UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Papel da atividade muscular sobre a regulação do conteúdo de carnosina em
resposta à suplementação de beta-alanina: um estudo em atletas com lesão
medular

Kleiner Márcio de Andrade Nemezio

São Paulo
2018

KLEINER MÁRCIO DE ANDRADE NEMEZIO

Papel da atividade muscular sobre a regulação do conteúdo de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina: um estudo em atletas com lesão medular

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

Área de concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli

São Paulo

2018

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Nemezio, Kleiner Márcio de Andrade

Papel da atividade muscular sobre a regulação do conteúdo de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina: um estudo em atletas com lesão medular / Kleiner Márcio de Andrade Nemezio. – São Paulo : [s.n.], 2018.

94p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli

1. Fadiga muscular 2. Paraplegia 3. Atletas 4. Lesão medular 5. Metabolismo I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: NEMEZIO, Kleiner

Título: Papel da atividade muscular sobre a regulação do conteúdo de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina: um estudo em atletas com lesão medular.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese à minha mãe, Isabel C. V. de Andrade Nemezio (em memória)
e a Seu José Cândido (em memória).*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu pai, Laelcio Nemezio, meu grande incentivador durante todo este processo. Agradeço também à sua esposa, Ângela Santana, minha mãe não de sangue, mas de coração. À minha irmã Karla e ao seu esposo André, que me deram uma linda sobrinha, Isabelly, hoje com três aninhos. E não poderia deixar de agradecer a quem certamente é a pessoa mais com finalização desta caminhada, minha noiva Jessica Macieira. Obrigado pelo amor, confiança, companheirismo e por se fazer presente sempre, mesmo a distância.

Também sou muito grato à minha família Paulistana, especialmente à minha prima Deusdete, quem posso considerar ter sido uma mãe durante esses anos paulistanos. Aos meus primos irmãos: Marcos, Lei, Sérgio, Márcio e Maciel, muito obrigado pelo acolhimento, companheirismo e amizade. Também agradeço aos meus primos Mário Nemezio e Lilian Nemezio.

Agradeço também a todos os meus colegas de laboratório, em especial ao meu grande amigo e irmão Guilherme Yamaguchi. Foi um grande prazer poder contar com a sua amizade e companheirismo, tanto na condução dos nossos projetos, quanto nos momentos de descontração, comendo aquela pizza e tomando aquela “gelada”. Agradeço também ao meu grande amigo Vagner Dantas, com quem aprendi e ainda aprendo muito sobre ciência, filosofia, amizade, descontração e tantas outras coisas. Também agradeço ao meu amigo e parceiro Vitor Painelli, com quem também pude aprender bastante! Foi um imenso prazer conhecer vocês, meus amigos. Vamos manter isso daí!

Agradeço aos meus amigos que também fizeram parte da era dos “alagoas” na EEFE: Carlos Rafeall, Marcos e João. Obrigado pelos momentos de amizade, brigas e, algumas vezes, ausência de sobriedade, reclamando de todos e de tudo. Agradeço também ao Professor Adriano, responsável por inaugurar a era dos “alagoas”.

Não poderia deixar também de agradecer aos meus amigos vizinhos de quitinete, Danilog, Maurog, Daniel e Marcelo. O clichê de moradia onde ninguém se fala caiu por terra com a amizade de vocês. Foram ótimos três anos de convivência. E aproveito a ocasião para agradecer ao Seu Edson, que manteve o preço do aluguel e sempre foi muito prestativo, o melhor locador do Butantã. Não os conheço, mas também agradeço aos seguranças da rua Caetano Ruggiero. Foram três anos morando na região sem sofrer nenhum assalto, muito obrigado.

Agradeço aos meus colegas vizinhos de laboratório, em especial à Marilda, a quem recorri tantas vezes para conseguir dar prosseguimento aos experimentos. Também agradeço ao Rafael, Isa e ao Dr. Samuel. E não poderia deixar de ser grato às “meninas da frente”, Elaine, Margarete, Eliz e Nicole. Obrigado por toda assistência!

