UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Estudo da cinética de *washout* da carnosina muscular após a suplementação de β-alanina

Guilherme de Carvalho Yamaguchi

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Estudo da cinética de *washout* da carnosina muscular após a suplementação de β-alanina

Guilherme de Carvalho Yamaguchi

São Paulo
2018

GUILHERME DE CARVALHO YAMAGUCHI

Estudo da cinética de *washout* da carnosina muscular após a suplementação de β-alanina

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

SÃO PAULO

2018

Catalogação da Publicação

Serviço de Biblioteca

Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Yamaguchi, Guilherme de Carvalho
Estudo da cinética de washout da carmosina muscular após a suplementação de β-alanina / Guilherme de Carvalho Yamaguchi. -- São Paulo :[s.n.], 2018.
82p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.
Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

1. Desempenho físico 2. Suplemento alimentar 3. Nutrição I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: YAMAGUCHI, Guilherme de Carvalho

Título: Estudo da cinética de *washout* da carnosina muscular após a suplementação de β-alanina

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico aos meus pais, Toshio Yamaguchi e Regina Maria de Carvalho Yamaguchi, que dignamente me deram a oportunidade do estudo e a educação.

Dedico a minha ex-noiva, Fernanda Vilela Reis, que mesmo nos momentos mais difíceis acreditou em meus sonhos. Dividimos muitas alegrias, choros, tristezas e separações ao longo da elaboração dessa dissertação.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Guilherme Artioli (EEFE – USP) pela oportunidade de poder realizar um sonho e por ter me aceitado como seu aluno.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Gualano (EEFE-USP) por ter me acolhido em momentos cruciais dessa jornada.

Agradeço a Profª Drª Marisa Medeiros, do Instituto de Química (IQ) por ceder gentilmente o equipamento HPLC, essencial para o desfecho dessa dissertação. Agradeço também a sua orientanda, Mariana Schulz, por toda sua boa vontade e paciência em me auxiliar com as análises principais deste estudo.

Agradeço ao meu grande amigo, colega de laboratório e "ex-marido", Kleiner Nemézio. Obrigado pelas conversas, pelo apoio, e por termos compartilhado a mesma "casa" tão tranquilamente durante esses anos.

Agradeço ao meu amigo e irmão Wagner Dantas, por todas as conversas, conselhos, risadas, cervejas, McDonald's e Pizzas durante a pós-graduação. Sempre vou me recordar do seu conselho "....tudo isso aqui é passageiro, aproveite!".

Agradeço ao meu excelentíssimo amigo Vitor de Salles Painelli, por toda sua generosidade, boa vontade e paciência, não apenas para com minha pessoa, mas com o grupo como um todo. "Vitão, você me ensinou muito ao longo dessa jornada, muito obrigado pelas oportunidades e pela amizade.

Agradeço ao Alan Lins e a Lívia de Souza Gonçalves pelas conversas, conselhos e momentos descontraídos, tão importantes nessa jornada de pós-graduação.

Obrigado a todos os membros do laboratório de Fisiologia e Nutrição aplicada, antigo Laboratório de Metabolismo e Nutrição, por terem me recebido tão bem quando cheguei acanhado, com medo, sem saber aonde e como pisar. Todos foram importantes para minha formação e levarei comigo um pedaço de cada um de vocês: Bryan Saunders, Aninha Hayashi, Igor Murai, Carol Kratz, Rafa Pires, Davi Santana, Victoria (Queque), Ana Jéssica, Aline Tritto, Salomão Bueno, Aline Vasques, Luana Oliveira e demais membros.

Agradeço aos grandes amigos Danilo Souza (Danilog), Mauro Tanaka (Maurog), Daniel (Carioca), Marcelo. Foi um prazer dividir a "vila" com vocês, muitos debates, risadas, almoços. Vocês foram minha família enquanto estive

em São Paulo. Não menos importante, muito obrigado ao Sr. Edson, por facilitar o aluguel e por ser uma pessoa muito solícita e bem-humorada.

Agradeço ao meu querido irmão, Lucas Yamaguchi, por ter acreditado em mim, mesmo naqueles momentos que nem mesmo eu acreditava. Saiba que você foi essencial para realização desse sonho.

Agradeço ao Dr. Luiz Riani, pois sem o “Doc”, nada disso teria se concretizado, a mão abençoada que realizou todas as biópsias e que, com todo bom humor do mundo nos fazia esquecer das adversidades.

Agradeço ao Laboratório de Força, por terem partilhado o espaço físico necessário para que nossas pesquisas pudessem acontecer. Obrigado pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas como a Carlinha, Manu, Caçaro, Miguel, Zé, Giba, Lucas (2), Fabiano e o Prof° Valmor Trícoli.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela oportunidade de conseguir a tão concorrida bolsa. Sem o auxílio eu não teria condições de realizar este sonho.

Agradeço aos meus amigos, e irmãos, Talita Esteves, Hélio Hipólito, Jonathan e Raquel Diniz e Bruno Ferreira. Família abençoada, deixo aqui o meu muito obrigado, pelo carinho, paciência e por sempre estarem ao meu lado e acreditarem nos meus sonhos.

Por fim, agradeço a todos os meus familiares, principalmente aos meus tios Paulo e Leila Da Dalto, que sempre me deram apoio durante o curso, e que sempre me aconselharam nos momentos que mais precisei.

"Vai. E se der medo, vai com medo mesmo." (Autor desconhecido)

RESUMO

YAMAGUCHI, GC. **Estudo da cinética de *washout* da canosina muscular após a suplementação de β-alanina.** 2018. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018

A β-alanina tem se tornado um suplemento nutricional bastante popular entre atletas de diferentes modalidades esportivas. A razão para tal popularidade deve-se ao grande número de evidências indicando que sua suplementação pode aumentar as concentrações intramusculares de L-carnosina. Com a interrupção da suplementação de β-alanina (BA), a degradação e eliminação da carnosina prevalecem sobre sua síntese, ocorrendo assim o chamado *washout.* O objetivo o presente trabalho foi avaliar a cinética de *washout* da carnosina durante 16 semanas após a suplementação de BA, associando as mudanças no conteúdo de carnosina muscular com o desempenho em exercício de alta intensidade. Foram recrutados 15 homens fisicamente ativos, não vegetarianos, a qual foram designados aleatoriamente em dois grupos, BA ($n= 11$) ou PL ($n= 4$). Cada participante recebeu a suplementação de BA ou PL (dextrose) em tabletes de liberação prologada (NAI®, USA) na dose de 6,4/d durante 8 semanas em um desenho duplo-cego. Amostras do músculo vasto lateral foram colhidas por meio de biópsia muscular, realizadas antes (S01) e após as 8 semanas (S02) de suplementação, bem como na 1ª (W01), 2ª (W02) 4ª (W03), 8ª (W04), 12ª (W05) e 16ª (W06) semanas após suplementação. Adicionalmente, um teste de tolerância ao esforço de alta intensidade (110% da potência máxima) foi aplicado no tempo S01 e S02, assim como nos tempos W03, W04, W05 e W06 para determinar o Tempo até a Exaustão (TTE). Após 8 semanas de suplementação, foi observada uma diferença significante do conteúdo de carnosina muscular entre o grupo BA (40,76± 12,29 mmol/Kg) e o grupo PL (18,74± 1,22 mmol/Kg; $p= 0,0040$). O delta médio absoluto observado do grupo BA foi de 18,73± 5,80 mmol/Kg (+ 85%) e, o grupo PL - 0,15± 1,78 mmol/Kg (-0,7%). Após W02 o grupo BA apresentava 17,35± 8,99 mmol/Kg de carnosina (~ 79%; $p= 0,4667$) e após W03, o conteúdo médio verificado foi 12,43± 8,95 mmol/Kg (~ 56%) no grupo BA, ($p= 0,0378$). Após W04 o grupo BA apresentava o delta médio de 6,9± 8,30 mmol/Kg (~ 38%; $p <0,0001$) e após W05, 2,91± 6,76 mmol/Kg (~ 13%; $p <0,0001$). Após W06, o conteúdo de carnosina retornou próximo aos valores basais em 21,91± 7,99 mmol/Kg ($p = 1,000$). Após o período de suplementação (S02), o TTE não apresentou diferença significante entre o grupo BA, 150,95± 19,31 segundos, e o grupo PL, 153,78± 13,08 ($p= 0,8184$). Foi possível observar uma forte correlação linear positiva ($r= 0,8995$) e significante ($p= 0,01492$) entre o conteúdo de carnosina muscular e o desempenho físico. Conclui-se que a carnosina é um dipeptídeo estável na musculatura esquelética, podendo levar um tempo de 16 semanas ou mais para retornar aos valores.

Palavras-chave: Decaimento; tamponamento; músculo; β-alanina; carnosina.

ABSTRACT

YAMAGUCHI, GC. **The kinetics of muscle carnosine washout after β-alanine supplementation.** 2018. 102 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola de Educação Física e Esportes, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018

β-alanine has become a popular nutritional supplement among athletes of different sports modalities. The reason for such popularity is due to the large number of evidences indicating that its supplementation may increase intramuscular concentrations of L-carnosine. With the interruption of β-alanine (BA) supplementation, the degradation and elimination of carnosine prevail over its synthesis, thus occurring the washout. The aim of this study was to evaluate carnosine washout kinetics for 16 weeks after BA supplementation, associating changes in muscle carnosine content with high intensity exercise performance. Fifteen physically active, non-vegetarian males were randomly assigned in two groups, BA (n = 11) or PL (n = 4). Each participant received supplementation of BA or PL (dextrose) in sustained-release tablets (NAI®, USA) at a dose of 6.4g. d^{-1} for 8 weeks in a double-blind design. Samples of the vastus lateralis muscle were collected by muscle biopsy performed before (S01) and after 8 weeks (S02) of supplementation, additionally in the 1st (W01), 2nd (W02) 4th (W03), 8th (W04), 12th (W05) and 16th (W06) weeks after supplementation. In addition, a high intensity exercise test (110% of maximum power) was performed at time S01 and S02, W03, W04, W05 and W06 to determine Time to Exhaustion (TTE). After 8 weeks of supplementation, a significant difference in muscle carnosine content was observed between the BA group (40.76 ± 12.29 $mmol.kg^{-1}$) and the PL group (18.74 ± 1.22 $mmol.kg^{-1}$; $p= 0.0040$). The absolute mean delta of the BA group was 18.73± 5.80 $mmol.kg^{-1}$ (+ 85%) and, the PL group - 0.15± 1.78 $mmol.kg^{-1}$ (-0.7%). After W02 the BA group showed 17.35± 8.99 $mmol.kg^{-1}$ carnosine (~ 79%, $p= 0.4667$), and after W03, the mean content was 12.43 ± 8.95 $mmol.kg^{-1}$ (~ 56%) in the BA group, ($p= 0.0378$). After W04 the BA mean delta was 6.9 ± 8.30 $mmol.kg^{-1}$ (~ 38%, $p <0.0001$) and after W05, 2.91± 6.76 $mmol.kg^{-1}$ (~ 13%, $p <0.0001$). After W06, the carnosine content returned to baseline levels in BA group 21.91 ± 7.99 mmol. Kg^{-1} ($p = 1,000$). After the supplementation period (S02), the TTE showed no significant difference between the BA group 150.95 ± 19.31 seconds and the PL group, 153.78 ± 13.08 ($p= 0.8184$). There was a strong positive linear correlation ($r= 0.8995$) and significant ($p= 0.01492$) between muscle carnosine content and performance. The present study shows that carnosine is a stable dipeptide in the skeletal muscle, which may take 16 weeks or longer to return to the baseline levels.

Key-words: Decay; buffering; muscle; β-alanine; carnosine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....1

2 OBJETIVOS.....6

3 REVISÃO DA LITERATURA.....7

3.1 Carnosina e β-alanina 7

3.2 Papéis fisiológicos da carnosina.....9

3.2.1 Regulação ácido-base.....9

3.2.2 Ação Antioxidante 11

3.2.3 Sensibilidade ao cálcio e função no aparato contrátil.....12

3.3 Enzimas e transportadores.....13

3.3.1 Carnosina sintase e carnosinases.....13

3.3.2 Transportadores de carnosina e β-alanina.....16

3.4 Fatores determinante do conteúdo muscular de carnosina.....18

3.4.1 Tipo de fibra 18

3.4.2 Gênero 19

3.4.3 Idade 20

3.4.5 *Status* de Treinamento 23

3.5 Suplementação de β-alanina.....25

3.6 β-alanina e desempenho físico.....29

3.7 *Washout* da carnosina muscular 32

3.8 Efeitos colaterais 39

3.9 Segurança do uso prolongado da β-alanina.....42

4. MÉTODOS.....45

4.1 Seleção da amostra.....45

4.2 Local e duração do estudo 45

4.3 Desenho experimental e protocolo de suplementação.....45

4.4 Avaliação do consumo alimentar.....46

4.5 Teste de Potência Máxima 47
4.6 Avaliação da tolerância ao esforço de alta intensidade 47
4.7 Biópsia muscular por agulha de sucção 48
4.8 Determinação do conteúdo de carnosina intramuscular 49
4.09 Eficácia do vendamento e efeitos colaterais 51
4.10 Análise estatística 52
5 RESULTADOS 53
5.1 Amostra 53
5.2 Dados de desempenho 54
5.3 Conteúdo de Carnosina Muscular 58
5.4 Avaliação do consumo alimentar 63
5.5 Eficácia do vendamento e efeitos colaterais 64
6 DISCUSSÃO 65
7 CONCLUSÃO 71
REFERÊNCIAS 72
RELATÓRIO ATUALIZADO DE ATIVIDADES (2017 – 2018) 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos aminácidos que constituem a molécula de carnosina. 8
Figura 2: Variação do conteúdo de carnosina durante a fase de suplementação (seis semanas) e pós suplementação (período de washout [9 semanas]). Adaptado de (BAGUET et al. 2009)..... 34
Figura 3: Concentração de β-alanina plasmática por 6 horas após a ingestão de 1,6 g de β-alanina pura e em tabletes de liberação lenta. Reproduzido de Decombáz et al. (2012). 42
Figura 4: Desenho experimental do estudo 46
Figura 5: Ilustração da agulha de Bergström, utilizada nos procedimentos de biopsia muscular – Bergström (1975). 49
Figura 6: Fluxograma de entrada, randomização e saída de participantes no estudo. 54
Figura 7: Painel A: Tempo até Exaustão grupo β-alanina. Painel B: Tempo até Exaustão grupo Placebo. Painel C: Total de trabalho realizado grupo β-alanina. Painel D: Total de trabalho realizado grupo Placebo. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão. 55
Figura 8: Painel A: Tempo até a Exaustão (TTE). Painel B: Total de Trabalho Realizado (TTR). Legenda: * diferença significante (p <0,05) em relação ao S01 (pré); # - em relação ao S02 (pós). 56
Figura 9: Conteúdo de carnosina muscular (mmol/Kg musculo seco), PRÉ e PÓS suplementação. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão. O símbolo * expressa diferença significante (p< 0.05). 58
Figura 10: Cinética de washout da carnosina muscular. Legenda: * diferença significante em relação ao S01 (pré); # - em relação ao S02 (pós); $ - em relação ao W02; & - em relação ao W03. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão. 59
Figura 11: Mudança relativa da concentração de carnosina muscular após a suplementação de β-alanina. Legenda: # - diferença significante em relação ao S02 (pós); $ - em relação ao W02; & - em relação ao W03 e @ - em relação ao W04. Dados expressos em valores de média e ± desvio-padrão. 60

Figura 12: Alterações absolutas de carnosina. Legenda: # - diferença significante em relação ao S02 (pós); $ - em relação ao W02; & - em relação ao W03 e @ - em relação ao W04. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão.62
Figura 13: Painel A: Coeficiente de Correlação de Pearson grupo BA – (p< 0,05). Painel B: grupo PL (p >0,05). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de pKa dos compostos imidazólicos 11
Tabela 2: Características das carnosinases 15
Tabela 3: Conteúdo médio de carnosina em alimentos do consumo habitual de britânicos (Valores apresentados em média e desvio-padrão). 23
Tabela 4: Caracterização da amostra 53
Tabela 5: Dados individuais – TTE e TTR – CCT110% 57
Tabela 6: Dados individuais referentes aos grupos β-alanina e Placebo 60
Tabela 7: Consumo calórico total, macronutrientes e β-alanina. 64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

CN1 – Carnosinase Sérica

CN2 – Carnosinase Tecidual

BA – β-alanina

PL – Placebo

H-RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

ATP – Adenosina Trifosfato

Km – Constante de Michaelis

pKa – Constante de dissociação iônica

CS – Carnosina Sintase

CO_2 – Gás Carbônico

H^+ - Hidrogênio

Mg^{+2} - Magnésio

pH – Potencial Hidrogeniônico

Kg – Quilograma

mg - Miligrama

mmol – Milimol

mmol/Kg – Milimol por Quilograma

µmol - Micromol

mM – Milimolar

TTR – Total de trabalho realizado

TTE – Tempo até a Exaustão

PEPT – *Peptide Transporter*

TauT – Transportador de Taurina

$CCT^{110\%}$ – *Cycling Capacity Test 110%*

GABA-T – 4-aminobutirato-2-oxoglutarato transaminases

AGXT2 – alanina-gloxilato transaminase

W_{max} – Potência Máxima

GABA - Ácido gama-aminobutírico

1 INTRODUÇÃO

A β-alanina tem se tornado um suplemento nutricional bastante popular entre atletas de diferentes modalidades esportivas. A razão para tal popularidade deve-se ao grande número de evidências indicando que sua suplementação pode aumentar as concentrações intramusculares de L-carnosina (β-alanil-L-histidina) em cerca de 40 – 80 % (DERAVE et al. 2007; HARRIS et al. 2006; HILL et al. 2007). Estudos têm consistentemente demonstrado que o carregamento da carnosina culmina no aumento do limiar da fadiga e consequente melhora do desempenho em exercícios de alta intensidade (BLANCQUAERT; EVERAERT; DERAVE, 2015). A carnosina é sintetizada principalmente no músculo esquelético pela ligação do aminoácido essencial L-histidina ao aminoácido β-alanina, em uma reação catalisada pela enzima carnosina sintase (BOLDYREV et al. 2013). Na dieta, a carnosina pode ser consumida principalmente através do consumo de carnes e peixes (PARK; VOLPE; DECKER, 2005). No entanto, sua absorção intacta é afetada pela presença da enzima carnosinase no trato gastrintestinal, a qual hidrolisa o dipeptídeo em seus aminoácidos constituintes (ASATOOR et al. 1970). Sabe-se que o músculo não é capaz de captar carnosina da corrente sanguínea em sua forma intacta, devido à ausência de transportadores de carnosina nas membranas das células musculares (HARRIS et al. 2006).

Várias funções fisiológicas para a carnosina têm sido descritas na literatura, incluindo ação antioxidante (BOLDYREV et al. 1993), regulação da sensibilidade ao cálcio (Ca^{++}) no aparato contrátil (DUTKA et al. 2012; LAMONT; MILLER, 1992), função anti-glicação de proteínas (HIPKISS; MICHAELIS; SYRRIS, 1995) e, principalmente, regulação do pH intracelular, uma vez que sua constante de dissociação (pKa) encontra-se próxima aos valores fisiológicos de 6,83 a 7,01 (ABE, 2000; ARTIOLI; GUALANO; LANCHA JUNIOR, 2009). É conhecido que a acidose muscular pode contribuir significativamente para a fadiga durante o exercício de alta intensidade (FITTS, 1994). Assim, o aumento da carnosina poderia aumentar a capacidade de tamponamento intramuscular, potencialmente postergando a fadiga muscular e a queda do desempenho (HOBSON et al. 2012).

Embora estudos demonstrem que a suplementação de β-alanina é uma estratégia eficaz em aumentar as concentrações de carnosina muscular (HARRIS et al., 2006, HILL et al. 2007; DERAVE et al. 2007; DEL FAVERO et al. 2011; SAUNDERS et al. 2016), ainda não se sabe se existe um limite superior para o acúmulo de carnosina no músculo (i.e. um ponto de saturação). Os estudos até então demonstram que o acúmulo de carnosina é primariamente dependente da quantidade de β-alanina ofertada ao longo do tempo (DUNNETT; HARRIS, 1999; STELLINGWERFF; DECOMBAZ; et al. 2012) e, ainda que seja plausível assumir que exista um limite superior para acúmulo de carnosina nos músculos, nenhum estudo até hoje foi capaz de demonstrar tal limite. Da mesma forma, estudos sobre o tempo de *washout* e, em especial, sobre a cinética de *washout* da carnosina ainda são escassos. Embora assuma-se que, quanto maior a concentração de carnosina no músculo, maior será a tolerância ao exercício de alta intensidade, a literatura ainda carece de dados que demonstrem de maneira clara a associação entre diferentes níveis de carnosina muscular e a capacidade de tolerar esforços. Cabe ressaltar que a caracterização precisa dessas variáveis traz informações importantes sobre as melhores estratégias de suplementação de β-alanina, com implicações tanto para o desempenho físico e esportivo, como para seu potencial uso terapêutico (GARIBALLA; SINCLAIR, 2000; QUINN; BOLDYREV; FORMAZUYK, 1992).

Sabe-se que a hidrólise da carnosina é catalisada pela enzima carnosinase, existente em duas isoformas no corpo humano (TEUFEL et al. 2003). A primeira é descrita como carnosinase sérica ou CN1 (EC 3.4.13.20) altamente ativa no plasma. A segunda isoforma é descrita como carnosinase tecidual (CN2) ou carnosinase citosólica não-específica (EC 3.4.13.18), que exibe baixa atividade no tecido muscular esquelético (TEUFEL et al. 2003). Quando as concentrações musculares de carnosina são elevadas através da suplementação de β-alanina, a mesma parece manter-se estável por um período relativamente longo de tempo. Estudos iniciais sobre o *washout* da carnosina indicam que tal processo é lento, sugerindo que, embora a enzima CN2 esteja presente no músculo, sua atividade parece ser muito baixa em humanos (SALE et al. 2013). Baguet et al. (2009) foram os primeiros a avaliar o período de *washout* da carnosina em diferentes grupos musculares após a suplementação crônica de β-alanina. Foi observada uma taxa de depuração de 2 – 4% por

semana e o tempo estimado para que as concentrações retornassem ao basal variaram de 9 a 15 semanas após o término da suplementação. Posteriormente, Stellingwerff et al. (2012) também avaliaram a o tempo de *washout* da carnosina em indivíduos suplementados com β-alanina durante 8 semanas. Foi demonstrado que seriam necessárias de 15 a 20 semanas de *washout* após o aumento de ~30 – 45 % de carnosina muscular, para o retorno aos valores basais de carnosina. Assim, os autores sugerem que, uma vez elevadas as concentrações musculares de carnosina, qualquer benefício em potencial sobre o desempenho manter-se-ia por 4 - 6 semanas após o término da suplementação. Tal hipótese, no entanto, ainda permanece sem confirmação.

A despeito da existência dos estudos que demostraram resultados semelhantes sobre a cinética de *washout* da carnosina, é importante ressaltar que ambos basearam suas medidas de carnosina muscular em análises de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (H-RMN). Tal método ainda não foi validado para essa finalidade, e existem potenciais problemas com o sinal oriundo da carnosina (SOLIS et al. 2015). Nesse sentido, a literatura ainda carece de estudos que confirmem a cinética de *washout* utilizando-se de método padrão-ouro de quantificação da carnosina muscular, a saber, cromatografia líquida de alto desempenho em amostras de biópsia muscular.

A aplicação H-RMN no estudo do músculo esquelético tem recebido um interesse considerável da comunidade científica por fornecer, de forma não invasiva, informações importantes sobre uma gama de metabólitos (OZDEMIR et al. 2007). Além da quantificação de outros compostos musculares, é possível quantificar a carnosina por meio da H-RMN. Tal método baseia-se nas propriedades únicas dos prótons que apresentam grupos imidazóis das subunidades histidínicas da carnosina, que os fazem visíveis na região baixa do espectro do músculo esquelético (PAN et al. 1988). Dessa forma, a carnosina pode apresentar visibilidade limitada no espectro. Ainda que aplicado em diversos estudos (BAGUET et al. 2009; DERAVE et al. 2007; STELLINGWERFF; ANWANDER; et al. 2012), os dados obtidos pelo método de H-RMN ainda não foram comparados com o método padrão ouro de biópsia muscular por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (ou HPLC, do inglês - *High Performance Liquid Chromatography)*. Apenas um estudo (BAGUET et al. 2011)

quantificou a carnosina muscular e comparou diretamente os valores obtidos pelos métodos de H-RMN e HPLC, onde foi encontrado uma correlação moderada (r = 0.517) entre os métodos. A despeito dos esforços iniciais de Baguet et al. (2011) em demonstrar a validade da H-RMN para quantificação da carnosina muscular, a literatura ainda carece de estudos de validação completos e bem conduzidos. Portanto, ainda não se pode afirmar que a H-RMN é um método confiável e válido de mensuração da carnosina. Especula-se, na verdade, que tal método seja pouco sensível (devido ao fraco sinal da carnosina), não específico (devido à quantificação do anel imidazol, e não da carnosina), e possivelmente não-linear, já que os estudos de quantificação utilizam uma única referência externa (fantoma de concentração única e consequente extrapolação) em vez de diferentes referências dentro da faixa de variação fisiológica (fantomas para construção de curva padrão e consequente interpolação).

Devido às limitações metodológicas dos estudos que avaliaram os períodos de *washout*, ainda não sabemos com precisão qual o comportamento da cinética de desaparecimento da carnosina muscular após um período de suplementação de β-alanina. Baguet et al. (2009) demonstraram que após 3 semanas as concentrações de carnosina muscular reduziram em ~30%, e após 6 semanas os valores retornaram aos níveis basais. No entanto, os indivíduos classificados como altamente responsivos à suplementação ainda exibiam concentrações elevadas de carnosina muscular durante a 9ª semana, atingindo os níveis basais na 15ª semana, aproximadamente. Contudo, o estudo limitou-se a avaliar as concentrações de carnosina em apenas dois momentos após o término da suplementação. Do mesmo modo, Stellingwerff et al. (2011), avaliaram em apenas dois momentos as concentrações de carnosina durante 8 semanas após o término suplementação. Considerando os dados limitados de tempo de *washout*, não é possível ainda estabelecer um período seguro de sua eliminação, tampouco sua cinética de eliminação, uma vez que vários fatores poderiam prolongar esse tempo.

