas de média a longa distância (n = 46), os quais estavam incluídos remadores, triatletas, nadadores e corredores de longa distância. Após o recrutamento, coletas de sangue venoso foram realizadas para a mensuração do conteúdo e atividade da enzima carnosinase. Relembrando o tópico de revisão anterior, a carnosinase está

presente no sangue humano e é bastante ativa, sendo a responsável pela hidrólise de carnosina em seus aminoácidos constituintes, a beta-alanina e a histidina. Além disso, esta enzima também é capaz de hidrolisar outros dipeptídeos contendo histidina (anserina, balenina), e assim, tem sido apontada como um fator determinante para os níveis circulantes de carnosina e de seus análogos após a ingestão destes compostos (LENNEY, PEPPERS, KUCERA-ORALLO & GEORGE, 1985; EVERAERT, TAES, DE HEER, BAELDE, ZUTINIC, YARD, SAUERHOFER, VANHEE, DELANGHE, ALDINI & DERAIVE, 2012). Assim, os autores supunham que uma baixa atividade e conteúdo da carnosinase no sangue favoreceria uma maior presença e estabilidade da carnosina e de seus análogos na circulação (principalmente após a suplementação ou ingestão dietética), possibilitando a ação tamponante destes compostos no sangue, logo, poupando outras defesas tamponantes dessa maneira (como as concentrações de bicarbonato), e portanto, favorecendo o sucesso durante exercícios de alta intensidade. E de fato, como principal resultado do estudo, os autores observaram que o grupo de atletas de explosão, isto é, aqueles engajados em esforços de alta intensidade e curta duração, possuem menor conteúdo e atividade da carnosinase no sangue em comparação aos atletas engajados em esforços de longa duração ou ao grupo controle de indivíduos sedentários.

Não se pode excluir a possibilidade de que a natureza do treinamento enfrentado por estes atletas ao longo dos anos pode ter influenciado esta adaptação da carnosinase sanguínea. Contudo, também não devemos excluir a possibilidade de que esta diminuída atividade/conteúdo da carnosinase no sangue seja o resultado de uma seleção genética. Semelhantemente, considerando a ausência de resultados positivos provenientes dos estudos longitudinais com treinamento físico e avaliação da carnosina muscular, não podemos excluir a possibilidade de que o aumentado conteúdo muscular deste dipeptídeo observado nos estudos transversais com atletas também seja uma herança genética, logo, uma estimativa de talento/sucesso em atividades de alta intensidade.

Por outro lado, embora as evidências destacadas ao longo deste tópico possam sugerir que o treinamento físico *per se* não modula o conteúdo muscular de carnosina, é importante notar que nenhum destes estudos controlou a variável interveniente mais importante no que diz respeito à concentração intramuscular de carnosina: a ingestão dietética de carnosina e de seu aminoácido constituinte, a

beta-alanina (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2006). Além disso, especula-se que os estudos anteriores possam não ter empregado protocolos de treinamento com intensidade (MANNION, JAKEMAN & WILLAN, 1994; KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE, 2008) e/ou duração (KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE, 2009; BAGUET, EVERAERT, DE NAEYER, REYNGOUDT, STEGEN, BEECKMAN, ACHTEN, VANHEE, VOLKAERT, PETROVIC, TAES & DERAIVE, 2011) suficientes para induzirem uma diminuição do pH intramuscular, limitando a possibilidade de aumento da concentração de carnosina intramuscular. Ainda, um outro aspecto relevante em relação à maioria destes estudos é a ausência da medida de carnosina nos diferentes tipos de fibra muscular, o que aumentaria consideravelmente a sensibilidade da análise. Levando-se em consideração todos estes itens, fica evidente que somente um estudo com participantes vegetarianos, submetidos a um programa de treinamento físico de alta intensidade com duração e volume adequados, e que inclua a análise de carnosina por tipo de fibra muscular, poderá responder de forma mais clara se o treinamento físico pode de fato modular o conteúdo muscular de carnosina e a expressão gênica e proteica de transportadores e enzimas relacionados à sua síntese no tecido muscular (HARRIS, WISE, PRICE, KIM, KIM & SALE, 2012).

3. OBJETIVOS

3.a. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de um programa de treinamento intermitente de alta intensidade, com duração de 12 semanas, sobre as concentrações intramusculares de carnosina de indivíduos vegetarianos.

3.b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Identificar o efeito de um programa de treinamento intermitente de alta intensidade sobre o(a):

- Capacidade física (tempo até a exaustão, distância total, trabalho total, potência máxima), consumo máximo de oxigênio e limiares ventilatórios num teste progressivo máximo;
- Desempenho intermitente de membros inferiores (trabalho total, potência pico e potência média) durante um teste de Wingate com séries consecutivas;
- Peso corporal, índice de massa corporal e gordura corporal;
- Conteúdo muscular total de carnosina;
- Conteúdo muscular de carnosina em fibras musculares do tipo I e II;
- Expressão gênica de enzimas e transportadores relacionados a via de síntese da carnosina no músculo esquelético, tais como a carnosina-sintase (CARNS), transportadores de carnosina/histidina (PHT1 e PHT2), transportadores de beta-alanina (TauT e PAT1) e beta-alanina transaminase (ABAT).

2) Comparar as possíveis alterações nos parâmetros acima citados dos indivíduos vegetarianos que serão submetidos ao treinamento físico com aqueles vegetarianos que permanecerão com suas respectivas rotinas (grupo controle).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.a. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Ao todo, 20 indivíduos do gênero masculino, de 18 a 40 anos de idade, foram recrutados para fazer parte deste estudo. Para participar do estudo, os indivíduos deveriam: 1) ser saudáveis; 2) ser fisicamente ativos (i.e. que não estivessem engajados em qualquer tipo de programa estruturado de atividade física e/ou competição); 3) não possuir qualquer doença crônico-degenerativa ou problema acometendo o aparelho locomotor; 4) e principalmente, estar seguindo uma dieta vegetariana, em específico a ovolactovegetariana ou a vegana (i.e. sem o consumo de qualquer tipo de carne) nos últimos 12 meses antes da adesão ao estudo. Foram excluídos os voluntários: 1) que estavam fazendo ou tinham feito uso de qualquer suplemento nutricional nos últimos 2 meses antes do início do estudo; 2) que estavam engajados em qualquer programa de treinamento físico ou competição; ou 3) que relataram seguir uma dieta vegetariana, mas realizavam a ingestão de algum tipo de carne (identificado por meio do uso de diários alimentares). Antes do início do estudo, os indivíduos foram informados sobre todos os objetivos do estudo e os procedimentos que seriam realizados, bem como os possíveis riscos envolvidos. Em seguida, após concordarem em participar, eles preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), bem como pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE 14647713.9.0000.5391).

4.b. LOCAL E DURAÇÃO DO ESTUDO

A avaliação da composição corporal, do consumo alimentar e as análises musculares foram conduzidas no LABNUTRI (Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados à Atividade Motora da EEFÉ-USP, sob supervisão dos Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior, Prof. Dr. Bruno Gualano e Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli.

A biópsia muscular, a avaliação do desempenho intermitente de membros inferiores e os testes progressivos máximos foram conduzidos no LADESP (Laboratório de Determinantes Energéticos do Desempenho Esportivo), sob supervisão do Dr. Luis Augusto Riani e dos Prof. Dr. Emerson Franchini e Prof. Dr. Rômulo Cássio de Moraes Bertuzzi.

Das avaliações iniciais até as avaliações pós-intervenção, a participação de cada voluntário na pesquisa teve duração de 4 meses. A pesquisa completa em si teve duração de 3 anos.

4.c. DESENHO EXPERIMENTAL

Uma vez selecionados para participarem do estudo, todos os voluntários passaram por uma consulta médica para verificar os critérios de elegibilidade. Antes e após o período de intervenção, os voluntários foram submetidos a um procedimento de biópsia do músculo vasto lateral para a avaliação do conteúdo intramuscular de carnosina e da expressão gênica de enzimas e transportadores relacionados a via de síntese da carnosina no músculo esquelético. A saber, a biópsia muscular pré-intervenção ocorreu 1 semana antes do início da intervenção; enquanto a biópsia muscular pós-intervenção ocorreu dentro de 48 a 72 horas após a última sessão de treino.

Para fins de avaliação do desempenho intermitente de membros inferiores (trabalho total, potência pico e potência média), antes e após o treinamento os participantes foram submetidos a um teste de Wingate com séries consecutivas, um

teste específico ao programa de treinamento empregado. Em dias diferentes do teste de Wingate, para a prescrição e avaliação da sensibilidade ao treinamento, antes e após o período de treino os voluntários também foram submetidos a um teste ergoespirométrico para a avaliação da capacidade física (tempo até a exaustão, potência máxima, distância total), limiar de lactato, da capacidade aeróbia máxima (por meio do consumo máximo de oxigênio - $VO_{2máx}$) e dos limiares ventilatórios. Por fim, os participantes também foram submetidos à avaliação da composição corporal, antes e após o período de treinamento, por meio do protocolo de dobras cutâneas.

Foi solicitado aos participantes que se abstivessem de álcool e exercício físico intenso nas 24 horas anteriores às avaliações acima mencionadas. O horário das avaliações foi padronizado, ou seja, as avaliações pós-intervenção foram conduzidas no mesmo horário das avaliações pré-intervenção. Além disso, foi orientado aos participantes que chegassem ao laboratório para a realização das avaliações pelo menos 2 horas após a última refeição, mas sem que fizessem um jejum maior do que 4 horas. No dia das avaliações pré-intervenção os voluntários preencheram diários alimentares para o registro do consumo alimentar das 48 horas antecedentes às avaliações, e eles foram orientados a repetirem esta mesma alimentação para as avaliações pós-intervenção.

Após as avaliações pré-intervenção, os voluntários foram pareados pelo $VO_{2máx}$ e foram aleatoriamente designados para um de dois grupos: 1) Treinado (T - n = 10); e 2) Controle (C - n = 10). Dentro de no máximo 7 dias após a realização das avaliações pré-intervenção, os voluntários iniciaram o programa de treinamento físico, com duração de 12 semanas e com 3 sessões de treino por semana (segunda-, quarta- e sexta-feira).

4.d. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FÍSICA E DO CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO

A fim de determinar a capacidade física, os limiares ventilatórios e o $VO_{2máx}$ dos voluntários, cada participante foi submetido a um teste incremental até a exaustão

antes e após o período de intervenção. Após aquecimento de 3 minutos, a carga de trabalho foi fixada em 50W, onde os sujeitos mantiveram o ritmo entre 70 e 100 rotações por minuto (rpm). Em cada teste a carga de trabalho foi incrementada em 30 W a cada 4 minutos. O teste foi interrompido quando a cadência do pedal reduziu de 70 rpm, sem possibilidade de retorno; ou através da exaustão voluntária. A capacidade física foi caracterizada como a mensuração de algumas das principais variáveis captadas em um teste progressivo máximo, tais como o tempo até a exaustão, a distância total percorrida e a potência máxima alcançada. A frequência cardíaca, a pressão arterial e a percepção subjetiva de esforço foram gravados a cada intervalo.

O teste incremental até a exaustão foi realizado em um cicloergômetro de frenagem eletrônica (Lode Excalibur, Gronigen, Holanda), mundialmente considerado o melhor em ergometria. Antes do início do teste os participantes permaneceram 3 minutos sentados na bicicleta para o estabelecimento da linha de base do consumo de oxigênio, a qual foi determinada a partir da média aritmética deste parâmetro nos 30 segundos finais desse período. O teste foi interrompido por meio da 1) exaustão voluntária; ou 2) quando o voluntário reduziu a cadência abaixo de 70 rpm, sem possibilidade de recuperação. Em repouso, após cada estágio de 4 minutos e após o término do teste (exaustão) foram coletadas amostras de sangue capilar da ponta do dedo indicador dos participantes para a análise de lactato plasmático, e posteriormente, do limiar de lactato. Foi fornecido encorajamento verbal para todos os voluntários conforme eles se aproximavam da exaustão.

A troca de gases respiratórios, isto é, do volume de gases inspirados e expirados (O_2 e CO_2) foi determinada minuto a minuto durante o teste por meio de um sistema portátil de análise de gases (K4b², Cosmed, Roma, Itália). A calibração do analisador de gases foi realizada imediatamente antes de cada teste e checada após o término dos mesmos. Tais procedimentos foram realizados utilizando-se uma seringa de 3 litros, seguindo as instruções do fabricante. O VO_{2max} foi determinado como a média de 30 segundos mais alta avaliada durante todo o teste. O limiar anaeróbio, isto é, o 1º limiar ventilatório, foi determinado como o ponto onde houve 1) a primeira inflexão da curva de ventilação; 2) a quebra entre o aumento do volume de dióxido de carbono expirado e o de oxigênio. O ponto de compensação respiratória, isto é, o 2º limiar ventilatório, foi determinado como o ponto onde 1) houve a segunda inflexão da curva de ventilação; 2) o equivalente ventilatório para o

dióxido de carbono (índice VE/VCO_2) foi o mais baixo antes de um aumento sistemático.

Simultaneamente ao teste progressivo máximo foi realizado um eletrocardiograma, permitindo avaliar possíveis alterações cardiovasculares que pudessem ser desconhecidas dos voluntários. O eletrocardiograma foi primeiramente executado em repouso utilizando-se as doze derivações padrão (D1, D2, D3, aVR, aVL, aVF, V1, V2, V3, V4, V5, V6). Durante o teste progressivo máximo, o comportamento cardiovascular foi continuamente avaliado através de eletrocardiógrafo (ErgoPC 13, Micromed, São Paulo, Brasil), com as doze derivações simultâneas. A frequência cardíaca foi registrada em medidor específico (Polar, Kempele, Finlândia) durante o repouso, ao final de cada estágio de 4 minutos do teste progressivo máximo e no 1º, 2º, 4º e 6º minuto de recuperação. A pressão arterial foi medida sempre pelo mesmo avaliador, em repouso, ao final de cada estágio de 4 minutos do teste progressivo máximo e no 1º, 2º, 4º e 6º minuto de recuperação.

4.e. COLETAS SANGUÍNEAS E AVALIAÇÃO DO LACTATO PLASMÁTICO

Tanto no período pré- quanto pós-intervenção, no dia em que o teste progressivo máximo foi realizado, foram colhidas amostras de sangue de 25 µL da ponta do dedo indicador em repouso, após cada estágio de 4 minutos e ao término do teste (exaustão). Para as coletas, após assepsia local e uso de lanceta, foram utilizados capilares heparinizados. Uma vez coletadas, as amostras foram armazenadas em microtubos contendo 25 µL solução de fluoreto de sódio a 2% (número de catálogo: 106441 - Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), os quais estiveram o tempo todo armazenados em gelo. No mesmo dia de coleta, as amostras foram centrifugadas (Universal 32R, Hettich, Buckinghamshire, England) a 4600 rpm por 5 min a 4º C para a separação do plasma. Uma vez separado, o plasma foi coletado e armazenado em freezer a -85 °C até a análise, a qual ocorreu dentro de 7 dias após o armazenamento.

A determinação da concentração plasmática de lactato foi realizada em duplicata, em microplacas por método enzimático colorimétrico utilizando-se o kit específico (número de catálogo: 10377390198 - Katal, Intertec, São Paulo, Brasil). A leitura das microplacas (Ouropel, São Paulo, Brasil) foi feita pelo espectrofotômetro de placas (Victor 3/1420 Multi-Label Counter, PerkinElmer Inc., Massachusetts, Estados Unidos da América). O coeficiente de variação intra-ensaio calculado para a análise de lactato plasmático foi de $0.86 \pm 0.66\%$.

O limiar de lactato foi calculado pelo método D_{máx} modificado (BISHOP, JENKINS & MACKINNON, 1998). Isto é, o mesmo foi determinado pelo ponto da curva de regressão polinomial que produz a máxima distância perpendicular até a linha reta que liga o primeiro aumento da concentração de lactato, logo acima do nível de repouso, e o ponto final (ver Figura 9). O coeficiente de variação do limiar de lactato foi avaliado por meio da variação desta variável entre a sessão de pré- e pós-intervenção do grupo controle, e foi calculado em $0.33 \pm 7.59\%$.

Figura 9: Ilustração do cálculo do limiar de lactato pelo método D_{máx}, de acordo com Bishop *et al.* (1998).