Agradeço também ao meu orientador, Guilherme Artioli, por ter apostado na minha capacidade, permitindo-me conduzir esse projeto, sendo o seu primeiro orientando de Doutorado. Foi um imenso prazer trabalhar contigo, Gui!

Agradeço também ao Professor Bruno Gualano, que num dos momentos mais conturbados desta caminhada, possibilitou a continuidade não só dos experimentos relacionados a este estudo, mas os de todos os outros colegas de laboratório.

Grato também ao Márcio, da secretaria pós-graduação, pelo excelente serviço prestado. Aos Professores Rômulo Bertuzzi e Emerdon Franchini, por cederem a estrutura do LADESP para a condução dos testes físicos e ao Edson Degaki, técnico do referido laboratório. Também agradeço aos Professores Valmor Tricoli, Hamilton Roschel e Carlos Ugrinowitsch por cederem a estrutura do laboratório de força para a condução das sessões de biópsias.

Agradeço imensamente a todos os voluntários que aceitaram fazer parte desse estudo. Em especial, agradeço a todos os atletas da equipe Gigantes de Rugby em cadeira de rodas, e à Ana Paula Ramkrapes, técnica dessa equipe e da seleção brasileira de Rugby em cadeira de rodas.

Agradeço à CAPES, que me concedeu a bolsa de estudos que possibilitou a minha estadia em São Paulo e à FAPESP, que financiou grande parte desse projeto.

EPÍGRAFE

*“Comovo-me em excesso, por natureza e por ofício. Acho medonho alguém viver sem
paixões”.*

Graciliano Ramos

RESUMO

NEMEZIO, K. **Papel da atividade muscular sobre a regulação da concentração de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina: um estudo em atletas com lesão medular.** 94 f. 2018. (Doutorado em Ciências) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.

INTRODUÇÃO: Atualmente ainda não está claro se a atividade muscular e o treinamento físico afetam a síntese de carnosina muscular (Mcar) em resposta à suplementação de beta-alanina. **OBJETIVO:** verificar o impacto da atividade e inatividade muscular sobre o conteúdo de carnosina muscular (Mcarn) e sobre o aumento de Mcarn em resposta à suplementação de beta-alanina e, adicionalmente, verificar seu efeito sobre a capacidade de realizar esforços de alta intensidade. **METHODS:** Dezesesseis homens treinados com lesão medular (LM) (escala ASIA: AIS A ou AIS B) foram divididos em 2 grupos: beta-alanina (BA) (N = 11) e placebo (PL) (N = 5). Amostras de biópsias musculares foram obtidas do músculo vasto lateral inativo e do deltoide ativo, antes e após 28 dias de suplementação com beta-alanina ($6.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$). Teste *t* independente foi aplicado para comparar a Mcar basal e a variação absoluta (PÓS - PRÉ) entre os músculos vasto lateral e deltoide. Um teste supramáximo de carga constante até a exaustão e um teste de Wingate de série única foram aplicados para verificar a capacidade de realizar esforços de alta intensidade. Análises por Modelo Misto foram aplicadas para comparar a Mcar, o tempo até a exaustão e os valores de potência pico intra e entre sujeitos. **RESULTADOS:** (média $\pm$ desvio padrão): a concentração basal de Mcar no vasto lateral foi significativamente maior que no deltoide ($32,0 \pm 12$ vs. $20,5 \pm 6,1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; $p = 0,02$). As variações absolutas na Mcar foram significativamente maiores no grupo BA em comparação com o PL, tanto para o vasto lateral (BA: $17,6 \pm 10,4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; PL: $2,5 \pm 2,3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; $p = 0,002$) como para o deltoide (BA: $15,7 \pm 6,8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; PL: $1,4 \pm 2,7 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; $p < 0,001$). As variações absolutas verificadas no vasto lateral e deltoide não foram diferentes entre si (vasto lateral: $17,6 \pm 10,4$; deltoide: $15,7 \pm 6,8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ do músculo seco; $p = 0,6$). Não houve efeito da suplementação sobre o tempo até exaustão e potência pico. **CONCLUSÃO:** a inatividade muscular crônica ocasionada por lesão medular, não afeta a Mcarn e também não interfere sobre o aumento de Mcarn em resposta à suplementação de BA. Estes resultados sugerem que a atividade muscular ou o estado de treinamento não influenciam a capacidade de síntese de Mcarn em resposta à suplementação de beta-alanina.