A origem do processo de eliminação da carnosina ainda permanece sem respostas. Segundo Stegen et al. (2013), vários mecanismos poderiam explicar a cinética de *washout* da carnosina muscular. No entanto, especula-se que a taxa de degradação da carnosina parece estar positivamente relacionada ao próprio conteúdo. É possível que o conteúdo de carnosina muscular possa

influenciar a sua taxa de degradação, de forma que sua taxa seja maior no início do *washout* e menor ao longo do tempo. No entanto, tal hipótese ainda não foi investigada.

2 OBJETIVOS

Avaliar a cinética de *washout* da carnosina durante 16 semanas após a suplementação de β-alanina, associando as mudanças no conteúdo de carnosina muscular com o desempenho em exercício de alta intensidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Carnosina e β-alanina

A carnosina foi primariamente identificada pelo bioquímico russo Vladimir Gulevich em no início do século XX, quando o mesmo investigava sobre compostos nitrogenados em extratos de carne (GULEWITCH, AMIRADZIBI, 1900). Trata-se de um dipeptídeo sintetizado a partir dos aminoácidos β-alanina e L-histidina, encontrados em maior abundância no músculo esquelético de animais vertebrados e invertebrados (SALE et al. 2013). A carnosina e seus análogos metilados (i.e. anserina e balenina, também conhecida como ofidina) fazem parte da classe dos dipeptídeos contendo histidina (DCH). Tanto a anserina como a ofidina podem ser sintetizados a partir da carnosina por meio da transferência do grupo metil (CH_3-), sendo estes, encontrados em grande variedade de animais terrestres e aquáticos (DE SALLES PAINELLI et al. 2015). Além da anserina e ofidina, outro análogo importante da carnosina é a homocarnosina, encontrado com maior predominância no sistema nervoso central (SNYDER, 1980).

A carnosina apresenta boa solubilidade em água, sendo composta por três grupos ionizáveis: grupo carboxílico (pKa 2,76), grupo amino da β-alanina (pKa 9,32) e anel imidazólico (pKa 6,83), considerado este, o de maior importância na atividade tamponante da carnosina (VISTOLI et al. 2012) (Figura 1). Em humanos, a carnosina é o único dipeptídeo histidínico presente, com concentrações variando entre 12 a 60 mmol/Kg de músculo seco (vasto lateral). É provável que mais de 99% da carnosina corporal esteja presente na musculatura esquelética devido ao seu tamanho (constituindo 40 – 50% do peso corporal total) e alta concentração quando comparado a outros tecidos, como o cérebro (DERAVE et al. 2010). Isso faz da carnosina uma das moléculas mais abundantes que compõe o músculo humano, com concentrações de magnitude semelhante a fosforilcreatina, creatina e ATP (SALE et al. 2013).

Sua síntese ocorre principalmente no musculo esquelético em uma reação catalisada pela enzima carnosina sintase (CS) (ARTIOLI et al. 2010).

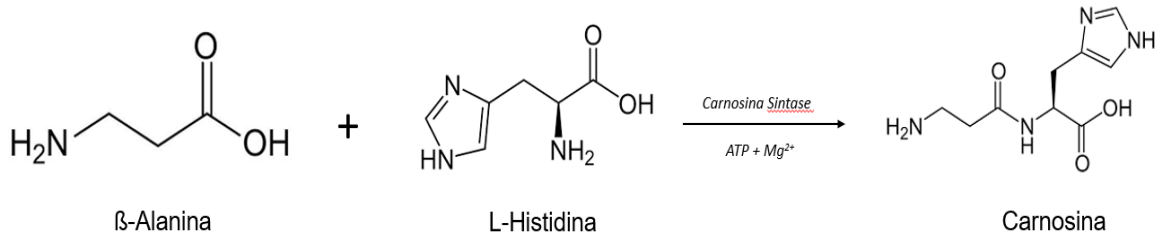

Figura 1: Estrutura química dos aminácidos que constituem a molécula de carnosina.

Após a ingestão de alimentos contendo carnosina, anserina ou ofidina, ou após a ingestão de suplementos contendo β-alanina, observa-se um aumento da quantidade de β-alanina no trato gastrintestinal (DE SALLES PAINELLI et al. 2015). Sadikali et al. (1975) inferem que após consumida através da dieta, uma parcela da carnosina é clivada pelos enterócitos, especialmente na mucosa jejunal, em seus aminoácidos constituintes (β-alanina e L-histidina) antes mesmo de atingir a corrente sanguínea, embora a atividade enzimática jejunal seja baixa. É provável que, parte da carnosina ingerida, ao atingir a corrente sanguínea seja rapidamente hidrolisada, devida a alta atividade da enzima carnosinase sérica (ASATOOR et al. 1970).

No músculo, a síntese de carnosina é dependente da atividade da enzima CS, enquanto que a magnitude de sua síntese é dependente da disponibilidade de β-alanina da dieta (HARRIS et al. 2006), que por sua vez é considerada o fator limitante da síntese muscular de carnosina.

O principal local de síntese endógena da β-alanina é o tecido hepático (MATTHEWS; TRAUT, 1987), onde sua principal via coincide com a via de degradação da uracila (FRITZSON; PIHL, 1957). Embora o produto final dessa via seja o CO_2, evidências mostram que a taxa de conversão de β-alanina a CO_2 é bastante baixa, de tal forma que apenas uma pequena fração da β-alanina produzida é degradada a CO_2 no fígado. Isso sugere que a síntese endógena de β-alanina, e não a degradação de uracila, é a principal função dessa via (ARTIOLI et al. 2010; FRITZSON; PIHL, 1957). No entanto, a taxa de síntese endógena de β-alanina é extremamente limitada, e por consequência, as

concentrações plasmáticas deste aminoácido encontram-se abaixo do limite de detecção (HARRIS et al. 2006).

Dado que a L-histidina e a β-alanina são aminoácidos essenciais a produção de carnosina pelo musculo esquelético, pode-se dizer que sua síntese é exclusivamente dependente da captação destes aminoácidos (ARTIOLI et al. 2010). No interior das células musculares, a concentração de β-alanina é cerca de 40 vezes menor do que de L-histidina (HARRIS et al. 2006). Além disso, a enzima carnosina sintase apresenta maior afinidade pela L-histidina do que pela β-alanina (HORINISHI; GRILLO; MARGOLIS, 1978). Dessa forma, é razoável assumir que o ponto limitante para síntese muscular de carnosina é a disponibilidade de β-alanina (HARRIS et al. 2006). Conforme será abordado mais adiante, veremos que vegetarianos (i.e, aqueles indivíduos que baseiam sua dieta em alimentos de origem vegetal) apresentam menor conteúdo de carnosina muscular, o que reforça a ideia de que a ingestão de β-alanina é imprescindível a síntese de carnosina.

3.2 Papéis fisiológicos da carnosina

3.2.1 Regulação ácido-base

O corpo humano é dotado de diversos mecanismos bem regulados responsáveis pela manutenção do pH dentro dos limites fisiológicos, incluindo tampões intracelulares e extracelulares, sistemas de tamponamento dinâmico, assim como os sistemas renal e respiratório para regulação do pH (HEISLER, 2004; JUEL, 2008).

Durante exercícios de alta intensidade, o balanço ácido-base no músculo esquelético é regulado principalmente pelos tampões intracelulares, extracelulares e pelo tamponamento dinâmico. A primeira linha de defesa consiste principalmente pelos fosfatos, proteínas e dipeptídeos, que exercem sua ação tamponante no citosol, onde o pH é próximo da constante de dissociação (i.e. Ka) destas substâncias (JUEL, 2008). Em decorrência da elevada demanda energética requerida pelo exercício de alta intensidade, o pH intramuscular pode atingir valores de ~ 6,5 ou menos, sendo este ambiente celular associado a fadiga (HULTMAN; SAHLIN, 1980), embora o papel da

acidose na fadiga muscular permaneça em intenso debate (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; PEDERSEN et al. 2004).

A carnosina é um dipeptídeo que possui o radical imidazol, com o pKa de 6,83, o que a torna um tampão adequado as faixas do pH fisiológico (SMITH, E. C. 1938). O radical imidazol pode ser encontrado nos resíduos de histidina das proteínas, nas moléculas livres de L-histidina e nos dipeptídeos que contêm esse aminoácido, tais como carnosina, anserina e ofidina (Tabela 1) (ABE, 2000). O fato do pKa dos grupos imidazóis ser bastante próximo dos valores fisiológicos de pH intracelular faz com que todos os compostos que contenham esse grupo, cujo nitrogênio presente em seu anel pode ser protonado em pH fisiológico, sejam potenciais tampões intracelulares (ABE, 2000).

Bate-Smith (1938) reportou que a carnosina pode ser responsável por até 25% da capacidade tamponante do musculo em *rigor mortis* e até 40% *in vivo*. Entretanto, Mannion et al. (1992) demonstraram que a carnosina, pode contribuir em média, com apenas 7% da capacidade tamponante muscular total, dentro da variação fisiológica de pH entre 7,1 – 6,5, uma porcentagem ínfima se comparado a cavalos por exemplo, onde o dipeptídeo representa cerca de 35% do tamponamento muscular total (HARRIS et al. 1990). Mannion et al. (1992), sugerem que em humanos, o papel da carnosina em prevenir a queda do pH seria de limitada importância. Em humanos a quantidade de DCH é relativamente pequena, quando comparada a outros mamíferos, o que significaria uma baixa contribuição na capacidade tamponante total (BOLDYREV; ALDINI; DERAVE, 2013). No músculo vasto lateral de humanos, por exemplo, a capacidade tamponante total relativa é de 4,5 % e 9,4 % em fibras do tipo I e II, respectivamente (KENDRICK et al. 2008).

Enquanto alguns autores sugerem que a capacidade tamponante muscular da carnosina é de pequena importância, outros apontam importante relevância fisiológica na regulação ácido-base. Uma importante evidência que apoia o importante papel da carnosina como tampão intracelular é o fato de sua concentração ser cerca de 3 vezes maior em fibras musculares do tipo II (i.e. glicolíticas), em relação às fibras do tipo I (i.e. oxidativa) (DE SALLES PAINELLI et al. 2015). Parkhouse et al. (1985), demonstraram que corredores velocistas e demais atletas engajados em exercícios de alta intensidade, apresentavam maior capacidade tamponante intramuscular, assim como maiores

concentrações de carnosina, quando comparados com corredores de *endurance* e sujeitos não-treinados. Outrossim, sabe-se que o os DCH tem sido encontrados em diversas espécies animais que dependem do metabolismo predominantemente anaeróbio para a sobrevivência ou envolvidas em competições, como cavalos de corrida, cachorros, camelos e em humanos (HARRIS et al. 1990).

Tabela 1: Valores de pKa dos compostos imidazólicos

Compostos	**pKa**
Histidina na proteína	6,5
L-Histidina	6,21
Carnosina	6,83
Anserina	7,15
Ofidina (Balenina)	6,93
Fosfato inorgânico	6,88

Abe, 2000.

Dessa forma, o tamponamento do pH vem sendo a mais bem demonstrada função da carnosina, pelo menos no que diz respeito ao tecido muscular (ARTIOLI et al. 2010).

3.2.2 Ação Antioxidante

A atividade antioxidante da carnosina foi primariamente estudada no final da década de 80 pelo pesquisador russo Alexander Boldyrev (BOLDYREV et al. 1987). Posteriormente, diversos estudos demonstraram os efeitos antioxidantes diretos e indiretos da carnosina em ensaios *in vitro* (BOLDYREV et al. 1988; BOLDYREV; GALLANT; SUKHICH, 1999; KOHEN et al. 1988). As propriedades antioxidantes da carnosina são mediadas pela sua propriedade de proteção as membranas biológicas e tal característica confere a ela a habilidade de neutralizar radicais livres e quelar íons metálicos (QUINN et al. 1992). A

carnosina é considerada um neutralizador dos radicais hidroxila e superóxido, além de um potente eliminador da espécie reativa oxigênio singlete (HARTMAN; HARTMAN; AULT, 1990). Outros estudos também demonstram a habilidade da carnosina e seus análogos em prevenir a formação dos produtos finais da glicação avançada ou AGE's (do inglês - *advanced glycation end-products*) e produtos finais da lipoxidação avançada ou ALE's (do inglês - *advanced lipoxidation end-products*), ambos envolvidos no processo de envelhecimento, assim como no desenvolvimento de diversas patologias tais como o diabetes *mellitus*, aterosclerose e doença de Alzheimer (BOLDYREV et al. 2013).

Embora as funções antioxidantes da carnosina pareçam promissoras, a maioria das evidências disponíveis até o presente provém de estudos testados *in vitro* e modelo animal. Apesar de não ser apresentado no escopo deste trabalho, a carnosina parece exercer outras diversas aplicações terapêuticas e atividades protetores.

3.2.3 Sensibilidade ao cálcio e função no aparato contrátil

Além das funções da carnosina até aqui apresentadas, recentes evidências têm demonstrado os possíveis efeitos da carnosina no músculo esquelético relacionado a melhora da liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático e na sensibilidade do aparato contrátil.

O retículo sarcoplasmático é a estrutura responsável pelo armazenamento de íons de cálcio e desempenha um papel central na regulação das atividades funcionais do musculo esquelético (GUYTON & HALL, 2011). Lemont & Miller (1992) demonstraram em fibras isoladas do músculo sartório de sapos que carnosina pode aumentar a sensibilidade dos íons de cálcio no aparato contrátil. Dutka & Lamb (2012) posteriormente corroboram tais achados demonstrando que em concentrações fisiológicas, ocorre um aumento na liberação dos íons de cálcio nas fibras do tipo I e II, em amostras do músculo vasto lateral de humanos. Entretanto, Hanna et al. (2015) não observaram alterações significantes na liberação de cálcio e em sua sensibilidade no aparato contrátil, após suplementarem 23 sujeitos com β-alanina como estratégia para elevar o conteúdo de carnosina muscular. Os autores observaram, na realidade, a redução do tempo médio de relaxamento muscular após a suplementação de

β-alanina, o que possivelmente, poderia ser explicado pelo aumento da receptação de cálcio no retículo sarcoplasmático. Tais achados apresentam implicações potencialmente importantes da carnosina para a eficiência da contração muscular, e que em última análise, poderia ajudar a elucidar o papel ergogênicos da β-alanina durante exercícios de alta intensidade envolvendo rápidas contrações musculares.

3.3 Enzimas e transportadores

3.3.1 Carnosina sintase e carnosinases

É bem sabido que velocidade das reações bioquímicas celulares são reguladas por moléculas catalizadoras denominadas enzimas. As enzimas são proteínas que exercem papel importante na regulação das vias metabólicas celulares.

A carnosina sintase ou sintetase (EC 6.3.2.11) é uma das principais enzimas envolvidas no metabolismo da carnosina, sendo responsável pela sua síntese a partir dos aminoácidos constituintes (β-alanina e L-histidina) (Teufel et al. 2003). O gene responsável pela sua expressão foi descoberto por Drozak et al. (2010), denominado *ATP-grasp domain containing protein-1* (ATP-GD1).

No final da década de 50, as propriedades bioquímicas das reações de síntese da carnosina foram estabelecidas em experimentos *in vitro*. Kalyancar & Meister (1959) identificaram *in vitro* que a síntese de carnosina era dependente de Mg^{+2} e ATP para que a reação fosse catalisada.

A carnosina sintase apresenta ampla especificidade, de forma que vários outros dipeptídeos podem ser formados pela substituição da β-alanina ou da L-histidina (KALYANKAR; MEISTER, 1959). No que se refere a sua localização, a carnosina sintase pode ser encontrada principalmente no músculo esquelético, cardíaco e algumas regiões do cérebro, onde é responsável também pela síntese da homocarnosina (DROZAK et al. 2010).

Estudos sugerem que a síntese muscular de carnosina é limitada pela quantidade de β-alanina disponível e não pela L-histidina. Considerando que a concentração de β-alanina intracelular é cerca de 40 vezes menor que as concentrações de L-histidina (HORINISHI et al. 1978), e que a β-alanina (Km

~2mM) apresenta uma afinidade 1000 vezes menor do que pela L-histidina (Km ~17 μM), assume-se que a disponibilidade de β-alanina é o principal fator limitante para síntese de carnosina. Tendo isto em mente, Harris et al. (2006) demonstraram que a suplementação de β-alanina é eficiente em elevar o conteúdo de carnosina muscular, confirmando que a síntese de carnosina muscular é dependente primariamente da disponibilidade de substrato (i.e. β-alanina).

Tão importante quanto a carnosina sintase, as enzimas responsáveis pela hidrólise da carnosina também apresentam um papel ímpar no seu metabolismo. A saber, a carnosina e seus análogos não são degradados pelas peptidases comuns do metabolismo proteico, mas sim, por suas próprias enzimas hidrolíticas específicas denominadas *canosinases* (BOLDYREV et al. 2013).

Hanson & Smith (1949) foram os primeiros a descrever e a purificar a carnosinase do órgão renal de suínos. Desde então, duas isoformas das carnosinases foram identificadas, sendo elas - CN1 ou carnosinase sérica e CN2 ou carnosinase citosólica não-específica ou tecidual. Ambas pertencentes a família das metaloproteases (BOLDYREV et al. 2013).

A carnosinase sérica (EC 3.4.13.20) foi primeiramente descrita por Perry, Hansen & Love, (1968) no jornal britânico *The Lancet*, a qual reportaram a presença de uma enzima específica no soro capaz de hidrolisar a carnosina e anserina em seus respectivos aminoácidos. Os mesmos autores (PERRY et al. 1967), já haviam reportado o caso de crianças com deficiência genética na atividade da carnosinase, a qual apresentavam o quadro de hipercarnosinuria (i.e. eliminação de carnosina pela urina) quando alimentadas com alimentos fontes de anserina e carnosina. Posteriormente a enzima CN1 foi isolada do plasma humano e nomeada por Lenney et al.(1982) como “carnosinase sérica humana”. Sua síntese parece ocorrer principalmente nos tecidos cerebral e hepático, uma vez que a mesma, também é apta a hidrolisar a homocarnosina (presente apenas no cérebro).

Em indivíduos saudáveis é possível observar a elevada atividade enzimática da CN1, de modo que a carnosina torna-se indetectável no sangue em poucos minutos (GARDNER et al. 1991). Cabe destacar que a atividade da CN1 pode apresentar uma variação bastante ampla entre indivíduos. Recém-nascidos apresentam baixa atividade enzimática, ao passo que indivíduos mais

idosos essa relação é inversa (PETERS et al. 2010). No que se refere ao pH, a CN1 apresenta sua ótima atividade em pH entre 7,5 – 8,5, além de sua reação ser dependente de co-fatores como o Zn^{2+} e Cd^{2+} (TEUFEL et al. 2003).

O gênero é outro fator determinante, visto que indivíduos do sexo masculino parecem apresentar menor atividade da CN1 quando comparado as mulheres (EVERAERT et al. 2011). Diferentemente dos humanos, alguns mamíferos, incluindo os roedores, apresentam a expressão da CN1 restrita ao tecido renal, de forma que seja possível então detectar a presença de carnosina no sangue (SAUERHOFER et al. 2007).

Já a isoforma CN2 (EC 3.4.13.18) foi primeiramente isolada *in vitro* e descrita por Lenney et al. (1985). Os autores sugerem que esta isoforma tem sua atuação mais ampla, com a denominação de "dipeptidase citosólica não-específica", isto é, menos seletiva a hidrólise de substratos, quando comparada a isoforma CN1. De acordo com Lenney et al. (1985), a atividade catalítica da CN2 no tecido muscular é consideravelmente baixa, de maneira que a carnosina é degradada lentamente. Teufel et al. (2003), verificaram em experimento *in vitro*, que o pH ótimo de atividade da CN2 para hidrólise da carnosina é da ordem de 9,5, ou seja, um pH alcalino se comparado ao pH fisiológico (Tabela 2).

Aparentemente a CN2 apresenta baixa ou nenhuma atividade sob a carnosina *in vivo*, tanto pela limitação do pH não ser ótimo para sua atividade, quanto pelo seu elevado valor de Km (i.e. afinidade enzima-substrato) de 20 mmol/kg carnosina (JACKSON; KUCERA; LENNEY, 1991). Adicionalmente, a CN2 apresenta sua atividade muito superior para hidrolisar outros dipeptídios, tais quais glicina-leucina e prolina-leucina (LENNEY, 1990).

Tabela 2: Características das carnosinases

	Carnosinase Sérica	**Carnosinase citosólica não-específica**
Outras nomenclaturas	CN1, ß-Ala-His dipeptidase	CN2

Expressão em tecidos humanos	Cérebro, fígado, soro e glomérulo renal	Ubiquamente expresso, não presente no soro e fluído cerebrospinal
Cofatores	Zn^{2+}, Cd^{2+}	Mn^{2+}
pH ótimo	8,5	9,5
Gene codificador	CNDP1	CNDP2
Número EC	3.4.13.20	3.4.13.18

Adaptado de BOLDYREV, ALDINI & DERAVE, 2013

3.3.2 Transportadores de carnosina e β-alanina

A carnosina pode ser transportada através de uma família de transportadores de membrana denominados *proton-coupled oligopeptide transporter* (POT) ou *solute carrier 15 family* (SLC15), as quais pertencem a um conjunto maior de transportadores denominados “Transportadores Peptídicos”, do inglês, *Peptide Transporter* (BOLDYREV et al. 2013; DANIEL; KOTTRA, 2004). Os POT’s podem transportar diversos dipetídeos, tripeptídeos e drogas semelhantes a peptídeos através das membranas biológicas (ZHAO; LU, 2015). Os principais transportadores de interesse da carnosina, são respectivamente, PEPT1 (SLC15A1), PEPT2 (SLC15A2) PHT1 (SLC15A4) e PHT2 (SLC15A3) (BOLDYREV et al. 2013).

O transportador PEPT1 constitui o principal transportador responsável pela absorção intestinal de quaisquer dipeptídeo e tripeptídeos, e apresenta maior afinidade por peptídeos com cadeias laterais alifáticas e grandes (FEI et al. 1994). O mecanismo de transporte quantitativamente mais eficiente e predominante utilizado pelo transportador é o chamado transporte ativo, onde há o gasto de ATP para a execução deste processo (MATTHEWS; ADIB, 1976). Além disso, o PEPT1 é caracterizado pela sua alta capacidade e baixa afinidade de transporte e apresenta um papel importante na absorção intestinal de peptídeos (BOLDYREV et al. 2013).

O transportador PEPT2 é amplamente expresso em vários tecidos, com predominância nos rins, cérebro, pulmões, olho, próstata, astrócitos, baço útero e glândulas mamárias (ZHAO; LU, 2015). Dada a sua afinidade 15 vezes maior que o PEPT1, pelo mesmo substrato, o PEPT2 é caracterizado pela sua alta afinidade e baixa capacidade de transporte (WANG et al. 2010). O PEPT2 pode transportar independentemente mais de 400 dipeptídeos e 8.000 tripeptídeos, a qual compõe os 20 L-alfa-aminoácidos (DANIEL; KOTTRA, 2004).

Os transportadores de peptídeos/histidina ou PHT's são responsáveis pelo transporte, como a sua própria denominação diz, de dipeptídeos, tripeptídeos e L-histidina (DANIEL; KOTTRA, 2004). Originalmente identificado e clonado do cérebro de ratos, o transportador PHT1 parece ser apto a transportar carnosina em um processo pH-dependente após ser expresso *in vitro* (YAMASHITA et al. 1997). Contudo, pouco se conhece a respeito dos transportadores PHT1 e PHT2, como sua função fisiológica no músculo, assim como sua principal direção de transporte, ou seja, se de fora para dentro das células ou de dentro para fora das células (BOLDYREV et al. 2013). Embora estudos *in vitro* sugiram que a carnosina não seja transportada em sua forma intacta para dentro da célula (BAUER; SCHULZ, 1994), estudos com análise de expressão gênica em músculo de humanos demonstram a significativa expressão de PHT2 (EVERAERT et al. 2013). Ainda que a expressão gênica de PHT2 não confirme terminantemente que a captação de carnosina ocorra, é razoável assumir que, em humanos a carnosina possa ser transportada para as células musculares (DE SALLES PAINELLI et al. 2015).

Enquanto o transporte da L-histidina para dentro da célula muscular ocorre através das isoformas 1 e 2 do transportador de peptídeos/histidina (*i.e.,* PHT1 e PHT2) já é bem caracterizado (DANIEL; KOTTRA, 2004; EVERAERT et al. 2013; SMITH; CLEMENCON; HEDIGER, 2013), a sua captação de β-alanina pelo músculo esquelético vem recebendo mais atenção. Nesse sentido, estudos realizados em culturas de células embrionárias do músculo esquelético de frangos apresentaram a existência de um transporte estequiométrico de β-alanina para dentro das células musculares dependente de sódio e cloreto, 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. Além da TauT,

recentemente descobriu-se a existência de uma outra proteína também responsável pelo transporte da β-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 et al. 2009). Apesar disso, devido ao fato de apenas a expressão gênica da TauT ser estimulada e inibida pelo tratamento com β-alanina e pela orquidectomia, respectivamente, esta proteína tem sido apontada como o transportador dominante na captação de β-alanina pelo músculo esquelético (EVERAERT et al. 2013).

3.4 Fatores determinante do conteúdo muscular de carnosina

3.4.1 Tipo de fibra

As fibras musculares podem ser classificadas de modo geral em fibras oxidativas (*i.e.,* tipo ou lentas) e fibras glicolíticas (i.e. tipo II ou rápidas). É bem sabido que as fibras glicolíticas estão envolvidas predominantemente no metabolismo anaeróbio e que o maior recrutamento dessas fibras é necessário durante esforços intensos a qual podem levar a fadiga muscular (ZIERATH; HAWLEY, 2004). Sendo assim, é plausível assumir que a ação tamponante da carnosina é um fator importante no metabolismo muscular, principalmente nas fibras do tipo II.

Harris et al. (1998) demonstraram em um estudo em humanos, através da técnica de biópsia muscular e análise por HPLC, que o conteúdo de carnosina nas fibras do tipo II eram duas vezes maiores do que as observadas nas fibras do tipo I (23,2± 17,8 e 10,5± 7,6 mmol/Kg^{-1}). Hill et al. (2007) observaram o mesmo padrão, com o conteúdo de carnosina 66% superior em fibras do tipo IIa (29,6± 2,01) do que em fibras do tipo I (17,8± 1,9). Outros estudos, também em humanos corroboram com estes achados ao observar que corredores velocistas e remadores apresentam maior conteúdo muscular de carnosina, quando comparados a corredores maratonistas e sujeitos sedentários (PARKHOUSE et al. 1985). Baguet et al. (2011) também quantificaram o conteúdo de carnosina muscular em diferentes grupos de atletas de elite e observaram resultados semelhantes com os de Parkhouse et al. (2015). Atletas velocistas (*i.e.,*

sprinters), apresentavam o conteúdo de carnosina muscular superior quando comparados a maratonistas, embora este grupo tenha avaliado o conteúdo de carnosina pelo método de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (H-RMN).