4.f. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO INTERMITENTE DE MEMBROS INFERIORES

Para a avaliação do desempenho intermitente de membros inferiores, todos os sujeitos foram submetidos a 3 séries do teste de Wingate para membros inferiores (INBAR & BAR-OR, 1986), em ergômetro projetado especificamente para este teste (Biotec 2100, Cefise, Nova Odessa, Brasil). Antes do teste pré-intervenção, foi realizada uma sessão de habituação ao teste físico. A estatura e o peso corporal dos participantes foram mensurados na chegada dos mesmos ao laboratório. A posição dos participantes no ergômetro (altura do banco, altura do guidão, distância do banco ao guidão) foi ajustada na sessão de habituação e mantida no restante das sessões em que o teste foi aplicado. A sessão pré-intervenção foi realizada pelo menos 1 semana após a realização da habituação. Todos os testes pós-intervenção foram realizados entre 48 e 96 horas após a última sessão de treino. O horário dos testes foi padronizado individualmente.

Durante os testes, os pés dos participantes foram anexados firmemente e com segurança aos pedais do ergômetro por meio de cintas e grampos. Antes do início do teste, todos os participantes realizaram um aquecimento no aparelho durante 5 minutos, sem carga. Após o término do aquecimento, a carga foi posicionada no ergômetro e o teste começou imediatamente com os participantes partindo de um início estático. Em cada sessão de teste foram realizadas 3 séries do teste de Wingate, com duração de 30 segundos em cada série, e carga fixa em 5% do peso corporal. As séries foram separadas por períodos de recuperação passiva de 3 minutos, e em cada série foi fornecido encorajamento verbal. Após o término do teste, a carga foi completamente removida do ergômetro e os participantes foram orientados a continuarem pedalando a uma cadência auto-selecionada para facilitar a recuperação.

Um sensor acoplado à roda mensurou a velocidade da mesma, de modo que um software (Ergometric 6.0, Cefise, Nova Odessa, Brasil) calculou automaticamente a potência (em Watts, W) produzida a cada segundo e a cada série. Com isso, foram extraídas a potência pico (valor único de potência mais alto dentre os 30 segundos) e a potência média (média da potência ao longo dos 30

segundos) de cada série. A partir da potência gerada foi calculado o trabalho realizado em cada série (em quilojoules, kJ), bem como o trabalho total (soma do trabalho realizado ao longo das 3 séries) em cada sessão de teste. O coeficiente de variação do trabalho total realizado pelo grupo treinado e controle foi avaliado por meio da variação desta variável entre a sessão de habituação e a sessão pré-intervenção, e foi calculado em $2.18 \pm 1.73\%$.

4.g. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

Os voluntários foram pesados em balança digital. A altura foi determinada na posição em pé, com auxílio de estadiômetro. Essas medidas foram utilizadas na realização do índice de massa corporal (IMC), o qual foi calculado pela fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$$

A composição corporal foi determinada pelo método de dobras cutâneas. Este método foi executado sempre pelo mesmo avaliador, e foi realizado em 3 oportunidades: 2 vezes antes do período de intervenção, com o objetivo de determinarmos a reprodutibilidade do método; e 1 vez após o período de intervenção, com o objetivo de determinarmos a sensibilidade do método à intervenção. Para a estimativa do percentual de gordura, primeiramente foi mensurada a densidade corporal de cada participante, especificamente, através do protocolo de três dobras cutâneas [peitoral (X1), abdominal (X2) e coxa (X3)], descrito por JACKSON & POLLOCK (1978), conforme a fórmula abaixo:

$$\text{DC} = 1,10938 - 0,0008267 (X1) + 0,0000016 (X2)^2 - 0,0002574 (X3)$$

A partir disto, o percentual de gordura foi posteriormente calculado aplicando-se a densidade corporal calculada à equação descrita por SIRI (1961).

$$\% \text{Gordura} = [(4,95 / \text{Densidade Corporal}) - 4,50] \times 100$$

O coeficiente de variação da estimativa de percentual de gordura para os grupos treinado e controle foi calculado em $1.93 \pm 1.73\%$.

4.h. BIÓPSIA MUSCULAR POR AGULHA DE SUCÇÃO

Antes do período de intervenção, e de 48 a 72h após a última sessão de treinamento, os voluntários foram orientados a comparecer ao LADESP, onde foi realizado o procedimento de biópsia muscular. Foi extraída uma pequena amostra (entre 50 e 60 miligramas) da porção lateral e mais volumosa do vasto lateral, cuja quantidade foi o suficiente para todas as análises propostas. O local aproximado da extração ocorreu entre o ponto médio da patela e do trocânter maior. O procedimento de biópsia muscular foi realizado a partir da utilização de uma agulha especialmente desenvolvida para extrair pequenas amostras de músculo, de acordo com BERGSTROM (1962).

Para a realização do procedimento, foi solicitado ao voluntário que se mantivesse deitado em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. O médico responsável realizou a assepsia do local e, em seguida, administrou 3 mL de xilocaína a 1% para anestesiá-lo. A aplicação do anestésico foi feita com agulhas hipodérmicas descartáveis de forma subcutânea.

Após assepsia e anestesia, foi feita a incisão para a entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. Para tanto, o médico responsável utilizou uma lâmina de bisturi nº11, esterilizada, individual e descartável para realizar a incisão de aproximadamente 0,5 centímetros de extensão. A incisão cortou a pele e a fáscia muscular. Os indivíduos não sentem qualquer dor durante a realização deste procedimento, uma vez que não há terminações nervosas sensitivas a dor na fáscia muscular ou no próprio músculo. A agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, foi então inserida pelo médico responsável através do pequeno orifício gerado pela incisão. Após uma sucção, aplicada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 60 mL, um pequeno pedaço de músculo foi puxado para

o interior da agulha e cortado pela sua lâmina interna. Frequentemente, os voluntários relatam ausência de qualquer sensação de desconforto.

Os voluntários foram sempre informados dos procedimentos que tomaram sequencia, e após a retirada da agulha, foi aplicada pressão sobre o ponto de incisão para prevenir sangramento. A incisão foi então fechada com bandagem esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. Uma faixa foi envolvida na coxa, sobre a região biopsiada, aplicando pressão contínua, a fim de evitar qualquer edema local. O voluntário foi instruído a manter a bandagem por 24 horas e a manter a incisão limpa e seca pelo período de 72 horas. As amostras foram congeladas e armazenadas a -85 °C até a liofilização, quando uma porção de músculo de cada biópsia foi dissecada de gordura, tecido conjuntivo e sangue.

4.i. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TAMPONANTE MUSCULAR *IN VITRO*

Esta técnica mede o potencial tamponante dos tampões físico-químicos intramusculares, excluindo o bicarbonato, o qual é removido durante o processo de liofilização. Amostras liofilizadas (2,0 - 3,0 miligramas) foram trituradas, e em seguida, homogeneizadas no vórtex em uma solução contendo fluoreto de sódio (10 mM) (5 *bursts* de 20 segundos cada um, intercalados por 30 segundos no gelo) a uma diluição de 30 miligramas de músculo seco / ml de solução de homogeneização (MANNION, JAKEMAN & WILLAN, 1993). Este homogenato foi então colocado em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos, antes e durante a medição do pH muscular. As medições de pH foram feitas com um microeletrodo (DGi101-SC, Mettler Toledo Inc, São Paulo, Brasil), ligado a um medidor de pH (AB 150 Accumet, Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

Após a medição inicial do pH dos homogenatos musculares, estes foram ajustados para um pH de 7,1 a partir da injeção de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,02 M - número de catálogo: 106462 - Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), e subsequentemente, foram titulados para um pH de 6.5 através da adição seriada de 2 µL de ácido clorídrico (HCl 10 mM - número de catálogo: 258148

- Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). A partir da linha de tendência de titulação, o número de mols de H^+ necessários para alterar o pH muscular de 7,1 até 6,5 foi interpolado (ver Figura 10). Este valor foi depois normalizado pela unidade de pH, a fim de que a disposição final dos resultados estivesse em milimols de H^+ por quilograma de músculo seco por unidade de pH ($mmol H^+.kg \text{ músculo seco}^{-1} \cdot unidade \text{ do } pH^{-1}$) e que fosse determinada a capacidade tamponante muscular *in vitro* ($\beta_{m_{in vitro}}$) individual. Em nosso laboratório, o coeficiente de variação intraensaio calculado para esta medida com base em amostras de músculo esquelético de ratos (sóleo e tibial anterior) é de $7.94 \pm 7.26 \%$.

Figura 10: Curva típica de titulação com ácido clorídrico (HCl) para um homogenato de músculo esquelético (vasto lateral) de humano. Peso da amostra = 2 miligramas (músculo seco). Total de 0.150 μmol de HCl necessários para alterar o pH do homogenato de músculo de 7.1 para 6.5. A capacidade tamponante *in vitro* ($\beta_{m_{in vitro}}$) é dada por: $-\Delta H^+ / \Delta pH = -0.150 / -0.6 = 0.250 \mu mol H^+ / 2 \text{ miligramas de músculo seco} = 125 mmol H^+.kg \text{ músculo seco}^{-1} \cdot unidade \text{ do } pH^{-1}$. (Adaptado de Mannion *et al.* 1993).

4.j. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO INTRAMUSCULAR TOTAL DE CARNOSINA

Uma porção de 20 a 30 miligramas de amostra de cada participante foi separada e liofilizada em equipamento específico para este fim. Após esta primeira

etapa, 3 a 5 miligramas de tecido liofilizado e em pó de cada amostra foram homogeneizados em solução contendo 0.4 M de ácido perclórico (HClO_4 - número de catálogo: 244252 - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 1mM de EDTA (número de catálogo: 324503 - Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). O homogenato foi submetido ao vórtex por 15 minutos, e subsequentemente, centrifugado a 5000 g, a 4° C, durante 3 minutos. O sobrenadante foi filtrado e 200 μL dessa solução foram adicionados a 50 μL de bicarbonato de potássio (KHCO_3 - número de catálogo: 237205 - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 2.1 M. Por fim, essa solução foi novamente centrifugada a 5000 g, a 4° C, por 3 minutos. O sobrenadante, considerado o extrato muscular, foi utilizado para a determinação do conteúdo total de carnosina muscular, sempre em duplicatas.

O conteúdo total de carnosina nas amostras musculares foi determinado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*), em um cromatógrafo (Hitachi, Schaumburg, IL) acoplado a um detector UV (ultravioleta), de acordo com o método descrito por MORA, SENTANDREU & TOLDRÁ (2007). O coeficiente de variação intraensaio para o conteúdo muscular de carnosina para ambos os grupos juntos foi de $0.88 \pm 0.93\%$. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi a coluna de sílica Atlantis HILIC (4,6 x 150 mm, 3 μm), adquirida (número de catálogo: 186002031) da empresa Waters (Milford, MA), ligada à uma guarda de coluna de sílica Atlantis (5 x 2,1 mm, 3 μm - número de catálogo: 186007670). A cromatografia foi realizada sob temperatura ambiente. Neste método, uma fase móvel inicial com um elevado teor de acetonitrila (um solvente orgânico - número de catálogo: 34967 - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi usada para promover interações hidrofílicas entre os compostos e a fase estacionária polar hidrofílica (isto é, a coluna de sílica). O composto polar, que está a ser quantificado (no caso, a carnosina), foi retido mais tempo do que os apolares, permitindo uma boa separação. O componente polar da fase móvel (isto é, água), foi o solvente forte usado para fracionar os compostos. O método utilizou duas fases móveis, cujas receitas são descritas a seguir:

- Fase Móvel A: acetato de amônia a 0,65 mM (número de catálogo: A1542 - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) em água/acetonitrila (25:75) (v/v), pH 5.5. Após o preparo, a fase móvel foi filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo através de um filtro de membrana 0.2 μm . O pH foi ajustado para 5.5 usando ácido acético ou solução

contendo NH_4OH (hidróxido de amônia - número de catálogo: 221465 - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

- Fase Móvel B: acetato de amônia a 4,55 mM em água/acetonitrila (70:30) (v/v), pH 5.5. Após o preparo, a fase móvel foi filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo através de um filtro de membrana em PVDF, com 0.22 μm de poro (Merck Milipore, MA, EUA). O pH foi ajustado para 5.5 usando ácido acético ou solução contendo NH_4OH (hidróxido de amônia).

A condição de separação compreendeu um gradiente linear de 0 a 100% do solvente B em 13 minutos, sob um fluxo de 1,4 mL/min. A fim de detectar a substância fracionada, a separação foi monitorada utilizando-se o detector UV, a um comprimento de onda de 214 nm. A quantificação foi realizada usando-se a área dos picos, as quais foram determinadas pelo software Chromera versão 3.0, acoplado ao cromatógrafo. As áreas dos picos obtidos para concentrações conhecidas (curva padrão) foram usadas para construir a equação de regressão necessária para interpolar os valores desconhecidos (no caso, as amostras). Uma vez que tais valores foram obtidos, os mesmos foram inseridos na equação abaixo, onde os valores obtidos no HPLC foram convertidos para as concentrações teciduais de carnosina:

$$\text{Conc. musc (mmol/kg)} = \left\{ \left[\left(\frac{\text{Conc. Extrato (uM)}}{1,000,000} \right) \times 1.25 \right] \times \left(\frac{\text{Peso da amostra (mg)}}{50} \right) \right\} \times \left(\frac{1000}{\text{Peso da amostra (mg)}} \right)$$

onde:

Conc. musc = concentração muscular total e final do composto analisado na amostra.

Conc. Extrato = concentração da amostra obtida pela cromatografia.

Peso da amostra = peso da amostra utilizada para obter o extrato.

4.k. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO INTRAMUSCULAR DE CARNOSINA POR TIPO DE FIBRA

A análise da concentração intramuscular de carnosina por tipo de fibra também foi realizada por HPLC, no mesmo cromatógrafo onde as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo intramuscular total de carnosina. Desta vez, entretanto, utilizou-se um detector de fluorescência ao invés do UV, de modo a aumentar a sensibilidade da análise. Considerando-se a importância das etapas minuciosas que antecedem a análise *per se*, consideramos por bem descrever detalhadamente abaixo cada uma destas etapas.

4.k.1. DISSECAÇÃO E PESAGEM DAS FIBRAS MUSCULARES ISOLADAS

A porção restante de cada amostra muscular liofilizada, que não foi utilizada para a determinação da capacidade tamponante muscular total *in vitro* ou para a concentração total de carnosina muscular, foi separada e manualmente dissecada. Para tanto, utilizou-se um microscópio simples (Laborana, São Paulo, Brasil - código de referência: 06-LAB-224B), com aumentos de 2 a 4x, uma placa de Petri e uma pinça modificada (Figura 11). Após a dissecação, a fibra muscular era cortada em duas partes, cujo comprimento variava de 0.5 a 1.0 mm de comprimento, aproximadamente. Cada uma destas partes foi destinada a experimentos diferentes; uma delas foi destinada à tipagem da fibra muscular dissecada, enquanto a outra metade foi destinada à análise do conteúdo de carnosina. A metade de cada fibra que teria o seu tipo determinado foi armazenada em *eppendorffs* de 0.6mL imediatamente após o corte da fibra em duas partes. Já a outra metade, antes de também ser armazenada num outro *eppendorff* de 0.6mL, foi cuidadosamente pesada numa balança de fibra de quartzo. Antes e após o seu uso durante o estudo, a balança de fibra de quartzo foi calibrada usando tiras de sal de DNA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO - nº de catálogo: D-1501), as quais tiveram o seu peso determinado após a sua dissolução em 1mL de água e comparação de suas absorbâncias (a 260nm) com padrões preparados a partir do mesmo material.

Figura 11: Ilustrações dos procedimentos realizados durante o processo de dissecação e pesagem das fibras musculares isoladas. O painéis superiores fazem alusão ao processo de dissecação das amostras. O painel inferior à esquerda representa algumas fibras musculares manualmente isoladas. O painel inferior à direita representa a fibra de quartzo visualizada pelo microscópio acoplado à balança; mede-se a deflexão da fibra de quartzo em resposta ao depósito de uma fibra muscular isolada sobre esta. Compara-se a deflexão das fibras musculares com a deflexão de 'tiras de sais de DNA' cujo peso é conhecido, e assim, obtêm-se o peso da fibra.