Palavras-chave: Recurso ergogênico; fadiga muscular; fibra muscular; biópsia muscular; paraplegia;

ABSTRACT

NEMEZIO, K. **Role of muscle activity on the regulation of carnosine concentration in response to beta-alanine supplementation: a study in athletes with spinal cord injury.** 2018. 94 p. (Doutorado em Ciências) Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.

BACKGROUND: it is currently unclear whether muscle activity and exercise training affect the ability of the skeletal muscle to synthesise carnosine in response to beta-alanine supplementation. **PURPOSE:** to study the impact of the extremes of muscle activity and inactivity on muscle carnosine content (M_{car}) and M_{car} loading in response to beta-alanine supplementation. **METHODS:** 16 trained male with spinal cord injury (SCI) (ASIA scale: AIS A or AIS B) were divided into 2 groups: beta-alanine (BA) (N = 11) and placebo (PL) (N = 5). Muscle biopsies samples were obtained from active deltoid and paralysed vastus lateralis at baseline and after 28 days of β -alanine supplementation ($6.4 \text{ g} \cdot \text{day}^{-1}$). Unpaired t-tests were applied to compare M_{car} at baseline and the absolute pre-post change in vastus lateralis and deltoid. Mixed model was used to compare M_{car} values within- and between-subjects. **RESULTS:** (mean $\pm$ SD): Baseline M_{car} concentration in vastus lateralis was significantly higher than in deltoid (32.0 ± 12 vs. $20.5 \pm 6.1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry muscle; $p=0.02$). Absolute changes in M_{car} was significantly higher in the BA group in comparison with PL for both vastus lateralis (BA: $17.6 \pm 10.4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry muscle; PL: $2.5 \pm 2.3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry muscle; $p=0.002$) and deltoid (BA: $15.7 \pm 6.8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry muscle; PL: $1.4 \pm 2.7 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry muscle; $p<0.001$). Absolute changes in M_{car} following BA supplementation between inactive vastus lateralis and active deltoid was not different (vastus lateralis: 17.6 ± 10.4 ; deltoid: $15.7 \pm 6.8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry muscle; $p=0.6$). **CONCLUSION:** chronic muscle inactivity due to paralysis in SCI does not affect M_{car} at baseline and does not affect M_{car} loading in response to BA supplementation. These results suggest that muscle activity or training status does not influence M_{car} synthesis capacity in response to beta-alanine supplementation.