Especula-se que o maior conteúdo de carnosina nas fibras glicolíticas em relação as fibras oxidativas, deve-se possivelmente a maior expressão enzimática da carnosina sintase e menor atividade das transaminases (*i.e.,* GABA-T e AGXT-2), conforme observado recentemente por Blancquert et al. (2016). Essa hipótese poderia explicar também o maior conteúdo de carnosina observado em humanos com predominância de fibras glicolíticas (HOSTRUP; BANGSBO, 2016).

É possível concluir que as fibras musculares do tipo II apresentam maior conteúdo de carnosina, o que seria uma adaptação a predominância do metabolismo anaeróbio, requeridos nos esforços de alta intensidade.

3.4.2 Gênero

Diferenças entre gêneros também influenciam o conteúdo de carnosina muscular. Mannion et al. (1992) avaliaram através de biópsias musculares o conteúdo de carnosina e anserina em 50 sujeitos saudáveis. Foi observado que homens apresentam um conteúdo de carnosina muscular 22% maior quando comparado as mulheres (21,3± 4,2 e 17,5± 4,8 respectivamente). Tais achados corroboram o estudo de Everaert et al. (2010), a qual observaram que o conteúdo de carnosina muscular era superior no sexo masculino, mas que a magnitude dessa diferença entre gêneros era dependente do tipo de fibra muscular. Os músculos sóleo de gastrocnêmio apresentaram um conteúdo de 36% e 28% maior em homens, enquanto que a diferença do músculo tibial anterior chegara a 82% maior em homens, avaliados pelo método de H-MRS.

Diversas hipóteses são possíveis para explicar a diferença do conteúdo de carnosina entre os gêneros. Evaraert et al. (2010) sugerem que, possivelmente mulheres apresentam menor conteúdo de carnosina muscular como resultado da menor proporção de fibras do tipo II, além de menores níveis de andrógenos circulantes, fatores estes determinantes no conteúdo de carnosina muscular.

Baguet et al. (2012) posteriormente demonstraram que homens jovens no período púbere apresentam conteúdo de carnosina muscular mais elevados nesta fase, quando comparado a mulheres jovens. Durante o período pré-púbere ao púbere houve um aumento de 23% e 44,6% no conteúdo de carnosina, nos músculos gastrocnêmio e sóleo respectivamente.

Por fim, diferenças no consumo alimentar de DCH e β-alanina entre homens e mulheres não ser desconsiderados, no que refere ao conteúdo de carnosina muscular, embora talvez este não seja considerado o fator gênero. Dessa forma, estudos a longo prazo com análises fenotípicas de fibras musculares em indivíduos vegetarianos de ambos os sexos são necessários para elucidar tais questões. Adicionalmente a taxa de síntese hepática de β-alanina tanto em homens quanto em mulheres deveria ser também incluídas nestes estudos (HARRIS et al., 2012).

3.4.3 Idade

A redução de carnosina muscular associado a idade foi primeiramente descrita por Stuerenburg & Kunze (1999) em ratos saudáveis. Estes mesmos autores, também observaram uma correlação negativa entre o conteúdo de carnosina e idade em humanos com doença neuromuscular. Everaert et al. (2011) apoiaram esses achados ao observarem a redução da concentração de carnosina no músculo sóleo de adultos com idade entre 19 – 47 anos.

Assim como o gênero, a concentração de carnosina muscular em sujeitos idosos relaciona-se com a redução de fibras musculares do tipo II (i.e. com maior conteúdo de carnosina), além da redução de hormônios andrógenos, embora o papel da testosterona neste processo não esteja totalmente elucidado. Baguet et al. (2012), confirmam em um estudo com 263 sujeitos saudáveis de diferentes faixas etárias, a redução das concentrações de carnosina muscular com o avançar da idade. Interessantemente, essa redução deu-se principalmente durante a fase adulta, logo após a puberdade e quase pouca ou nenhuma redução foi observada durante a transição para a terceira idade.

Tallon et al. (2007) investigaram as alterações nas concentrações de carnosina muscular, relacionados a idade, em fibras do tipo I e tipo II. Idosos com osteoartrite apresentavam em média uma redução de 53% nas concentrações

de carnosina muscular, enquanto que nenhuma alteração foi observada nas fibras do tipo I. Segundo os autores, a manutenção das concentrações de carnosina nas fibras do tipo I possivelmente é resultante do seu maior recrutamento com o avançar da idade, em decorrência da redução das fibras do tipo II.

Fatores relacionados a síntese e hidrólise da carnosina também poderiam refletir a redução das concentrações de carnosina observada em idosos. Lenney et al. (1982) sugerem que a atividade da carnosinase encontra-se aumentada com o avançar da idade, o que levaria ao aumento da degradação de carnosina. Assim como sua redução poderia estar relacionada com a diminuição da expressão dos transportadores de β-alanina, e da carnosina sintase ou inclusive com a menor atividade da carnosina sintase. Contudo, nenhum estudo até o presente momento pode elucidar tais hipóteses.

3.4.4 Dieta

Sabendo que a β-alanina é um aminoácido não-essencial, imprescindível a síntese de carnosina muscular, é intuitivo assumir que seu consumo alimentar é um fator determinante no conteúdo total de carnosina, uma vez que, a β-alanina e a carnosina são predominantemente consumidas em dietas onívoras. É sabido que o suporte endógeno de β-alanina é presumivelmente limitado e dependente da síntese hepática proveniente da degradação de uracila (FRITZSON; PIHL, 1957). No entanto essa rota metabólica permanece pouco compreendida e possivelmente insuficiente as demandas fisiológicas de β-alanina (BOLDYREV et al. 2013). Sendo assim, o consumo exógeno por alimentos e/ou suplementos parecem exercer um papel imprescindível.

O fato de vegetarianos apresentarem concentrações reduzidas de carnosina muscular quando comparados a indivíduos onívoros, avigora a ideia de que a β-alanina consumida via dieta é indispensável para síntese de carnosina muscular (DE SALLES PAINELLI et al. 2015). Everaert et al. (2011) observaram que de fato, vegetarianos de longa data (> 8 anos) apresentaram reduções de 17 - 26% de carnosina muscular (nos músculos sóleo, gastrocnêmio e tibial anterior), comparados a sujeitos que consumiam uma dieta mista, com consumo médio de 330 mg/d de β-alanina.

As principais fontes alimentares de carnosina constituintes na dieta do homem são as carnes vermelhas, aves e peixes (JONES, SMITH, HARRIS, 2011). A ingestão diária de carnosina e outros DCH na dieta de humanos pode variar de < 50 mg/d para aqueles indivíduos com uma dieta estritamente vegetariana, até > 4.000 mg/d para os consumidores assíduos de carnes (ABE, 2000).

Everaert et al. (2011) observaram que a ingestão média de β-alanina baseado no consumo de carnes e peixes de uma amostra composta por 29 homens onívoros foi de 332± 144 mg/d. Contudo, a ingestão de β-alanina através destes alimentos parece não ser determinante ao conteúdo de carnosina muscular. De acordo com estes mesmos autores, não houve correlação entre o consumo de β-alanina e o conteúdo de carnosina muscular, assim como, diferenças entre àqueles indivíduos que apresentavam baixo consumo (< 332 mg/d) ou alto consumo (> 332 mg/d) de β-alanina. No entanto, essas inferências devem ser avaliadas com cautela, dado as limitações do número da amostra estudada. Salienta-se ainda que o consumo de carnes pode variar amplamente em diversos países, sendo a América do Norte, o Brasil e a União Europeia os maiores consumidores, segundo os dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - OECD-FAO (2016).

É presumível assumir que a forma de preparo dos alimentos ricos em DHC pode ser alterada com o processo de cocção, assim como ocorre com a creatina (PURCHAS et al. 2004). Segundo Harris et al. (2011) poder-se-ia ocorrer uma perda de até 100% do conteúdo de carnosina após a cocção do alimento fonte de carnosina. Em contrapartida, Park et al. (2005) demonstraram que o cozimento de carne moída 74º C (temperatura interna), não alterou de forma significativa a concentração de carnosina.

Assim, a avaliação do consumo alimentar dos DCH torna-se limitada, dada a quantidade de variáveis envolvidas no consumo de DCH na dieta humana. Jones et al. (2011) propuseram a avaliar o conteúdo de DCH de alimentos habitualmente consumidos na dieta britânica (Tabela 3). No total, foram analisados 10 alimentos m triplicatas e em seguida avaliados pela técnica de HPLC para o conteúdo de anserina e carnosina.

Tabela 3: Conteúdo médio de carnosina em alimentos do consumo habitual de britânicos (Valores apresentados em média e desvio-padrão).

Animal / Espécie	Região / pedaço	CARNOSINA (mmol/kg^{-1} de músculo seco)	
		Média	DP
Camarões de Hondura	Inteiro	40.9	5.2
Camarões do Atlântico Norte	Inteiro	51.5	5.1
Peru	Peitoral	46.7	10.9
Frango	Peitoral	54.0	13.2
Atum	Filé	4.7	1.1
Carne de vaca	Alcatra	70.4	7.2
Cordeiro	Alcatra	33.6	1.5
Carne de porco	Alcatra	55.4	3.3
Cavalinha	Filé	34.6	13.1
Truta arco-íris	Filé	0.5	0.1

Tabela adaptada de JONES et al, 2011.

Destarte, estudos mais robustos a respeito do conteúdo alimentar de carnosina e β-alanina, assim como suas possíveis alterações físico-químicas, tornam-se necessárias, principalmente a análise dos alimentos de origem brasileira, dado este, ainda inexistente na literatura.

3.4.5 *Status* de Treinamento

Ao que parece, Mannion et al. (1994), foram os primeiros a avaliar se o treinamento físico seria capaz de aumentar o conteúdo muscular de carnosina. Contudo, o programa de treinamento físico empregado pelos autores, o qual consistia de extensões de joelho em dinamômetro isocinético, realizadas 3 vezes por semana, durante 16 semanas, não geraram alterações significantes no conteúdo muscular carnosina e na capacidade tamponante muscular.

Por outro lado, estudos transversais com indivíduos anaerobicamente treinados demonstram o maior conteúdo de carnosina muscular nestes sujeitos. Conforme citado anteriormente, Parkhouse et al. (1985) demonstraram que remadores e velocistas apresentavam o conteúdo de carnosina muscular superior a maratonistas e indivíduos não-treinados. Tallon et al. (2005) verificaram que atletas fisiculturistas apresentam maior conteúdo de carnosina muscular, quando comparado indivíduos fisicamente ativos. Da mesma forma, Kim et al. (2006) observaram resultados semelhantes em patinadores. A hipótese postulada por ambos os autores se apoia no ambiente ácido a qual a musculatura destes atletas é exposta, o que implicaria no *upregulation* na síntese de carnosina muscular (KENDRICK et al. 2008). Entretanto, as conclusões do estudo de Tallon et al. (2005) devem ser vistas com cautela, uma vez que, o aumento de carnosina muscular poderia estar associado a outros fatores (e.g. *shift* de fibras musculares, uso de esteroides anabólicos, consumo aumentado de proteínas) e não ao treinamento *per se* (HARRIS et al. 2012).

Suzuki et al. (2004) observaram que um programa de treinamento consistido pela execução de 3 séries de 30 segundos em cicloergômetro, realizadas 2 vezes por semana durante 8 semanas (totalizando 48 séries no estudo ou 24 minutos de exercício), pode gerar o expressivo aumento no conteúdo intramuscular de carnosina (> 100%). Este foi o primeiro estudo a demonstrar um efeito modulador do treinamento físico sobre a carnosina muscular, embora algumas limitações possam ser observadas, tais como, os valores elevados do conteúdo de carnosina, o baixo volume de treinamento empregado e adicionalmente a deficiência de informações metodológicas.

Os achados de Baguet et al. (2011) não corroboram com os dados de Suzuki et al. (2004), onde um protocolo semelhante de treinamento foi aplicado em 20 sujeitos não-treinados (11 homens e 9 mulheres). Após um grupo seguir uma dieta ovo-lacto-vegetariana e o treinamento durante 5 semanas, não foram observados aumentos significantes no conteúdo de carnosina muscular. Ademais, não foi detectada alteração na expressão gênica da CS, enzima responsável pela síntese de carnosina muscular.

Kendrick et al. (2008) avaliaram a interação entre o treinamento de força e o conteúdo de carnosina muscular durante 10 semanas em estudantes vietnamitas saudáveis, fisicamente ativos. Não foram observadas alterações

significantes no conteúdo muscular de carnosina após o protocolo de treinamento de força empregado. No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores (KENDRICK et al. 2009), avaliaram os efeitos de 4 semanas de treinamento isocinético em um modelo de treino unilateral de pernas (*i.e.,* uma perna torna-se controle da outra). Os indivíduos foram separados em dois grupos, treinamento + suplementação de β-alanina (6,4g/d) e grupo placebo. Similarmente aos achados anteriores, não houveram aumentos significantes do conteúdo muscular de carnosina na perna treinada do grupo placebo e na perna não-treinada do grupo β-alanina.

É interessante destacar que a maioria dos estudos não empregaram indivíduos vegetarianos, uma vez que o consumo de β-alanina e carnosina poderiam enviesar os resultados. Adicionalmente, a caracterização fenotípica da fibra muscular (*i.e.,* a identificação de fibras do tipo I, IIa, IIx) permitiria avaliar se as alterações no conteúdo de carnosina muscular, conforme observada por Suzuki et al. (2004) são secundárias ao *shift* de fibras musculares ou se por outro mecanismo.

As evidências presentes até o momento não suportam a hipótese de que o treinamento é um fator modulador do conteúdo de carnosina muscular, embora dados preliminares do nosso grupo apontem tal efeito em indivíduos vegetarianos submetidos ao treinamento de alta intensidade por 12 semanas.

Fica evidente que atletas altamente treinados em modalidades que envolvem exercícios de alta intensidade apresentam níveis maiores de carnosina muscular, no entanto fica interrogado por quais mecanismos dá-se este fenômeno.

3.5 Suplementação de β-alanina

Há pouco mais de uma década, diversos estudos têm avaliado os efeitos da suplementação da β-alanina (HARRIS et al., 2006, HILL et al. 2007; DERAVE et al. 2007; DEL FAVERO et al. 2011; DE SALLES PAINELLLI et al. 2013; SAUNDERS et al. 2017). Já está bem estabelecido na literatura que a ingestão oral de 4 – 6g/d de β-alanina durante 2 - 10 semanas pode aumentar as concentrações de carnosina muscular em uma magnitude de 40 – 80 % (HILL et al. 2007; HARRIS et al. 2006), embora estudos mais recentes já tenham

empregado a suplementação de β-alanina por 24 semanas, com aumentos relativos de até quase ~200% (SAUNDERS et al. 2016).

Harris et al. (2006) em uma série de estudos foram pioneiros ao avaliar os efeitos da suplementação de β-alanina nas concentrações de carnosina muscular durante 4 semanas. Foram testadas três doses diárias: 40 mg/Kg, 20 mg/Kg e 10 mg/Kg. Foi observado um pico elevado de β-alanina após a ingestão da maior dose, no entanto, após 20 minutos foram relatados sintomas de "formigamento" na pele, em diversas partes do corpo, conhecido como parestesia. A dose intermediária de 20 mg/Kg obteve um pico moderado de β-alanina, contudo, também levou aos mesmos sintomas observados com a dose superior, porém, menos intenso. A menor dose elevou o pico de maneira discreta, com sintomas modestos de parestesia. Tais dados demonstram que a dose limite tolerável é de aproximadamente 10 mg/Kg (~ 800 mg). A duração do pico plasmático observado foi de ~30 – 40 minutos com meia vida de desaparecimento ocorrendo cerca de 25 minutos após o pico. Os níveis basais de β-alanina retornaram após ~3 horas. Deste modo, sugere-se que doses elevadas de β-alanina devem ser fracionadas ao longo do dia, não ultrapassando a dose de ~800 mg para evitar sintomas indesejáveis.

Neste mesmo estudo, Harris et al. (2006), investigaram diferentes tipos de protocolos de suplementação de β-alanina, onde um grupo recebeu baixa dose de β-alanina (4 x 800 mg/d ~ 3,2 g/d), 2) o outro grupo alta dose (4 g/d na primeira semana e 6,4 g/d até o término das 4 semanas). Ambos os protocolos foram efetivos em aumentar as concentrações de carnosina muscular, no entanto, o grupo que recebeu maior dose de β-alanina apresentou o pico plasmático superior que o grupo de baixa dose.

Hill et al. (2007) investigaram os efeitos da suplementação de β-alanina durante 10 semanas sob as concentrações de carnosina muscular e o desempenho físico em um teste de capacidade máxima a 110% ($CCT^{110\%}$). Foi observado o aumento de 60% nas concentrações de carnosina muscular após 4 semanas e adicionalmente 20%, após 10 semanas.

Kendrick et al. (2009), também demonstraram que suplementação de 6,4 g de β-alanina (800 mg 8x/d) durante 10 semanas foi eficiente em elevar as concentrações de carnosina muscular em 59 %.

Stellingwerff et al. (2011) foram os primeiros a avaliar uma dose de manutenção da β-alanina com objetivo de manter os níveis de carnosina muscular constantes. Após elevar as concentrações da carnosina muscular nas primeiras 4 semanas com a suplementação de 3,2 g/dia de β-alanina, foi observado o aumento de ~ 30 % da carnosina após 4 semanas com a ingestão de 1,6 g/d de β-alanina. Desta forma, entende-se que a dose ótima de manutenção possivelmente esteja entre 0 e 1,6 g/dia. Corroborando com essa hipótese, Stegen et al. (2013), investigaram três doses de manutenção (0, 0,8, e 1,2 g/dia) após a suplementação de 3,2 g/dia de β-alanina durante 46 dias. Ao término estudo, conclui-se que a suplementação de 1,2 g/dia de β-alanina foi a mais eficaz em manter as concentrações de carnosina muscular elevadas após a fase de carregamento.

Saunders et al. (2016) suplementaram 6,4 g/dia de β-alanina, em uma amostra de 25 indivíduos jovens saudáveis, durante 24 semanas. O objetivo dos pesquisadores foi avaliar a existência de um ponto de saturação da carnosina muscular, tal como ocorre com a suplementação de creatina (SAHLIN, 2014). Interessantemente, a maioria dos indivíduos apresentaram maiores aumentos do conteúdo muscular de carnosina nas últimas 20 semanas do estudo. Cinco destes indivíduos apresentaram níveis aumentados somente na 24ª semana. O aumento absoluto de carnosina muscular após 24 semanas de suplementação apresentou uma variação de ~32 – 64 mmol/Kg de musculo seco e valores relativos de ~ 59 – 200 %, valores estes dependentes do conteúdo inicial de carnosina. O aumento de carnosina foi acompanhado pela melhora do desempenho de alta intensidade no cicloergômetro, ou seja, os indivíduos suplementados com β-alanina apresentaram melhora de desempenho. Além disso, foi detectada a “baixa-regulação” (ou *downregulation)* da expressão gênica de TauT (i.e. transportador de β-alanina), sugerindo que o aumento de carnosina muscular pode ser dependente do transporte de β-alanina para dentro do músculo, uma vez que, isso poderia influenciar diretamente a disponibilidade de β-alanina para a síntese de carnosina. A redução da atividade da TauT durante períodos prolongados de β-alanina circulante poderia ser um mecanismo fisiológico da homeostase da carnosina muscular, limitando assim, a captação de β-alanina no músculo.

Tem-se discutido, no entanto, a eficiência da suplementação de β-alanina e quais seriam as possíveis estratégias para otimizar o conteúdo de carnosina muscular. Em condições onde o consumo exógeno de β-alanina pode exceder as necessidades e ou a capacidade de sintetizar carnosina, é possível que a β-alanina seja degradada e utilizada como fonte de energia (BLANCQUAERT et al. 2016). Stegen et al. (2013) demonstraram que de fato, a suplementação de β-alanina apresenta elevada retenção corporal, com aproximadamente 97 – 98% da β-alanina retida, após cinco semanas de suplementação com desses de 4,8 g/dia. No entanto, apenas ~3 % parece ser retido na forma de carnosina muscular, o que sugere um possível desvio da β-alanina para outras funções metabólica (e.g. oxidação e provisão energética).

Blancquaert et al. (2016), demonstram que a ingestão de β-alanina é possivelmente priorizada para outras rotas metabólicas, tais como sua oxidação. Neste elegante estudo, o objetivo dos pesquisadores foi avaliar a contribuição de duas enzimas denominadas, 4-aminobutirato-2-oxoglutarato transaminases (GABA-T) e alanina-gloxilato transaminase (AGXT2), para a homeostase da carnosina e seus análogos metilados. Verificou-se *in vitro* que ambas as enzimas são capazes de transaminar a β-alanina eficientemente. Além disso, foi possível observar em modelo animal que, após a inibição destas transaminases, os níveis de β-alanina circulantes estavam três vezes aumentados, e o conteúdo de carnosina e anserina significativamente maiores nos tecidos muscular e cardíaco. Esses achados sugerem que a homeostase da carnosina possivelmente é controlado pela β-alanina circulante a qual pode ser suprimido pela sua ingestão oral.

Hostrup & Bangsbo (2016), baseado nos achados de Blancquert et al. (2016) propõem uma estratégia de otimização da suplementação de β-alanina, através da saturação das transaminases (i.e. GABA-T e AGXT2) através de uma dose única elevada de β-alanina, seguido de pequenas doses com tabletes de liberação lenta, divididas ao longo do dia. Embora essa hipótese ainda careça de testagem, pode-se inferir que a administração de uma dose única elevada pudesse levar a sintomas de parestesia.

Em um estudo recente, Church et al. (2017) demonstraram que a suplementação de 12g/d de β-alanina em cápsulas de liberação lenta durante duas semanas foi eficiente em aumentar o conteúdo de carnonisa muscular

similar a dose de 6g/d durante quatro semanas, sem efeito colateral de parestesia e alterações hematológicas. Este foi o primeiro estudo a empregar um protocolo de 4g ingeridas três vezes ao dia.

A suplementação de β-alanina também parece ser influenciada pela resposta insulínica. Stegen et al. (2013) exploraram a influência do *timing* das refeições sob as concentrações musculares de carnosina após suplementarem um grupo de indivíduos com 3,2 g/d de β-alanina durante 6 – 7 semanas. Os autores observaram o maior carregamento de carnosina quando a β-alanina era consumida no início de cada refeição (+64%) quando comparada a ingestão entre as refeições (+41%). Contudo, os mecanismos por trás do papel da insulina sob as concentrações de carnosina muscular permanecem inexplorados. Um estudo do nosso grupo, irá tentar elucidar a influência da insulina na captação de β-alanina pelos tecidos através da técnica de *Clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico.

Baseado a luz destes estudos, fica clara a necessidade do preenchimento de algumas lacunas, considerando que a suplementação de β-alanina é um tema relativamente recente na ciência, quando comparado a outros recursos ergogênicos nutricionais.

3.6 β-alanina e desempenho físico

A suplementação de β-alanina tem cada vez mais despertado o interesse de atletas e entusiastas do esporte, assim como da comunidade científica (DE SALLES PAINELLI et al. 2015). Um levantamento recente realizado com atletas australianos demonstrou que mais de 60% deles fazem uso da suplementação de β-alanina, embora a grande maioria destes atletas realizem seu consumo erroneamente (KELLY et al. 2017).

No que se refere ao desempenho físico-esportivo, a suplementação de β-alanina tem-se mostrado efetiva, especialmente em modalidades onde o acumulo de íons H^+ é predominante (SALE, et al. 2013). Em exercícios de alta intensidade e curta duração a fadiga muscular desenvolve-se rapidamente, sendo este, um dos principais fatores limitantes do desempenho físico (FREITAS et al. 2015), ainda que a etiologia da fadiga permaneça em intenso debate na literatura científica (FITTS, 2016; WESTERBLAD, 2016).

Em exercícios de alta intensidade e curta duração, observa-se o acúmulo de diversos metabólitos no interior das células, tais como, ADP, Pi (*i.e.,* fosfato inorgânico), lactato e íons H^+ (SPRIET, et al. 1989). Neste sentido, é razoável assumir que o potencial efeito ergogênico da carnosina (obtido pela suplementação de β-alanina), dá-se pelo seu potencial na regulação ácido-base intramuscular.

A primeira meta-análise publicada por Hobson et al. (2010) demonstrou que a β-alanina exerce seu potencial efeito ergogênico em exercícios com duração entre 1 – 4 minutos, não apresentando qualquer efeito significante quando o tempo de exercício é inferior a 1 minuto. Saunders et al. (2017) demonstraram em uma recente meta-análise, que o tempo de exercício é o principal fator influenciador da suplementação de β-alanina. Os resultados da meta-análise também demonstraram maior eficácia da suplementação de β-alanina em sujeitos não-treinados, enquanto um menor efeito foi observado em sujeitos treinados. Do ponto de vista prático, esses achados podem auxiliar na tomada de decisões (*i.e.,* se o sujeito deve ou não fazer uso do suplemento), baseada nas modalidades praticadas pelo sujeito (e.g. 400, 800, 1500 m de corrida; 4 km de ciclismo; 100, 200 e 400 m de natação).

Hill et al. (2007) investigaram os efeitos da suplementação de β-alanina em um teste de capacidade máxima no cicloergometro a 110% (em inglês: *Cycling Capacity Test* – 110%). Esse protocolo foi desenvolvido para induzir um grande acúmulo de íons H+ e consequentemente queda do pH intramuscular (SAUNDERS et al. 2013). Os autores observaram o aumento de 13% no trabalho total realizado (TTR) durante o teste, após um aumento de 60% de carnosina muscular após 4 semanas de suplementação com β-alanina. Ao término de 10 semanas a concentração de carnosina muscular aumentou em 80% e o TTR 16,2%.

Sale et al. (2011) avaliaram os efeitos adicionais da suplementação de β-alanina e bicarbonato de sódio aplicando o mesmo protocolo de Hill et al. (2007). Foi detectada uma melhora significativa na capacidade anaeróbica do grupo suplementado com β-alanina, assim como no grupo β-alanina e bicarbonato de sódio, quando comparados ao grupo placebo.