A saber, a balança de fibra de quartzo é uma balança montada em uma posição horizontal (Figura 12). Esta balança é o equipamento ideal para pesar pequenas amostras de tecido seco, tais como fibras musculares isoladas. O sistema possui uma sensibilidade razoável, a qual certamente é maior que qualquer outra balança mecânica (LOWRY & PASSONNEAU, 1972). Uma vantagem (e necessidade) da balança de quartzo é que ela pode ser colocado em uma pequena câmara, reduzindo dessa maneira as correntes de ar que podem prejudicar a reprodutibilidade da medida no equipamento (LOWRY & PASSONNEAU, 1972). A balança de fibra de quartzo tem sido utilizada nas ciências do esporte com o objetivo

de pesar fibras musculares individuais (de biópsias musculares dissecadas), auxiliando a relativizar a medida de substratos intramusculares (tais como a carnosina, a fosforilcreatina, a taurina, entre outros), e dessa maneira, evitando alguns fatores de confusão no momento da quantificação de substratos bioquímicos, tal como as mudanças morfológicas musculares que ocorrem ao longo do tempo ou de uma intervenção (HARRIS, DUNNETT & GREENHAFF, 1998; HILL, HARRIS, KIM, HARRIS, SALE, BOOBIS, KIM & WISE, 2007, KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE, 2009).

Figura 12: Ilustrações da balança de fibra de quartzo.

4.k.2. TIPAGEM DAS FIBRAS MUSCULARES ISOLADAS

Conforme mencionado anteriormente, cada fibra muscular dissecada foi separada (e armazenada em *eppendorffs* de 0.6mL) em duas porções variando aproximadamente de 0.5 a 1.0 mm de comprimento, sendo que uma destas porções foi destinada à tipagem daquela fibra muscular. O tipo de cada uma das fibras musculares isoladas foi determinado através da caracterização do perfil da isoforma

da miosina de cadeia pesada, via eletroforese de proteínas em géis de SDS (dodecil-sulfato de sódio)-poliacrilamida (TALMADGE & ROY, 1993). Inicialmente, foram pipetados 15 µL de um tampão de extração em cada porção de fibra muscular destinada a este fim, as quais permaneceram em geladeira durante 24 horas até o momento da eletroforese (testes em nosso laboratório demonstraram que não há diferença nos resultados caso o tampão seja pipetado à fibra muscular imediatamente antes da eletroforese, ou mesmo se ambos já estejam congelados por semanas). Uma solução de 100mL do tampão de extração era composta por tris-hidroximetil-aminometano a 0.06M (pH 6.8; Bio-Rad, CA, EUA - nº de catálogo: 1610719), 5% de β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO - nº de catálogo: M-6250), 0.6% de EDTA (LGC Biotecnologia, SP, Brasil; nº de catálogo: 13.1324.01), 15% de glicerol (SERVA, Heidelberg, Alemanha - nº de catálogo: 23176.01), 2.3 g de SDS (USB Corp, OH, EUA - nº de catálogo: 151213) e uma 'pitada' (aproximadamente 0.07g) de Azul de Bromofenol (Bio-Rad, CA, EUA - nº de catálogo: 1610404).

Todas as corridas foram realizadas em minigéis, preparados em placas de vidro com espessura de 1.0mm, usando o sistema Bio-Rad Mini-Protean II (Bio-Rad, CA, EUA - nº de catálogo: 1658001). O gel de separação foi composto da seguinte maneira: 35% de glicerol absoluto, 26.64% de acrilamida/bis-acrilamida (99:1), 9.94% de água MiliQ, 13.34% de tampão tris-HCl (1.5M, pH 8.8), 10% de glicina (1M; Bio-Rad, CA, EUA - nº de catálogo: 1610718), 4% de SDS, 1% de persulfato de amônio (APS, 10%; LGC Biotecnologia, SP, Brasil; nº de catálogo: 13.1311.002), e 0.08% de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino; Bio-Rad, CA, EUA - nº de catálogo: 1610801). Já o gel de empacotamento teve em sua composição os seguintes reagentes: 30% de glicerol absoluto, 13.3% de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1), 33.65% de água MiliQ, 14% de tampão tris-HCl (0.5M, pH 6.7), 4% de EDTA, 4% de SDS, 1% de APS e 0.05% de TEMED. Após a polimerização dos géis, as amostras foram pipetadas em cada um dos poços do gel de empacotamento, sendo que nos dois primeiros poços de cada gel foram sempre pipetados nesta ordem: 1) o marcador de proteínas Kaleidoscópio™ (Bio-Rad, CA, EUA - nº de catálogo: 1610324), para a marcação da proteína Miosina; e 2) uma amostra de diafragma (solubilizada no mesmo tampão de extração das fibras) de rato Wistar, a qual sabidamente possui os tipos de fibra I, IIa e IIx (TALMADGE & ROY, 1993), e serviu como parâmetro de controle na comparação com as amostras. A corrida dos

géis foi executada com as cubas posicionadas dentro de um isopor com gelo e dentro da geladeira, a uma voltagem constante de 80V, com um tempo total de 24 horas. Durante as corridas foi utilizado um tampão 5 vezes concentrado, cuja composição para o preparo de 2L era de: Glicina (28,8g), tris-hidroximetilaminometano (6,068g) e SDS (2g).

Após as 24 horas de corrida, os géis eram removidos das placas e tinha início o processo de coração dos géis. Para tanto, foi utilizado o *PlusOne™ Silver Staining Kit* (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido - nº de catálogo: 17-1150-01) cuja sensibilidade é aproximadamente 100 vezes maior do que a do Coomassie Blue, alcançando 0.2 a 0.6 ng de proteína por banda. A coração de cada gel durava aproximadamente 3 horas, e as recomendações do fabricante foram acuradamente seguidas. Uma vez finalizada a coração, numa análise qualitativa, as bandas expressas por cada fibra eram comparadas com a amostra de referência (diafragma), permitindo a caracterização do perfil da isoforma da miosina de cadeia pesada, e em última instância, a determinação do tipo da fibra muscular.

Figura 13: Ilustração de um gel de SDS-poliacrilamida para a tipagem das fibras musculares isoladas. À extrema direita está representado o poço em que foi pipetada uma amostra do músculo diafragma de um rato Wistar, exibindo os 3 tipos de fibra muscular (I, IIa e IIx). Nos demais poços estão representadas as fibras musculares isoladas, as quais foram qualitativamente comparadas à amostra de diafragma (no gel em questão todas foram tipadas como IIa).

4.k.3. DETERMINAÇÃO DA CARNOSINA NOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ISOLADAS

Assim como a concentração total de carnosina muscular, a concentração de carnosina nos diferentes tipos de fibras musculares isoladas também foi

determinado através de HPLC, no mesmo cromatógrafo anteriormente utilizado (Hitachi, Schaumburg, IL), mas desta vez acoplado a um detector de fluorescência, de acordo com o método descrito por DUNNETT & HARRIS (1997). Para este fim foi utilizada a outra metade da fibra muscular que foi dissecada, mas não foi utilizada para a tipagem. O coeficiente de variação intraensaio para o conteúdo de carnosina para ambos os grupos juntos foi de $4.71 \pm 4.37\%$ nas fibras do tipo IIa, e $4.86 \pm 4.87\%$ nas fibras do tipo I. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi a coluna Ascentis C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m), adquirida (número de catálogo: 581324) da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Não foi utilizada nenhuma guarda de coluna durante esta análise, embora seu uso seja altamente recomendável por nós, de modo a otimizar a vida útil da coluna.

A cromatografia foi sempre realizada sob temperatura constante de 20 °C, utilizando-se um gradiente binário formado pelas fases móveis A [tampão de acetato de sódio 12.5mM, pH 7.2; e tetraidrofurano (numa proporção v/v de 995:5, respectivamente)] e B [tampão de acetato de sódio 12.5mM, pH 7.2; metanol; e acetonitrila (numa proporção v/v de 500:350:150, respectivamente)]. O tampão de acetato de sódio a 12mM foi preparado misturando-se quantidades isomolares de acetato de sódio (1,026 g.L⁻¹) e ácido acético glacial (0,751 g.L⁻¹), onde o seu pH inicial era de aproximadamente 4.79, sendo necessários aproximadamente 4,9mL de NaOH para ajustá-lo até 7.2. Após o preparo, as fases móveis foram filtradas com o auxílio de uma bomba de vácuo através de um filtro de membrana em PVDF, com 0.22 μ m de poro (Merck Milipore, MA, EUA - n° de catálogo: GVWP04700), e foram desgaseificadas através de equipamento específico (L-7614, VWR International, Pensilvânia, EUA) durante a injeção e corrida das amostras.

Apesar de nos basearmos no estudo preliminar de DUNNETT & HARRIS (1997) para conduzir esta análise, adaptamos alguns parâmetros da composição dos gradientes com o objetivo de otimizar o tempo de análise (que foi reduzido de aproximadamente 60 para 40 minutos). O gradiente utilizado ficou da seguinte maneira: de 0 a 1,5 minutos, 0% de solvente B; de 1,5 até 10 minutos, 35% de solvente B; de 10 até 26 minutos, 60% de solvente B; de 26 até 30 minutos, 100% de solvente B; de 30 até 35 minutos, 100% de solvente B; de 35 até 45 minutos, 0% de solvente B. O fluxo de fase móvel iniciou-se em 2 mL.min⁻¹ até 10 minutos, quando começou a diminuir gradualmente até 1mL.min⁻¹, até atingir 1mL.min⁻¹ aos 26 minutos de corrida e manter-se assim até o final. As ondas de excitação e

emissão do detector de fluorescência foram fixadas em 340 e 450nm, respectivamente. Durante cada uma das injeções, para que os analitos fossem detectados e quantificáveis no detector de fluorescência, foi incluído um reagente de derivatização junto às amostras, na proporção de 1:1. De forma a compensar a possibilidade de erros aleatórios e sistemáticos durante o processo principalmente decorrentes da reação de derivatização, optamos ainda por incluir um padrão interno junto a cada injeção de amostra. O padrão interno utilizado, a saber, foi a nor-leucina, na concentração de 6 μ M. O reagente de derivatização foi preparado misturando-se 80 μ L de uma solução contendo optaldeído (OPA - Sigma Aldrich, St. Louis, MO - n° de catálogo: 79760) e etanol absoluto (na proporção 40 mg de OPA para 800 μ L de etanol absoluto), 4 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO - n° de catálogo: M-6250), e 1000 μ L de tampão borato a 0.4M, pH 9.5. O tampão borato foi preparado diluindo-se borato de sódio anidro (8,084 gramas em 100 mL de água destilada). Dada a baixa solubilidade do borato de sódio a 20°C, foi necessário aquecer a água até aproximadamente 100°C (ressalta-se que após a dissolução completa do borato de sódio, a solução em questão já atinge o pH 9.5). A cada dia de análise um novo reagente de derivatização era preparado e mantido a 4°C, no escuro. A concentração de carnosina em cada fibra isolada ou num '*pool*' de fibras do mesmo tipo foi determinada através da comparação das áreas integradas dos picos no cromatogramas com as áreas provenientes de padrões (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M - ver Figuras 14 até 18), os quais foram realizados todos os dias de análise. Cada fibra muscular ou *pool* de fibras do mesmo tipo foi extraído adicionando-se 200 μ L ou 300 μ L de água destilada, respectivamente, e imediatamente após a adição de água, foi utilizado o vórtex em velocidade máxima por 3 minutos constantes.

Figura 14: Cromatograma resultante da injeção de 1 µM de carnosina.

Figura 15: Cromatograma resultante da injeção de 5 µM de carnosina.

Figura 16: Cromatograma resultante da injeção de 10 µM de carnosina.

Figura 17: Cromatograma resultante da injeção de 25 μ M de carnosina.

Figura 18: Cromatograma resultante da injeção de 50 μ M de carnosina.

4.I. EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS E TRANSPORTADORES RELACIONADOS À CARNOSINA

Os genes pertencentes às vias de síntese, degradação e transporte da carnosina no músculo esquelético tiveram a sua expressão determinada pelo uso da técnica de PCR em tempo real (do inglês "*PCR real time*"). Foi analisada a expressão gênica da carnosina-sintase (CARNS, enzima que sintetiza a carnosina a partir dos aminoácidos beta-alanina e histidina), da carnosinase (CNDP isoforma II, enzima que degrada a carnosina em seus aminoácidos constituintes, a beta-alanina

e a histidina), do transportador de prótons/aminoácidos e do transportador da taurina (PAT1 e TauT, ambos transportadores de beta-alanina para dentro da célula muscular), do transportador de histidina/carnosina (PHT isoforma 1, transportador de carnosina e/ou histidina para dentro do músculo esquelético), e da beta-alanina transaminase (ABAT, enzima responsável pela transaminação do aminoácido beta-alanina em malonil semi-dialdeído). Considerando que todas essas proteínas ainda foram muito pouco estudadas na literatura, não há anticorpos comercialmente disponíveis para as mesmas, o que nos impediu de quantificar diretamente a sua expressão proteica.

Usando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, EUA - número de catálogo: 15596018) e seguindo as recomendações do fabricante, o RNA total foi isolado de cada uma das amostras musculares, sendo que para este ensaio elas não precisavam estar liofilizadas e uma quantidade variando de 15 a 20 miligramas de tecido foi destinado à análise da expressão gênica. Após a extração e a lavagem para a aquisição de pureza, o RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop – ND 2000), mensurando a absorbância a 260 nm. A integridade do RNA foi determinada qualitativamente, após a eletroforese de um gel denaturante de agarose a 1%.

Com o objetivo de economizar gastos com diferentes reagentes, de diferentes marcas, e assim, também minimizar variações no protocolo, o DNA complementar (cDNA) foi obtido utilizando-se um kit específico (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, EUA - número de catálogo: 4368813) a partir de 1µg do RNA extraído. O homogenato resultante da combinação do kit à amostra foi colocado no Rotor Gene 6000 (Qiagen), e a reação de transcrição reversa para a obtenção do cDNA foi efetuada a 70 °C por 10 minutos, com ciclos subsequentes e intercalados a 42 °C por 60 minutos e um estágio final de 95 °C por 10 minutos.

Os iniciadores (*primers*) que foram utilizados foram baseados em um estudo anterior (EVERAERT *et al.*, 2013) e foram sintetizados por uma empresa terceirizada (IDT - Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). O EEF1A1 foi o gene, adotado pelo estudo, como controle interno. A reação do PCR em tempo real foi realizada utilizando o Rotor Gene 6000 (Qiagen). Para cada gene, a reação foi feita em duplicata, com o volume total da reação contendo 22 µL, os quais incluíam o cDNA diluído (10 ng) em mistura contendo Fast SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, EUA - número de catálogo: 4385616), água

ultrapura e os respectivos *primers* senso e anti-senso. Os ciclos de quantificação (Cq) e os valores de ΔCq foram calculados em cada amostra para cada gene de interesse como se segue: $Cq^{\text{gene de interesse}} - Cq^{\text{gene de referência}}$, com o EEF1A1 como o gene de referência. Variações relativas do nível de expressão dos genes específicos ($\Delta - \Delta Cq$) foram calculadas através da subtração do ΔCq no período PRÉ (utilizado como um calibrador) para o correspondente ΔCq no período PÓS. Por fim, a mudança na expressão foi determinada como $2^{-\Delta - \Delta Cq}$. O coeficiente de variação intraensaio para os ensaios de expressão gênica, com base no gene de referência (EEF1A1), para ambos os grupos unicamente foi de $0.82 \pm 1.05\%$.

Tabela 3. *Primers* utilizados na análise de PCR em tempo real.

FUNÇÃO	ESPÉCIE	PRIMER SENDO (5'-3')	PRIMER ANTI- SENDO (5'-3')	GENE ID	FONTE
Síntese de carnosina (CARNS)	HUMANA	GGC-GTC-AGC-AAG- AAG-TTC-GT	CCG-GTG-CTC-TGT- CAT-GTC-AA	57571	IDT Tech.
Degradação de carnosina (CNDP2)	HUMANA	TTG-CTG-ATG-GGC- TCT-TTG-GT	TCG-ATG-TCG-TCG- TAC-AGC-TTG-T	55748	IDT Tech.
Transporte de histidina e carnosina (PHT1)	HUMANA	GGT-TAT-GCG-ATC- CCC-ACT-GT	ATC-AGG-AGG-CTT- GGT-GAT-GAA	121260	IDT Tech.
Transporte de beta-alanina (TauT)	HUMANA	CGT-ACC-CCT-GAC- CTA-CAA-CAA-A	CAG-AGG-CGG-ATG- ACG-ATG-AC	6533	Iruloh <i>et al</i> (2007)
Transporte de beta-alanina (PAT1)	HUMANA	CAT-AAC-CCT-CAA- CCT-GCC-CAA-C	GGG-ACG-TAG-AAC- TGG-AGT-GC	206358	Anderson <i>et al</i> (2009)
Transaminação de beta-alanina (ABAT)	ROEDOR	CCT-TCA-TGG-GTG- CTT-TCC-A	CAA-AGG-AAG-GGA- TGT-CAA-TCT-TG	268860	IDT Tech.
Gene de Referência (Normalizador - EEF1A1)	HUMANA	CTG-GCA-AGG-TCA- CCA-AGT-CT	CCG-TTC-TTC-CAC- CAC-TGA-T	1915	IDT Tech.