Key words: Ergogenic aid; muscle fatigue; muscle fiber; muscle biopsy; paraplegia;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da beta-alanina e histidina (parte de cima) e dos principais dipeptídeos histidínicos: anserina, carnosina e ofidina (balenina).	20
Figura 2- Enzimas e transportadores atuantes no metabolismo da carnosina e seus aminoácidos constituintes. A carnosina proveniente de alimentos fonte (carnes) entra nos enterócitos através do PEPT1. No enterócito, sofre hidrólise pela ação da enzima CN2 (carnosinase 2). As proteínas ATB ⁰⁺ , TAUT e PAT1, transportam a beta-alanina do enterócitos para a corrente sanguínea. A carnosina não hidrolizada, por sua vez, segue através do PEPT1. No sangue, a CN1 (carnosinase 1) realiza a hidrólise dos resíduos de carnosina ainda íntegros.	22
Figura 3- Transportadores e enzimas atuantes no metabolismo da carnosina dentro do tecido muscular. O transporte de beta alanina do sangue para o tecido muscular é realizado pelas proteínas TauT e PAT1, enquanto a histidina é carregada pela PHT1. É possível que este último também realize o transporte de carnosina diretamente para o tecido muscular, embora as evidências sugiram que a mesma seja totalmente hidrolisada pela CN1 no fluxo sanguíneo..	23
Figura 4- Variação da concentração sanguínea de beta-alanina ao longo de seis horas após a ingestão de 40 mg·kg ⁻¹ de massa corporal de beta-alanina. Adaptado de Harris et al. (2006).	34
Figura 5- Variação da concentração sanguínea de beta-alanina ao longo de seis horas seguintes a ingestão do caldo de filé de frango (com equivalente, em beta-alanina, a 40 mg·kg ⁻¹ de massa corporal). Adaptado de Harris et al. (2006).	35
Figura 6- Variação da concentração sanguínea de β-alanina ao longo de nove horas durante a ingestão de três doses de beta-alanina (10 mg·kg ⁻¹ de massa corporal) nos momentos 0, 3 e 6 horas. As análises foram realizadas no 1º (▲) e no 15º (◇) dia de suplementação. Adaptado de Harris et al. (2006).	36
Figura 7- Aumento do conteúdo muscular de carnosina nos músculos gastrocnêmio e deltoide de atletas (ciclistas, caiaquistas e nadadores) e não atletas. Adaptado de Bex et al. (2014). ...	39
Figura 8- fluxograma de recrutamento.	45
Figura 9- Desenho experimental. INCREM.: teste incremental máximo; FAM: familiarização; BIOPs: biópsias de vasto lateral e deltoide; TCC: teste de carga constante até a exaustão; WING.: teste de Wingate de série única; ● - suplementação de beta-alanina (6.4 g·dia ⁻¹).	49
Figura 10- tabletes de beta-alanina e placebo utilizados neste estudo.	51
Figura 11- Sistema descartável de biopsia Bard® Max-core®.	54
Figura 12- Balança de fibra de quartzo. Painel A: vista geral da balança e seus componentes; painel B: capela de vidro, dentro da qual está a fibra de quartzo. Sua disposição lembra uma vara de pesca; painel C: fibras musculares dissecadas, vista através do microscópio óptico, com magnificação de 2 vezes; painel D: pesagem de uma fibra muscular vista através do microscópio acoplado à balança. Na imagem é possível observar a fibra muscular repousando sobre a fibra de quartzo. O peso da fibra muscular ocasiona uma deflexão da fibra de quartzo. Esse deslocamento é medido através da escala fixada na lente do microscópio.	55
Figura 13- caracterização das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) por meio de gel de poliacrilamida. Ref.: amostra de referência, composta por um extrato de músculo diafragma	