Adicionalmente aos estudos que avaliaram os efeitos da suplementação de β-alanina em testes de capacidades físicas, recentemente tem-se avaliado

seus efeitos em diversas modalidades esportivas. Do ponto de vista prático, diversas modalidades esportivas de alta intensidade poderiam se beneficiar dos atributos ergogênicos da β-alanina.

de Andrade Kratz et al. (2016), avaliaram os efeitos da suplementação de β-alanina em atletas de judô. Considerando que o Judô é uma modalidade esportiva caracterizada por esforços intermitentes de alta-intensidade (FRANCHINNI, ARTIOLI, BRITO, 2013), seria presumível assumir que a suplementação de β-alanina pudesse melhorar o desempenho destes atletas. No estudo, foram recrutados 23 atletas aleatoriamente designados no grupo suplementação (β-alanina 6,4 g/d) e placebo (6,4 g/d), durante quatro semanas. Para avaliar o desempenho dos atletas, foram aplicados testes específicos da modalidade (*Randori* e *Special Judo Fitness Test*), consistido por simulações de combate e projeções do adversário. Ao término do estudo, foi observado o maior número de projeções realizado pelo grupo β-alanina comparado ao placebo, embora os autores não tenham quantificado diretamente a carnosina muscular da amostra estudada.

Claus et al. (2017) investigaram os efeitos da suplementação de β-alanina em atletas de polo aquático. No total, 15 atletas jovens com experiência de nível nacional foram aleatoriamente alocados no grupo β-alanina (6,4 g/d) ou placebo (6,4 g/d), em um estudo duplo-cego, durante 6 semanas. O desempenho dos atletas foi avaliado através de testes com gestos específicos do esporte, arremessos e nado livre. Após a intervenção, foi observada melhora significante no desempenho no grupo β-alanina. Salles Painelli et al. (2012) demonstraram resultados similares no nado livre de 200 m em um grupo de nadadores jovens, após a suplementação de β-alanina (3,2 g/d durante 1 semana e 6,4 g/d durante 4 semanas). Recentemente, ainda em modalidades aquáticas, Brisola et al. (2018) demonstraram que a suplementação de 6,4g/d de β-alanina durante 4 semanas atenuou os efeitos decorrentes da fadiga em jogadores de polo aquático. Foi observado no grupo suplementado com β-alanina, o aumento total de *sprints* efetuados, distancia coberta e o tempo total em zona considerada de alta intensidade, durante uma partida simulada de polo aquático.

Destaca-se que a suplementação de β-alanina pode exercer a melhora de desempenho não apenas em indivíduos jovens, como também na população idosa. del Favero et al. (2012) demonstraram que idosos (60 – 80 anos)

suplementados com 3,2 g/d de β-alanina durante 12 semanas apresentavam melhora do tempo até a exaustão (TTE) sob uma intensidade aproximada de 90% do $VO_{2máx.}$

No que tange a suplementação de β-alanina e treinamento de força, Bassinello et al. (2018) demonstraram que a suplementação de β-alanina (6,4g/d) durante 4 semanas foi eficiente em promover ganhos de 17% na força isométrica de membros inferiores, em sujeitos previamente treinados em força, porém, foram observados efeitos na força isocinética e dinâmica.

Bailey et al. (2018) investigaram os efeitos da suplementação de β-alanina (3,2 g/d) no treinamento força em idosos (60 – 82 anos), durante 12 semanas. Não foram observadas diferenças significantes nas variáveis antropométricas, força e resistência. Embora a suplementação de β-alanina não tenha exercido efeitos positivos adicionais, o treinamento de força *per se* melhorou significativamente variáveis de força (1RM) e funcionalidade.

É possível concluir que a β-alanina é um recurso nutricional ergogênico, apresentando melhoria de desempenho em diversas populações (*i.e.,* adolescentes, adultos e idosos), embora o tamanho do efeito observado (0.18) em meta-análise de Saunders et al. (2016) seja considerado pequeno. A suplementação de β-alanina será especialmente ergogênica nos exercícios de esforços intermitentes ou anaeróbios contínuos, onde a duração aproximada será de 0,5 – 10 minutos (SAUNDERS et al. 2016).

3.7 *Washout* da carnosina muscular

Até o presente momento, poucos estudos tiveram como objetivo avaliar o tempo de *washout* da carnosina muscular. Baguet et al. (2009) foram os pioneiros em avaliar o *washout* da carnosina muscular. No total, foram avaliados 15 homens não-treinados em um estudo duplo-cego, controlado por placebo. Durante 5 - 6 semanas os participantes foram suplementados com 4,8 g/d de β-alanina ou placebo (maltodextrina). A carnosina muscular foi quantificada nos músculos sóleo, tibial anterior e gastrocnêmio através do método de (H-RNM), antes e após a suplementação de β-alanina, assim como na 3ª e 9ª semanas ao término da suplementação. Foi observado o aumento significante nas concentrações de carnosina muscular nos músculos sóleo (39%), tibial (27%) e

gastrocnênio (23%), declinando ao término da suplementação em uma taxa de 2 – 4% por semana. Em média dos três grupos musculares avaliados, apenas ~30% ou 0,57 mM do aumento da carnosina havia sido depurada após 3 semanas de *washout*, retornando aos valores basais na 9ª semana. Após a suplementação de β-alanina, os autores subdividiram os sujeitos em "altamente responsivos" (> 30 %) e "pouco responsivos" (< 30 %). Após categorizados, os sujeitos altamente responsivos apresentaram em média 55% de aumento nas concentrações de carnosina muscular, com uma taxa de *washout* de ~3,5%/semana, indicando que seriam necessárias ~15 semanas para a depuração completa da carnosina (baseado em regressão linear). Os indivíduos classificados como "pouco responsivos" a suplementação obtivera uma média de 15% no aumento das concentrações de carnosina muscular e uma taxa de *washout* de ~2,5%/semana, ou seja, cerca de ~ 6,5 semanas para completar o *washout.* Em média, a taxa de eliminação da carnosina muscular foi 0,21 mM/semana e parece ser linear (Figura 3).

Os autores assim concluem que a carnosina é um dipeptídeo estável, tanto em fibras de contração rápida, quanto de contração lenta, embora tais conclusões sejam apenas especulativas, uma vez que não foram realizadas aferições diretas da carnosina em ambos os tipos de fibras. Além disso, o estudo enfatiza ainda a importância de se determinar o tempo de *washout* antes que se realizem estudos do tipo *crossover*, uma vez que o período de *washout* usualmente utilizado nos estudos (1 – 4 semanas) poderia não ser adequado, podendo levar meses ao invés de semanas.

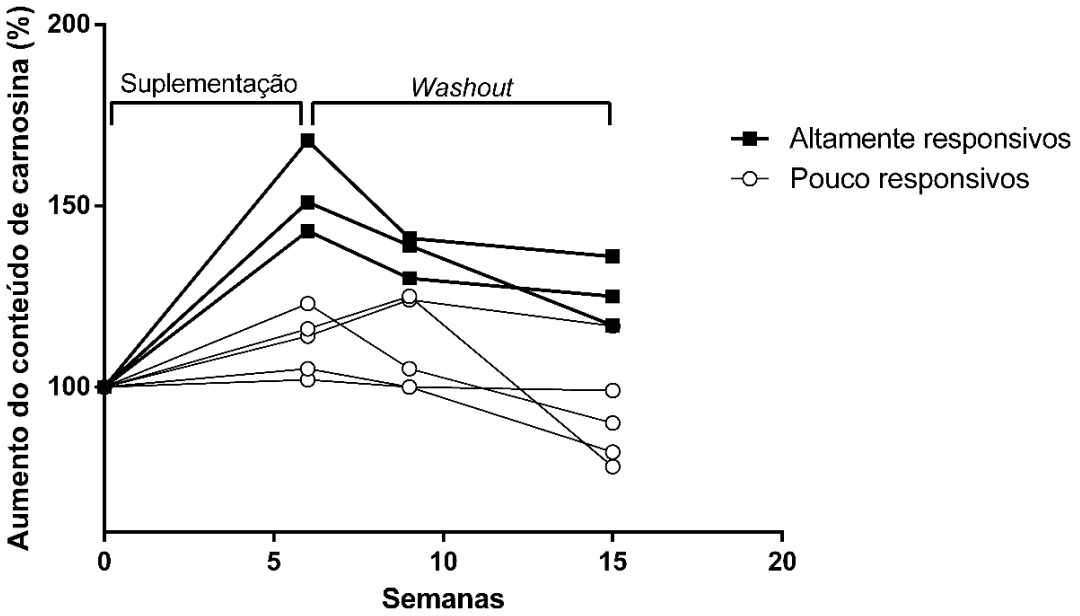

Figura 2: Variação do conteúdo de carnosina durante a fase de suplementação (seis semanas) e pós suplementação (período de washout [9 semanas]). Adaptado de (BAGUET et al. 2009).

Posteriormente Stellingwerff et al. (2011) em um estudo randomizado, duplo-cego, suplementaram 31 jovens do sexo masculino com β-alanina (*slow-release*), divididos em três grupos: 1) *High-low*: 3,2 g/d por 4 semanas, seguido por 1,6 g/d por mais 4 semanas. 2) *low-low*: 1,6 g/d por 8 semanas e 3) placebo. As concentrações de carnosina do musculo tibial anterior e gastrocnêmio foram avaliadas por H-RMN nas semanas 0, 2, 4, 8, 12 e 16. Este foi o primeiro estudo a avaliar o *washout* da carnosina muscular com dois protocolos diferentes de suplementação de β-alanina. A taxa de *washout* observada foi de ~15 – 20 semanas após o aumento de 30 – 45% da carnosina muscular. As taxas modestas apresentadas (~ 2 - 3%/semana) resultaram nos níveis de carnosina ~50% acima dos valores basais após a 4ª semana do período de *washout*. Esta taxa encontrada é ~40% mais lenta do que as observadas no estudo de Baguet et al. (2009). Os autores atribuem tais discrepâncias as diferentes metodologias aplicadas em cada estudo. No estudo de Stillingwerff et al. (2011), os indivíduos que apresentavam elevadas concentrações basais de carnosina foram excluídos, além disso não foram avaliadas as concentrações de carnosina no músculo sóleo (incluído no estudo de Baguet et al. 2009).

Considerando o baixo número da amostra de ambos os estudos (Baguet, n= 8 e Stillingwerff, n= 21) não é possível realizar conclusões assertivas. Aliado a isso, ambos os estudos avaliaram as concentrações de carnosina muscular durante o período de *washout*.

No mesmo ano, Baguet et al. (2011) realizaram um novo estudo comparando diretamente os métodos de H-RMN (não invasivo) e biópsia muscular (invasivo) – HPLC, sendo este o único estudo comparativo realizado até o momento. A concentração de carnosina no musculo gastrocnêmio lateral foi avaliada por ambos os métodos de HPLC e H-RMN. Os autores encontraram uma significante (p= 0.002) correlação positiva (r = 0.517) entre os métodos, embora considerada moderada.

Por fim, o estudo mais recente a avaliar o tempo de *washout* da carnosina muscular, foram os achados do grupo de Danaher et al. (2014), a qual 8 homens saudáveis, fisicamente ativos foram suplementados com 4,8 g/d de β-alanina durante 4 semanas e 6,4 g/d durante 2 semanas, em um estudo *crossover*, cujo objetivo foi avaliar os efeitos aditivos da suplementação de bicarbonato e β-alanina sob o desempenho em exercício de alta intensidade e curta duração. Após 6 semanas de suplementação, foi observado o aumento médio de 5,03± 1,44 mM (+ 62%) de carnosina no musculo gastrocnêmio e 4,92± 1,28 mM (+88%) no musculo sóleo. Por se tratar de um estudo *crossover*, o período de *washout* adotado foi de 12 semanas (baseado no estudo de BAGUET et al. 2009). Após 6 semanas de *washout* as concentrações de carnosina muscular reduziram 19 e 25% nos músculos gastrocnêmio e sóleo respectivamente, em uma taxa de decaimento de 0,3 mM/semana e 0,4 mM/semana. Após 12 semanas as concentrações de carnosina muscular retornaram aos valores basais, com a taxa média de decaimento de 0,5± 0,03 mM/semana do musculo gastrocnêmico e 0,4± 0,02/ semana no musculo sóleo. Assim como os demais estudos mencionados anteriormente, as concentrações de carnosina muscular foram estimadas pela técnica de H-RNM, senda está uma limitação do estudo, assim como o reduzido número de sujeitos avaliados.

Em um resumo publicado no *The FASEB Journal*, Harris et al. (2009) apresentaram os dados de *washout* da carnosina muscular durante 6 semanas, após a suplementação de 6,4 g/d β-alanina (avaliados na 3ª e 6ª semana pós suplementação). O conteúdo de carnosina muscular foi avaliado pela técnica de

biópsia muscular e análise por HPLC, diferentemente dos estudos anteriores. Os aumentos de carnosina muscular observados após o período de suplementação foram de ~ 60% (25,9 ±4,3 mmol/Kg PRÉ e 41,3± 5,5 mmol/Kg PÓS). Após a 3ª semana de *washout* foi observado o decaimento de 19,4% (38,3± 6,7 mmol/Kg) da carnosina muscular e 18,8% (2,9 mmol/Kg) após a 6ª semana, com tempo de meia vida estimado de ~ 9 semanas. A partir destes dados pode-se verificar que a taxa de *washout* encontrada foi de aproximadamente ~1 mmol/Kg/ semana ou 6,3 %/semana, valores estes consideravelmente superiores aos encontrados por Baguet et al. (2009) e Stellingwerff et al. (2012). Tais discrepâncias poderiam ser explicadas pelas diferentes sensibilidades dos métodos em quantificar a carnosina, além da dose utilizada. Esses achados confirmam, mesmo que de forma limitada, que a carnosina é um dipeptídeo bastante estável na musculatura esquelética, de forma que o *washout* completo ocorreria apenas ~ 18 semanas após a interrupção da suplementação de β-alanina.

Segundo Stegen et al. (2013), quatro mecanismos poderiam elucidar os mecanismos de degradação de carnosina: 1) A liberação ativa através de transportadores de membrana, 2) perda passiva da carnosina através de micro rupturas do sarcolema, 3) degradação enzimática em β-alanina e L-histidina através da CN2 ou 4) a combinação destes.

Todas as hipóteses mecanísticas permanecem pouco exploradas até o presente. Conforme discutido anteriormente, os principais transportadores relacionados ao transporte da carnosina (*i.e.,* PHT1; PHT2; PEPT1 e PEPT2), poderiam em tese, contribuir com sua homeostase. Contudo, Everaert et al. (2012) não observaram a expressão gênica dos PEPT's na musculatura de ratos e de humanos, apenas a expressão dos PHT's. Por outro lado, Saunders et al. (2016) detectaram a expressão gênica de PEPT2 e PHT1 na musculatura esquelético de humanos. Tais resultados conflitantes não permitem ainda assumir que a carnosina muscular poderia de alguma forma ser transportada de forma ativa para fora da célula.

Por outro lado, algumas evidências parecem apontar que o exercício físico pode exercer influência direta na degradação da carnosina, através do processo de contração e ruptura do sarcolema. Dunnet et al. (2002) investigaram em cavalos a associação entre exercício físico intenso e dano muscular sobre as concentrações de carnosina plasmática. A saber, cavalos não apresentam

atividade da enzima CN1, o que torna possível realizar a detecção plasmática da carnosina. Após submeterem cavalos puro sangue ao exercício máximo em esteira, foi possível observar o aumento significante da concentração plasmática de carnosina (Pré: 10,3±1 µmol/L – Pós 12,4±4,4 µmol/L). Adicionalmente, os marcadores de dano muscular (CK e AST) apresentaram aumentos expressivos de atividade, juntamente com a elevação da carnosina plasmática. Os autores discutem que possivelmente o aumento plasmático de carnosina, dá-se em consequência das micro-lesões do sarcolema, o que levaria subsequentemente ao extravasamento do conteúdo intracelular ao sangue. No entanto, o mesmo ainda não pode ser verificado em humanos.

Nagai et al. (2003) observaram resultados semelhantes, em um estudo experimental, onde as concentrações plasmáticas de carnosina foram duas vezes superiores em ratos que realizam exercício, do que nos ratos sedentários. Contudo, os mecanismos por traz destes achados permanece interrogado, embora seja intuitivo assumir os mesmos mecanismos propostos por Dunnet et al. (2002).

Em humanos, Nordsborg et al. (2003) avaliaram pela técnica de microdiálise o aumento significante de carnosina no fluído intersticial, após o exercício submáximo de extensão do joelho a 20W. Na realidade, neste estudo a carnosina intracelular foi utilizada apenas como um marcador de ruptura do sarcolema, ocasionado pela técnica invasiva de microdiálise. Até o momento, nenhum outro estudo conseguiu demonstrar a relação entre o exercício e aumento das concentrações plasmáticas de carnosina. Isso se deve ao fato da presença da enzima CN1 no sangue, a qual prontamente hidrolisa a carnosina em seus respectivos aminoácidos (LENNEY et al. 2005).

Ainda que os estudos não demonstrem o aumento da carnosina plasmática em humanos, é possível que a técnica empregada seja o fator limitante. Gardner et al. (1991) conseguiram detectar em humanos, a presença de carnosina plasmática em até 1 hora e 30 minutos após a ingestão oral de 4 g de carnosina intacta. Após coletadas, as amostras foram mantidas em baixa temperatura (4º C), de modo a inativar a atividade enzimática. Quando as amostras foram incubadas a 37º C (*i.e.,* próximo a temperatura corporal), a carnosina foi inteiramente clivada em torno de 10 minutos. Tais resultados sugerem que degradação da carnosina plasmática não é imediata, e que

possivelmente outros estudos não detectaram a carnosina plasmática em decorrência a aplicações metodológicas inadequadas.

Outra hipótese mecanística do *washout* da carnosina muscular, seria sua degradação enzimática. Ainda nos primórdios das pesquisas com carnosina, cientistas russos já haviam concluído que os tecidos aptos a sintetizar carnosina possivelmente não seriam capazes de promover também sua degradação (BOLDYREV, 2012). De fato, alguns tecidos e células, ou apresentam alta capacidade de síntese de carnosina, ou alta capacidade de degradação, através da enzima CN1, e raramente ambas as capacidades (BOLDYREV et al. 2013).

Everaert et al. (2012) observaram a expressão gênica da enzima CN2 na musculatura esquelética de humanos. Dessa maneira, seria intuitivo pensar que enzima CN2 assumiria um importante papel no processo de degradação da carnosina. No entanto, conforme relatado ao longo do texto, a CN2 parece degradar de maneira muito limitada a carnosina muscular, ~ 30 vezes mais lenta que a carnosina presente nos rins (LENNEY et al. 1982). Outro possível fator limitante, é o fato do pH ótimo da enzima CN2 ser de ~ 9,5 (LENNEY et al. 1982), nível este significantemente superior ao pH fisiológico (*i.e.,* 7,3). Sabe-se que um dos principais fatores que alteram a atividade enzimática é o pH do ambiente celular (POWERS & HOWLEY, 2014). Contudo, é importante destacar que as observações realizadas por Lenney et al. (1985) foram em estudos *in vitro*, o que limita a extrapolação em humanos.

Mais adiante, veremos que os poucos estudos que avaliaram o tempo de *washout* da carnosina muscular observaram um longo período para a ocorrência deste fenômeno, o que indica a elevada estabilidade da carnosina muscular.

Fica evidente que pouco se conhece a respeito dos mecanismos envolvidos no processo de *washout* da carnosina muscular. É possível que o exercício físico exerça influências neste processo, possivelmente através da perda passiva proporcionada por micro lesões, embora este, não possa ser atribuído como o principal mecanismo. No entanto, ainda é controverso se a carnosina poderia ser transportada ativamente pelos transportadores de membrana (*i.e.,* PEPT's e PHT's), como parte de algum processo fisiológico regulatório ou se apenas pelo extravasamento em decorrência as rupturas de membrana proporcionada pelo exercício (BOLDYREV et al. 2013).

Por outro lado, Stegen et al. (2013) propõem que, a taxa de degradação da carnosina muscular parece estar positivamente relacionado ao próprio conteúdo em si, ou seja, quanto maior for o conteúdo de carnosina, maior será a eliminação. Esse fenômeno basear-se-ia na interação “enzima-substrato”, considerando que a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzimas depende da concentração inicial de substrato. A medida que a concentração de substrato é aumentada, sua velocidade inicial também aumenta até que a enzima esteja completamente saturada pelo substrato (DEVLIN, 2011). Dessa forma, é plausível que o conteúdo de carnosina muscular possa influenciar a sua taxa de degradação, de forma o *washout* seja mais rápido no início e mais lento ao longo do tempo.

Deve-se considerar as doses de β-alanina empregados nos estudos que avaliaram o *washout* da carnosina. Baguet at al. (2009) e Stellingwerff et al. (2012) utilizaram doses compreendendo entre 3,2 a 4,8 g/dia. Ao observar os protocolos empregados em ambos os estudos, é intuitivo assumir que o tempo de *washout* observado poderia ser diferente se doses maiores tivessem sido utilizadas (*i.e.,* 6,4 g/d). Se a hipótese de que o conteúdo de carnosina muscular pode influenciar sua taxa de degradação, especula-se que o período de *washout* possa ser ainda mais longo que os estudos até o presente demonstram.

As evidências aqui apresentadas, não nos permite concluir precisamente a cinética de *washout* da carnosina muscular, dada as limitações dos estudos citados. É possível observar que os valores médios de *washout* variam de 10 – 18 semanas, com os dados individuais mostrando variações de 6 a 20 semanas. Outra limitação refere-se a característica população estudada, referente apenas a indivíduos homens, jovens, não-treinados, em dieta mista e saudáveis. Ainda permanece em aberto a descrição do comportamento da carnosina muscular em outras populações, como mulheres, idosos, vegetarianos e atletas. Mais importante ainda, é a avaliar a cinética de *washout* da carnosina muscular através do método de biópsia-HPLC, considerado padrão outro para medir o conteúdo muscular de carnosina.

3.8 Efeitos colaterais

Atualmente, o único efeito colateral conhecido ocasionado pela suplementação de β-alanina é a parestesia, que se inicia minutos após a ingestão aguda de quantidade acima de 10 mg/kg de massa corporal (ARTIOLI et al. 2010). Segundo o Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health – NIH*) a parestesia pode ser definida como uma sensação indolor, descrita como um formigamento na pele que, em certa medida, assemelha-se ao adormecimento que sentimos quando sentamos por muito tempo em cima das pernas. A diferença, entretanto, é que a parestesia induzida pela β-alanina é restrita apenas à pele. Outras sensações frequentemente relatas incluem coceira na pele, rubor e a percepção de pequenas "agulhadas" (HARRIS et al. 2006).

Os sintomas de parestesia mais comumente relatados ocorrem na região do rosto, cabeça, pescoço, braços e mãos, podendo também ocorrer em outras regiões, embora de forma menos frequente (TREXLER et al 2015). Apesar de serem desagradáveis, a parestesia não parece provocar nenhum tipo de dano à saúde do indivíduo. Sabendo disso, é plausível considerar a parestesia como um efeito colateral da suplementação de β-alanina, embora não necessariamente seja um efeito indesejado e, menos ainda, um efeito adverso[1].

Uma das hipóteses que explicam o mecanismo causador da parestesia seria o reconhecimento da β-alanina por receptores sensoriais localizados na pele (SHINOHARA et al. 2004). A hipótese mais aceita sugere que a β-alanina ativa receptores encontrados na pele denominados *MrgD* (CROZIER et al. 2007). Mais especificamente, os *MrgD* são altamente expressos em um subconjunto de neurônios localizados nos gânglios da raiz dorsal, responsáveis pela inervação da pele (CROZIER et al 2007). Os *Mrg* pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors – GPCR)*, que, por sua vez, possuem diversas funções fisiológicas, incluindo as percepções sensoriais (DONG et al. 2001). Estudos *in vitro* mostram que a β-alanina pode ativar esses receptores, resultando na sensação de parestesia (CROZIER et al. 2007).

---

[1] Efeito Adverso pode ser definido como qualquer resposta indesejada ou prejudicial ao indivíduo. Denomina-se Efeito Colateral qualquer resposta diferente daquele considerado como principal por uma substância. A principal diferença entre Efeito Colateral e Efeito Adverso é que neste último caso, as consequências são sempre prejudiciais.

Conforme já discutido no tópico “Suplementação de β-alanina”, o estudo de Harris et al. (2006) demonstraram que os sintomas de parestesia ocorrem após a ingestão de β-alanina pura, em doses acima de 10 mg/kg de massa corporal. Assim, a parestesia é dependente da dose de β-alanina agudamente ingerida e está relacionada à cinética de absorção pós ingestão desse aminoácido. Uma estratégia eficaz para evitar o aparecimento desse sintoma é a distribuição da das doses de até 800 mg ao longo do dia, separadas por intervalos de três horas (tempo necessário para que as concentrações sanguíneas de β-alanina retornem aos valores basais).

Outra estratégia para evitar a parestesia e, ao mesmo tempo, permitir o consumo de doses maiores, consiste em tabletes de β-alanina que possuem uma cobertura especialmente desenvolvida para retardar o processo de absorção da β-alanina no intestino. A fórmula de liberação prolongada, foi patenteada sob o nome comercial de Carnosyn SR™ (Natural Alternatives International) e tem se mostrado capaz promover um pico plasmático de β-alanina menor e mais tardio (DÉCOMBAZ et al. 2012). Estes tabletes viabilizam a ingestão de doses maiores de β-alanina, podendo-se chegar a 1,6 g por dose única. Assim, pode-se dobrar a quantidade diária de β-alanina consumida (6,4 g/dia se 1,6 g forem ingeridos quatro vezes ao dia), ou se pode diminuir pela metade o número de vezes em que o suplemento deve ser consumido (duas doses diárias seriam suficientes para consumir 3,2 g/dia).

No que se refere a cinética de absorção da β-alanina em tabletes de liberação lenta *versus* β-alanina pura (Figura 3), podemos notar que a concentração plasmática máxima dos tabletes é detectada em torno de 1 hora, ao passo que para a β-alanina pura ~ 30 minutos, de forma a não haver diferenças na área sob a curva (AUC). Dessa maneira, devido ao seu perfil de cinética, os tabletes de liberação lenta atenuam os sintomas de parestesia, uma vez que a rápida taxa de aparecimento plasmático parece ser o fator de maior relevância no aparecimento deste efeito colateral (DECOMBAZ et al. 2012).