Legenda: Gene ID: Identificação do gene; IDT Tech: Integrated DNA Technologies.

Figura 19: Ilustração dos géis denaturantes de agarose a 1%, para avaliação qualitativa da integridade do RNA nas amostras de 1 a 15 (Painel A), 16 a 30 (Painel B) e 31 a 39 (Painel C). A ausência de 'rastro' nas amostras 1, 19, 34 e 35, por exemplo, indica que as mesmas estavam com a integridade do seu RNA prejudicada.

4.m. TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico foi conduzido em três dias por semana (segunda-, quarta- e sexta-feira), durante 12 semanas consecutivas, e foi conduzido semelhantemente a protocolos anteriores de treinamento intermitente os quais foram eficazes em aumentar significativamente a capacidade tamponante do músculo esquelético (EDGE *et al.*, 2006a; EDGE *et al.*, 2006b). Todas as sessões de treino foram conduzidas em cicloergômetro (828E, Monark, Estocolmo, Suécia) e foram precedidas por aquecimento de 5 minutos a 50W. O treinamento seguiu um plano

periodizado, de forma a simular programas de treinamento atlético, permitir a progressão de intensidade e prevenir o *overtraining*. O treino foi realizado a uma intensidade de 140% (1^a a 3^a semana), 150% (4^a a 6^a semana), 160% (7^a a 9^a semana) e 170% (10^a a 12^a semana) do limiar de lactato determinado no teste progressivo máximo pré-intervenção. Os participantes completavam 6 a 9 séries de 2 minutos nas sessões da 1^a a 3^a semana, 8 a 10 séries nas sessões da 4^a a 6^a semana, 9 a 12 séries nas sessões da 7^a a 9^a semana e 6 a 9 séries nas sessões da 10^a a 12^a semana. Cada série de 2 minutos foi separada por 1 minuto de recuperação passiva. Foi orientado aos voluntários que mantivessem a cadência de 80 rpm durante o esforço executado em cada série. Assim, a progressão do treinamento foi controlada através do aumento da intensidade (alterando a carga) e volume (alterando o número de séries de 2 minutos) realizados durante sessões de treino. Durante cada sessão de treino, os participantes puderam ingerir água *ad libitum*. Após o término de cada sessão, os participantes receberam um 'lanche' (composto principalmente de frutas) com o intuito de melhorar a recuperação pós-treino e aumentar a aderência às sessões.

4.n. ANÁLISE DA DIETA

Imediatamente antes e após o período de intervenção, para a avaliação do consumo calórico, de carboidratos, de proteína e de gordura na dieta, foram preenchidos diários alimentares em 3 dias não-consecutivos, sendo um de fim de semana, para que a variação da ingestão que normalmente ocorre neste período constasse na avaliação. Os diários foram conferidos no momento de sua devolução e, caso alguma inconsistência fosse notada, o participante foi indagado. Este registro foi feito após os sujeitos terem sido treinados para tanto, segundo protocolo já testado pelo nosso grupo de pesquisa (Scagliusi et al., 2003). Os voluntários receberam uma cartilha com instruções e exemplos sobre como preencher o diário e 38 ilustrações bidimensionais em preto e branco, em tamanho real, de medidas caseiras e porções de alimentos. Esse instrumento também já foi validado pelo nosso grupo (dados não publicados). O consumo energético e de macronutrientes

foi analisado através do software Virtual Nutri^{TM} (São Paulo, Brasil). A ingestão de beta-alanina e seus derivados relacionados foi estimada a partir dos dados de JONES *et al.* (2011).

4.o. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados em média $\pm$ desvio-padrão. Para a comparação entre os grupos no período pré-intervenção das características dos participantes, consumo alimentar, composição corporal, capacidade física, desempenho intermitente, capacidade tamponante muscular *in vitro*, conteúdo intramuscular de carnosina e expressão de transportadores e enzimas relacionadas à síntese de carnosina, foi realizado um Teste-T para amostras independentes. Para a comparação destas mesmas variáveis entre os grupos, antes e após o período de intervenção, foi conduzido o Modelo Misto, com "grupo" e "tempo" como fatores. Para a comparação da concentração de carnosina por tipo de fibra muscular entre os grupos, antes e após o período de intervenção, foi conduzido o Modelo Misto, com "grupo", "tempo" e "tipo de fibra" como fatores. O Teste-T para amostras independentes também foi utilizado para a comparação da variação absoluta (PÓS - PRÉ) das variáveis acima mencionadas entre os grupos. Foram testadas 4 diferentes matrizes de co-variância para verificarmos qual o melhor modelo que se ajustava aos dados, de acordo com o critério de Schwarz Bayesian (menor valor BIC – do inglês “Bayesian Information Criterion”). No caso de um valor F significativo, um teste de *post-hoc* de Tukey foi utilizado para encontrar diferenças específicas. O Tamanho do Efeito (do inglês “*Effect Size*” - ES) foi calculado utilizando o coeficiente *d* de Cohen. Os descritores qualitativos para a interpretação do ES foram designados da seguinte maneira: <0.2, efeito trivial; 0.2 - 0.39, efeito pequeno; 0.40 - 0.75, efeito moderado; >0.75, efeito grande. A análise dos dados foi conduzida através do software SAS versão 9.3. O nível de significância assumido foi de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.a. AMOSTRA

A pesquisa foi amplamente divulgada via e-mail, em redes sociais e nos arredores da nossa universidade, e seguindo todos os critérios de inclusão e exclusão já destacados no subtópico "seleção da amostra", 20 homens jovens, saudáveis e fisicamente ativos, com idade entre 18 e 40 anos, preencheram os critérios de elegibilidade. Os participantes foram devidamente informados sobre os riscos e desconfortos associados ao estudo antes de passarem por uma avaliação de saúde e assinarem o TCLE. Após a assinatura do TCLE e a realização das avaliações pré-intervenção, os voluntários foram pareados pelo $VO_{2máx}$ e foram aleatoriamente designados para um de dois grupos: 1) Treinado (T); ou 2) Controle (C). Um indivíduo do grupo Treinado desistiu de sua participação na pesquisa na metade do período de treinamento (6^a semana) devido a motivos particulares não vinculados ao treinamento ou ao estudo em si, o que significa que os dados de 19 participantes (T = 9; C = 10) foram incluídos na análise final.

As características dos participantes estão apresentadas na Tabela 4. Foi solicitado aos participantes de ambos os grupos que mantivessem seus níveis habituais de atividade física e consumo alimentar durante todo o período de estudo. Este pedido foi confirmado verbalmente pelos participantes durante e após o estudo. Também foi solicitado aos participantes do grupo Treinado que estes tivessem a maior taxa de aderência o possível às sessões de treino. Este pedido foi alcançado com os participantes realizando as sessões nos dias da semana pré-programados (segunda-, quarta- e sexta-feira); porém, sempre que da impossibilidade do atendimento às sessões num destes dias, era solicitado aos participantes que repusessem tal sessão num outro dia (terça- e quinta-feira ou sábado). A taxa de aderência às sessões de treino do estudo foi de $94.78 \pm 7.19\%$.

Tabela 4. Características dos participantes.

	TREINADO	CONTROLE	P
	(N = 09)	(N = 10)	
Idade (anos)	27 ± 6	29 ± 6	0.56
Peso Corporal (kg)	73.4 ± 9.7	70.3 ± 9.9	0.47
Altura (m)	1.78 ± 0.06	1.77 ± 0.06	0.88
IMC (kg/m²)	23.5 ± 3.0	22.1 ± 2.1	0.26
Tempo sob dieta vegetariana (anos)	3.5 ± 3.0	5.1 ± 4.2	0.31
W_{max} (W)	233.3 ± 40.9	209.0 ± 24.7	0.14
VO_{2max} (ml.kg⁻¹.min⁻¹)	40.05 ± 6.21	39.14 ± 3.28	0.69
FC_{max} (bpm)	193 ± 6	191 ± 6	0.50
Trabalho Total - Wingate (J)	38827 ± 5957	36448 ± 6832	0.41
Gordura Corporal (%)	15.6 ± 6.7	12.6 ± 3.5	0.26

Os dados estão apresentados como média ± desvio-padrão. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos para qualquer um dos parâmetros. LEGENDA - IMC: índice de massa corporal; W_{max}: potência máxima; VO_{2max}: consumo máximo de oxigênio; FC_{max}: frequência cardíaca máxima; kg: quilogramas; m: metros; kg/m²: quilogramas por metro quadrado; W: watts; ml.kg⁻¹.min⁻¹: mililitros por quilograma por minuto; bpm: batimentos por minuto; J: Joules.

5.b. DESEMPENHO INTERMITENTE DE MEMBROS INFERIORES

Conforme observado na Tabela 4, o Teste-T independente não detectou diferenças significantes no trabalho total entre os grupos no período pré-intervenção

(T: 38827 ± 5957 ; C: 36448 ± 6832 ; $P = 0.41$). A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre o trabalho total ($F = 22.96$; $P = 0.0003$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P < 0.0001$; ES = 0.99), indicando um aumento do trabalho total realizado por este grupo em comparação ao período pré-intervenção ($+10.07 \pm 5.79\%$; Figura 20, Painel A), enquanto nenhuma diferença foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($-2.17 \pm 5.75\%$; $P = 0.20$; ES = -0.09; Figura 20, Painel A). A Figura 20 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta do trabalho total, onde diferenças significantes ($P = 0.0003$) entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente.

Figura 20: PAINEL A - Trabalho total realizado antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção pelos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas); **PAINEL B** - Variação absoluta no trabalho total realizado pelos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.01$).

Tanto no período pré- quanto pós-intervenção, ambos os grupos experimentaram uma redução significativa da potência média na Série 3 do Teste de Wingate em comparação à Série 1 (Figura 21, Painéis A e B). Apesar disso,

comparada ao teste pré-intervenção, a potência média no teste pós-intervenção foi significativamente maior na 2ª e 3ª série do grupo Treinado (Figura 21, Painel A; ambas ao nível $P \leq 0.05$). Nenhuma alteração foi verificada neste sentido no grupo Controle (Figura 21, Painel B).

Figura 21 - Potência média durante cada série do teste de Wingate pré- (barras brancas) e pós-intervenção (barras pretas) nos grupos Treinado (**Painel A**) e Controle (**Painel B**). Legenda: O símbolo \$ significa diferença estatisticamente significativa em relação à Série 1 ao nível $P \leq 0.05$; O símbolo * significa diferença estatisticamente significativa em relação à mesma série no período pré-intervenção ao nível $P \leq 0.05$.

Similarmente à potência média, uma redução significativa da potência pico foi experimentada por ambos os grupos na Série 3 do Teste de Wingate em comparação à Série 1 (Figura 22, Painéis A e B), tanto antes quanto após a intervenção. Contudo, não foram observadas quaisquer diferenças neste parâmetro do período pré- para o período pós-intervenção, tanto no grupo Controle (Figura 22, Painel B) quanto no grupo Treinado (Figura 22, Painel A).

Figura 22 - Potência pico durante cada série do teste de Wingate pré- (barras brancas) e pós-intervenção (barras pretas) nos grupos Treinado (**Painel A**) e Controle (**Painel B**). Legenda: O símbolo \$ significa diferença estatisticamente significativa em relação à Série 1 ao nível $P \leq 0.05$.

5.c. CAPACIDADE FÍSICA

Conforme destacado no tópico de "avaliação da capacidade física e do consumo máximo de oxigênio", a Capacidade Física foi caracterizada pelo conjunto dos parâmetros Tempo até a Exaustão, Potência Máxima e Distância Total, e assim, cada um deles será individualmente contemplado.

O Teste-T independente não detectou diferenças significantes no tempo até a exaustão entre os grupos no período pré-intervenção (T: 1970.00 ± 371.08 segundos; C: 1681.80 ± 258.93 segundos; $P = 0.09$). A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre o tempo até a exaustão ($F = 5.40$; $P = 0.027$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo

efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P = 0.004$; $ES = 1.32$), indicando um aumento do tempo até a exaustão neste grupo em comparação ao período pré-intervenção (+23.72%; Figura 23, Painel A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.78$; $ES = -0.17$; Figura 23, Painel A). A Figura 23 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta do tempo até a exaustão, onde diferenças significantes ($P = 0.0002$) entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente.

Figura 23: PAINEL A - Tempo até a exaustão antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas); **PAINEL B** - Variação absoluta no tempo até a exaustão dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.004$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$).

Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos no período pré-intervenção para o parâmetro distância total (T: 14106.4 ± 4005.1 metros; C: 11686.1 ± 2432.7 metros; $P = 0.16$). A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre a distância total ($F = 5.92$; $P = 0.021$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P = 0.002$), indicando um aumento da distância total percorrida por

este grupo no teste progressivo máximo em comparação ao período pré-intervenção (+42.34%; Figura 24, Painel A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.83$; Figura 24, Painel A). A Figura 24 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta da distância total, onde diferenças significantes ($P = 0.0006$) entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente.

Figura 24: PAINEL A - Distância total antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas); **PAINEL B** - Variação absoluta na distância total percorrida pelos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.002$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$).

O Teste-T independente não detectou diferenças significantes na potência máxima alcançada no teste progressivo entre os grupos no período pré-intervenção (T: 233.30 ± 40.90 W; C: 209.00 ± 24.70 W; $P = 0.14$). A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre a potência máxima ($F = 6.67$; $P = 0.015$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P = 0.003$; ES = 1.29), indicando um aumento da potência máxima adquirida por este grupo em comparação ao período pré-

intervenção (+21.07%; Figura 25, Painel A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.58$; ES = -0.16; Figura 25, Painel A). A Figura 25 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta da potência máxima, onde diferenças significantes ($P = 0.0004$) entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente.

Figura 25: PAINEL A - Potência máxima adquirida no teste progressivo máximo dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta na potência máxima pelos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.003$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$).

5.d. CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO E LIMIARES VENTILATÓRIOS

O Teste-T independente não detectou diferenças significantes no $VO_{2máx}$ entre os grupos no período pré-intervenção (T: $40.05 \pm 6.21 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; C: $39.14 \pm 3.28 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $P = 0.69$). A análise pelo Modelo Misto não detectou qualquer interação Grupo x Tempo significativa sobre o $VO_{2máx}$ ($F = 0.98$; $P = 0.32$).

Similarmente, não foram verificadas diferenças significantes intra-grupo para esta variável para o grupo Treinado ($P = 0.20$; ES = 0.52) ou Controle ($P = 0.88$; ES = 0.09) (Figura 26, Painel A). Contudo, uma diferença significativa ($P = 0.045$) entre os grupos na variação absoluta do $VO_{2\text{máx}}$ foi detectada pelo Teste-T independente (Figura 26, Painel B), com o treinamento físico proporcionando um aumento de 8.11% (+ 3.25 mL.kg⁻¹.min⁻¹) neste parâmetro.

Figura 26: PAINEL A - Consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$) atingido no teste progressivo máximo dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta no consumo máximo de oxigênio dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta).

Curiosamente, o Teste-T independente detectou uma tendência a diferença estatística entre os grupos no tempo de teste em que o 1° limiar ventilatório foi atingido (T: 1413.3 ± 429.1 segundos; C: 1107.00 ± 260.55 segundos; $P = 0.08$) no período pré-intervenção; e uma diferença significativa entre os grupos no tempo de teste em que o 2° limiar ventilatório foi atingido (T: 1873.3 ± 354.7 segundos; C: 1473.0 ± 211.9 segundos; $P = 0.01$) neste mesmo período.