de rato selvagem. Os demais poços são extratos de fibras isoladas de músculo humano, especificamente do deltoide.....	56
Figura 14- cromatograma correspondente ao padrão de 50 µM de carnosina.	60
Figura 15- cromatograma correspondente ao padrão de 100 µM de carnosina.	60
Figura 16- cromatograma correspondente ao padrão de 500 µM de carnosina.	61
Figura 17- cromatograma correspondente ao padrão de 1000 µM de carnosina.	61
Figura 18- cromatograma correspondente ao padrão de 2500 µM de carnosina.	62
Figura 19- Determinação das proporções dos tipos de fibra. À direita, os gráficos gerados a partir das intensidades das bandas. No exemplo, uma amostra de músculo deltoide.....	62
Figura 20- Dados individuais referentes à concentração basal de carnosina nos músculos vasto lateral (VL) inativo e deltoide (DE) ativo. Painel A mostra os dados com <i>outliers</i> , os quais foram excluídos da análise apresentada no painel B.	66
Figura 21- Concentração de carnosina nos músculos deltoide (painel A) e vasto lateral (painel B) nos momentos PRE e POS suplementação. Legenda: o símbolo “*” indica diferença intra-grupo significativa em relação ao momento PRE; “#” indica diferença entre-grupos significativa em relação ao momento PRE; “&” indica diferença significativa entre-grupos em relação ao momento PÓS.	67
Figura 22- Dados individuais referentes à variação absoluta (Δ POS – PRE) da concentração de carnosina muscular. Legenda: BA – grupo beta alanina; PL: grupo placebo; VL: músculo vasto lateral; DE: músculo deltoide.....	68
Figura 23- Dados individuais referentes à variação relativa da concentração de carnosina muscular. Legenda: BA – grupo beta alanina; PL: grupo placebo; VL: músculo vasto lateral; DE: músculo deltoide.	68
Figura 24- Tempo até a exaustão (painel A) e trabalho total realizado (painel B) realizado antes (PRE) e após (POS) suplementação de beta-alanina.	72
Figura 25- Concentração de lactato nos grupos BA (painel A) e PL (painel B), antes (PRE) a após (POS) suplementação de beta-alanina. As medidas foram realizadas antes do teste de carga constante (repouso) e 3, 5 e 7 minutos após a tarefa.	73
Figura 26- Potência pico (painel A) e trabalho total realizado (painel B) realizado antes (PRE) e após (POS) suplementação de beta-alanina.	74
Figura 27- Concentração de lactato nos grupos BA (painel A) e PL (painel B), antes (PRE) a após (POS) suplementação de beta-alanina. As medidas foram realizadas no repouso e 3, 5 e 7 minutos após o teste de Wingate de série única.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características individuais da lesão e nível de condicionamento.....	47
Tabela 2- características gerais dos participantes.....	47
Tabela 3- Consumo alimentar estimado dos participantes.	64
Tabela 4- concentração de carnosina nos tipos de fibra I e IIx do músculo deltoide.....	69
Tabela 5- concentração de carnosina nos tipos de fibra IIa e IIa/IIx do músculo vasto lateral	70
Tabela 6- Variação absoluta da concentração de carnosina nos diferentes tipos fibras dos músculos vasto lateral e deltoide.	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Vladimir Gulevich e a descoberta da carnosina.....	17
2.2 Estrutura e distribuição dos dipeptídeos histidínicos no reino animal.....	18
2.3 Metabolismo da carnosina	20
2.3.1 Hidrólise e transporte	20
2.3.2 Síntese de carnosina	23
2.3.3 Síntese endógena de beta-alanina.....	24
2.3.4 Transaminação da beta-alanina	25
2.4 Papel da carnosina no tecido muscular	26
2.4.1 Regulação do retículo sarcoplasmático e sensibilidade ao cálcio	26
2.4.2 Carnosina como tampão intramuscular	27
2.5 Fatores determinantes do conteúdo muscular de carnosina.....	29
2.5.1 Tipo de fibra muscular	29
2.5.2 Treinamento físico.....	30
2.5.3 Dieta	32
2.6 Suplementação de beta-alanina.....	33
2.6.1 Primeiros testes com humanos: cinética de absorção e dosagens	34
2.6.2 Efeitos sobre o conteúdo muscular de carnosina	36
2.6.3 Efeito sobre o conteúdo muscular de carnosina em idosos.....	37
2.6.4 Efeito sobre o conteúdo de carnosina em atletas.....	38
2.7 Lesão medular.....	40
2.7.1 Impacto da perda de função motora sobre o tecido muscular	41
2.8 Considerações finais	42
3 OBJETIVO GERAL.....	44
3.1 Objetivos específicos	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Participantes.....	45
4.2 Desenho experimental.....	48
4.3. Teste incremental máximo	49