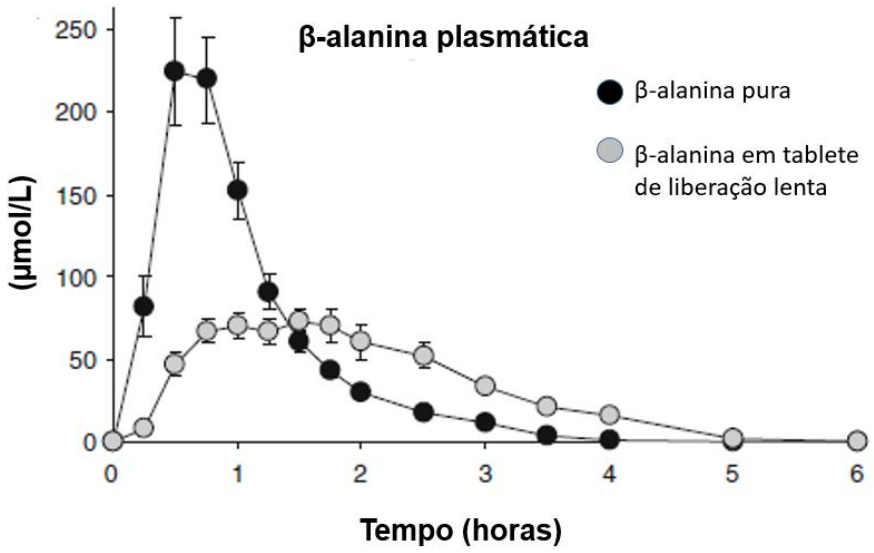

Figura 3: Concentração de β-alanina plasmática por 6 horas após a ingestão de 1,6 g de β-alanina pura e em tabletes de liberação lenta. Reproduzido de Decombáz et al. (2012).

Diversos estudos têm demonstrado com êxito que suplementação de β-alanina em tablete de liberação lenta é eficiente em aumentar as concentrações de carnosina muscular, tanto em adultos, quanto em idosos, assim como na melhora do desempenho esportivo (BEX et al. 2014; CHUNG et al. 2014; DEL FAVERO et al. 2012; HOFFMAN et al. 2014; SAUNDERS et al. 2016; SOUNDERS, 2016; STELLINGWERFF; DECOMBAZ; et al. 2012).

3.9 Segurança do uso prolongado da β-alanina

Em se tratando da segurança da suplementação de β-alanina, desde o primeiro experimento publicado em 2006 (HARRIS et al. 2006), os pesquisadores monitoraram marcadores sanguíneos relacionados à saúde de órgãos vitais como rins e fígado. Para as dosagens experimentadas até o presente, não foram constatadas quaisquer alterações, o que parece atestar a segurança da suplementação de β-alanina para indivíduos saudáveis

Diversos estudos têm então demonstrado consistentemente a segurança da suplementação de β-alanina. Hill et al. (2007) não reportaram quaisquer efeitos colaterais em indivíduos fisicamente ativos suplementados com 6,4 g/d

de β-alanina durante 10 semanas. Stellingwerff et al. (2012), também avaliaram marcadores bioquímicos, hematológicos, além de avaliarem possíveis alterações de humor e estado de ansiedade após a suplementação de 3,2 g/dia durante 4 semanas e posteriormente 1,6 g/dia por mais 4 semanas. A suplementação se mostrou segura, não havendo alterações em nenhum dos exames realizados. Em concordância, del Favero et al. (2012) suplementaram idosos entre 60-80 anos com 3,2 g/dia de β-alanina. Não foram observados efeitos colaterais ou alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, mesmo em uma população mais susceptível a alterações metabólicas. McCormak et al. (2013), demonstraram resultados semelhantes, também em idosos, onde o consumo de suplementos enriquecidos com β-alanina (800 – 1200 mg) duas vezes por dia, durante 12 semanas, não alteravam quaisquer marcadores de saúde.

Kendall et al. (2014) avaliaram durante 28 dias os possíveis efeitos colaterais de um suplemento pré-treino contendo 4 g de β-alanina, em homens jovens, fisicamente ativos. Nenhuma alteração significativa foi observada nos parâmetros de saúde renal, hepática, hematológica, cardíaca e pressóricas.

Mais recentemente, em um estudo bastante semelhante, outro grupo de pesquisadores americanos, (VOGEL et al. 2015) avaliaram os mesmos parâmetros, porém, em mulheres jovens, fisicamente ativas. Nenhuma alteração hematológica, bioquímica, clínica e metabólica foi observada. É importante destacar que neste estudo, não foi possível saber em quais doses a β-alanina foi ingerida, pois tratava-se de uma “fórmula proprietária” contida no suplemento comercial avaliado.

Saunders et al. (2016) demonstraram recentemente que a suplementação crônica de β-alanina durante 24 semanas, em altas doses (6,4 g/d) se mostrou segura em indivíduos jovens, saudáveis, fisicamente ativos. Não foram relatados efeitos colaterais e nenhuma alteração nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Outro possível efeito colateral observado pela suplementação de β-alanina é seu potencial em reduzir as concentrações de taurina, devido a ambos compartilharem do mesmo transportador no caminho entre o plasma sanguíneo e a célula muscular (TauT) (TOBIAS et al. 2013). Dessa forma, ao elevar as concentrações de β-alanina, teoricamente a absorção da taurina ficaria

comprometida. Um dos efeitos atribuídos a taurina é sua capacidade antioxidante (JONG; AZUMA; SCHAFFER, 2012), e acredita-se que sua redução poderia aumentar o estresse oxidativo. No entanto, até o momento não existem dados na literatura que sustentam tal hipótese. De fato, estudos em modelo animal tem demonstrado que a suplementação de β-alanina resulta na redução significativa das concentrações intracelulares de taurina em diversos tecidos como fígado, coração e cérebro (PARILDAR-KARPUZOGLU et al. 2007). No entanto, vale ressaltar que as doses de β-alanina utilizadas nesses estudos com modelo animal eram 100 vezes superiores às administradas nos estudos com humanos, que foram baseados na quantidade de β-alanina ingerida através de uma dieta normal.

Harris et al. (2006) não observaram alteração nas concentrações musculares de taurina e perdas urinárias. Posteriormente Hill et al. (2007) suplementaram indivíduos fisicamente ativos com doses entre 4,0 – 6,4 g/dia de β-alanina, durante 10 semanas. Corroborando os achados de Harris et al. (2006), não foi observada a redução de taurina muscular. Portanto a suplementação de β-alanina parece não influenciar as concentrações musculares de taurina, o que atesta a segurança do seu uso como suplemento nutricional, desde que se obedeçam às dosagens já conhecida dos estudos apresentados.

No entanto, mais recentemente, Blancquaert et al. (2017) observaram a depleção de L-histidina plasmática e muscular (- 30,6 % e - 31,6 %) após 23 dias de suplementação de β-alanina (6 g/dia). Os autores observaram que a depleção foi atenuada quando a β-alanina foi associada a suplementação de L-histidina (4,7 g/d). A hipótese por trás deste fenômeno, parece ser explicada pelo fato da suplementação crônica de β-alanina gradualmente levar a depleção de L-histidina, devido à maior demanda para síntese de carnosina. Contudo, os efeitos negativos desse fenômeno ainda são meramente especulativos. Os autores discutem também um possível efeito negativo no estímulo da síntese proteica, a qual é fundamentalmente regulada pela disponibilidade de aminoácidos, embora a leucina pareça ser o aminoácido mais importante neste processo (STIPANUK, 2007) e não a L-histidina. Este foi o primeiro estudo a avaliar os efeitos da depleção de L-histidina associada a suplementação de β-alanina, portanto, mais estudos ainda são necessários para o melhor entendimento deste fenômeno.

4. MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Para a realização deste estudo, foram incluídos homens jovens, com idade entre 18 e 35 anos, saudáveis, fisicamente ativos, não vegetarianos, sem histórico de doenças crônicas ou que acometessem o aparelho locomotor. Uma vez que a natureza do presente estudo foi primariamente descritiva, a estimativa do número amostral não foi baseada em modelos inferenciais. Ao contrário, foi estimando o número máximo de indivíduos possíveis de completarem o estudo, dado o cronograma a duração da participação de cada indivíduo.

Foram excluídos os voluntários que fizeram ou tiveram feito uso de suplementos contendo β-alanina ou creatina nos últimos 6 ou 3 meses antes do início do estudo, respectivamente. Adicionalmente, foram excluídos voluntários tabagistas, com histórico de uso de esteroides e outras drogas consideradas ilícitas, bem como o uso crônico de qualquer medicamento. Previamente ao início do estudo, os participantes foram informados sobre o objetivo estudo e os procedimentos que seriam realizados, bem como seus possíveis riscos.

4.2 Local e duração do estudo

As coletas de amostras, mensurações e testes de desempenho ocorreram no Laboratório de Fisiologia e Nutrição aplicada ao Exercício Físico - Escola de Educação Física e Esporte – EEFE USP. O tempo aproximado do estudo foi de aproximadamente 5 semestres.

4.3 Desenho experimental e protocolo de suplementação

O estudo adotou o desenho randomizado, duplo-cego, controlado por placebo. Os participantes foram aleatoriamente randomizados para os grupos β-alanina ou placebo na proporção 2:1 (isto é, a cada três voluntários, dois eram designados ao grupo β-alanina). Dessa maneira foi possível minimizar o número de voluntários biopsiados no grupo placebo. A randomização foi realizada em blocos de três indivíduos, e os participantes pareados pela potência máxima

produzida no teste em cicloergômetro. Para o grupo β-alanina, foram administradas doses de 6,4g/d, fornecidas em tabletes de liberação lenta (NAI, EUA) durante 8 semanas (2 x 800 mg, 4x/d em intervalos de 3 – 4 horas). O grupo placebo (n=10) recebeu a mesma quantidade de dextrose em tabletes de aparência idêntica pelas mesmas 8 semanas (2 x 800 mg, 4x/d em intervalos de 3 – 4 horas).

Amostras do músculo vasto lateral foram colhidas por meio de biópsia muscular por agulha de sucção, que foram realizadas antes e após as 8 semanas de suplementação, bem como na 1ª, 2ª, 4ª, 8ª, 12ª e 16ª semanas após o término do período de suplementação. Adicionalmente, um teste de tolerância ao esforço de alta intensidade (CCT 110%) foi aplicado antes, durante e após o período de suplementação, assim como na 4ª, 8ª, 12ª e 16ª semanas após o término da suplementação (Figura 5).

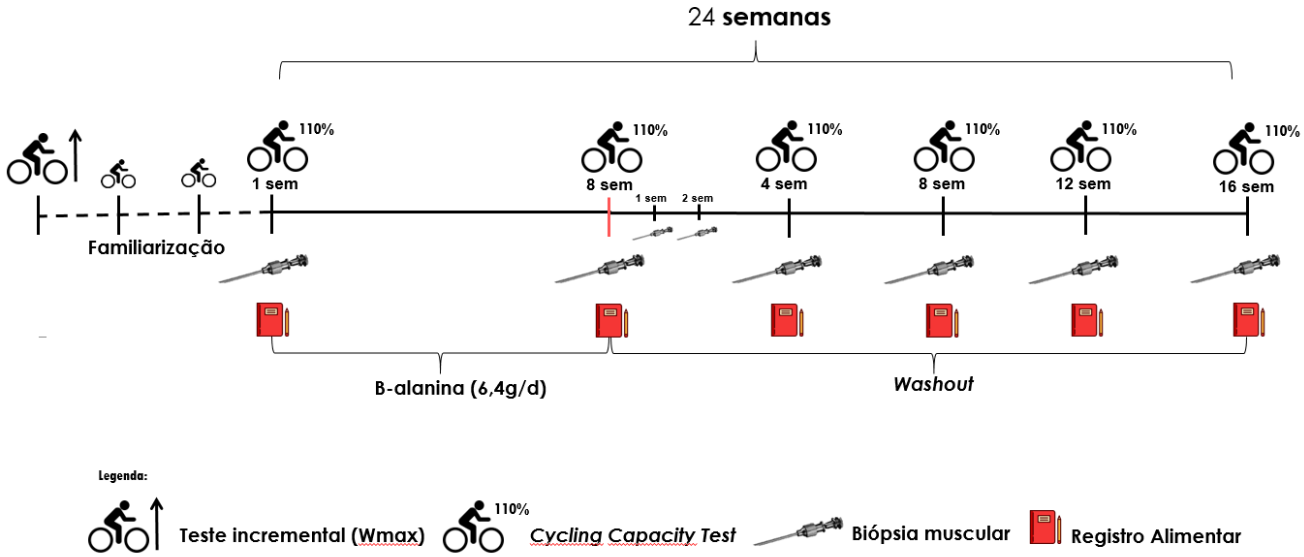

Figura 4: Desenho experimental do estudo

4.4 Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado nas semanas que antecederam cada uma das biópsias musculares, por meio de registros alimentares de 3 dias não consecutivos (um dia de final de semana e dois dias de semana, sendo um na véspera de cada biópsia muscular). Os registros foram conferidos por um

nutricionista no momento da devolução e, caso alguma inconsistência fosse observada, o indivíduo era indagado para que a dúvida fosse esclarecida. Os participantes receberam a devida orientação para o preenchimento da planilha a fim de que erros fossem minimizados.

Os dados foram tabulados e calculados através de um software específico de nutrição (Avanutri® *Online*). Foram calculadas a ingestão calórica total, carboidratos, proteínas e lipídeos totais. O cálculo da ingestão alimentar de β-alanina foi baseada em tabelas disponíveis na literatura (ABE et al. 2000; JONES, SMITH, HARRIS, 2011; JONES, 2013).

4.5 Teste de Potência Máxima

Os voluntários iniciaram o teste de potência máxima pedalando a uma carga de 100 watts, que foi aumentada em 6 watts a cada 15 segundos, baseado no protocolo proposto por Saunders et al., (2012). A cadência era mantida constante (em torno de 100 rpm) ao longo do teste até que o voluntário entrasse em fadiga. Os voluntários foram orientados a interromper o exercício no momento em que a cadência não pudesse ser mantida acima de 60 rpm. A potência máxima (W_{max}) foi determinada pela média dos dois últimos estágios completados do teste. A posição do ergômetro e a altura do selim foram gravadas durante os testes preliminares e mantidas ao longo de todas as sessões experimentais.

4.6 Avaliação da tolerância ao esforço de alta intensidade

A tolerância ao esforço de alta intensidade foi avaliada por meio do $CCT^{110\%}$ (SALE et al. 2011; SAUNDERS et al. 2013). Os indivíduos pedalaram em um cicloergômetro (Lode Excalibur, Lode B.V. Germany) até a exaustão voluntária contra uma carga fixa de 110% da potência máxima (W_{max}), a qual foi previamente determinada pelo teste incremental até a exaustão. Anteriormente as sessões de $CCT^{110\%}$ os voluntários foram submetidos a um aquecimento de 5 minutos a 100 watts seguido de um intervalo de três minutos até o início do teste. O teste era iniciado a 80 % da potência máxima (W_{max}) durante os primeiros 15 segundos, 95 % (W_{max}) durante 15 segundos e 110 % (W_{max}) até a exaustão.

Encorajamentos verbais foram realizados durante todos os testes, que tinha a duração média de 120 a 240 segundos. O mesmo teste tem sido utilizado com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa, bem como por outros grupos (HILL et al. 2007; SALE et al. 2011) para detectar os efeitos ergogênicos da suplementação de β-alanina. Trata-se, portanto, de um modelo de avaliação sensível às mudanças no conteúdo intramuscular de carnosina, em que a produção e acúmulo de íons H^+ é limitante para o desempenho (SAUNDERS et al. 2013).

4.7 Biópsia muscular por agulha de sucção

Os voluntários eram previamente agendados a comparecer a Escola de Educação Física e Esporte – EEFE USP, de acordo com a agenda médica. Foram extraídas pequena amostras (~100 - 150 mg) do músculo vasto lateral, suficiente para todas as análises propostas. O local aproximado da extração foi realizado entre o ponto médio da patela e do trocânter maior. Para o procedimento, foram empregadas agulhas especialmente desenvolvidas para extrair pequenas amostras de músculo, de acordo com o método proposto por Bergström (1962).

Para a realização do procedimento, o voluntário manteve-se deitado em uma maca, com os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. O médico responsável realizava a assepsia do local e, em seguida, administrava 3 mL de xilocaína a 1% para anestesiar o local. A aplicação do anestésico foi feita de forma subcutânea com agulhas hipodérmicas descartáveis. Após assepsia e anestesia, foi feita a incisão de aproximadamente 0,5 cm para a entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. Para tanto, o médico responsável utilizava uma lâmina de bisturi nº 11, esterilizada, individual e descartável. A incisão cortava a pele e a fáscia muscular. A agulha de biópsia era 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 era puxado para o interior da agulha e cortado pela sua lâmina interna.

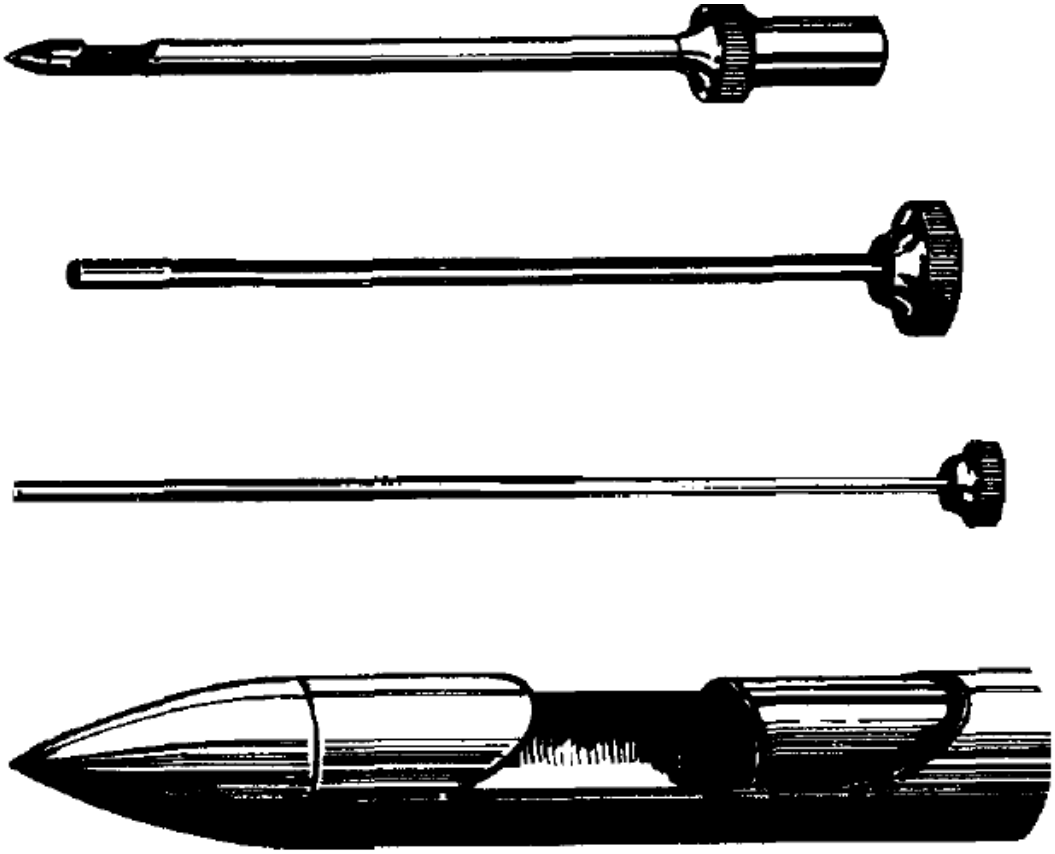

Figura 5: Ilustração da agulha de Bergström, utilizada nos procedimentos de biopsia muscular – Bergström (1975).

Os voluntários foram sempre informados dos procedimentos que tomaram sequência e, após a retirada da agulha, era aplicada uma pressão sobre o ponto de incisão para prevenir sangramento. A incisão era então fechada com bandagem esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. Uma faixa era envolvida na coxa, sobre a região biopsiada, aplicando pressão contínua, a fim de evitar edema local. Os voluntários foram instruídos a manter a bandagem por 24 horas e a manter a incisão limpa e seca pelo período de 72 horas. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C até a liofilização.

4.8 Determinação do conteúdo de carnosina intramuscular

4.8.1 Extração da carnosina

Cerca de 3 mg de cada amostra liofilizada foram desproteinizadas com uma solução de ácido perclórico e posteriormente neutralizados com tampão fosfato, conforme descrito por Dunnett & Harris (1997). Os extratos obtidos foram então filtrados e injetados em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para quantificação de carnosina, seguindo o protocolo descrito por Mora et al. (2007).

A cada amostra de musculo liofilizado foi adicionado uma alíquota de solução de 0,5 molar de HClO4 e 1 mM de EDTA (Solução - G22). Posteriormente as amostras foram vortexeadas por 15 minutos. Para separar o sobrenadante, o homogenato foi centrifugado a 5.000 rpm a 4º C por 3 minutos (Eppendorf® – 5427 R). O sobrenadante de cada amostra foi pesado em balança analítica (Shimadzu® - *Tokyo Japan*) para obter o peso do extrato. O peso do extrato foi dividido pela densidade da solução para obter o volume do extrato. Em seguida foi adicionado ao extrato a solução de KHCO3 a 2,1 molar (G23). As amostras foram então centrifugadas novamente a 5.000 rpm a 4º C por 3 minutos para separar o precipitado do extrato. Para verificar se o pH das amostras, foi utilizado o pHmetro (Tecnopon® – MPA 210) Após a verificação do pH dos extratos, as amostras foram filtradas com filtros de seringa (Hexis® – PVDF, 13mm, 02μm) e seringas hipodérmicas de 5 ml (BD®).

Após a extração, os extratos foram submetidos a análise por HPLC (Shimadzu® - *Tokyo, Japan*) com uma coluna de sílica de interação hidrofílica - HILIC (4,6 x 150 mm, 3μm; Waters, Milford, MA). O método utilizado consistiu na utilização de duas fases moveis, a saber - Fase móvel A, 0,65 mM de acetato de amônia em água e acetonitrila em uma proporção de 25:75, e Fase móvel B, 4,55 mM de acetato de amônia em água/acetonitrila (70:30). O pH de ambas as soluções fora ajustado para 5,5 utilizando ácido hidroclorídrico (HCl) e posteriormente filtradas a vácuo em um filtro de membrana (0,2μm).

As amostras foram analisadas em duplicatas através do método de injeção automática. Cerca de 100μl foram inseridos em *vials* certificados na cor âmbar (Sigma-Aldrich®) e 05 μl injetados para análise no equipamento para cada análise. Para evitar possíveis erros na injeção, todas as amostras foram visualmente inspecionadas e vortexeadas, para garantir que não houvesse a presença de bolhas de ar nas amostras. Além disso, foram utilizados padrões

carnosina (Sigma-Aldrich®) com concentrações conhecidas (50, 100, 500, 1000 e 2500 µM), para realização de uma curva padrão, a qual apresentou excelente linearidade (r^2 = 0.9905).

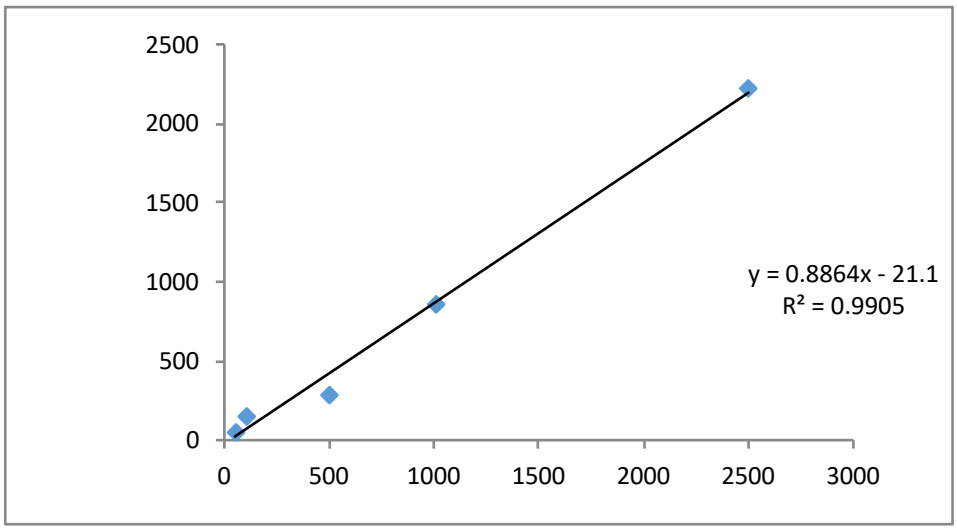

Gráfico 1: Equação da curva padrão de carnosina.

As separações das fases foram compostas por um gradiente linear de 0% a 100% da Fase móvel B, com tempo programado de 13 minutos, em um fluxo de 1,4 ml/min. Foi utilizado o detector UV com o comprimento de onda a 214 nm para monitorar a separação das fases.

A quantificação do conteúdo de carnosina muscular foi baseado na área sob a curva (AUC) dos picos apresentados no cromatograma de cada amostra, a qual foi calculada manualmente através do software acoplado ao equipamento. Os valores da AUC foram posteriormente inclusos na equação de regressão (obtida através das curvas padrão), e dessa forma, o conteúdo de carnosina muscular pode ser obtido por interpolação.

4.09 Eficácia do vendamento e efeitos colaterais

Ao término do estudo, os voluntários foram indagados sobre qual suplemento acreditavam terem tomado (β-alanina ou placebo), a fim de verificar a eficácia do vendamento. Os voluntários também foram indagados sobre possíveis efeitos colaterais sentidos durante o período de suplementação de β-alanina.

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados por modelos mistos de medidas repetidas, com ajuste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas e análises de contraste de grau de liberdade único para comparações específicas. Os grupos e os períodos foram considerados fatores fixos e, os sujeitos, fatores aleatórios. A análise por Modelos Mistos, por além do efeito principal de tempo e da interação grupo*tempo, utilizou análise de contraste guiada por hipótese para comparações específicas entre grupos nos diferentes tempos.

A proporção de participantes que acertaram/erraram o suplemento ingerido foi testada contra a possibilidade de erro aleatório (isto é, 50% de acerto e 50% de erro) por meio do teste exato de Fischer. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O nível de significância adotado para rejeitar a hipótese nula foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa *SAS*®.

5 RESULTADOS

5.1 Amostra

No total, 27 indivíduos foram randomizados e 12 foram considerados desistentes (*dropouts*). Dessa forma, calculou-se a taxa de abandono baseado apenas no número de voluntários que chegaram a ser randomizados e desistiram, ou seja, uma taxa de 44,4%.

Conforme descrito na sessão de “métodos”, optou-se por randomizar os sujeitos na proporção de 2:1 respectivamente (isto é, 2 indivíduos foram designados para o grupo beta-alanina e 1 para o placebo). Assim, 11 sujeitos foram alocados no grupo beta-alanina e 4 no grupo placebo.