A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre o 1° ($F = 6.04$; $P = 0.020$) e 2° limiares ventilatórios ($F = 5.63$; $P =$

0.024). O Modelo Misto também revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P = 0.012$; ES = 1.14), indicando um aumento do tempo para atingir o 1º limiar ventilatório por este grupo em comparação ao período pré-intervenção (+28.95%; Figura 27, Painel A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.39$; ES = -0.36; Figura 27, Painel A). Similarmente, um significativo efeito intra-grupo foi observado para o grupo Treinado ($P = 0.014$; ES = 1.08) no tempo para atingir o 2º limiar ventilatório (+19.90%; Figura 28, Painel A), enquanto nenhuma alteração foi verificada no grupo Controle ($P = 0.42$; ES = -0.35; Figura 28, Painel A).

As Figuras 27 (Painel B) e 28 (Painel B) trazem os resultados da análise da variação absoluta do tempo em que o 1º e 2º limiares ventilatórios foram atingidos, respectivamente, onde diferenças significantes entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente para ambas as variáveis (ambos $P < 0.01$).

Figura 27: PAINEL A - Tempo para atingir o 1º limiar ventilatório (1º LV) durante o teste progressivo máximo dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta no tempo para atingir o 1º LV dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.012$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$). O símbolo \$ significa tendência estatística a um efeito inter-grupo ao nível $P = 0.08$.

Figura 28: PAINEL A - Tempo para atingir o 2º limiar ventilatório (2º LV) durante o teste progressivo máximo dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta no tempo para atingir o 2º LV dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.014$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P \leq 0.01$).

5.e. CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE LACTATO PLASMÁTICO E POTÊNCIA REFERENTE AO LIMAR DE LACTATO

O Teste-T independente não detectou diferenças significantes entre os grupos na concentração de lactato plasmático avaliada ao final do teste progressivo no período pré-intervenção (T: 10.29 ± 1.19 mmol/L; C: 9.24 ± 1.11 mmol/L; $P = 0.13$). A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre o lactato plasmático ($F = 5.58$; $P = 0.025$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P < 0.001$),

indicando um aumento da concentração plasmática de lactato ao final do teste neste grupo em comparação ao período pré-intervenção (+32.41%; Figura 29, Painel A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.16$; Figura 29, Painel A). A Figura 29 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta da concentração máxima de lactato plasmática, onde diferenças significantes ($P = 0.02$) entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente.

Figura 29: PAINEL A - Concentração plasmática de lactato ao final do teste progressivo máximo dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta na concentração plasmática de lactato dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P < 0.0001$).

De modo curioso e similar aos resultados dos Limiares Ventilatórios, o Teste-T independente detectou uma diferença significativa entre os grupos na potência referente ao momento em que o limiar de lactato foi atingido no teste progressivo (T: 138.1 ± 19.0 W; C: 121.1 ± 13.1 W; $P = 0.041$) no período pré-intervenção.

A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre a potência referente ao limiar de lactato ($F = 7.74$; $P = 0.009$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P = 0.0003$), indicando um aumento da potência/intensidade necessária para atingir o limiar de lactato neste grupo em comparação ao período pré-intervenção (+23.17%; Figura 30, Painel A), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.94$; Figura 30, Painel A). A Figura 30 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta da potência referente ao limiar de lactato, onde diferenças significantes ($P = 0.0002$) entre os grupos foram detectadas pelo Teste-T independente.

Figura 30: PAINEL A - Potência necessária para atingir o limiar de lactato dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta na potência referente ao limiar de lactato dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta). Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.0003$). O símbolo # indica efeito inter-grupo estatisticamente significativo ($P \leq 0.05$).

5.f. PESO E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Não foram detectadas diferenças significantes entre o peso corporal dos grupos no período pré-intervenção (T: 73.4 ± 9.7 kg; C: 70.3 ± 9.9 kg; $P = 0.47$). A análise pelo Modelo Misto não detectou interação Grupo x Tempo significativa sobre o peso corporal ($F = 0.85$; $P = 0.37$). Similarmente, o Modelo Misto não detectou quaisquer efeitos intra-grupo para este parâmetro, seja para o grupo Treinado ($P = 0.12$) ou grupo Controle ($P = 0.71$). Por fim, não foram detectadas diferenças significantes ($P = 0.40$) entre os grupos na análise da variação absoluta do peso corporal.

O Teste-T independente não detectou diferenças significantes entre os grupos na gordura corporal no período pré-intervenção (T: 15.5 ± 6.7 %; C: 12.6 ± 3.5 %; $P = 0.26$). A análise pelo Modelo Misto não detectou interação Grupo x Tempo significativa sobre a gordura corporal ($F = 0.23$; $P = 0.63$). Em concordância, o Modelo Misto também não detectou quaisquer efeitos intra-grupo, seja para o grupo Treinado ($P = 0.27$; Figura 31, Painel A) ou grupo Controle ($P = 0.72$; Figura 31, Painel A). A Figura 31 (Painel B) traz os resultados da análise da variação absoluta da gordura corporal, onde também não foi observada qualquer diferença significativa ($P = 0.64$) entre os grupos.

Figura 31: PAINEL A - Gordura corporal dos grupos Controle (barras brancas) e Treinado (barras pretas), antes (PRÉ) e depois (PÓS) da intervenção; **PAINEL B** - Variação absoluta na gordura corporal dos grupos Controle (barra branca) e Treinado (barra preta).

5.g. CONSUMO ALIMENTAR

Na Tabela 5 estão apresentados os dados de consumo alimentar dos participantes antes e após o período de intervenção, contendo o consumo calórico, de carboidratos, de proteínas, de gorduras e o consumo de proteínas/kg de peso corporal. Em conformidade com a ausência de ingestão de carnes na dieta, não foi possível observar nos diários alimentares dos participantes o consumo de beta-alanina e de seus derivados. Adicionalmente, conforme evidenciado na tabela, a dieta dos participantes permaneceu inalterada durante o estudo (para todos, interação Grupo x Tempo $P > 0.05$).

Tabela 5. Média do consumo alimentar dos participantes.

	TREINADO		CONTROLE		<i>P</i> *
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	
ENERGIA					
(kcal)	2717 ± 1066	2588 ± 899	2041 ± 430	1961 ± 438	0.81
PROT (g)	60.3 ± 32.4	80.7 ± 28.5	84.2 ± 57.9	73.2 ± 28.2	0.23
PROT (%)	11.4 ± 4.5	13.1 ± 4.3	13.1 ± 3.6	14.0 ± 4.4	0.82
CHO (g)	461.3 ± 272.0	406.0 ± 235.9	331.8 ± 102.7	275.0 ± 58.4	0.82
CHO (%)	62.5 ± 12.2	60.2 ± 15.8	56.1 ± 5.9	55.8 ± 6.5	0.65
GORD (g)	76.1 ± 28.4	71.3 ± 44.4	85.3 ± 44.6	67.8 ± 25.9	0.47
GORD (%)	30.9 ± 8.2	26.6 ± 12.7	30.8 ± 5.5	26.1 ± 10.2	0.49
Prot/kg	0.99 ± 0.43	1.10 ± 0.50	0.94 ± 0.27	1.07 ± 0.41	0.91

Legenda: * - os valores desta coluna fazem referência ao valor *P* de interação Grupo x Tempo; kcal - quilocaloria; PROT: proteína; CHO: carboidrato; GORD: gordura; Prot/kg - proteína por quilograma de peso corporal; g: gramas.

5.h. CAPACIDADE TAMPONANTE MUSCULAR *IN VITRO*

O Teste-T independente não detectou diferenças significantes na capacidade tamponante muscular *in vitro* ($\beta m_{in vitro}$) entre os grupos no período pré-intervenção (T: 129.40 ± 27.37 mmol H^+ . kg músculo seco⁻¹. unidade de pH⁻¹; C: 180.40 ± 33.37 mmol H^+ . kg músculo seco⁻¹. unidade de pH⁻¹; $P = 0.07$). A análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre a $\beta m_{in vitro}$ ($F = 7.30$; $P = 0.020$). Além disso, o Modelo Misto revelou um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado ($P = 0.047$; ES = 1.17), indicando um aumento da $\beta m_{in vitro}$ neste grupo em comparação ao período pré-intervenção (+42.90%; Figura 32), enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para este parâmetro no grupo Controle ($P = 0.136$; ES = -0.63; Figura 32).

Figura 32: Capacidade tamponante intramuscular *in vitro* ($\beta m_{in vitro}$ em mmol H^+ . kg⁻¹ de músculo seco. unidade de pH⁻¹) nos grupos Treinado (barras pretas) e Controle (barras brancas), antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de intervenção. Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.047$).

5.i. CONTEÚDO TOTAL DE CARNOSINA MUSCULAR

Não foram verificadas diferenças no conteúdo muscular de carnosina entre os grupos no período pré-intervenção (Controle: $14.3 \pm 5.3 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de músculo seco x Treinado: $15.8 \pm 5.7 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de músculo seco - $P = 0.981$). Interessantemente, a análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre o conteúdo muscular de carnosina ($F = 4.72$; $P = 0.049$). Especificamente, um significativo efeito intra-grupo (Figura 33) para o grupo Treinado foi verificado ($P = 0.012$; ES = 0.87), indicando um aumento (+36.04%; de 15.8 ± 5.7 para $20.6 \pm 5.3 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de músculo seco) das concentrações musculares de carnosina neste grupo em comparação ao período pré-intervenção (ver Figura 33). Nenhuma alteração significativa ocorreu no grupo Controle (de 14.3 ± 5.3 para $15.0 \pm 4.9 \text{ mmol.kg}^{-1}$ de músculo seco; $P = 0.99$; ES = 0.14).

Figura 33: Concentração intramuscular de carnosina (em mmol.kg^{-1} de músculo seco) nos grupos Treinado e Controle, antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de intervenção. Legenda: O símbolo * indica efeito intra-grupo estatisticamente significativo ($P = 0.012$).

5.j. CONTEÚDO DE CARNOSINA POR TIPO DE FIBRA MUSCULAR ISOLADA

Não foram verificadas diferenças no conteúdo muscular de carnosina nos diferentes tipos de fibra muscular isolada entre os grupos no período pré-intervenção (todos $P > 0.05$ - ver Tabela 6). A análise pelo Modelo Misto não indicou efeito de interação Grupo x Tempo x Tipo de Fibra sobre o conteúdo de carnosina nas fibras musculares isoladas ($F = 1.20$; $P = 0.347$). No entanto, um efeito principal

para o Tipo de Fibra foi verificado ($F = 36.62$; $P < 0.0001$), demonstrando haverem diferenças no conteúdo de carnosina das fibras do tipo I para as fibras do tipo IIa e IIx. Também foi executada a análise do Modelo Misto, com "Grupo" e "Tipo de Fibra" como fatores, para verificar potenciais diferenças na variação absoluta do conteúdo de carnosina nos diferentes tipos de fibra (ver Tabela 7). Nesse tocante, foi observada uma diferença significativa ($P = 0.032$) na variação absoluta da carnosina presente nas fibras do tipo IIa do grupo Treinado ($+13.77 \pm 17.94\%$) para o Controle ($-5.64 \pm 10.37\%$). Apesar da variação absoluta da carnosina presente nas fibras do tipo I do grupo Treinado ($+24.21 \pm 27.20\%$) para o Controle ($+1.48 \pm 18.49\%$) não ter atingido significância estatística ($P = 0.251$), 7 dos 9 participantes que finalizaram o estudo neste grupo aumentaram o conteúdo de carnosina neste tipo de fibra.

Tabela 6. Conteúdo de carnosina dos diferentes tipos de fibra muscular isolada dos grupos Controle (CTRL) e Treinado (TR), antes (PRÉ) e após (PÓS) o período de intervenção.

	PRE			PÓS		
	Tipo I	Tipo IIa	Tipo IIx	Tipo I	Tipo IIa	Tipo IIx
CTRL	14.01 ± 5.52	19.72 ± 4.47	19.47 ± 4.70	14.92 ± 5.44	18.75 ± 4.35	19.67 ± 4.74
	(N = 115)	(N = 103)	(N = 48)	(N = 71)	(N = 110)	(N = 52)
TR	14.38 ± 5.93	18.78 ± 6.06	17.51 ± 5.25	16.78 ± 7.59	20.51 ± 6.43	21.53 ± 7.04
	(N = 111)	(N = 131)	(N = 55)	(N = 79)	(N = 100)	(N = 31)

Os dados estão expressados em média $\pm$ desvio-padrão.

Tabela 7. Variação absoluta (em mmol.kg^{-1}) no conteúdo de carnosina dos grupos Controle (CTRL) e Treinado (TR) entre os diferentes tipos de fibra muscular isolada.

	Δ Tipo I	Δ Tipo IIa
CTRL	$+0.16 \pm 2.02$	-1.21 ± 2.08
TR	$+2.70 \pm 3.27$	$+2.04 \pm 2.24^*$

Os dados estão expressados em média $\pm$ desvio-padrão. O símbolo * refere-se a diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTRL.

5.k. EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS E TRANSPORTADORES VINCULADOS À CARNOSINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

A análise pelo Modelo Misto não revelou qualquer efeito de interação Grupo x Tempo (ver Figura 34) sobre a expressão de CARNS ($F = 1.71$; $P = 0.208$), CNDP-2 ($F = 0.59$; $P = 0.453$), ABAT ($F = 1.53$; $P = 0.231$), PAT-1 ($F = 0.71$; $P = 0.412$) ou TauT ($F = 0.02$; $P = 0.898$).

Figura 34: Expressão gênica da carnosinase (CNDP II), beta-alanina transaminase (ABAT), transportador da taurina (TauT), transportador de prótons/aminoácidos 1 (PAT 1) e carnosina-sintase (CARNS). Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio-padrão das mudanças ("fold change") no período PÓS, com os níveis no período PRÉ-intervenção de ambos os grupos arbitrariamente estabelecidos em 1. Nenhuma diferença significativa foi observada.

Por outro lado, a análise pelo Modelo Misto revelou um significativo efeito de interação Grupo x Tempo sobre a expressão de PHT1 ($F = 11.12$; $P = 0.004$).

Especificamente, um significativo efeito intra-grupo para o grupo Treinado foi verificado ($P = 0.036$), indicando um aumento da expressão gênica de PHT1 neste grupo em comparação ao período pré-intervenção (ver Figura 35).

Figura 35: Expressão gênica do transportador histidina/peptídeos 1 (PHT1). Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio-padrão das mudanças ("*fold change*") no período PÓS, com os níveis no período PRÉ-intervenção de ambos os grupos arbitrariamente estabelecidos em 1. Um significativo efeito intra-grupo ($P = 0.036$) foi observado para o grupo Treinado.

6. DISCUSSÃO

Até a condução do presente estudo remanesce a dúvida sobre o potencial adaptativo da carnosina muscular em resposta ao treinamento físico. Na verdade, a predominância de resultados na literatura a respeito desta temática direcionava fisiologistas e cientistas do esporte a concluir a favor da ausência de efeitos do treinamento físico sobre a modulação deste dipeptídeo no músculo esquelético. Contudo, é possível que as diversas limitações circundando os estudos anteriores possam ter gerado conclusões precipitadas. Nesse tocante, nenhum destes estudos controlou a variável interveniente mais importante no que diz respeito à concentração intramuscular de carnosina: a ingestão dietética de carnosina e de seu aminoácido constituinte, a beta-alanina (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, HILL, SALE & WISE, 2005). Além disso, é possível que os estudos anteriores não tenham empregado protocolos de treinamento com intensidade (MANNION, JAKEMAN & WILLAN, 1994; KENDRICK, HARRIS, KIM, KIM, DANG, LAM, BUI, SMITH & WISE, 2008) e/ou duração (KENDRICK, KIM, HARRIS, KIM, DANG, LAM, BUI & WISE, 2009; BAGUET, EVERAERT, DE NAEYER, EYNGOUDT, STEGEN, BEECKMAN, ACHTEN, VANHEE, VOLKAERT, PETROVIC, TAES & DERAIVE, 2011) suficientes para induzirem uma diminuição do pH intramuscular, limitando a possibilidade de aumento da concentração de carnosina intramuscular. E por fim, apenas um destes estudos mensurou a carnosina nos diferentes tipos de fibra muscular, permitindo um aumento considerável da sensibilidade da análise.