4.4 Teste de carga constante até a exaustão e teste de Wingate.....	50
4.5 Protocolo de suplementação, verificação da aderência, vendamento e efeitos colaterais	50
4.6 Análise do consumo alimentar	51
4.7 Biopsias musculares.....	52
4.7.1 Biópsia muscular de vasto lateral por agulha de sucção	52
4.7.2 Biópsia muscular de deltoide por microagulha e por agulha de sucção.....	53
4.8 Determinação da concentração de carnosina em fibras individuais	54
4.8.1 Dissecção e pesagem das fibras.....	54
4.8.2 Determinação do tipo de fibra	55
4.8.3 Análise da concentração de carnosina em fibras individuais	56
4.9 Determinação da concentração intramuscular total de carnosina	58
4.10 Determinação das proporções dos tipos de fibra	62
4.11 Tratamento estatístico	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Consumo alimentar	64
5.2 Proporções dos tipos de fibra nos músculos vasto lateral e deltoide	64
5.4 Concentração basal de carnosina muscular.....	65
5.5 Efeito da suplementação sobre a concentração de carnosina muscular	66
5.6 Variação absoluta da concentração de carnosina muscular	67
5.7 Efeito da suplementação sobre a concentração de carnosina por tipo de fibra.....	69
5.8 Testes de capacidade.....	71
5.8.1 Teste de carga constante.....	71
5.8.2 Teste de Wingate com série única.....	73
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

A carnosina (β -alanyl-L-histidina) é um dipeptídeo constituído pelos aminoácidos beta-alanina e L-histidina. Ela está presente em altas concentrações principalmente na musculatura esquelética de animais (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013; DOLAN et al., 2018), mas pode ser também encontrada em menor quantidade noutras células excitáveis, como, por exemplo, as que compõem o músculo cardíaco (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013; BLANCQUAERT et al., 2016) e o sistema nervoso (KISH, PERRY e HANSEN, 1979). Em humanos, a concentração de carnosina muscular corresponde a cerca de $20 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de músculo seco, podendo variar em função de fatores como a idade, o gênero, o condicionamento físico e a modalidade esportiva praticada, no caso de atletas (PARKHOUSE et al., 1985; TALLON et al., 2005; KIM, 2009; DEL FAVERO et al., 2012). Estudos conduzidos desde os primeiros anos após descoberta da carnosina têm atribuído a esta molécula diversas funções fisiológicas, algumas das quais: ação antiglicante, regulação do retículo sarcoplasmático (estimulando a liberação de Ca^{+}), aumento da sensibilidade ao Ca^{+} no aparato contrátil e ação antioxidante (SEVERIN, KIRZON e KAFTANOVA, 1953; BEGUM, CUNLIFFE e LEVERITT, 2005; BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013; CARVALHO et al., 2018; DOLAN et al., 2018). Com mais destaque, no entanto, evidências apontam a ação tamponante da carnosina como principal papel fisiológico desempenhado no tecido muscular (BEGUM, CUNLIFFE e LEVERITT, 2005; BUDZEN e RYMASZEWSKA, 2013; SALE et al., 2013; DOLAN et al., 2018). Tal propriedade se deve à constante de dissociação iônica (Pka) do grupo imidazólico da molécula, calculado em 6.8, valor ideal para atuar na faixa de variação do pH intramuscular muscular que engloba os valores de repouso ($\text{pH} = 7.1$) e exaustão ($\text{pH} = 6.5$) após o exercício intenso (SMITH, 1938). Portanto, elevadas concentrações de carnosina estão associadas a maior capacidade de resistir a esforços de alta intensidade e que demandam elevada produção de energia por via glicolítica anaeróbia (HOBSON et al., 2012; BELLINGER, 2014; SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017).