No total, 15 sujeitos aderiram ao estudo (Figura 6). Todos os foram orientados a manter seus níveis habituais de atividade física e consumo alimentar ao longo do estudo. Os sujeitos eram em parte, alunos da própria universidade, indivíduos externos a universidade com interesses em conhecer as pesquisas realizadas no laboratório ou indivíduos interessados em realizar os testes de desempenho. Dentre as atividades físicas relatas pelos sujeitos, estava, o treinamento de força, ciclismo, atletismo, *le parkour*. No que se refere a frequência de atividade física, 40% dos sujeitos realizavam atividade física 5x ou mais por semana, 26,7% entre 3 – 4x por semana, 26,7% entre 2 – 3x por semana e 6,7% entre 1 – 2x por semana. O volume de atividade realizado durante a semana foi de 40% com duração entre 1 – 2 horas, 46,7% com duração entre 40 minutos – 1 hora e 13,3% entre 10 – 30 minutos.

Tabela 4: Caracterização da amostra

	β-alanina	**Placebo**
	n = 11	*n = 4*
Idade (anos)	28,45± 4,48	27,25± 6,13
Peso (Kg)	77,21± 15,70	73,10± 23,54
Altura (m)	1,75± 0,09	1,72± 0,08
IMC (Kg/m^2)	24,99± 3,34	24,45± 5,95

Dados expressos em média e ± desvio padrão.

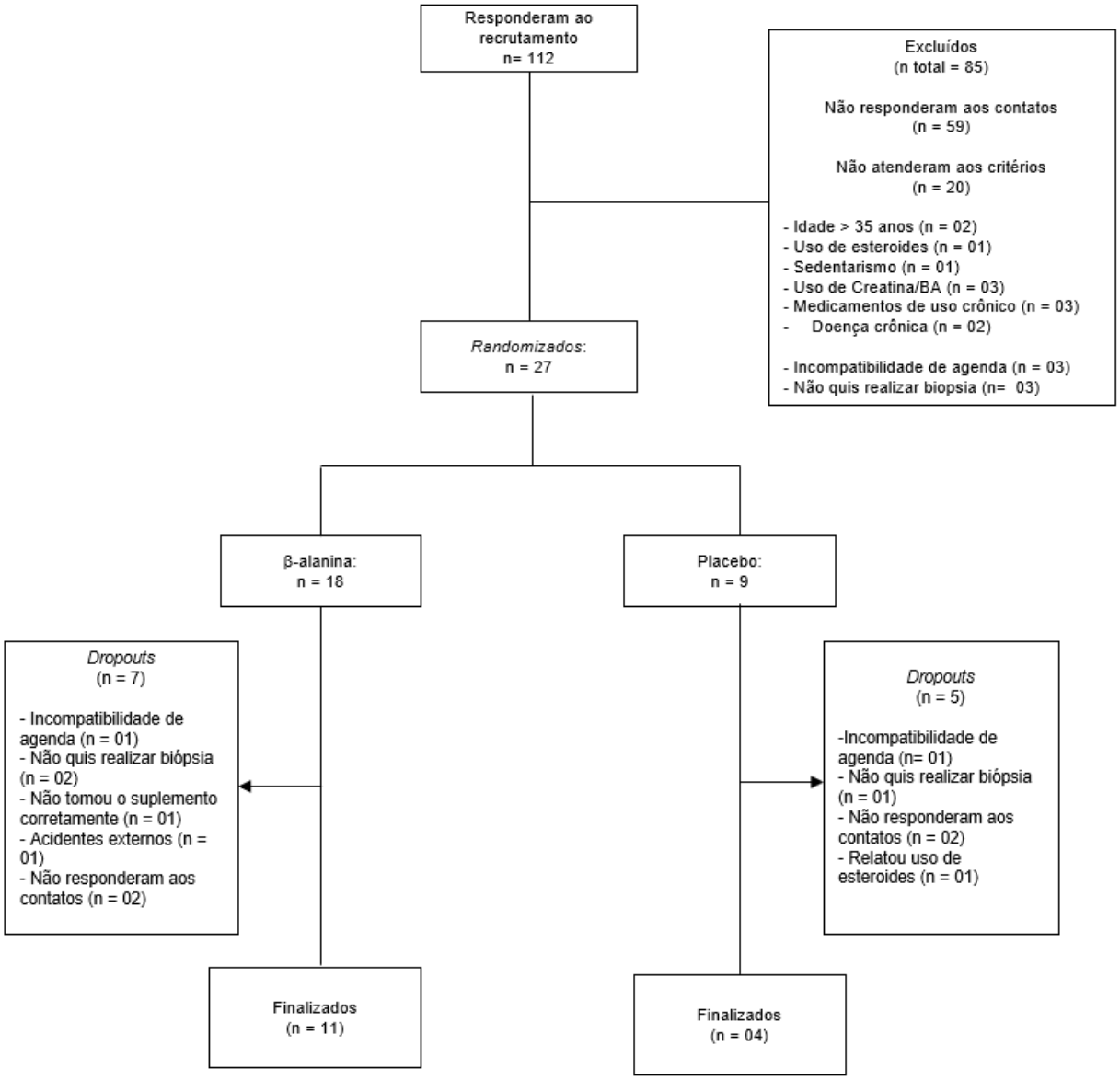

Figura 6: Fluxograma de entrada, randomização e saída de participantes no estudo.

5.2 Dados de desempenho

Conforme descrito no relatório anterior, na sessão de métodos, o teste aplicado para verificar o desempenho dos sujeitos foi o teste no cicloergômetro - $CCT^{110\%}$. Para minimizar a variabilidade do teste, duas sessões de familiarizações foram realizadas antes do início dos testes principais. O coeficiente de variação adotado foi de 5% (SAUDERS, et al. 2012). Todos os testes foram realizados com o intervalo de uma semana entre as sessões e sempre que possível nas mesmas condições de horário e temperatura. Um

voluntário se lesionou após o teste máximo (W_{max}) e, portanto, no total 14 voluntários realizaram os testes de desempenho, dos 15 randomizados.

A potência máxima obtida pelos voluntários (W_{max}) foi em média 260,93± 49,43 (W). O Tempo até a Exaustão (TTE) na primeira familiarização do grupo β-alanina (BA) foi de 145,5±14,35 segundos e na segunda familiarização, 145,62±16,91 segundos. O teste *t* independente não detectou diferença significante no TTE obtido nas familiarizações do grupo BA (*p= 0,9812*), conforme demonstrado na Figura 7. O coeficiente de variação (%CV) intra-sujeitos foi de 4,06± 5,91% para o TTE, dentro da variação aceitada de 5% e de acordo com os achados observados por outros grupos que aplicaram o mesmo teste (SAUNDERS et al., 2016; SALE et al., HILL et al., 2007). Para o grupo placebo (PL), o TTE obtido na primeira familiarização foi de 132,7± 5,86 e na segunda familiarização 137,57±7,15 segundos. O teste *t* independente não detectou diferença significante no TTE obtido nas familiarizações do grupo BA (*p= 0,3350*).

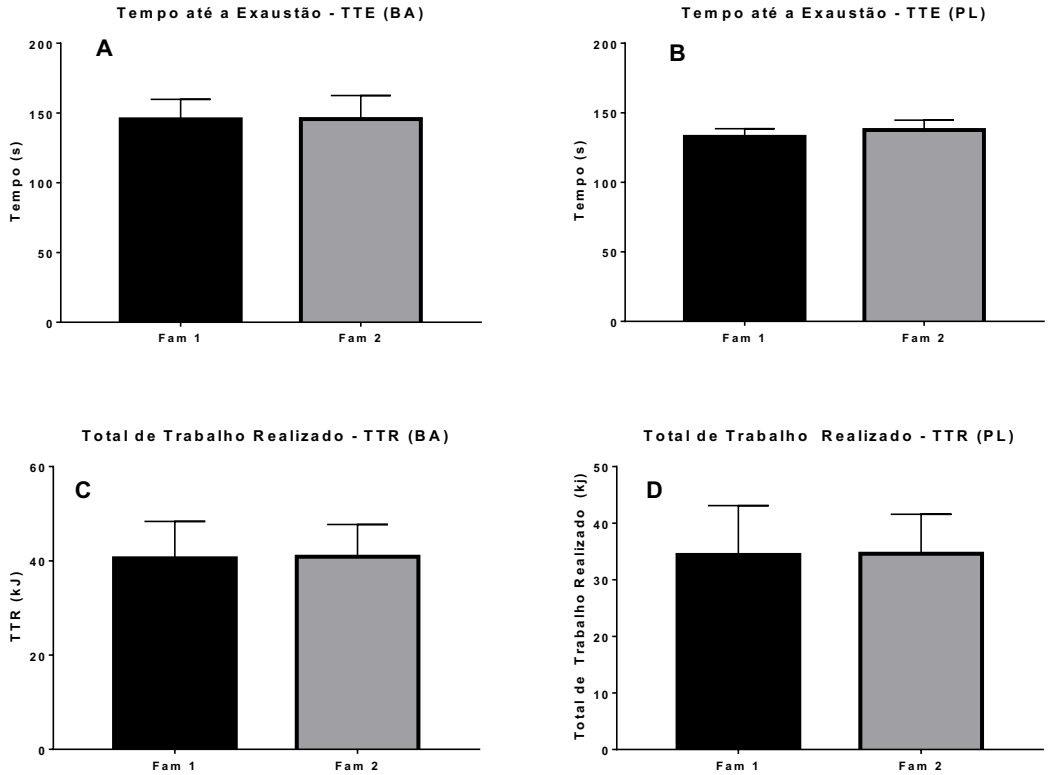

Figura 7: Painel A: Tempo até Exaustão grupo β-alanina. Painel B: Tempo até Exaustão grupo Placebo. Painel C: Total de trabalho realizado grupo β-alanina.

Painel D: Total de trabalho realizado grupo Placebo. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão.

O Total de Trabalho Realizado (TTR) obtido em média pelo grupo β-alanina foi de 40,54±7,82 kJ na primeira familiarização e 40,88±6,84 kJ na segunda familiarização. O teste *t* independente não detectou diferenças significantes entre as familiarizações (*p= 0,9196*). O %CV observado foi de 4,84± 1,91%. Para o grupo PL, o TTR obtido em média foi de 34,39±8,72 kJ na primeira familiarização e 34,61±6,98 kJ na segunda familiarização. O %CV observado foi de 5,36± 1,85%. O teste *t* independente não detectou diferenças significantes entre as familiarizações (*p= 0,9702*).

O Modelo Misto não verificou diferenças significantes no TTE entre Grupos BA e PL (*F= 0.46; p= 0,5119)*, Tempo (*F=1.89; p= 0,1103*) e interação Grupo x Tempo (*F= 0.74; p= 0,5989*).

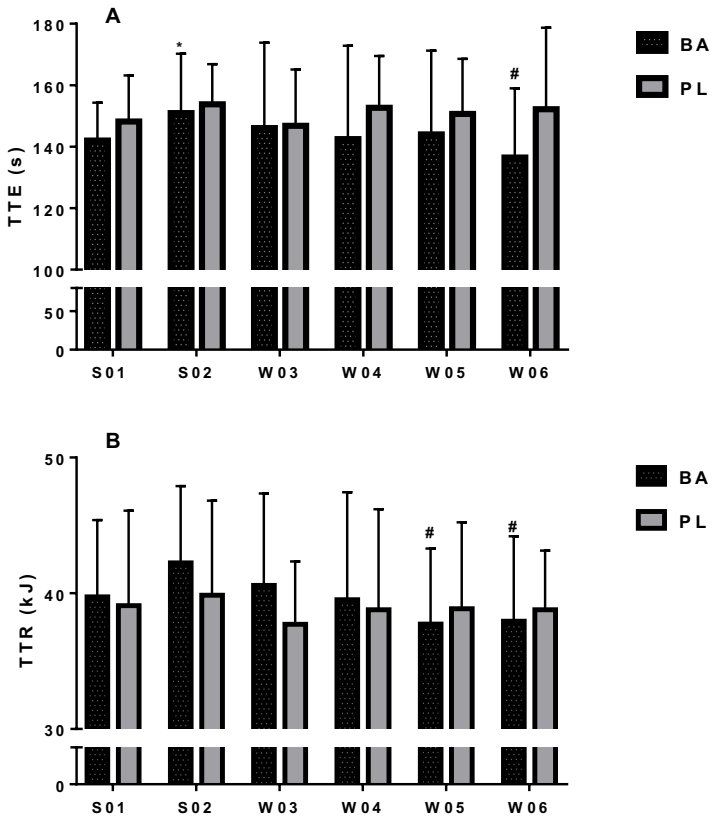

Figura 8: Painel A: Tempo até a Exaustão (TTE). Painel B: Total de Trabalho Realizado (TTR). Legenda: * diferença significante (p <0,05) em relação ao S01 (pré); # - em relação ao S02 (pós).

No teste S01 (Pré) o grupo BA apresentou o TTE médio de 142,01± 12,30 segundos e o grupo PL 148,22± 14,93 segundos (*p= 0,6146*). Após o período de suplementação (S02), o TTE não apresentou diferença significante entre o grupo BA - 150,95± 19,31 segundos, e o grupo PL - 153,78± 13,08 (*p= 0,8184*). No entanto, a análise *pos hoc* verificou diferenças significantes no TTE entre os testes S01 (Pré) e S02 (Pós) do grupo BA (*p= 0,0090*), e o teste W06 (16 semanas pós) e S02 (Pós) (*p= 0,0192*).

Tabela 5: Dados individuais – TTE e TTR – $CCT^{110\%}$

Sujeito	S01		S02		W03		W04		W05		W06	
Grupo β-alanina												
	TTE (s)	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**
2	152,61	49,94	133,82	43,73	116,87	37,73	108,04	34,45	122,41	39,75	119,08	38,62
3	138,83	34,31	149,81	36,99	146,80	36,40	146,61	36,38	147,10	36,37	160,80	39,93
6	155,41	39,98	158,21	40,7	167,02	43,20	161,47	41,37	147,22	37,74	144,64	36,92
12	146,23	32,41	135,21	29,87	132,92	29,34	130,41	28,64	126,23	27,66	117,92	25,79
15	154,42	39,06	185,05	47,21	195,45	49,93	202,21	51,73	202,43	43,4	170,63	43,40
20	139,44	44,63	143,8	46,12	127,44	40,64	131,87	42,05	127,76	40,74	134,21	42,79
22	123,80	33,25	143,02	38,72	118,64	31,80	109,81	29,30	113,41	30,29	108,43	28,95
25	119,61	45,44	122,84	46,86	120,46	45,83	124,43	47,44	*	*	114,64	43,54
26	140,85	39,09	163,84	45,80	154,36	42,87	*	*	142,64	39,58	130,07	35,87
28	148,86	39,25	173,92	46,35	180,73	48,06	167,07	44,29	166,89	44,03	164,28	43,55
MÉDIA	**142,01**	**39,74**	**150,95**	**42,24**	**146,07**	**40,58**	**142,44**	**39,52**	**144,01**	**37,73**	**136,47**	**37,94**
DP	**12,30**	**5,65**	**19,31**	**5,66**	**27,75**	**6,77**	**30,39**	**7,93**	**27,25**	**5,56**	**22,50**	**6,27**
Grupo Placebo												
	TTE (s)	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**	**TTE (s)**	**TTR (kJ)**
9	161,81	33,05	166,24	34,02	170,01	34,77	174,61	35,82	172,01	35,29	179,61	36,79
14	148,21	34,04	149,22	34,13	145,70	33,55	144,09	30,33	140,49	32,08	147,05	33,74
23	155,42	41,22	162,21	43,11	146,20	38,66	156,1	41,47	158,14	41,86	164,23	43,59
24	127,44	48,04	137,46	48,14	125,30	43,84	135,82	47,55	131,95	46,20	117,76	40,98
MÉDIA	**148,22**	**39,09**	**153,78**	**39,85**	**146,78**	**37,71**	**152,66**	**38,79**	**150,65**	**38,86**	**152,16**	**38,78**
DP	**14,93**	**6,99**	**13,08**	**6,98**	**18,30**	**4,63**	**16,84**	**7,40**	**17,94**	**6,37**	**26,51**	**4,37**

Legenda: * representa dados faltantes (i.e aqueles sujeitos que não compareceram no dia do teste).

O Modelo Misto não verificou diferenças significantes no TTR entre os grupos BA e PL (*F= 0.01; p= 0,9251*), Tempo (*F= 2.17; p= 0,1262*) e interação Grupo x Tempo (*F= 1.33; p= 0,3146*).

Não houve diferença significante entre o teste S01 (Pré) e S02 (Pós) do grupo BA (*p= 0,0701*) e no grupo PL (*p= 0,7071*). Na análise *Pos Hoc* foi

verificada diferenças significantes entre os testes W05 (12 semanas pós) e o teste S02 (Pós) (*p= 0,0347*) e o teste W06 (16 semanas pós) e o teste S02 (Pós) (*p= 0,0058*).

5.3 Conteúdo de Carnosina Muscular

No total foram analisadas 91 amostras do total de 120 propostas, este déficit foi devido a indisponibilidade da coleta destas amostras em determinados tempos do desenho experimental. No grupo BA, 02 (duas) amostras foram coletadas no tempo W01 (1 semana pós), e no grupo PL não houveram amostras coletadas neste tempo. Dessa forma, para a análise do Modelo Misto, foram considerados os tempos Pré (S01), Pós (S02), W02 (2 semanas pós), W03 (4 semanas pós), W04 (8 semanas pós), W05 (12 semanas pós) e W06 (16 semanas pós).

A análise do Modelo Misto para os valores absolutos de carnosina, verificou um efeito principal de grupo (*F= 7.23; p= 0,0153),* Tempo (*F= 9.41; p< 0,0001)* e interação Grupo x Tempo (*F= 9.49; p <0,0001).* Não houveram diferenças significantes entre os grupos BA (22,02± 8,64 mmol/Kg) e PL (18,89± 2,37 mmol/Kg; *p> 0,05*) no tempo Pré (S01). Após 8 semanas de suplementação, foi observada uma diferença significante entre o grupo BA (40,76± 12,29 mmol/Kg) e o grupo PL (18,74± 1,22 mmol/Kg; *p= 0,0040*).

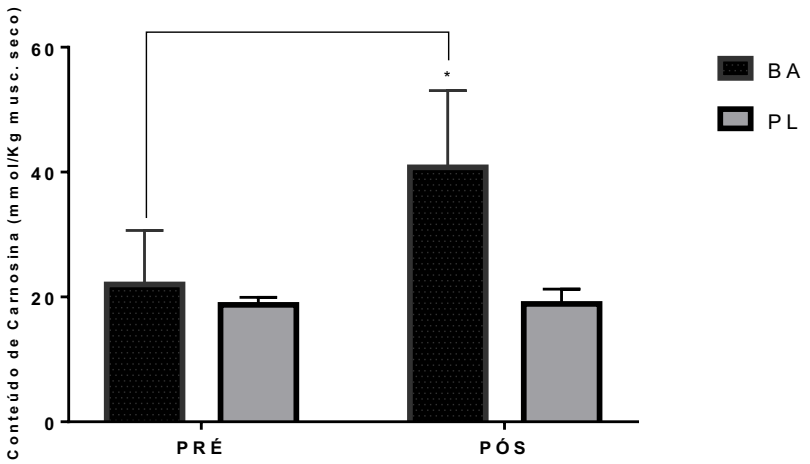

Figura 9: Conteúdo de carnosina muscular (mmol/Kg musculo seco), PRÉ e PÓS suplementação. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão. O símbolo * expressa diferença significante (p< 0,05).

Após a interrupção da suplementação de BA, o conteúdo de carnosina muscular permaneceu sem diferença significante após 2 semanas (W02) (*p= 0,9992*), com valor médio de 33,39± 11 mmol/Kg e no grupo PL 18,92 mmol/Kg (*p= 1,000*). Após 4 semanas de *washout* (W03), o conteúdo médio verificado foi 34,45± 13,95 mmol/Kg no grupo BA (*p= 0,877*), e 18,58± 1,51 mmol/Kg no grupo PL (*p = 1,000*), sem diferença significante.

A partir de 08 semanas de *washout* (W04) a análise *pos hoc* verificou diferença significante no conteúdo de carnosina do grupo BA 28,92± 11,56 mmol/Kg (*p= 0,0002*) enquanto o grupo PL permaneceu sem diferença significante 19,37± 1,30 mmol/Kg (*p= 1,000*). Após 12 semanas (W05) 25,84± 7,42 mmol/Kg (*p <0,0001*) e 16,53± 1,95 mmol/Kg no grupo PL (*p= 1,000*). Por fim, após 16 semanas (W06), o conteúdo de carnosina retornou próximo aos valores basais em 21,91± 7,99 mmol/Kg (*p= 1,000*) e 18,11± 0,83 mmol/Kg no grupo PL (*p= 1,000*).

A análise *post hoc* verificou também diferenças significantes entre os tempos W02 (2 semanas pós) em relação ao tempo Pré (S01) *p= 0,0022*) e o tempo W03 (04 semanas pós) em relação ao tempo Pré (S01- *p= 0,0286*).

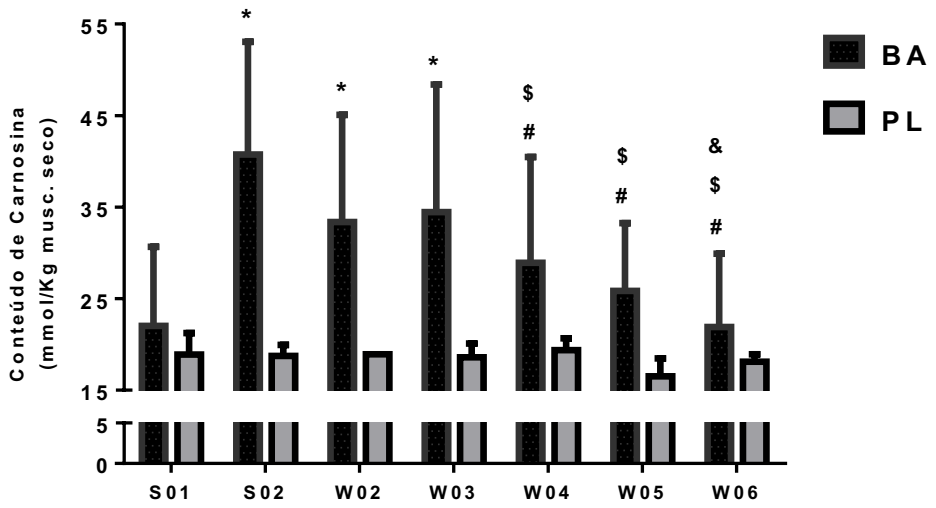

Figura 10: Cinética de washout da carnosina muscular. Legenda: * diferença significante em relação ao S01 (pré); # - em relação ao S02 (pós); $ - em relação ao W02; & - em relação ao W03. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão.

O tempo W05 (12 semanas pós) apresentou diferença significante (*p= 0,0427*) em relação ao tempo W02 (02 semanas pós), assim como o tempo W06 (16 semanas pós) em relação ao tempo W02 (02 semanas pós) (*p= 0,0015*). Houve também diferença significante no tempo W06 (16 semanas pós) em relação ao tempo W04 (08 semanas pós). O Modelo Misto não detectou diferenças significantes em relação aos tempos do grupo placebo (*p> 0,05*).

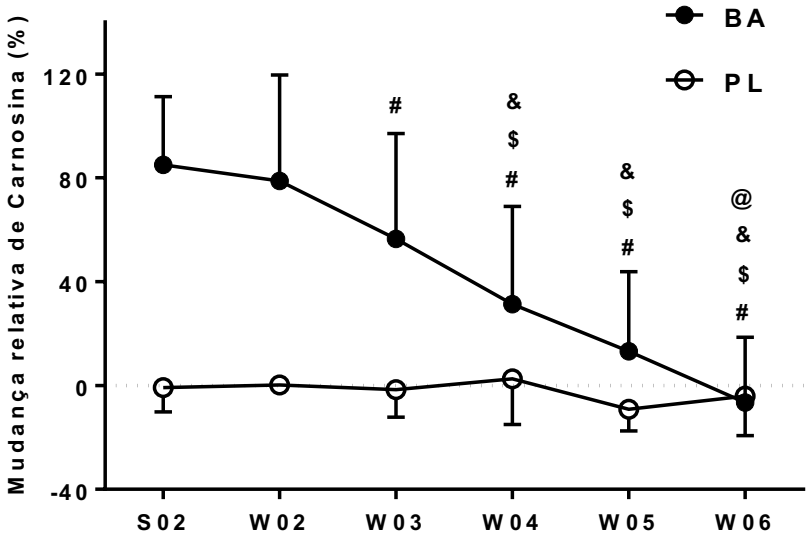

Figura 11: Mudança relativa da concentração de carnosina muscular após a suplementação de β-alanina. Legenda: # - diferença significante em relação ao S02 (pós); $ - em relação ao W02; & - em relação ao W03 e @ - em relação ao W04. Dados expressos em valores de média e ± desvio-padrão.

Tabela 6: Dados individuais referentes aos grupos β-alanina e Placebo

Grupo β-alanina								
Sujeito	**PRE (S01)**	**POS (S02)**	**Mudança absoluta (mmol/Kg musc. Seco)**	**W02**	**W03**	**W04**	**W05**	**W06**
2	39,45	58,15	18,69	*	46,20	36,98	33,79	37,74
3	17,50	36,05	18,55	36,51	35,66	30,02	21,53	*
6	20,79	34,48	13,69	*	17,36	18,01	18,09	16,04
11	19,09	34,30	15,21	*	34,33	27,17	27,17	24,22
15	22,41	36,62	14,21	*	34,41	18,72	18,60	16,41
20	22,02	51,96	29,95	*	42,77	36,52	32,69	20,05
22	19,14	43,24	24,10	48,52	40,81	40,71	34,03	27,34
25	12,93	28,90	15,96	22,63	18,85	17,48	*	12,39
26	14,57	29,20	14,63	25,88	24,30	20,27	17,53	*
27	16,87	30,61	13,74	*	20,45	19,74	20,03	15,75

28	37,46	64,81	27,35	*	63,84	52,52	34,96	27,25
MÉDIA	**22,02**	**40,76**	**18,73**	**33,39**	**34,45**	**28,92**	**25,84**	**21,91**
DP	**8,64**	**12,29**	**5,80**	**11,70**	**13,95**	**11,56**	**7,42**	**7,99**
			Grupo Placebo					
Sujeito	**PRE (S01)**	**POS (S02)**	**Mudança absoluta (mmol/Kg musc. Seco)**	**W02**	**W03**	**W04**	**W05**	**W06**
9	20,80	20,15	-0,66	*	19,99	18,77	*	18,63
14	16,15	18,51	2,36	*	18,77	21,27	14,27	18,89
23	20,93	19,09	-1,84	18,92	19,13	19,11	17,70	17,05
24	17,68	17,23	-0,45	*	16,45	18,34	17,62	17,88
MÉDIA	**18,89**	**18,74**	**-0,15**	**18,92**	**18,58**	**19,37**	**16,53**	**18,11**
DP	**2,37**	**1,22**	**1,78**	*	**1,51**	**1,30**	**1,95**	**0,83**

Legenda: * se refere as amostras faltantes.