Em virtude do mencionado, ao recrutar participantes vegetarianos (isto é, não consumiam carnosina na dieta), empregar um protocolo de treinamento sabidamente capaz de aumentar a capacidade tamponante, e efetuar a análise de carnosina por tipo de fibra muscular, o presente estudo teve por objetivo investigar definitivamente os efeitos do treinamento físico sobre as concentrações intramusculares de carnosina. Em consonância com a hipótese inicial do projeto, os resultados nos mostram que o programa de treinamento intermitente de alta intensidade com duração de 12 semanas proporcionou um significativo aumento de aproximadamente 36% no conteúdo total de carnosina muscular, levando-nos à conclusão de que o protocolo de treinamento empregado pelo nosso grupo de fato foi eficaz em

aumentar as concentrações deste dipeptídeo no tecido muscular. Com isso, poder-se-ia especular que a alta acidose intramuscular gerada durante as sessões de treino tenha gerado sinais que, cronicamente, resultaram em um aumento das concentrações de carnosina, como uma resposta adaptativa no sentido de aumentar a capacidade tamponante muscular. E de fato, o ensaio da capacidade tamponante muscular *in vitro* nos mostrou que o programa de treinamento empregado induziu um aumento significativo desta variável (~43%), como consequência do aumento de carnosina.

Como se sabe, a medida da capacidade tamponante muscular *in vitro* é problemática. Durante a preparação das amostras, especificamente, durante a liofilização dos tecidos, todo o bicarbonato é removido/evaporado das amostras, e assim, este método não leva em consideração a contribuição desta molécula para o tamponamento. Em seguida, durante a trituração e homogeneização das amostras, a integridade dos compartimentos celulares é destruída, fato que inevitavelmente culminará em uma série de alterações metabólicas. Uma delas é a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, induzindo um acelerado turnover de ATP na célula devido à ação de ATPases dependentes de cálcio (PÖRTNER, BOUTILIER, & TOEWS, 1990). Tal ação está associada com uma ativação do metabolismo anaeróbio, resultando numa depleção rápida e quase completa de ATP e fosforilcreatina. Em última instância, a depleção destes substratos levará a um acúmulo de fosfatos inorgânicos dentro da célula, os quais sabidamente possuem capacidade de tamponar íons H^+ . Com isso, tem-se que o presente método de mensuração da capacidade tamponante *in vitro* superestima a real capacidade tamponante muscular (SPRIET, SÖDERLUND, THOMSON & HULTMAN, 1986). Apesar de tais limitações, este método vem sendo amplamente empregado na literatura e resultados consistentes tem sido apresentados. Por exemplo, o grupo de David Bishop e colaboradores observou um aumento significativo de 25% na capacidade tamponante muscular *in vitro* após 5 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade, utilizando um protocolo similar ao do presente estudo. O mesmo aumento não foi observado com o treinamento de intensidade moderada (EDGE, BISHOP & GOODMAN, 2006a). Similarmente, o mesmo grupo observou um aumento de 31% na capacidade tamponante muscular *in vitro* após 8 semanas do mesmo protocolo de treinamento intermitente de alta intensidade (EDGE, BISHOP & GOODMAN, 2006b). Em nosso estudo, um aumento de

aproximadamente 43% foi observado com o treinamento intermitente empregado, cuja característica foi similar a dos estudos acima mencionados. Com isso, é possível inferir que períodos de treinamento maiores resultarão em maiores adaptações da capacidade tamponante muscular *in vitro* e que a correlação entre os aumentos desta variável e o tempo de treinamento são positivos (para uma análise inferencial, ver Figura X). Assim, poder-se-ia especular que a acidose muscular/acúmulo de metabólitos pode funcionar como um gatilho para a adaptação da capacidade tamponante muscular ao treinamento intermitente de alta intensidade, a qual o conteúdo muscular de carnosina parece contribuir para aumentar, ainda que parcialmente. Estudos futuros devem se dedicar a examinar a real contribuição dos diferentes tampões intracelulares (carnosina, fosfatos inorgânicos, resíduos de histidina em proteínas, mioglobina) para a capacidade tamponante muscular, e quais/quanto destes tampões são modificados com o treinamento físico.

Figura 36: Correlação entre o tempo de treinamento físico e a variação absoluta da capacidade tamponante muscular *in vitro* ($\beta m_{in vitro}$ - em mmol H^+ .kg⁻¹ músculo seco. unidade de pH⁻¹). Foi observada uma correlação positiva e alta ($R = 0.89$) entre os parâmetros.

Com o intuito de auxiliar a explicação de tais achados, nosso grupo se debruçou sobre a hipótese de que o observado aumento de carnosina nas amostras musculares seria meramente um reflexo do deslocamento ('*shifting*') dos tipos de fibra muscular do tipo I (possuem menor conteúdo de carnosina) para o tipo II (possuem maior conteúdo de carnosina), principalmente em decorrência da

natureza intensa do treinamento empregado. Nesse sentido, analisando o músculo glúteo médio de camelos e cavalos puro-sangue, DUNNETT & HARRIS (1997) observaram valores médios de carnosina nas fibras do tipo I, IIa e IIb de 27.27 ± 5.89 , 89.69 ± 10.27 e 96.62 ± 12.93 mmol/kg de músculo seco, respectivamente. Similarmente, no músculo vasto lateral de humanos, HARRIS e colaboradores (1998) observaram o dobro do conteúdo muscular de carnosina em fibras musculares do tipo II quando comparadas às fibras do tipo I (23.2 vs. 10.5 mmol/kg de músculo seco). Ou seja, a quantidade de carnosina varia substancialmente em função do tipo de fibra muscular, tanto em animais quanto em humanos. É especulado que esta diferença se deva ao metabolismo predominante em cada tipo de fibra. A exemplo, dada a predominância do metabolismo glicolítico nas fibras do tipo II, com a consequente liberação e acúmulo de íons H^+ , um aumentado conteúdo de carnosina nestas fibras representaria uma adaptação ao 'ambiente acidótico' gerado pelo acúmulo de íons H^+ , e portanto, uma adaptação ao metabolismo predominante neste tipo de fibra.

Da mesma forma, sabe-se que, de acordo com a intensidade, o treinamento físico pode influenciar o deslocamento do tipo de fibra muscular (FITTS, 2003). Enquanto protocolos de menor intensidade proporcionam uma translocação de fibras do tipo II para as fibras do tipo I, protocolos de treinamento de maior intensidade proporcionam uma translocação das fibras musculares do tipo I para as fibras do tipo II (WILSON, LOENNEKE, JO, WILSON, ZOURDOS & KIM, 2012). Tais alterações também são exemplos de adaptações que ocorrem nas fibras musculares frente à demanda metabólica e contrátil imposta pelo treinamento físico. Em nosso estudo, empregamos um programa de treinamento intermitente de alta intensidade, e com isso, esperar-se-ia um aumento da capacidade tamponante muscular, bem como um maior deslocamento das fibras do tipo I no sentido das fibras do tipo II. Porém, fisiologicamente falando e conforme já mencionado, as fibras do tipo II possuem maior conteúdo de carnosina se comparadas às fibras do tipo I. Uma vez que a quantidade de carnosina varia em função do tipo de fibra muscular, havia a possibilidade de que as mudanças naturais decorrentes do treinamento físico nos diferentes tipos de fibras musculares, ou que as variações interindividuais na distribuição dos tipos de fibra pudessem ter afetado profundamente a quantidade total de carnosina nas nossas amostras de músculo esquelético. Por esse motivo, determinar a carnosina em fibras musculares isoladas se tornou imprescindível para

permitir uma avaliação mais robusta e precisa a respeito da nossa intervenção sobre o metabolismo da carnosina. Os resultados iniciais de carnosina por tipo de fibra muscular corroboram com a literatura vigente e reforçam a diferença pré-existente no conteúdo deste dipeptídeo das fibras do tipo I para as fibras IIa e IIx. Mas mais importante, tais resultados nos mostram que o aumentado conteúdo total de carnosina não é apenas o resultado de alterações fenotípicas, as quais provavelmente ocorreram mas não medimos no estudo, mas também o reflexo de aumentos específicos em ambos os tipos de fibra, com especial ênfase nas fibras do tipo IIa.

Tendo em mente que o aumentado conteúdo total de carnosina muscular com o treinamento físico não foi solenemente o resultado de um aumento na proporção de fibras do tipo II, mas também de um aumento da concentração deste dipeptídeo específico e inerente a estas fibras, nosso grupo persistiu na busca de um potencial mecanismo para os resultados observados. Para tanto, nosso grupo se adiantou a analisar a expressão gênica de uma série de enzimas e transportadores vinculados à síntese e transporte de carnosina no tecido muscular. Conforme o apresentado, não foram verificadas quaisquer alterações na expressão gênica de CARNS, CNBP 2, PAT 1, TauT ou ABAT, sugerindo que alterações na sua síntese e degradação, bem como no transporte e desaminação de um de seus aminoácidos constituintes (neste caso, a beta-alanina), não são considerados mecanismos responsáveis pelo observado aumento das concentrações de carnosina no músculo. Contudo, um significativo aumento da expressão gênica de PHT 1 foi observada em nossos experimentos, sendo este o único potencial mecanismo que pudemos encontrar que explica o observado aumento de carnosina. A saber, o PHT 1 é o transportador responsável pelo transporte de histidina e peptídeos, como a carnosina, para dentro da célula muscular. Tem-se por estabelecido que os níveis circulantes de carnosina são insignificantes, já que a alta atividade da enzima carnosinase presente no sangue rapidamente clivaria este dipeptídeo em seus aminoácidos constituintes, a beta-alanina e a histidina (SALE, ARTIOLI, GUALANO, SAUNDERS, HOBSON & HARRIS, 2013). Por conseguinte, o aumento da expressão gênica deste transportador provavelmente reflete a sua tentativa de transportar o aminoácido histidina para dentro da célula muscular, o outro aminoácido constituinte da carnosina. Contudo, dada a inexistência de anticorpos comercialmente disponíveis para avaliar a expressão proteica deste transportador e dos outros genes avaliados

neste estudo em amostras de humanos, apenas podemos especular sobre isso. Ainda assim, temos dificuldade em explicar como um aumentado transporte de histidina poderia favorecer o observado aumento de carnosina, já que é a disponibilidade de beta-alanina quem é considerada o fator limitante para a síntese de carnosina no tecido muscular (HARRIS, TALLON, DUNNETT, BOOBIS, COAKLEY, KIM, FALLOWFIELD, SALE & WISE, 2006). Por outro lado, dada a ausência de alterações na expressão gênica da maioria das enzimas e transportadores avaliados, há ainda a possibilidade de que o aumento de carnosina muscular observado em nosso estudo seja um reflexo de uma aumentada síntese endógena de β -alanina nos hepatócitos. De fato, considerando que os participantes do estudo eram vegetarianos, e portanto não consumiam carnosina pela dieta, tal mecanismo seria o mais promissor (e o que melhor convence o nosso grupo) na explicação de um eventual aumento da carnosina muscular. Por motivos óbvios, não foram realizadas biópsias hepáticas, e assim, este mecanismo ainda carece de ser elucidado.

De forma esperada, os resultados do estudo também demonstram que o programa de treinamento intermitente de alta intensidade foi eficaz em melhorar o desempenho físico intermitente de membros inferiores, bem como a capacidade física de uma forma geral. Dado que não foram detectadas alterações significantes no consumo alimentar (calorias, carboidratos, proteínas e gorduras) dos participantes do período pré- para o pós-treinamento, podemos afirmar que a dieta não teve qualquer influência na melhora proporcionada pela nossa intervenção. Embora o aumento do $VO_{2m\acute{a}x}$ (+ 3.25 ml.kg⁻¹.min⁻¹; + 8.11%) proporcionado pela nossa intervenção possa parecer ligeiramente baixo, tal aumento está em concordância com meta-análises recentemente publicadas na literatura mostrando incrementos semelhantes do $VO_{2m\acute{a}x}$ (~ 3.6 ml.kg⁻¹.min⁻¹; + 4.2 a 13.4%) após a aplicação de programas de treinamento intermitente com natureza e duração similares ao nosso (SLOTH, SLOTH, OBERGAARD & DALGAS, 2013; GIST, FEDEWA, DISHMAN & CURETON, 2014). Por outro lado, não foram observadas quaisquer alterações decorrentes do treinamento na gordura corporal dos participantes. Apesar dos cuidados que tivemos para diminuir os potenciais erros desta medida, tais como a padronização de um avaliador experiente para a execução do protocolo de dobras cutâneas, bem como a mensuração de uma mesma dobra 3 vezes, ainda é possível que a variação inerente à medida (no nosso

estudo foi de ~2%) tenha mascarado os potenciais efeitos do nosso programa de treinamento sobre esta variável. Independentemente da ausência de efeitos do treinamento sobre a gordura corporal, mediante a modulação positiva de todos os outros parâmetros, podemos concluir que o nosso programa de treinamento intermitente de alta intensidade empregado por 12 semanas se mostrou uma ferramenta efetiva para melhorar o condicionamento, a capacidade e o desempenho físicos.

Diversos estudos têm descrito inúmeras adaptações musculares em resposta ao treinamento intermitente de alta intensidade. No presente estudo, nós confirmamos que um aumento da capacidade tamponante muscular é uma adaptação ao treinamento intermitente de alta intensidade, além de expandir esta noção ao demonstrar que um aumentado conteúdo muscular total de carnosina é uma nova adaptação este tipo de treino, o que auxilia parcialmente a explicar a aumentada capacidade tamponante muscular. Este aumento do conteúdo muscular total de carnosina não é direcionado apenas devido a alterações no *shifting* de fibras musculares, mas a um aumento intrínseco de carnosina em todos os tipos de fibra. Tal fato provavelmente se deve à uma produção endógena aumentada de beta-alanina nos hepatócitos, embora os mecanismos exatos ainda precisem ser determinados.

Em conclusão, este estudo demonstrou que o treinamento intermitente de alta intensidade pode aumentar o conteúdo muscular de carnosina, total e por tipo de fibra, por mecanismos distintos da regulação crônica da expressão de seus genes. Tal aumento, associado ao da capacidade tamponante muscular *in vitro*, pode ajudar fisiologistas e cientistas do esporte a explicarem o potente efeito deste tipo de treino sobre o desempenho físico e a saúde.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; OKUMA, E. Rigor mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 57, p. 2095-2100, 1991.

ABE, H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 7, p. 757–765, 2000.

AHLBORG B, BERGSTROM J, EKELUND L, GUARNIERI G, HARRIS RC, HULTMAN E & NORDESJO LO. Muscle metabolism during isometric exercise performed at constant force. **Journal of Applied Physiology**, v. 33, p. 224–228, 1972.

ALDINI, G.; CARINI, M.; BERETTA, G.; BRADAMANTE, S.; FACINO, R.M. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: Through what mechanism of reaction? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 699-706, 2002.

ANDERSON, C.M.; HOWARD, A.; WALTERS, J.R.; GANAPATHY, V.; THWAITES, D.T. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 4, p. 731–744, 2009.

ARTIOLI, G.G.; GUALANO, B.; SMITH, A.; STOUT, J.; LANCHI, A.H. Jr. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 6, p. 1162-1173, 2010.

ASATOOR, A.M.; BANDO, J.K.; LANT, A.F.; MILNE, M.D.; NAVAB, F. Absorption of amino acids and the dipeptide, carnosine, from the gut in normal subjects and a case of Hartnup disease. **Clinical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 568, 1969.

ASATOOR, A.M.; BANDO, J.K.; LANT, A.F.; MILNE, M.D.; NAVAB, F. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. **Gut**, v. 11, n. 3, p. 250-254, 1970.

ASHIKAWA, I.; ITOH, K. Raman-spectra of polypeptides containing L-histidine residues and tautomerism of imidazole side-chain. **Biopolymers**, v. 18, p. 1859–1876, 1979.

AVIOLI, L. Calcium and phosphorus. In: Shils M, Young V, editors. Modern nutrition in health and disease. **Philadelphia; Lea & Febiger**, p. 254–288, 1988.

BAGUET, A.; REYNGOUDT, H.; POTTIER, A.; EVERAERT, I.; CALLENS, S.; ACHTEN, E.; DERAIVE, W. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 3, p. 837-42, 2009.

BAGUET, A.; EVERAERT, I.; DE NAEYER, H.; REYNGOUDT, H.; STEGEN, S.; BEECKMAN, S.; ACHTEN, E.; VANHEE, L.; VOLKAERT, A.; PETROVIC, M.; TAES, Y.; DERAIVE, W. Effects of sprint training combined with vegetarian or mixed diet on muscle carnosine content and buffering capacity. **European of Journal Applied Physiology**, v. 111, n. 10, p. 2571-2580, 2011.

BAGUET, A.; EVERAERT, I.; ACHTEN, E.; THOMIS, M.; DERAIVE, W. The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 13-20, 2012.