Além de evidências produzidas através de experimentos *in vitro* (SEVERIN, KIRZON e KAFTANOVA, 1953; BEGUM, CUNLIFFE e LEVERITT, 2005), evidências indiretas corroboram o relevante papel da carnosina na regulação do pH intramuscular. Dentre elas, podemos destacar as maiores concentrações do dipeptídeo encontradas no músculo de atletas velocistas em comparação com atletas de endurance e controles não treinados (PARKHOUSE et al., 1985), bem como os elevados valores encontrados em fibras do tipo II ($23.2 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de músculo seco), até duas vezes maiores em relação às fibras oxidativas do

tipo I ($10.5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco) (HARRIS, 1998; KENDRICK et al., 2009; SALLES PAINELLI et al., 2018). Cabe dizer que esforços de alta intensidade demandam altas taxas de transferência de energia por vias anaeróbias, processo este que gera grande acúmulo de íons H^+ e, portanto, redução do pH muscular. A queda no pH intramuscular está, por sua vez, implicada no desenvolvimento da fadiga periférica, pois resulta em inibição de enzimas atuantes no sistema glicolítico e de processos contráteis ao nível do sarcômero (ROBERGS, GHIASVAND e PARKER, 2004). Nesse caso, um sistema tampão eficiente, otimizado pela presença de carnosina em maiores concentrações, caracterizaria uma adaptação no sentido de elevar a capacidade de realizar esforços de alta intensidade.

Esse importante papel atribuído à carnosina despertou o interesse de pesquisadores em buscar estratégias que promovessem aumento de suas concentrações musculares acima dos valores basais. Por ser encontrada em alimentos de origem animal e que, portanto, fazem parte da dieta onívora, a carnosina pode ser obtida por meio da dieta. No trato gastrointestinal, a ação da enzima carnosinase hidrolisa a carnosina em seus dois aminoácidos constituintes, a saber, beta-alanina e L-histidina (SADIKALI, DARWISH e WATSON, 1975), os quais podem ser captados pelas células musculares a partir da corrente sanguínea. Dentro da célula muscular, a enzima carnosina sintase reconhece a beta-alanina e a L-histidina, realizando a síntese de carnosina (DROZAK et al., 2010). O uso de suplementos a base de beta-alanina e L-histidina na dieta de equinos, em experimento realizado por Dunnett e Harris (DUNNETT e HARRIS, 1999), tornou-se uma das primeiras evidências a respeito da possibilidade de elevar o conteúdo de carnosina através da ingestão de suplementos e de aumentar a capacidade tamponante das fibras musculares por meio de manipulações dietéticas. O mesmo grupo do Prof. Roger Harris também verificou, em posterior estudo com humanos, que a síntese de carnosina era dependente da biodisponibilidade de beta-alanina, uma vez que a presença deste aminoácido na corrente sanguínea é bastante baixa em comparação à L-histidina (HARRIS et al., 2006). Além disso, a carnosina sintase apresenta maior afinidade à L-histidina ($K_m \sim 16 \mu\text{M}$) (HORINISHI, GRILLO e MARGOLIS, 1978) do que à beta-alanina ($K_m \sim 1\text{-}2.3 \text{ mM}$) (NG e MARSHALL, 1978), tornando a disponibilidade deste último um fator limitante à taxa de síntese de carnosina (HARRIS et al., 2006). A partir de então, estudos envolvendo suplementação de beta-alanina e seus efeitos sobre o conteúdo de carnosina, capacidade física e desempenho, passaram a crescer substancialmente nos últimos anos (ARTIOLI et al., 2010; CULBERTSON et al., 2010; DERAIVE et al., 2010; SALE, SAUNDERS e HARRIS, 2010; HARRIS et al., 2012; HOBSON

et al., 2012; STELLINGWERFF, DECOMBAZ, et al., 2012; BELLINGER, 2014; KO et al., 2014; QUESNELE et al., 2014; SAUNDERS, V, et al., 2017).