No que se refere aos valores em deltas absolutos do conteúdo de carnosina muscular, o Modelo Misto verificou um efeito principal de Grupo (*F= 12.58; p= 0,0022*), tempo (*F= 4.43; p=0,0020*) e interação Grupo X Tempo (*F= 4.01; p= 0,0038*). O delta médio absoluto observado do grupo BA foi de 18,73± 5,80 mmol/Kg (+ 85%) e, o grupo PL - 0,15± 1,78 mmol/Kg (-0,7%).

Após 2 semanas (W02) o grupo BA ainda apresentava 17,35± 8,99 mmol/Kg de carnosina (~ 79%) e o grupo PL 0,03 mmol/Kg (0,1%), sem diferença significante (*p= 0,4667*). Após 4 semanas de *washout* (W03), o conteúdo médio verificado foi 12,43± 8,95 mmol/Kg (~ 56%) no grupo BA, e -0,31± 2,0 mmol/Kg (- 1,62%) no grupo PL, (*p= 0,0378*). Após 08 semanas (W04) o grupo BA apresentava o delta médio de 6,9± 8,30 mmol/Kg (~ 38%; *p <0,0001*) e o grupo PL 0,48± 3,33 mmol/Kg (2,5%). Após 12 semanas (W05), grupo BA 2,91± 6,76 mmol/Kg (~ 13%; *p< 0,0001*) e grupo PL -1,72± 1,59 mmol/Kg (- ~9%). Por fim, após 16 semanas de *washout* (W06), o conteúdo de carnosina retornou próximo aos valores basais no grupo BA - 1,44± 5,55 mmol/Kg (- ~ 6% *p< 0,0001*) e 0,78± 2,88 mmol/Kg (- 4%) no grupo PL.

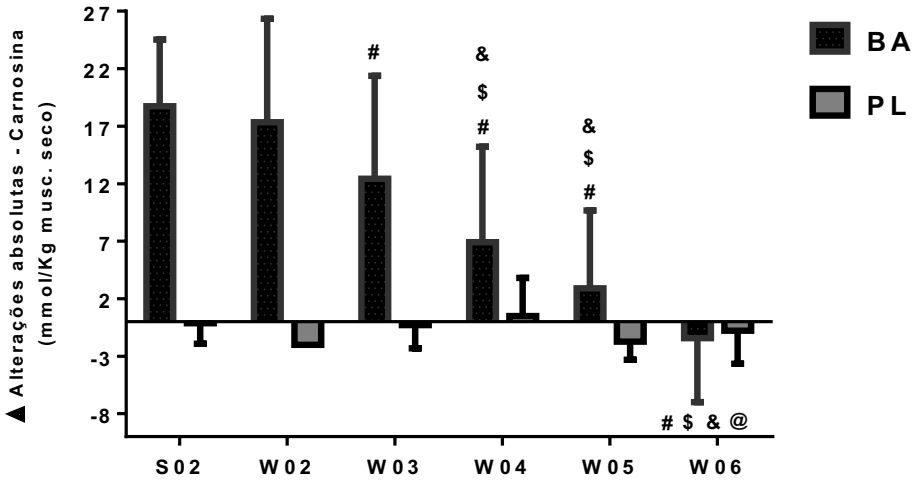

Figura 12: Alterações absolutas de carnosina. Legenda: # - diferença significante em relação ao S02 (pós); $ - em relação ao W02; & - em relação ao W03 e @ - em relação ao W04. Dados expressos em valores de média ± desvio-padrão.

A análise *pos hoc* verificou também diferença significante no tempo W04 (08 semanas) em relação ao tempo W02 (02 semanas) (p= *0,0024*), assim como os tempos W05 (12 semanas) (p< *0,0001*) e W06 (16 semanas) (p< *0,0001*). Em relação ao tempo W03 (04 semanas), foi verificada diferença significante (p= *0,0075*) entre o tempo W04 (8 semanas), W05 (12 semanas) (p= *0,0002*) e W06 (16 semanas) (p< *0,0001*). Em relação ao tempo W04 (08 semanas), foi verificada diferença significante no tempo W06 (16 semanas) (p= *0,0032*).

Para avaliar a associação entre o conteúdo de carnosina muscular e o desempenho físico, foi realizado o coeficiente de correlação de Pearson através dos dados médios do conteúdo de carnosina muscular e do TTE obtido nos testes. Foi possível observar uma forte correlação linear positiva (r = *0,8995*) e significante (p = *0,01492*) entre as duas variáveis (*i.e.,* conteúdo de carnosina x TTE). O grupo placebo apresentou o coeficiente de correlação desprezível (r = *0,05*) e sem diferença significante (p = *0,9222*).

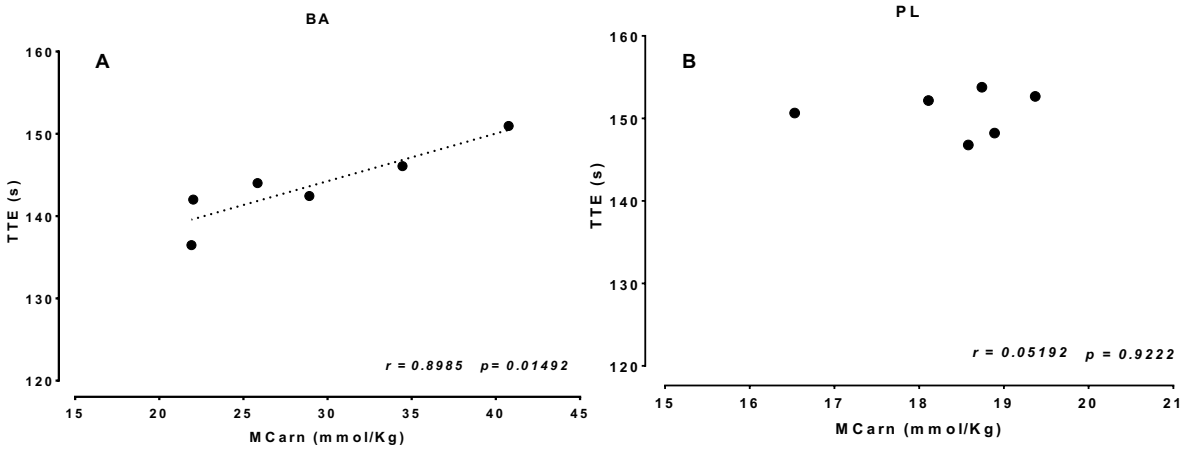

Figura 13: Painel A: Coeficiente de Correlação de Pearson grupo BA – ($p < 0,05$). Painel B: grupo PL ($p > 0,05$).

5.4 Avaliação do consumo alimentar

Os dados apresentados referem-se ao consumo calórico total, macronutrientes em valores absolutos (*i.e.,* carboidratos, proteínas e lipídeos) e β-alanina, estimados por tabelas de referência (JOHNES et al. 2011; JOHNES, 2011). No grupo β-alanina foram calculados os recordatórios alimentares do total de 10 sujeitos, enquanto que no grupo placebo foram calculados os recordatórios de 4 sujeitos.

A análise do Modelo Misto não verificou interação de Grupo x Tempo sobre a variável do consumo calórico total ($F= 0.28; p= 0,9237$). No entanto, foi verificado um efeito principal de grupo ($F= 6.70; p= 0,0252$). Na análise dos macronutrientes, não foram verificadas interações de Grupo x Tempo para proteína ($F= 1.44; p= 0,2247$), e lipídeos ($F=0.40; p= 0,8470$). Foi verificado um efeito principal de grupo para variável carboidrato ($F= 13.08; p= 0,0041$).

Para o consumo de β-alanina, o Modelo Misto não verificou diferenças significantes entre os grupos ($F= 1.68; p= 0,2215$). O consumo médio do grupo β-alanina foi de 0,55± 0,21 g (Pré) e 0,80± 0,47 (Pós) e 0,55± 0,38 (Pré) e 0,68± 0,35 (Pós).

Tabela 7: Consumo calórico total, macronutrientes e β-alanina.

	β-alanina					
n= 10	**S01**	**S02**	**W03**	**W04**	**W05**	**W06**
Kcal/dia	2088,89± 386,35	2175,67± 287,84	2235,42± 367,68	2326,94± 492,41	2213,59± 277,21	2264,43± 194,28
Carb. (g/d)	275,245± 40,06	268,66± 55,03	289,09± 28,01	305,674± 64,76*	282,06± 60,24	305,09± 39,96
Prot. (g/d)	85,97± 16,94	97,75± 30,68	95,39± 24,96	81,89± 19,17	96,94± 16,59	99,40± 19,72
Lip. (g/d)	71,35± 30,09	71,5± 17,05	75,87± 34,26	86,27± 31,93	76,77± 13,70	71,87± 14,76
β-alanina (g/d)	0,55± 0,21	0,80± 0,47	0,76± 0,18	0,67± 0,29	0,75± 0,33	0,77± 0,39
n= 4	**Placebo**					
Kcal/dia	1829,83± 164,94	1909,93± 296,31	1985,43± 368,84	1877,39± 557,56	2080,25± 211,90	1976,09± 424,13
Carb. (g/d)	234,16± 28,63	202,95± 29,69	251,24± 56,42	207,51± 53,98	234,43± 37,57	282,33± 37,57
Prot. (g/d)	92,41± 32,98	119,37± 12,39	82,75± 21,34	108,24± 61,98	113,91± 3,88	95,95± 16,91
Lip. (g/d)	59,14± 25,82	69,51± 33,73	73,22± 25,11	67,59± 27,87	76,32± 14,37	53,27± 30,86
β-alanina (g/d)	0,55± 0,38	0,68± 0,35	0,72± 0,37	0,55± 0,46	0,40± 0,30	0,56± 0,08

Dados expressos em valores de média± desvio-padrão.

*Refere-se a diferença estatisticamente significante em relação ao grupo placebo ($p < 0,05$).

5.5 Eficácia do vendamento e efeitos colaterais

Os voluntários finalizados foram indagados sobre qual suplemento acreditavam terem tomado (β-alanina ou placebo), a fim de se verificar a eficácia do vendamento. Os voluntários também foram questionados quanto ao percentual de certeza de suas respostas. Além disso, os voluntários foram orientados a relatar qualquer efeito colateral sentido durante o período de suplementação de beta-alanina.

No total 6 voluntários reportaram efeito colateral (parestesia) em baixo grau, localizado na região dos lábios, nuca, costas e braços, após a ingestão dos tabletes. No entanto, o teste exato de Fisher não detectou diferença significativa no número acertos entre os grupos β-alanina ou placebo ($p = 0,6564$).

6 DISCUSSÃO

A suplementação de β-alanina tem cada vez mais despertado o interesse de atletas e entusiastas do esporte, assim como da comunidade científica (DE SALLES PAINELLI et al. 2015). No que se refere ao desempenho físico-esportivo, a suplementação de β-alanina tem-se mostrado efetiva, especialmente em modalidades onde o acumulo de íons H^+ é predominante (SALE, et al. 2013). Em exercícios de alta intensidade e curta duração a fadiga muscular desenvolve-se rapidamente, sendo este, um dos principais fatores limitantes do desempenho físico (FREITAS et al. 2015). Baseado nisso, demos escolha ao teste $CCT^{110\%}$, por apresentar tais características.

No presente estudo, a melhora de desempenho observada foi de 6,3% para o grupo β-alanina (acima do coeficiente de variação do teste), e de 3,75% para o grupo Placebo. Tais achados são relativamente inferiores aos observados por outros autores que utlizaram o mesmo protocolo de teste. Hill et al. (2007), verificaram uma melhora de 16% após a suplementação de β-alanina durante 10 semanas (4,0 – 6,4/d), Sale et al. (2011) um aumento de 12% após 4 semanas de suplementação (6,4 g/d) e Danaher et al. (2014) um aumento de 14% após 6 semanas (4,8 g/d – 4 semanas e 6,4g por mais 2 semanas). Saunders et al. (2016) observaram uma melhora significante ($p< 0,05$) no TTE após avaliarem a suplementação de β-alanina (6,4 g/d) durante 24 semanas. Os testes foram aplicados a cada 4 semanas e modelo estatístico (*Magnitude Based Inference*) indicou efeito “possivelmente a quase certamente positivo” em todos os 6 testes aplicados.

Diversos são os fatores que poderiam contribuir para os resultados inferiores observados neste estudo, como por exemplo, o longo intervalo entre os testes (*i.e.,* 8 semanas entre Pré e Pós). Embora os voluntários tenham sido verbalmente instruídos a manterem seus níveis habituais de atividade física ao longo do estudo, houveram relatos de redução dos níveis de atividade física (por mudanças de rotina, imprevistos, etc.), e consequentemente redução dos níveis de aptidão física. Cabe destacar que a adesão a suplementação dos voluntários do grupo β-alanina foi de 96,5 ± 3,3%, o que de certa forma, reduziria a hipótese de a suplementação ter sido ineficiente. Outra possível limitação, foram os diferentes níveis de atividade física e modalidades praticadas entre voluntários,

ou seja, haviam voluntários que praticavam atividade física com a frequência de 1 – 2x por semana, enquanto outros, 5x ou mais por semana. No entanto, é preciso salientar que por se tratar de um estudo de longa duração (24 semanas) e de caráter descritivo, não nos dispusemos a limitar nossa amostra entre sujeitos que praticavam a mesma modalidade esportiva, dada a grande dificuldade de se recrutar voluntários para o estudo (vide a taxa de *dropouts* do estudo).

Como objetivo secundário deste estudo, coube investigar se o conteúdo de carnosina muscular se associava ao desempenho em exercício de alta intensidade e curta duração. Foi possível observar através do coeficiente de correlação de Pearson uma forte correlação entre as duas variáveis, isto é, o maior conteúdo de carnosina muscular parece estar fortemente associado ao maior desempenho físico ($r= 0,8995$), enquanto que a queda de seu conteúdo está associada a redução do desempenho. Conforme já discutido no presente relatório, esta associação entre a carnosina e o desempenho físico poder ser explicado pela sua ação no tamponamento intramuscular e consequente redução da fadiga muscular e melhoria de desempenho. Uma revisão sistemática com meta-analise recentemente demonstrou que de fato, a suplementação de β-alanina melhora o desempenho físico em exercícios onde a produção de ácidos (H^+) é predominante, com duração entre 0,5 – 10 minutos.

Com a interrupção da suplementação de β-alanina, a degradação e eliminação da carnosina prevalecem sobre sua síntese, ocorrendo assim o chamado *washout* ou “limpeza” (STELLINGWERFF et al. 2012). Entretanto, os pontos chaves que definem a sua regulação ainda permanecem pouco explorados. A exemplo da creatina, que apresenta um período de *washout* de ~ 4 semanas (HULTMAN et al. 1996), a carnosina parece apresentar um tempo de *washout* relativamente lento (STELLINGWERFF et al. 2012). A partir dos primeiros estudos que avaliaram a cinética de *washout* da carnosina muscular (BAGUET et al., 2009; STELLINGWERFF et al. 2012), foi possível ter indícios de que este dipeptídeo pode permanecer elevado na musculatura esquelética por ~10 – 20 semanas, após a interrupção da suplementação de β-alanina.

A principal pergunta deste trabalho foi investigar a cinética de desaparecimento (*i.e., washout*) da carnosina muscular, avaliado pelo método de biópsia muscular seguido pela análise por Cromotografia Líquida de Alta

Eficiência (do inglês – *High Performance Liquid Chromotograph – HPLC*), após a suplementação de β-alanina. Até o presente, a cinética de *washout* da carnosina muscular havia sido avaliado apenas pela técnica de H-RMS (BAGUET et al. 2009; STELLINGWERFF et al. 2012) e apenas em dois momentos após a suplementação.

Após 8 semanas de suplementação de β-alanina (6,4 g/d) as concentrações de carnosina muscular se elevaram em média de 85%, com uma variação individual entre 47 – 136%. Já está bem estabelecido na literatura que a ingestão oral de 4 – 6,0g/d de β-alanina durante 2 - 10 semanas pode aumentar as concentrações de carnosina muscular em uma magnitude de 40 – 80 % (HILL et al. 2007; HARRIS et al. 2006; KENDRICK et al. 2009), embora estudos mais recentes já tenham empregado a suplementação de β-alanina por 24 semanas, com aumentos relativos entre 59 a ~ 200% (SAUNDERS et al. 2016). Já o conteúdo absoluto de carnosina muscular observado foi em média 18,73± 5,80 mmol/Kg, valores estes, próximos aos observados por Hill et al. (2007), onde, após suplementarem 13 indivíduos com β-alanina (4,0 – 6,4g/d) durante 10 semanas, verificaram o aumento médio absoluto de 21,8± 1,6 mmol/Kg.

Foi possível verificar que de fato, uma vez elevado o conteúdo de carnosina muscular, a mesma pode permanecer elevada por um relativo longo período. Após a interrupção da suplementação de β-alanina, ~79% (33,39± 11,70 mmol/Kg musculo seco) da concentração de carnosina ainda se encontrava na musculatura esquelética após 2 semanas de *washout*, ou seja, uma redução de ~ 6% (~ 1,4 mmo/Kg musculo seco). Mesmo após 4 semanas ainda foi possível observar ~ 56% da concentração de carnonisa muscular. Ainda que o estudo de Stellingwerff et al. (2012) tenham empregado metodologias diferentes para avaliar a concentração de carnosina (H-RMN), similarmente foi verificado que ~ 50% da concentração de carnosina muscular ainda permanecia aumentada após 4 semanas, enquanto Baguet et al. (2009) observaram a concentração de ~ 68% após 3 semanas de *washout.*

No que se refere a taxa de degradação absoluta de carnosina muscular, o presente estudo observou o decaimento médio de 1,17 mmol/semana (musculo seco) ou 5,3%/semana. Estes valores são superiores aos encontrados por Baguet et al. (2009), que após suplementarem 8 sujeitos com 4,8g de β-alanina durante 5 – 6 semanas, observaram uma taxa de decaimento de 2,5 –

3,5 %/semana, após um aumento de 23 – 39% da concentração de carnosina. Já Stellingwerff et al. (2012) observaram uma taxa de decaimento de ~2%/semana após o aumento de 30 – 45%. Essas discrepâncias, embora que ainda sugiram o lento *washout* da carnosina, poderiam ser atribuídas as diferentes magnitudes de aumento no conteúdo de carnosina muscular, assim como as diferentes metodologias utilizadas (HPLC x H-RNM).

Em relação a cinética de *washout* da carnosina muscular, pode-se observar que seu decaimento apresentou uma maior magnitude nas primeiras 4 semanas após interrupção da suplementação (- 29%), e tendeu a reduzir ao longo das semanas até o completo *washout* (após 16 semanas). É razoável assumirmos através deste comportamento o modelo cinético de reação de primeira ordem ao invés de um decaimento linear de ordem zero, uma vez que seu decaimento não se mantém constante ao longo das semanas. Baguet et al. (2009) sugerem que a taxa de decaimento da carnosina muscular se de linearmente, ao invés de seguir um modelo exponencial de primeira ordem. Todavia, os limitados dados as respeito deste fenômeno ainda permanecem conflitantes. Hoffman et al. (2018) relatam que possivelmente o *washout* da carnosina muscular segue o modelo cinético de reação de primeira ordem (*i.e.,* quando se aumenta a concentração de um reagente, aumenta-se a velocidade da reação). Da mesma maneira, nossa hipótese inicial era de que o conteúdo de carnosina muscular poderia influenciar sua taxa de degradação ao longo do período de *washout*. Cabe ainda destacar que ao observar os dados individuais de carnosina muscular, dois sujeitos ainda apresentavam o conteúdo de carnosina acima dos valores iniciais (+5,13 mmol/Kg e + 8,2 mmol/Kg) mesmo após 16 semanas. Dessa maneira, é possível que o *washout* completo nesses sujeitos pudesse ocorrer em um tempo superior a 20 semanas.

Baseado no que foi discutido acima, a taxa de degradação da carnosina parece depender do seu conteúdo. Stellingwerff et al. (2012b) sugerem que o decaimento do conteúdo de carnosina muscular parece estar em função dos incrementos iniciais de carnosina acima dos níveis de pre-suplementação. No estudo de Baguet et al. (2009) os sujeitos classificados como “altamente responsivos” (*i.e.,* aqueles que apresentavam maiores aumentos de conteúdo de carnosina após a suplementação) requereram um tempo maior de *washout* para que o conteúdo de carnosina retorne aos valores iniciais (~15 semanas), do que

os sujeitos considerados “pouco responsivos” (~6 semanas). Contudo, deve-se reforçar a necessidade de uma interpretação cautelosa ao se comparar os resultados obtidos no presente estudo com os apresentados por Baguet et al. (2009) e Stellingwerff et al. (2012), por terem utilizados métodos diferentes (*i.e.,* HPLC x H-RMN).

Em um resumo publicado no *The FASEB Journal*, Harris et al. (2009) apresentaram os dados de *washout* da carnosina muscular durante 4 semanas, após a suplementação de 6,4 g/d β-alanina (avaliados na 3ª e 6ª semana pós suplementação). O conteúdo de carnosina muscular foi avaliado pela técnica de biópsia muscular e análise por HPLC. Os aumentos de carnosina muscular observados após o período de suplementação foram de ~ 60% (25,9 ±4,3 mmol/Kg PRÉ e 41,3± 5,5 mmol/Kg PÓS). Após a 3ª semana de *washout* foi observado que 48% da concentração de carnosina ainda estava presente na musculatura (38,3± 6,7 mmol/Kg) e após a 6ª semana ~37% (35,4± 5,5 mmol/Kg). A partir destes dados pode-se verificar que a taxa de *washout* encontrada foi de aproximadamente ~1 mmol/semana ou 6,3 %/semana, valores estes também superiores aos encontrados por Baguet et al. (2009) e Stellingwerff et al. (2012), porém, similares aos encontrados neste estudo (5,3%/semana). Os autores propõem o decaimento da carnosina muscular se de através da cinética de primeira-ordem, com meia vida de ~9 semanas.

É importante destacar que os mecanismos envolvidos no processo de *washout* da carnosina muscular ainda carecem de estudos que explorem este fenômeno, de modo a elucidar questões ainda interrogadas. Ainda que existam algumas possíveis hipóteses para explicar tal processo, (*i.e.,* liberação ativa através de transportadores de membrana; perda passiva da carnosina através de micro rupturas do sarcolema; degradação enzimática em β-alanina e L-histidina através da CN2 ou a combinação destes (STAGEN, 2013), o presente estudo não permite conjecturar hipóteses que possam explicar o fenômeno.

No que tange o consumo alimentar, pode-se observar que a ingestão média de β-alanina se encontrou dentro do consumo médio observado no estudo de Saunders et al. (2016), a qual empregou uma população similar (~ 0,7 g/d). Os fatores que contribuem para uma maior ingestão de β-alanina, podem atribuídas ao maior consumo de alimentos fontes (*i.e.,* carnes de aves, bovinas, peixes). Quando se compara a ingestão de β-alanina com outras populações,

pode-se observar o consumo superior a ingestão relatada por outros estudos, como de Everaert et al. (2010), a qual observaram o consumo de β-alanina em média 0,33± 0,14g, entre sujeitos belgas com uma dieta ocidental onívora. Salienta-se ainda que o consumo de carnes pode variar amplamente em diversos países, sendo a América do Norte, o Brasil e a União Europeia, os maiores consumidores, segundo os dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - OECD-FAO (2016). Durante todo o estudo, os sujeitos foram orientados a manter dieta habitual padronizada, porém, não controlada, devido ao tempo de segmento do estudo, onde o controle dessa variável seria inviável. Ao avaliar o consumo alimentar de macronutrientes e de β-alanina, é preciso ter em mente que se tratam de quantidades estimadas, pois as ferramentas para obtenção destes dados (*i.e.,* registros alimentares de 3 dias, recordatórios alimentares, questionários de frequência alimentar, etc.) podem ser limitadas, uma vez que dependem da memória e auto relato do indivíduo entrevistado. Adicionalmente, a literatura ainda carece de dados a respeito da quantidade centesimal de β-alanina contida em alimentos de origem nacional.

Por fim, o presente estudo ainda apresenta questões que poderão ser melhores investigadas no futuro, de modo a trazer luz ao fenômeno de *washout* da carnosina muscular. A saber, a análise da cinética de decaimento nos diferentes tipos de fibra (*i.e.,* tipa I, IIa e IIx), para avaliar se o tempo de *washout* é maior nas fibras com maior conteúdo de carnosina (fibras do tipo II). Harris et al. (1997) observaram, através da técnica de biópsia muscular e análise por HPLC, que o conteúdo de carnosina nas fibras do tipo II eram duas vezes maiores do que em fibras do tipo I (23,2± 17,8 e 10,5± 7,6 mmol/Kg^{-1}). Hill et al. (2007) relataram o mesmo padrão, com o conteúdo de carnosina 66% superior em fibras do tipo IIa (29,6± 2,01) do que em fibras do tipo I (17,8± 1,9). Embora os estudos sobre *washout* citados anteriormente (BAGUET et al. 2009; STELLINGWERFF et al. 2012) tenham avaliado o decaimento em músculos com diferentes predominâncias de fibras, a análise por fibra individual e análise por HPLC ainda permanece inexplorado. Além disso, a cinética de *washout* em uma amostra composta por mulheres e sujeitos de diferentes faixas etárias também merecem investigações futuras.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a carnosina é um dipeptídeo relativamente estável na musculatura esquelética, podendo levar um tempo superior a 16 semanas para retornar aos seus valores basais após a suplementação de β-alanina. Além disso, o retorno do conteúdo da carnosina muscular parece estar associada a queda concomitante do desempenho físico de alta intensidade e curta duração.

REFERÊNCIAS

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

ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiol Rev,** v. 88, n. 1, p. 287-332, Jan 2008.