BAKARDJIEV, A.; BAUER, K. Transport of beta-alanine and biosynthesis of carnosine by skeletal muscle cells in primary culture. **European Journal of Biochemistry**, v. 225, n. 2, p. 617-623, 1994.

BATE-SMITH, E.C. The buffering of muscle in rigor: protein, phosphate and carnosine. **Journal of Physiology**, v. 92, p. 336-343, 1938

BATRUKOVA. M. A.; RUBTSOV, A. M. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1324, n. 1, p. 142-150, 1997.

BAUER, K.; SCHULZ, M. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 1-2, p. 43-47, 1994.

BERGSTROM, J. Muscle electrolytes in man determination by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. A study on normal subjects, kidney patients and patients with chronic diarrhea. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 14, p. 100–110, 1962.

BISHOP, D.; JENKINS, D.G.; MACKINNON, L.T. The relationship between plasma lactate parameters, W_{peak} and 1-h cycling performance in women. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, p. 1270–1275, 1998.

BOLDYREV, A.A.; DUPIN, A.M.; PINDEL, E.V.; SEVERIN, S.E. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 89, n. 2, p. 245-250, 1988.

BOLDYREV, A.A.; KOLDOBSKI, A.; KURELLA, E.; MALTSEVA, V.; STVOLINSKI, S. Natural histidine-containing dipeptide carnosine as a potent hydrophilic antioxidant with membrane stabilizing function. A biomedical aspect. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 19, n. 1-2, p. 185–192, 1993.

BOLDYREV, A.A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. **Physiology and pathophysiology of carnosine**. *Physiological Reviews*, v. 93, n. 4, p. 1803-1845, 2013.

BONEN, A.; McCULLAGH, K.J.; PUTMAN, C.T.; HULTMAN, E.; JONES, N.L.; HEIGENHAUSER, G.L. Short-term training increases human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 1, p. 102-107, 1998.

BROOKS, G.A.; DUBOUCHAUD, H.; BROWN, M.; SICURELLO, J.P.; BUTZ, E. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 3, p. 1129–1134, 1999.

BUCK, C.L.; WALLMAN, K.E.; DAWSON, B.; GUELFI, K.J. Sodium phosphate as an ergogenic aid. **Sports Medicine**, v. 43, n. 6, p. 425-435, 2013.

BURGOMASTER, K.A.; CERMAK, N.M.; PHILLIPS, S.M.; BENTON, C.R.; BONEN, A.; GIBALA, M.J. Divergent response of metabolite transport proteins in human

skeletal muscle after sprint interval training and detraining. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 5, p. 1970-1976, 2007.

BURNETT, S.M.; GUNAWARDENE, S.C.; BRINGHURST, F.R.; JUPPNER, H.; LEE, H.; FINKELSTEIN, J.S. Regulation of C-Terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 8, p. 1187–1196, 2006.

CAIN, D.F.; DELLUVA, A.M.; DAVIES, R.E. Carnosine phosphate as phosphate donor in muscular contraction. **Nature**, v. 182, n. 4637, p. 720-721, 1958.

CAIN, D.F.; INFANTE, A.A.; DAVIES, R.E. Chemistry of muscle contraction. Adenosine triphosphate and phosphorylcreatine as energy supplies for single contractions of working muscle. **Nature**, v. 196, p. 214-217, 1962.

CARNEGIE, P.R.; ILIC, M.Z.; ETHERIDGE, M.O.; COLLINS, M.G. Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balenine present in fresh meat. **Journal of Chromatography**, v. 261, n. 1, p. 153-157, 1983.

COSTILL, D.L.; BARNETT, A.; SHARP, R.; FINK, W.J.; KATZ, A. Leg muscle pH following sprint running. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 15, p. 325-329, 1983.

COSTILL, D.L.; VERSTAPPEN, F.; KUIPERS, H.; JANSSEN, E.; FINK, W. Acid base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO₃. **International Journal of Sports Medicine**, v. 5, n. 5, p. 228–231, 1984.

DANIEL, H.; KOTTRA, G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 610-618, 2004.

DECKER, B.; SENDER, S.; GROS, G. Membrane-associated carbonic anhydrase IV in skeletal muscle: subcellular localization. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 405-411, 1996.

DERAVE, W.; EVERAERT, I.; BEECKMAN, S.; BAGUET, A. Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247-263, 2010.

DE SALLES PAINELLI, V.; DA SILVA, R.P.; DE OLIVEIRA Jr, O.M.; DE OLIVEIRA, L.F.; BENATTI, F.B.; RABELO, T.; GUILHERME, J.P.; LANCHI Jr, A.H.; ARTIOLI, G.G. The Effects of Two Different Doses of Calcium Lactate on Blood pH, Bicarbonate and Repeated High-Intensity Exercise Performance. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, 2014. [em impressão]

DONALDSON, S.K.; HERMANSEN, L.; BOLLES, L. Differential, direct effects of H^+ on Ca^{2+} -activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 376, n. 1, p. 55-65, 1978.

DUBOUCAUD, H.; BUTTERFIELD, G.E.; WOLFEL, E.E.; BERGMAN, B.C.; BROOKS, G.A. Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 278, n. 4, p. 571-579, 2000.

DUNNETT, M.; HARRIS, R.C. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. **Journal of Chromatography**, v. 688, n. 1, p. 47–55, 1997.

DUNNETT, M.; HARRIS, R.C. Carnosine and taurine contents of different fibre types in the middle gluteal muscle of the Thoroughbred horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 18, p. 214–217, 1997.

DUTKA, T. L.; LAMB, G. D. Effect of carnosine on excitation-contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 25, n. 3, p. 203-213, 2004.

DUTKA, T.L.; LAMBOLEY, C.R.; McKENNA, M.J.; MURPHY, R.M.; LAMB, G.D. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**. v. 112, n. 5, p. 728-736, 2012.

EDGE, J.; BISHOP, D.; GOODMAN, C. The effects of training intensity on muscle buffer capacity in females. **European Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 1, p. 97-105, 2006 (a).

EDGE, J.; BISHOP, D.; GOODMAN, C. Effects of chronic NaHCO_3 ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 3, p. 918-925, 2006 (b).

EDGE, J.; EYNON, N.; MCKENNA, M.J.; GOODMAN, C.A.; HARRIS, R.C.; BISHOP, D.J. Altering the rest interval during high-intensity interval training does not affect muscle or performance adaptations. **Experimental Physiology**, v. 98, p. 481-490, 2013.

EDSALL, J.T. Biophysical Chemistry, **Academic Press, Inc.**, New York, 1958.

EVERAERT, I.; MOOYAART, A.; BAGUET, A.; ZUTINIC, A.; BAELE, H.; ACHTEN, E.; TAES, Y.; DE HEER, E.; DERAIVE, W. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. **Amino Acids**. v. 40, n. 4, p. 1221-1229, 2011.

EVERAERT, I.; TAES, Y.; DE HEER, E.; BAELE, H.; ZUTINIC, A.; YARD, B.; SAUERHOFER, S.; VANHEE, L.; DELANGHE, J.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Low plasma carnosinase activity promotes carnosinemia after carnosine ingestion in humans. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 302, n. 12, p. 1537-1544, 2012.

EVERAERT, I.; DE NAEYER, H.; TAES, Y.; DERAIVE, W. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**. v. 113, n. 5, p. 1169-1179, 2013.

FABIATO, A.; FABIATO, F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. **The Journal of Physiology**, v. 276, p. 233-255, 1978.

FAISS, R.; LEGER, B.; VESIN, J.M.; FOURNIER, P.E.; EGDEL, Y.; DERIAZ, O.; MILLET, G.P. Significant Molecular and Systemic Adaptations after Repeated Sprint Training in Hypoxia. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-13, 2013.

FAVERO, T. G.; PESSAH, I. N.; KLUG, G. A. Prolonged exercise reduces Ca^{2+} release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Pflugers Archiv**, v. 422, n. 5, p. 472-475, 1993.

FEI, Y.J.; KANAI, Y.; NUSSBERGER, S.; GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H.; ROMERO, M.F.; SINGH, S.K.; BORON, W.F.; HEDGER, M.A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. **Nature**, v. 368, n. 6471, p. 563-566, 1994.

FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13, p. 218, 2012.

FITTS, R.H. Cellular mechanisms of muscle fatigue. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 49-94, 1994.

FITTS, R. H. Effects of regular exercise training on skeletal muscle contractile function. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 82, p. 320-331, 2003.

FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mechanisms of amino acids and oligopeptides absorption in humans. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.

FUKUDA, D.H.; SMITH, A.E.; KENDALL, K.L.; STOUT, J.R. Phosphate Supplementation: An Update. **Strength and Conditioning Journal**, v. 32, n. 5, p. 53-56, 2010.

GARDNER, M.L.; ILLINGWORTH, K.M.; KELLEHER, J.; WOOD, D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. **Journal of Physiology**, v. 439, p. 411-422, 1991.

GIBALA, M.J.; LITTLE, J.P.; MACDONALD, M.J.; HAWLEY, J.A. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **Journal of Physiology**, v. 590, p. 1077-1084, 2012.

GIST, N.H.; FEDEWA, M.V.; DISHMAN, R.K.; CURETON, K.J. Sprint interval training effects on aerobic capacity: a systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 44, n. 2, p. 269-279, 2014.

GOLDMAN, H.I.; BECKLAKE, M.R. Respiratory function tests. **American Review of Tuberculosis and Pulmonary Disease**, v.79, p.457-467, 1959.

GOODALL, M.C. Carnosine phosphates as phosphate donor in muscular contraction. **Nature**, v. 178, p. 539–540, 1956.

GRAHAM, M.R.; DAVIES, B.; GRACE, F.M.; KICMAN, A.; BAKER, J.S. Anabolic steroid use: patterns of use and detection of doping. **Sports Medicine**, v. 38, n. 6, p. 505-525, 2008.

GREEN, H.J.; SUTTON, J.R.; WOLFEL, E.E.; REEVES, J.T.; BUTTERFIELD, G.E.; BROOKS, G.A. Altitude acclimatization and energy metabolic adaptations in skeletal muscle during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 73, n. 6, p. 2701-2708, 1992.

GUALANO, B.; EVERAERT, I.; STEGEN, S.; ARTIOLI, G.G.; TAES, Y.; ROSCHEL, H.; ACHTEN, E.; OTADUY, M. C.; JUNIOR, A. H.; HARRIS, R.; DERAIVE, W. Reduced muscle carnosine content in type 2, but not in type 1 diabetic patients. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 21-24, 2012.

GUARIGLIA, A.; ARDUINI, U.; DEL CANALE, S.; FIACCADORI, E.; COFFRINI, E.; MORI, G.; RENI, F.; VITALI, P. [Measurement of intracellular bicarbonate and pH: preliminary study using potentiometric determination of muscle acid-labile CO₂]. **Acta Biomedica Ateneo Parmense**, v. 54, n. 1, p. 19-26, 1983.

GUARIGLIA, A.; ANTONUCCI, C.; COFFRINI, E.; DEL CANALE, S.; FIACCADORI, E.; RENI, F.; VITALI, P.; ARDUINI, U.; BORGHETTI, A. Intracellular bicarbonate and pH of skeletal muscle in chronic renal failure. **Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 21, p. 881-887, 1985.

HARMER, P.A. Anabolic-androgenic steroid use among young male and female athletes: is the game to blame? **British Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 26-31, 2010.

HARRIS, R.C.; EDWARDS, R.H.; HULTMAN, E.; NORDESJO, L.O.; NYLIND, B.; SAHLIN, K. The time course of phosphorylcreatine resynthesis during recovery of the quadriceps muscle in man. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 367, n. 2, p. 137-142, 1976.

HARRIS, R. C.; MARLIN, D. J.; DUNNETT, M.; SNOW, D. H.; HULTMAN, E. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 249-251, 1990.

HARRIS, R.C.; DUNNETT, M.; GREENHAFF, P.L. Carnosine and taurine contents in individual fibres in human vastus lateralis muscle. **Journal of Sports Sciences**, v. 16, p. 639–643, 1998.

HARRIS, R.C.; TALLON, M.J.; DUNNETT, M.; BOOBIS, L.; COAKLEY, J.; KIM, H.J.; FALLOWFIELD, J.L.; HILL, C.A.; SALE, C.; WISE, J.A. The absorption of orally supplied Beta-Alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. **Amino Acids**, v. 30, n. 3, p. 279-289, 2005.

HARRIS, R.C.; SALE, C. Beta-alanine supplementation in high-intensity exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 59, p. 1-17, 2012.

HARRIS, R.C.; WISE, J.A.; PRICE, K.A.; KIM, H.J.; KIM, C.K.; SALE, C. Determinants of muscle carnosine content. **Amino Acids**, v. 43n. 1, p. 5-12, 2012.

HASHIMOTO, T.; HUSSIEN, R.; BROOKS, G.A. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 290, n. 6, p. 1237 – 1244, 2006.

HILL, C.A.; HARRIS, R.C.; KIM, H.J.; HARRIS, B.D.; SALE, C.; BOOBIS, L.H.; KIM, C.K.; WISE, J.A. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle

carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. **Amino Acids**, v. 32, n. 2, p. 225-233, 2007.

HIPKISS, A.R.; MICHAELIS, J.; SYRRIS, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. **FEBS Letters**, v. 371, n. 1, p. 81–85, 1995.

HIPKISS, A.R. Carnosine and protein carbonyl groups: a possible relationship. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 7, p. 771–778, 2000.

HOBSON, R.M.; SAUNDERS, B.; BALL, G.; HARRIS, R.C.; SALE, C. Effects of β -alanine supplementation on exercise performance: a meta-analysis. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 25-37, 2012.

HOLMGREN, A.; MOSSFELDT, F.; SJÖSTRAND, T.; STRÖM, G. Effect of Training on Work Capacity, Total Hemoglobin, Blood Volume, Heart Volume and Pulse Rate in Recumbent and Upright Positions. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 72-83, 1960.

HORINISHI, H.; GRILLO, M.; MARGOLIS, F.L. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. **Journal of Neurochemistry**, v. 31, n. 4, p. 909-919, 1978.

HULTMAN, E.; SAHLIN, K. Acid-base balance during exercise. **Exercise and Sport Science Reviews**, v. 8, p. 41-128, 1980.

IAIA, F.M.; THOMASSEN, M.; KOLDING, H.; GUNNARSSON, T.; WENDELL, J.; ROSTGAARD, T.; NORDSBORG, N.; KRUSTRUP, P.; NYBO, L.; HELLSTEN, Y.; BANGSBO, J. Reduced volume but increased training intensity elevates muscle Na⁺-K⁺ pump alpha1-subunit and NHE1 expression as well as short-term work capacity in humans. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. 966-974, 2008.

INBAR, O.; BAR-OR, O. Anaerobic characteristics in male children and adolescents. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 18, n. 3, p. 264–269, 1986.

IRULOH, C.G.; D'SOUZA, S.W.; SPEAKE, P.F.; CROCKER, I.; FERGUSON, W.; BAKER, P.N.; SIBLEY, C.P.; GLAZIER, J.D. Taurine transporter in fetal T lymphocytes and platelets: differential expression and functional activity. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. 332-341, 2007.

JACKSON, A.S.; POLLOCK, M.L. Prediction accuracy of body density, lean body weight, and total body volume equations. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 9, n. 4, p. 197-201, 1978.

JONES, G.; SMITH, M.; HARRIS, R. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. **Proceedings of the Nutrition Society**, 70 (OCE6), E363, 2011.

JUEL, C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 21–358, 1997.

JUEL, C. Skeletal muscle Na⁺/H⁺ exchange in rats: pH dependency and the effect of training. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 164, n. 2, p. 135-140, 1998.

JUEL, C. Expression of the Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE1 in rat skeletal muscle and effect of training. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 170, n. 1, p. 59-63, 2000

JUEL, C.; LUNDBY, C.; SANDER, M.; CALBET, J.A.; VAN HALL, G. Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. **Journal of Physiology**, v. 548, n. 2, p. 639-648, 2003.

JUEL, C. Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 193, n. 1, p. 17-24, 2008.

KALYANKAR, G.D.; MEISTER, A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, p. 3210-3218, 1959.

KANG, J.H.; KIM, K.S.; CHOI, S.Y.; KWON, H.Y.; WON, M.H.; KANG, T.C. Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxyl radical-mediated Cu, Zn superoxide dismutase modification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1570, n. 2, p. 89-96, 2002.