ANDERSON, C. M. et al. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H+-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na+- and Cl(-)-dependent TauT (SLC6A6). **J Physiol,** v. 587, n. Pt 4, p. 731-44, Feb 15 2009.

ARTIOLI, G. G.; GUALANO, B.; LANCHA JUNIOR, A. H. Suplementação de beta-alanina: uma nova estratégia nutricional para melhorar o desempenho esportivo. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte,** v. 8, p. 15, 2009.

ARTIOLI, G. G. et al. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Med Sci Sports Exerc,** v. 42, n. 6, p. 1162-73, Jun 2010.

ASATOOR, A. M. et al. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. **Gut,** v. 11, n. 3, p. 250-4, Mar 1970.

BAGUET, A. et al. Effects of sprint training combined with vegetarian or mixed diet on muscle carnosine content and buffering capacity. **Eur J Appl Physiol,** v. 111, n. 10, p. 2571-80, Oct 2011.

BAGUET, A. et al. A new method for non-invasive estimation of human muscle fiber type composition. ***PLoS One,*** v. 6, n.7 e21956, p. 1-6, Jul 2011.

BAGUET, A. et al. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. **J Appl Physiol (1985),** v. 106, n. 3, p. 837-42, Mar 2009.

BAILEY, C.H. et al. Beta-alanine does not enhance the effects of resistance training in older adults. **J Diet Suppl**, v. 2, n.15, 2018.

BAKARDJIEV, A.; BAUER, K. Transport of beta-alanine and biosynthesis of carnosine by skeletal muscle cells in primary culture. **Eur J Biochem,** v. 225, n. 2, p. 617-23, Oct 15 1994.

BASSINELLO, D. et al. Beta-alanine supplementation improves isometric, but not isotonic or isokinetic strength endurance in reacreationally strength-trained youg men. **Amino Acids**, june, 2018.

BAUER, K.; SCHULZ, M. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. **Eur J Biochem,** v. 219, n. 1-2, p. 43-7, Jan 15 1994.

BERGSTRÖM, 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.

BERGSTRÖM, J. Percutaneous Needle Biopsy of Skeletal Muscle in Physiological and Clinical Research. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 35, p. 609 – 616, 1975.

BEX, T. et al. Muscle carnosine loading by beta-alanine supplementation is more pronounced in trained vs. untrained muscles. **J Appl Physiol (1985),** v. 116, n. 2, p. 204-9, Jan 15 2014.

BLANCQUAERT, L. et al. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by beta-alanine transamination. **J Physiol,** v. 594, n. 17, p. 4849-63, Sep 01 2016.

BLANCQUAERT, L.; EVERAERT, I.; DERAVE, W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care,** v. 18, n. 1, p. 63-70, Jan 2015.

BOLDYREV, A. A. Carnosine: new concept for the function of an old molecule. **Biochemistry (Mosc),** v. 77, n. 4, p. 313-26, Apr 2012.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiol Rev,** v. 93, n. 4, p. 1803-45, Oct 2013.

BOLDYREV, A. A. et al. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. **Biochem Int,** v. 15, n. 6, p. 1105-13, Dec 1987.

BOLDYREV, A. A. et al. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. **Comp Biochem Physiol B,** v. 89, n. 2, p. 245-50, 1988.

BOLDYREV, A. A.; GALLANT, S. C.; SUKHICH, G. T. Carnosine, the protective, anti-aging peptide. **Biosci Rep,** v. 19, n. 6, p. 581-7, Dec 1999.

BOLDYREV, A. A. et al. Natural histidine-containing dipeptide carnosine as a potent hydrophilic antioxidant with membrane stabilizing function. A biomedical aspect. **Mol Chem Neuropathol,** v. 19, n. 1-2, p. 185-92, May-Jun 1993.

BRISOLA, G.M.P., et al. Four weeks of beta-alanine supplementation improves high-intensity game activities in water polo. **Int J Sports Physiol Perform,** v. 13, 2018.

CHUNG, W. et al. Doubling of muscle carnosine concentration does not improve laboratory 1-hr cycling time-trial performance. **Int J Sport Nutr Exerc Metab,** v. 24, n. 3, p. 315-24, Jun 2014.

CHURCH, D.D. et al. Comparison of two beta-alanine dosing protocols on muscle carnosine elevations. **J Am Coll Nutr.** Vol. 36, n. 8, p. 608 – 616, 2017.

CLAUS, G.M et al. β-Alanine Supplementation Improves Throwing Velocities in Repeated Sprint Ability and 200-m Swimming Performance in Young Water Polo Players. **Pedriatric Exercise Sciences**, oct, 2017.

CROZIER, R. A. et al. MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. **J Neurosci,** v. 27, n. 16, p. 4492-6, Apr 18 2007.

DANAHER, J. et al. The effect of beta-alanine and NaHCO3 co-ingestion on buffering capacity and exercise performance with high-intensity exercise in healthy males. **Eur J Appl Physiol,** v. 114, n. 8, p. 1715-24, Aug 2014.

DANIEL, H.; KOTTRA, G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. **Pflugers Arch,** v. 447, n. 5, p. 610-8, Feb 2004.

DE SALLES PAINELLI, V. et al. Metabolismo da carnosina, suplementação de beta-alanina e desempenho físico: atualização - parte 1. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva,** v. 9, n. 52, p. 17, 2015.

DECOMBAZ, J. et al. Effect of slow-release beta-alanine tablets on absorption kinetics and paresthesia. **Amino Acids,** v. 43, n. 1, p. 67-76, Jul 2012.

DEL FAVERO, S. et al. Beta-alanine (Carnosyn) supplementation in elderly subjects (60-80 years): effects on muscle carnosine content and physical capacity. **Amino Acids,** v. 43, n. 1, p. 49-56, Jul 2012.

DERAVE, W. et al. Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Med,** v. 40, n. 3, p. 247-63, Mar 01 2010.

DERAVE, W. et al. beta-Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. **J Appl Physiol (1985),** v. 103, n. 5, p. 1736-43, Nov 2007.

DE ANDRADE KRATZ, C. et al. Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in high-trained athletes. Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in highly-trained athletes. **Journal of Science and Medicine in Sport**, 2016.

DE SALLES PAINELLI, V. et al. The ergogenic effect of beta-alanine combined with sodium bicarbonate on high-intensity swimming performance. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. Vol. 5. Num. 20. 2013. p.525-532.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com corelações clínicas.** São Paulo: Edgard Blucher, 2011.

DONG, X. et al. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. **Cell,** v. 106, n. 5, p. 619-32, Sep 07 2001.

DROZAK, J. et al. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). **J Biol Chem,** v. 285, n. 13, p. 9346-56, Mar 26 2010.

DUNNETT, M.; HARRIS, R. C. Influence of oral beta-alanine and L-histidine supplementation on the carnosine content of the gluteus medius. **Equine Vet J Suppl**, n. 30, p. 499-504, Jul 1999.

DUNNET, M. et al. Plasma carnosine concentratrion: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage.**Equine vet. J,** n. 34, p.283-287, Sep 2002.

DUTKA, T. L. et al. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca(2)(+) sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) release in human skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol (1985),** v. 112, n. 5, p. 728-36, Mar 2012.

EVERAERT, I. et al. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol,** v. 113, n. 5, p. 1169-79, May 2013.

EVERAERT, I. et al. 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. 1221-9, Apr 2011.

FEI, Y. J. et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. **Nature,** v. 368, n. 6471, p. 563-6, Apr 07 1994.

FITTS, R. H. The Role of Acidosis in Fatigue: Pro Perspective. **Med Sci Sports Exerc,** v. 48, n. 11, p. 2335-2338, Nov 2016.

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

FREITAS, P. et al. Metabolismo da Carnosina, Suplementação de β-alanina e desempenho físico: Atualização - parte II. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva,** v. 9, p. 20, 2015.

FRITZSON, P.; PIHL, A. The catabolism of C14-labeled uracil, dihydrouracil, and beta-ureidopropionic acid in the intact rat. **J Biol Chem,** v. 226, n. 1, p. 229-35, May 1957.

GARDNER, M. L. et al. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. **J Physiol,** v. 439, p. 411-22, Aug 1991.

GARIBALLA, S. E.; SINCLAIR, A. J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age Ageing,** v. 29, n. 3, p. 207-10, May 2000.

GULEWITCH, W.S., AMIRADZIBI S. Zur Uber das carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes. **Ber Deutsch Chem Ges** B33: S1902–S1903, 1900.

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. et al. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol,** v. 97, n. 2, p. 249-51, 1990.

HARRIS, R. C. et al. 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. 279-89, May 2006.

HARTMAN, P. E.; HARTMAN, Z.; AULT, K. T. Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. **Photochem Photobiol,** v. 51, n. 1, p. 59-66, Jan 1990.

HEISLER, N. Buffering and H+ ion dynamics in muscle tissues. **Respir Physiol Neurobiol,** v. 144, n. 2-3, p. 161-72, Dec 15 2004.

HILL, C. A. et al. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. **Amino Acids,** v. 32, n. 2, p. 225-33, Feb 2007.

HIPKISS, A. R.; MICHAELIS, J.; SYRRIS, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. **FEBS Lett,** v. 371, n. 1, p. 81-5, Aug 28 1995.

HOBSON, R. M. et al. Effects of beta-alanine supplementation on exercise performance: a meta-analysis. **Amino Acids,** v. 43, n. 1, p. 25-37, Jul 2012.

HOFFMAN, J. R. et al. beta-alanine supplementation improves tactical performance but not cognitive function in combat soldiers. **J Int Soc Sports Nutr,** v. 11, n. 1, p. 15, Apr 10 2014.

HORINISHI, H.; GRILLO, M.; MARGOLIS, F. L. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. **J Neurochem,** v. 31, n. 4, p. 909-19, Oct 1978.

HOSTRUP, M.; BANGSBO, J. Improving beta-alanine supplementation strategy to enhance exercise performance in athletes. **J Physiol,** v. 594, n. 17, p. 4701-2, Sep 01 2016.

HULTMAN, E.; SAHLIN, K. Acid-base balance during exercise. **Exerc Sport Sci Rev,** v. 8, p. 41-128, 1980.

HULTMAN, E. et al. Muscle creatine loading in men. **J Appl Physiol (1985),** v. 81, n. 1, p. 232-7, Jul 1996.

JACKSON, M. C.; KUCERA, C. M.; LENNEY, J. F. Purification and properties of human serum carnosinase. **Clin Chim Acta,** v. 196, n. 2-3, p. 193-205, Feb 15 1991.

JONES G, SMITH M, HARRIS R. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. **Proc Nut Soc** 2011; 70:363.

JONES G, SMITH M AND HARRIS R. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. **Proc Nutr Soc,** v.70, 2011p.p. E363.

JONG, C. J.; AZUMA, J.; SCHAFFER, S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. **Amino Acids,** v. 42, n. 6, p. 2223-32, Jun 2012.

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

KALYANKAR, G. D.; MEISTER, A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. **J Biol Chem,** v. 234, p. 3210-8, Dec 1959.

KELLY, V. G. et al. Prevalence, knowledge and attitudes relating to beta-alanine use among professional footballers. **J Sci Med Sport,** v. 20, n. 1, p. 12-16, Jan 2017.

KENDRICK, I. P. et al. 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. 547-54, May 2008.

KENDRICK, I. P. et al. The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. **Eur J Appl Physiol,** v. 106, n. 1, p. 131-8, May 2009.

KOHEN, R. et al. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 85, n. 9, p. 3175-9, May 1988.

LAMONT, C.; MILLER, D. J. Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. **J Physiol,** v. 454, p. 421-34, Aug 1992.

LENNEY, J. F. Human cytosolic carnosinase: evidence of identity with prolinase, a non-specific dipeptidase. **Biol Chem Hoppe Seyler,** v. 371, n. 2, p. 167-71, Feb 1990.

LENNEY, J. F. et al. Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. **Clin Chim Acta,** v. 123, n. 3, p. 221-31, Aug 18 1982.

MANNION, A.F., et al. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. **Eur J Appl Physiol** 64:47–50, 1992.

MATTHEWS, D. M.; ADIB, S. A. Peptide Absorption. **Gastroenterology,** v. 71, n. 1, p. 10, 1976.

MATTHEWS, M. M.; TRAUT, T. W. Regulation of N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase, the terminal enzyme in pyrimidine catabolism, by ligand-induced change in polymerization. **J Biol Chem,** v. 262, n. 15, p. 7232-7, May 25 1987.

MCCORMACK, W. P. et al. Oral nutritional supplement fortified with beta-alanine improves physical working capacity in older adults: a randomized, placebo-controlled study. **Exp Gerontol,** v. 48, n. 9, p. 933-9, Sep 2013.

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

OZDEMIR, M. S. et al. Absolute quantification of carnosine in human calf muscle by proton magnetic resonance spectroscopy. **Phys Med Biol,** v. 52, n. 23, p. 6781-94, Dec 07 2007.

PAN, J. W. et al. Intracellular pH in human skeletal muscle by 1H NMR. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 85, n. 21, p. 7836-9, Nov 1988.

PARILDAR-KARPUZOGLU, H. et al. Decreases in taurine levels induced by beta-alanine treatment did not affect the susceptibility of tissues to lipid peroxidation. **Amino Acids,** v. 32, n. 1, p. 115-9, Jan 2007.

PARK, Y. J.; VOLPE, S. L.; DECKER, E. A. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. **J Agric Food Chem,** v. 53, n. 12, p. 4736-9, Jun 15 2005.

PARKHOUSE, W. S. et al. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. **J Appl Physiol (1985),** v. 58, n. 1, p. 14-7, Jan 1985.

PEDERSEN, T. H. et al. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. **Science,** v. 305, n. 5687, p. 1144-7, Aug 20 2004.

PERRY, T. L. et al. Carnosinemia. A new metabolic disorder associated with neurologic disease and mental defect. **N Engl J Med,** v. 277, n. 23, p. 1219-27, Dec 07 1967.

PERRY, T. L; HANSEN, S; LOVE, D.L. Serum carnosinase deficiency in carnosinaemia. **The Lancet**, v.8, p. 1229 – 1230, 1968.

PETERS, V. et al. Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity. **Amino Acids,** v. 38, n. 5, p. 1607-15, May 2010.

PLACE, N.; BRUTON, J. D.; WESTERBLAD, H. Mechanisms of fatigue induced by isometric contractions in exercising humans and in mouse isolated single muscle fibres. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 36, n. 3, p. 334-9, Mar 2009.

PURCHAS, R.W., et al. Cooking temperature effects on the forms of iron and levels of several other compounds in beef semitendinosus muscle. **Meat Sciences**, v. 68, p. 207 - 207, Sep 2004.

QUINN, P. J.; BOLDYREV, A. A.; FORMAZUYK, V. E. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. **Mol Aspects Med,** v. 13, n. 5, p. 379-444, 1992.

SAHLIN, K. Muscle energetics during explosive activities and potential effects of nutrition and training. **Sports Med,** v. 44 Suppl 2, p. S167-73, Nov 2014.

SALE, C. et al. Carnosine: from exercise performance to health. **Amino Acids,** v. 44, n. 6, p. 1477-91, Jun 2013.

SALE, C.; SAUNDERS, B.; HARRIS, R. C. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. **Amino Acids,** v. 39, n. 2, p. 321-33, Jul 2010.

SALE, C. et al. Effect of beta-alanine plus sodium bicarbonate on high-intensity cycling capacity. **Med Sci Sports Exerc,** v. 43, n. 10, p. 1972-8, Oct 2011.

SAUERHOFER, S. et al. L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. **Diabetes,** v. 56, n. 10, p. 2425-32, Oct 2007.

SAUNDERS, B. et al. Twenty-four Weeks beta-alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. **Med Sci Sports Exerc**, Dec 06 2016.

SAUNDERS, B. et al. Reliability of a high-intensity cycling capacity test. **J Sci Med Sport,** v. 16, n. 3, p. 286-9, May 2013.

SHINOHARA T, HARADA M, OGI K, MARUYAMA M, FUJII R, TANAKA H, et al. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. J Biol Chem. 2004;279(22):23559–64. doi:10.1074/jbc.M314240200.

SMITH, D. E.; CLEMENCON, B.; HEDIGER, M. A. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. **Mol Aspects Med,** v. 34, n. 2-3, p. 323-36, Apr-Jun 2013.

SMITH, E. C. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. **J Physiol,** v. 92, n. 3, p. 336-43, Apr 14 1938.

SNYDER, S. H. Brain peptides as neurotransmitters. **Science,** v. 209, n. 4460, p. 976-83, Aug 29 1980.

SOLIS, M. Y. et al. Effects of beta-alanine supplementation on brain homocarnosine/carnosine signal and cognitive function: an exploratory study. **PLoS One,** v. 10, n. 4, p. e0123857, 2015.

SAUNDERS, B. D. S. P. V.; OLIVEIRA, L.; DA EIRA SILVA, V.; DA SILVA, R. P.; RIANI, L.; FRANCHI, M.; DE SOUZA GONÇALVES, L.; HARRIS, R. G.; ROSCHEL, H.; ARTIOLI, G.G.; SALE, C.; GUALANO, B. Twenty-four Weeks β-alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** v. in press, 2016.

STELLINGWERFF, T. et al. Effect of two beta-alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. **Amino Acids,** v. 42, n. 6, p. 2461-72, Jun 2012.

STELLINGWERFF, T. et al. Optimizing human in vivo dosing and delivery of beta-alanine supplements for muscle carnosine synthesis. **Amino Acids,** v. 43, n. 1, p. 57-65, Jul 2012.

STIPANUK, M. H. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. **Nutr Rev,** v. 65, n. 3, p. 122-9, Mar 2007.

TALLON M.J. et al. The carnsoine content of vastus lateralis is elevated in resistancetrained bodybuilders. J Strength Cond Res 19:725–729, 2005.

TEUFEL, M. et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. **J Biol Chem,** v. 278, n. 8, p. 6521-31, Feb 21 2003.

TIEDJE, K.E. et al. β-alanine as a small molecule neurotransmitter. **Neurochemistry International,** v.57, p. 177-188, 2010.

TOBIAS, G. et al. Additive effects of beta-alanine and sodium bicarbonate on upper-body intermittent performance. **Amino Acids,** v. 45, n. 2, p. 309-17, Aug 2013.

TREXLER, E.T. et al. International Society of Sports Nutirition position stand: beta-alanine. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.12, n.30, 2015.

VISTOLI, G. et al. Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis. **Chirality,** v. 24, n. 7, p. 566-76, Jul 2012.

VOGEL, R. M. et al. Safety of a dose-escalated pre-workout supplement in recreationally active females. **J Int Soc Sports Nutr,** v. 12, p. 12, 2015.

WANG, M. et al. Comparative analysis of vertebrate PEPT1 and PEPT2 genes. **Genetica,** v. 138, n. 6, p. 587-99, Jun 2010.

WESTERBLAD, H. Acidosis Is Not a Significant Cause of Skeletal Muscle Fatigue. **Med Sci Sports Exerc,** v. 48, n. 11, p. 2339-2342, Nov 2016.

YAMASHITA, T. et al. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. **J Biol Chem,** v. 272, n. 15, p. 10205-11, Apr 11 1997.

ZHAO, D.; LU, K. Substrates of the human oligopeptide transporter hPEPT2. **Biosci Trends,** v. 9, n. 4, p. 207-13, Aug 2015.

ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biol,** v. 2, n. 10, p. e348, Oct 2004.

RELATÓRIO ATUALIZADO DE ATIVIDADES (2017 – 2018)

Ao longo deste último ano de bolsa FAPESP, o aluno Guilherme de Carvalho Yamaguchi pode cumprir 100% os créditos das disciplinas exigidas pelo programa, assim como o desenvolvimento de outras atividades acadêmicas, a qual serão contempladas a seguir.

Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE)

Embora o Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino não fosse obrigatório ao aluno, o mesmo julgou ser importante para sua formação acadêmica, assim como para sua formação docente. Durante o segundo semestre de 2017 o aluno pode acompanhar a Profa. Dra. Edilamar Menezes, responsável pela disciplina "Bioquímica da atividade motora – EFB0203", com carga horária de 45 horas.

O objetivo da disciplina foi dar conhecimento aos alunos dos processos bioquímicos nos sistemas biológicos envolvidos no exercício físico agudo e crônico. O plano de ensino da disciplina contemplou a análise do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas na transformação energética muscular. Avaliação da taxa metabólica através do cálculo do consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, além do estudo da regulação neuro-endócrina do metabolismo de substratos e do equilíbrio ácido-base durante a prática de atividades motoras envolvidas na Educação Física e Esporte.

Atividades desenvolvidas

Antes do início das aulas, foi realizada uma reunião a fim expor a metodologia de ensino que seria adotada, bem como as formas de avaliações dos discentes.

Durante o semestre foi possível auxiliar a docente responsável durante as aulas ministradas, assim como a discussão do conteúdo. Foram aplicados exercícios em sala, assim como trabalhos em grupos. Ao longo do semestre também foram realizados plantões de dúvidas para auxiliar os discentes com as dúvidas.

Além disso, foi possível ministrar parte de duas aulas ao longo do semestre, sendo elas: Teoria do Treinamento Esportivo e Metabolismo do Lactato.

Publicações científicas

Conforme abordado no relatório anterior, o aluno pode colaborar em trabalhos que resultaram em publicações internacionais, tais como:

OLIVEIRA, L.; **YAMAGUCHI, G**.; Painelli VS; SILVA, R.; SOUZA, L. G.; Gualano, Bruno; Saunders B. Comprehensive reliability analysis of a work-based (~420 kJ) cycling time-trial in recreationally-trained individuals. *Journal of Science and Cycling*, 2017.

OLIVEIRA, L. F.; PAINELLI, V. S.; NEMEZIO, K.; GONCALVES, L. S. ; **YAMAGUCHI, G.**; SAUNDERS, B.; GUALANO, B.; ARTIOLI, G. G. . Chronic lactate supplementation does not improve blood buffering capacity and repeated high-intensity exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 2016.

SAUNDERS, B.; OLIVEIRA, L. F.; SILVA, R. P.; PAINELLI, V. S.; GONCALVES, L. S.; **YAMAGUCHI, G**.; MUTTI, T.; MACIEL, E.; ROSCHEL, HAMILTON ; ARTIOLI, G. G.; GUALANO, B. Placebo in sports nutrition: a proof-of-principle study involving caffeine supplementation. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports,* 2016.

GONÇALVES, L. S.; PAINELLI, V. S.; **YAMAGUCHI, G.**; OLIVEIRA, L. F; SAUNDERS, B.; SILVA, R. P.; MACIEL, E.; ARTIOLI, G. G.; ROSCHEL, HAMILTON; GUALANO, B. Habitual caffeine intake does not influence the efficacy of acute caffeine supplementation. *Journal of Applied Physiology,* vol. 123, 213 – 220, 2017.

B. GUALANO, L.D.S. GONÇALVES, V.D.S. PAINELLI, **G. YAMAGUCHI**, L.F. DE OLIVEIRA, B. SAUNDERS, R.P. DA SILVA, E. MACIEL, G.G. ARTIOLI, H. Roschel. Reply to Areta et al.: Time to withdraw and let the myth rest. Letter to the editor. *J Appl Physiol* 123: 1415, 2017.

Artigos aceitos para publicação

BARRETO, G; DA SILVA, R; **YAMAGUCHI, G.** DE OLIVEIRA, L.F; DE SALLES PAINELLI, V; GONÇALVES, L.S; GUALANO, B; SAUNDERS, B. Does caffeine supplementation alter energy contribution during a work-based ~30 min cycling time-trial? *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte,* 2018 (no prelo).

Participação em eventos

Seminário Internacional HIIT – BF Eventos
Carga horária: 08 horas
Ocorrido no dia 05 de agosto de 2017

Seminário Internacional de Nutrição Esportiva – BF Eventos
Carga horária: 08 horas
Ocorrido no dia 25 de novembro de 2017

Premiações

No dia 28 de novembro de 2017 (São Paulo), o trabalho intitulado "O Consumo habitual de Cafeína não influencia o efeito ergogênico da suplementação aguda de cafeína sobre o desempenho: o fim de um mito" foi vencedor do **XI Prêmio SAÚDE/Nutrição** na categoria Nutrição Esportiva, estando o aluno envolvido no projeto ganhador.

Revisão de periódicos

Neste último ano, o aluno teve a oportunidade de exercitar a função a de revisor do periódico científico internacional *Nutrition and Health*, a qual pode, através da orientação do Prof. Bruno Gualano desenvolver as habilidades como revisor de periódico.

Outras informações relevantes

No segundo semestre de 2017 o laboratório de pesquisa recebeu a visita de dois ilustres pesquisadores internacionais – Professor Roger Harris (UK) e Professor Jacques Poortmans (Bélgica). A saber, o Prof. Roger Harris foi o responsável pelos estudos pioneiros com suplementação de beta-alanina, e dessa forma, foi possível apresentar e discutir o projeto, e os dados da presente pesquisa.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Escola de Educação Física e Esporte
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

39135 - 8786951/1 - Guilherme de Carvalho Yamaguchi

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MCM5880-3/4	Bioestatística I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/03/2016	11/04/2016	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EFP5757-5/1	Docência no Ensino Superior em Educação Física e Esporte	02/03/2016	15/06/2016	90	6	100	A	N	Concluída
EEF5710-3/1	Seminários Avançados em Educação Física e Esporte	08/03/2016	21/06/2016	60	4	100	B	N	Concluída
EFB5755-4/1	Efeitos do Exercício Físico no Metabolismo Muscular	03/05/2016	04/07/2016	90	6	83	A	N	Concluída
FBA5729-4/3	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	01/08/2016	04/09/2016	75	5	87	A	N	Concluída
EFP5773-1/2	Aplicações e Implicações de Conceitos de Estatística nos Estudos da Educação Física e Esporte	10/08/2016	09/11/2016	90	6	100	B	N	Concluída
EFP5769-3/1	Caracterização Acadêmica e Profissional da Educação Física e Esporte	16/08/2016	24/10/2016	90	6	90	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho "Placebo in sports nutrition: a proof-of-principle study involving caffeine supplementation" no Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, p.1240/1247, v27, EUA, 2016 (1)	01/11/2016	30/11/2016	-	2	-	-	-	-
Atividade do Programa	Publicação do trabalho "Dispelling the myth that habitual caffeine consumption influences the performance response to acute caffeine supplementation" no Journal of Applied Physiology, p.213/220, v123, EUA, 2017 (1)	01/05/2017	31/05/2017	-	3	-	-	-	-
TNM5791-3/3	Metodologia da Pesquisa Científica (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	30/05/2017	21/08/2017	60	4	83	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	40	42
Estágios:			
Total:	0	40	42

Créditos Atribuídos à Dissertação: 56