KATZ, A.; COSTILL, D.L.; KING, D.S.; HARGREAVES, M.; FINK, W.J. Maximal exercise tolerance after induced alkalosis. **International Journal of Sports Medicine**, v. 5, n. 2, p. 107-110, 1984.

KATZ, L.A.; SWAIN, J.A.; PORTMAN, M.A.; BALABAN, R.S. Intracellular pH and inorganic phosphate content of heart in vivo: a ^{31}P -NMR study. **The American Journal of Physiology**, v. 255, n. 1, p. 189-196, 1988.

KENDRICK, I.P.; HARRIS, R.C.; KIM, H.J.; KIM, C.K.; DANG, V.H.; LAM, T.Q.; BUI, T.T.; SMITH, M.; WISE, J.A. The effects of 10 weeks of resistance training combined with beta-alanine supplementation on whole body strength, force production, muscular endurance and body composition. **Amino Acids**, v. 34, n. 4, p. 547-554, 2008.

KENDRICK, I.P.; KIM, H.J.; HARRIS, R.C.; KIM, C.K.; DANG, V.H.; LAM, T.Q.; BUI, T.T.; WISE, J.A. The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 1, p. 131-138, 2009.

KIM, H.J.; KIM, C.K.; HARRIS, R.C.; HARRIS, D.B.; SALE, C.; WISE, J.A. Effect on muscle fibre morphology and carnosine content after 12 days training of Korean speed skaters. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, suplemento. 192, 2005.

KITAOKA, Y.; MACHIDA, M.; TAKEMASA, T.; HATTA, H. Expression of monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in overloaded mice plantaris muscle. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 61, n. 6, p. 467-472, 2011 (a).

KITAOKA, Y.; MASUDA, H.; MUKAI, K.; HIRAGA, A.; TAKEMASA, T.; HATTA, H. Effect of training and detraining on monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in Thoroughbred horses. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 3, p. 348-355, 2011 (b).

KJELLBERG, S.V.; RUDHE, U.; SJÖSTRAND, T. Increase of the Amount of Hemoglobin and Blood Volume in Connection with Physical Training. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 19, n. 2-3, p. 146-151, 1949.

KOHEN, R.; YAMAMOTO, Y.; CUNDY, K.C.; AMES, B.N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 9, p. 175-179, 1988.

KOOYMAN, G.L.; CASTELLINE, M.A.; DAVIS, R.W. Physiology of diving in marine mammals. **Annual Review of Physiology**, v. 43, p. 343-356, 1981.

KOWALCHUK, J.M.; SMITH, S.A.; WEENING, B.S.; MARSH, G.D.; PATERSON, D.H. Forearm muscle metabolism studied using ³¹P-MRS during progressive exercise to fatigue after Acz administration. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 1, p. 200–209, 2000.

KREIDER, R.B. Phosphate supplementation in exercise and sport. In: Driskell JA, Wolinsky I, editors. Macroelements, water and electrolytes in sport nutrition. **Boca Raton: CRC Press**, p. 29–46, 1999.

KRISTENSEN, J.M.; KRISTENSEN, M.; JUEL, C. Expression of Na⁺/HCO₃ co-transporter proteins (NBCs) in rat and human skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, n. 1, p. 69–76, 2004.

LAMONT, C.; MILLER, D.J. Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. **Journal of Physiology**, v. 454, p. 421–434, 1992.

LAMB, G. D. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 23, n. 1, p. 81-91, 2002.

LEE, P.M. The effect of a carbonic anhydrase inhibitor on the pH, bicarbonate, and carbon dioxide concentrations in blood and aqueous humour. **Journal of Physiology**, v. 128, n. 3, p. 80-81, 1955.

LENNEY, J.F.; PEPPERS, S.C.; KUCERA-ORALLO, C.M.; GEORGE, R.P. Characterization of human tissue carnosinase. **Biochemistry Journal**, v. 228, n. 3, p. 653-660, 1985.

LOWRY, O.H.; PASSONNEAU, J.V. The quartz fiber fishpole balance. In: Lowry OH, Passonneau JV 1972. **A flexible system of enzymatic analysis**. London, United Kingdom: Academic Press, Inc. 1972.

MAINWOOD, G.W.; WORSLEY-BROWN, P.A. The effect of extracellular pH and buffer concentration on the efflux of lactate from frog sartorius muscle. **Journal of Physiology**, v. 250, p. 1-22, 1975.

MAIRBAURL, H. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 1-13, 2013.

MANNION, A. F.; JAKEMAN, P. M.; DUNNETT, M.; HARRIS, R. C.; WILLAN, P. L. T. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 64, n. 1, p. 47-50, 1992.

MANNION, A.F.; JAKEMAN, P.M.; WILLAN, P.L. Determination of human skeletal muscle buffer value by homogenate technique: methods of measurement. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 3, p. 1412-1418, 1993.

MANNION, A.F.; JAKEMAN, P.M.; WILLAN, P.L. Effects of isokinetic training of the knee extensors on high-intensity exercise performance and skeletal muscle buffering. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 68, p. 356–361, 1994.

MATTHEWS, D.M.; ADDISON, J.M.; BURSTON, D. Evidence for active transport of the dipeptide carnosine (beta-alanyl-L-histidine) by hamster jejunum in vitro. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 46, n. 6, p. 693-705, 1974.

MATTHEWS, D.M.; ADIBI, S.A. Peptide absorption. **Gastroenterology**, v. 71, p. 151-161, 1976.

MATHEWS, M.M.; TRAUT, T.W. Regulation of N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase, the terminal enzyme in pyrimidine catabolism, by ligand-induced change in polymerization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 15, p. 7232-7237, 1987.

MESSONNIER, L.; KRISTENSEN, M.; JUEL, C.; DENIS, C. Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal

exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 5, p. 1936-1944, 2007.

MORA, L.; SENTANDREU, M.A.; TOLDRÁ, F. Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4664-4669, 2007.

NG, R.H.; MARSHALL, F.D. Regional and subcellular distribution of homocarnosine-carnosine synthetase in the central nervous system of rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 30, n. 1, p. 87-90, 1978.

OHE, M.; KAJITA, A. Changes in pKa values of individual histidine residues of human hemoglobin upon reaction with carbon monoxide. **Biochemistry**, v. 19, n. 19, p. 4443-4450, 1980.

OKUMA, E.; ABE, H. Major buffering constituents in animal muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 102, n. 1, p. 37-41, 1992.

PADILLA, J.; HAMILTON, S.A.; LUNDGREN, E.A.; McKENZIE, J.M.; MICKLEBOROUGH, T.D. Exercise training in normobaric hypoxia: is carbonic anhydrase III the best marker of hypoxia? **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 2, p. 730, 2007.

PARKHOUSE, W.S.; McKENZIE, D.C. Possible contribution of skeletal muscle buffers to enhanced anaerobic performance: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 16, n. 4, p. 328-338, 1984.

PARKHOUSE, W.S.; MCKENZIE, D.C.; HOCHACHKA, P.W.; OVALLE, W.K. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 58, n. 1, p. 14-17, 1985.

PARK, Y.J.; VOLPE, S.L.; DECKER, E.A. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4736-4739, 2005.

PAVLOV, A.R.; REVINA, A.A.; DUPIN, A.M.; BOLDYREV, A.A.; YAROPOLOV, A.I. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1157, n. 3, p. 304-312, 1993.

PENAFIEL, R.; RUZAF, C.; MONSERRAT, F.; CREMADES, A. Gender-related differences in carnosine, anserine and lysine content of murine skeletal muscle. **Amino Acids**, v. 26, n. 1, p. 53-58, 2004

PHILLIPS, S.M. Protein requirements and supplementation in strength sports. **Nutrition**, v. 20, n. 7-8, p. 689-695, 2004.

PILEGAARD, H.; BANGSBO, J.; RICHTER, E.A.; JUEL, C. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 4, p. 1858-1862, 1994.

PILEGAARD, H.; TERZIS, G.; HALESTRAP, A.; JUEL, C. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 5, p. 843-848, 1999 (a).

PILEGAARD, H.; DOMINO, K.; NOLAND, T.; JUEL, C.; HELLSTEN, Y.; HALESTRAP, A.P.; BANGSBO, J. Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 2, p. 255 — 261, 1999 (b).

PINTO, L.M.; DE SALLES PAINELLI, V.; LANCHA Jr, A.H.; ARTIOLI, G.G. Lactato: De causa da fadiga a suplemento ergogênico?. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 2, p. 173-181, 2014.

PLOWMAN, J.E.; CLOSE, E.A. An evaluation of a method to differentiate the species of origin of meats on the basis of the contents of anserine, balenine and carnosine in skeletal muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 45, n. 1, p. 69-78, 1988.

PÖRTNER, H.O. Determination of intracellular buffer values after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. **Respiration Physiology**, p. 81, n. 2, p. 275-288, 1990.

PÖRTNER, H.O.; BOUTILIER, R.G.; TANG, Y.; TOEWS, D.P. Determination of intracellular pH and PCO₂ after metabolic inhibition by fluoride and nitrilotriacetic acid. **Respiration Physiology**, p. 81, n. 2, p. 255-273, 1990.

PUTNEY, L.K.; DENKER, S.P.; BARBER, D.L. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 527-552, 2002.

REDDY, V. P.; GARRETT, M. R.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Carnosine: a versatile antioxidant and antiglycating agent. **Science of Aging Knowledge Environment**, v. 18, p. 12, 2005.

ROTHER, K.F. Changes in the extracellular pH value and its effect on the intracellular pH value of tissues. **Fortschritte der Medizin**, v. 102, n. 7, p. 158-163, 1984.

ROTH, D.A.; BROOKS, G.A. Lactate and pyruvate transport is dominated by a pH gradient-sensitive carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 279, n. 2, p. 386–394, 1990.

SAHLIN, K. Metabolic factors in fatigue. **Sports Medicine**, v. 13, n. 2, p. 99-107, 1992.

SALE, C.; ARTIOLI, G.G.; GUALANO, B.; SAUNDERS, B.; HOBSON, R.M.; HARRIS, R.C. Carnosine: from exercise performance to health. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1477-1491, 2013.

SCAGLIUSI, F.B.; POLACOW, V.O.; ARTIOLI, G.G.; BENATTI, F.B.; LANCHI JR, A.H. Selective underreporting of energy intake in women: magnitude, determinants, and effect of training. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 10, p. 1306-1313, 2003.

SEVERIN, S.E.; KIRZON, M.V.; KAFTANOVA, T.M. Effect of carnosine and anserine on action of isolated frog muscles. **Dokl Akad Nauk SSSR**, v. 91, p. 691–694, 1953.

SEWELL, D. A.; HARRIS, R. C.; MARLIN, D. J.; DUNNETT, M. Estimation of the carnosine content of different fibre types in the middle gluteal muscle of the Thoroughbred horse **Journal of Physiology**, v. 455, p. 447-453, 1997.

SIRI, W.E. Body composition from fluid spaces and density: Analyses of methods in techniques for measuring body composition. **National Academy of Sciences**, National Research Council, p.223-244, 1961.

SJOQVIST, F.; GARLE, M.; RANE, A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. **Lancet**, v. 371, n. 9627, p. 1872-1882, 2008.

SLEISENGER, M.H.; KIM, Y.S. Protein digestion and absorption. **New England Journal of Medicine**, v. 300, n. 12, p. 659, 1979.

SLOTH, M.; SLOTH, D.; OVERGAARD, K.; DALGAS, U. Effects of sprint interval training on VO₂max and aerobic exercise performance: A systematic review and meta-analysis. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 23, n. 6, p. 341-352.

SMITH, D.E.; CLEMENÇON, B.; HEDIGER, M.A. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2-3, p. 323-336, 2013.

SPRIET LL, SÖDERLUND K, THOMSON JA, HULTMAN E. pH measurement in human skeletal muscle samples: effect of phosphagen hydrolysis. **Journal of Applied Physiology**, v. 61, n. 5, p. 1949-1954, 1986.

STELLINGWERFF, T.; ANWANDER, H.; EGGER, A.; BUEHLER, T.; KREIS, R.; DECOMBAZ, J.; BOESCH, C. Effect of two β -alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. **Amino Acids**, v. 42, n. 6, p. 2461-2472, 2012.

STUERENBURG, H. J.; KUNZE, K. Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle biopsies and rat muscles. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 29, n. 2, p. 107-113, 1999.

STUERENBURG, H. J. The roles of carnosine in aging of skeletal muscle and in neuromuscular diseases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 7, p. 862-865, 2000.

SUTTON, J.R.; JONES, N.L.; TOEWS, C.J. Effect of PH on muscle glycolysis during exercise. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 61, n. 3, p. 331-338, 1981.

SUZUKI, Y.; ITO, O.; TAKAHASHI, H. The effect of sprint training on skeletal muscle carnosine in humans. **International Journal of Sport and Health Science**, v. 2, p. 105-110, 2004.

SWENSON, E.R. A comparative approach to carbonic anhydrase: the work of Thomas H. Maren. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 136, n. 2, p. 229-241, 2003.

TABATA, I.; NISHIMURA, K.; KOUZAKI, M.; HIRAI, Y.; OGITA, F.; MIYACHI, M.; YAMAMOTO, K. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO₂max. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 28, p. 1327-1330, 1996

TALLON, M.J.; HARRIS, R.C.; BOOBIS, L.H.; FALLOWFIELD, J.L.; WISE, J.A. The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 19, n. 4, p. 725-729, 2005.

TALMADGE, R.J.; ROY, R.R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 5, p. 2337-2340, 1993.

TANOKURA, M.; TASUMI, M.; MIYAZAWA, T. ¹H nuclear magnetic resonance studies of histidine-containing di- and tripeptides. Estimation of the effects of charged groups on the pKa value of the imidazole ring. **Biopolymers**, v. 15, n. 2, p. 393-401, 1976.

TELEPNEVA, V. I. Content of carnosine and anserine in various segments of the rabbit plantar muscle in normal conditions and following denervation. **Biulleten Eksperimental noi Biologii i Meditsiny**, v. 56, p. 60-63, 1963.

TEUFEL, M.; SAUDEK, V.; LEDIG, J.P.; BERNHARDT, A.; BOULARAND, S.; CARREAU, A.; CAIRNS, N.J.; CARTER, C.; COWLEY, D.J.; DUVERGER, D.; GANZHORN, A.J.; GUENET, C.; HEINTZELMANN, B.; LAUCHER, V.; SAUVAGE, C.; SMIRNOVA, T. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 6521-6531, 2003.

THOMSON, J.A.; SETO, L. Phosphocreatine hydrolysis does alter muscle homogenate pH. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 21, S. 70 (abstract), 1989.

TREMBLAY, M.S.; GALLOWAY, S.D.R.; SEXSMITH, J.R. Ergogenic effects of phosphate loading: physiological fact or methodological fiction? **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 1994.

VANDER, A.J.; SHERMANN, J.H.; LUCIANO, D.S. Human physiology: the mechanisms of body function (6th edition). **New York, McGraw Hill**, 1994.

VAUGHAN-JONES, R.D.; SPITZER, K.W. Role of bicarbonate in the regulation of intracellular pH in the mammalian ventricular myocyte. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 5, p. 579-596, 2002.

WETZEL, P.; SCHEIBE, R.J.; HELLMANN, B.; HALLERDEI, J.; SHAH, G.N.; WAHEED, A.; GROS, G.; SLY, W.S. Carbonic anhydrase XIV in skeletal muscle: subcellular localization and function from wild-type and knockout mice. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 293, n. 1, p. 358-366, 2007.

WILMORE, J.H.; BEHNKE, A.R. An anthropometric estimation of body density and lean body weight in young men. **Journal of Applied Physiology**, v.27, p.25-31, 1969.

WILSON, J M.; LOENNEKE, J. P.; JO, E.; WILSON, G. J.; ZOURDOS, M. C.; KIM, J. S. The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. **The Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 26, p. 1724-1729, 2012.

ZAPATA-SUDO, G.; SUDO, R. T.; LIN, M.; NELSON, T. E. Calcium-sensitizing function for the dipeptide carnosine in skeletal muscle contractility. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 7, p. 81–92, 1997.

ZOLL, J.; PONSOT, E.; DUFOUR, S.; DOUTRELEAU, S.; VENTURA-CLAPIER, R.; VOGT, M.; HOPPELER, H.; RICHARD, R.; FLUCK, M. Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. III. Muscular adjustments of selected gene transcripts. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 4, p. 1258-1266, 2006.