A despeito da eficácia da suplementação de beta-alanina em promover aumentos das concentrações musculares de carnosina, questões concernentes a sua eficiência ainda precisam ser melhor investigadas, uma vez que apenas 3 a 6% do conteúdo total de beta-alanina ingerido é captado para a síntese de carnosina no tecido muscular, segundo demonstraram Stegen et al. (2014) e Saunders et al. (2017). Nesse sentido, evidências parecem sugerir que músculos cronicamente treinados poderiam responder melhor à suplementação de beta-alanina, ou que o próprio treinamento físico poderia potencializar as respostas de síntese de carnosina muscular quando da suplementação de beta-alanina. Bex et al. (2014), por exemplo, mostraram que músculos cronicamente treinados de atletas expressaram um aumento de 77,9% nas concentrações de carnosina após 28 dias de suplementação de beta-alanina ($6.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$), enquanto músculos não treinados desses mesmos atletas e de pessoas fisicamente ativas exibiram aumento relativo de apenas 42,9%. Posteriormente, os mesmo autores mostraram que indivíduos submetidos ao treinamento de alta intensidade com baixo volume, bem como ao treino de baixa intensidade e com alto volume, obtiveram maiores aumentos de carnosina muscular em resposta à suplementação, em comparação com indivíduos igualmente suplementados, porém não submetidos a um protocolo de treinamento (BEX et al., 2015). Por outro lado, Kendrick et al. (2009) não verificaram qualquer vantagem do treinamento isocínético de alta intensidade sobre a capacidade de síntese de carnosina muscular em resposta à suplementação de beta-alanina. De Salles Painelli et al. (2014) também mostraram que atletas e homens fisicamente ativos melhoraram suas capacidades anaeróbias em magnitudes semelhantes após suplementarem com beta-alanina, o que indiretamente sugere a mesma resposta em termos de aumento de carnosina muscular, independentemente do condicionamento físico. Também vale salientar que no estudo de Kendrick et al. (2009) os autores utilizaram a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) para quantificar carnosina muscular total e também por tipo de fibra, método considerado padrão ouro para esse tipo de análise. O grupo de Bex nas duas ocasiões (BEX et al., 2014; BEX et al., 2015), entretanto, optaram pela técnica de ressonância magnética que, embora caracterize um meio não invasivo, apresenta baixos índices de validade, conforme dados ainda não publicados produzidos em nosso laboratório. Portanto, dado o conjunto limitado de estudos a esse respeito, bem como as limitações apresentadas pelos mesmos, não é possível saber se músculos treinados são mais eficientes em armazenar

carnosina, seja em resposta a uma dieta onívora ou em resposta à suplementação de beta-alanina.

A fim de solucionar essa questão, estudamos a suplementação de beta-alanina em um modelo extremo, qual seja, atletas com lesão medular. Nessas condições, indivíduos acometidos por para- ou tetraplegia (sem comprometimento motor de membros superiores), utilizam-se apenas dos membros superiores para se locomover, realizar as tarefas do dia-a-dia, bem como as ações exigidas no esporte praticado. Portanto, seria possível verificar, no mesmo indivíduo submetido a um protocolo de suplementação, a resposta de um músculo cronicamente inativo, a exemplo do vasto lateral e de outro cronicamente ativo, a exemplo do deltoide. Entretanto, no caso da musculatura inativa por ocasião da lesão medular, a absoluta predominância de fibras do tipo II (GRIMBY et al., 1976; SCELSI et al., 1982) passa a ser uma característica inerente a esse tipo de condição. Uma vez que o conteúdo de carnosina difere entre os tipos de fibra, a distribuição dos tipos de fibra torna-se uma forte variável interveniente. Portanto, para esse tipo de comparação, a análise do conteúdo de carnosina por tipo de fibra se faz absolutamente necessária. Além disso, o conteúdo de carnosina em músculos cronicamente inativos, como no caso do vasto lateral em pessoas acometidas por lesão medular, nunca fora verificado antes. Pelo fato da carnosina estar associada à capacidade física em tarefas de alta intensidade, seria interessante verificar os efeitos da inatividade crônica sobre o conteúdo muscular de carnosina.

Em se tratando de capacidade física, atletas com lesão medular acompanhada por perda de função motora nos membros inferiores dependem exclusivamente dos membros superiores para a realização das tarefas em suas respectivas modalidades. Soma-se a isso o fato de que os músculos dos membros superiores parecem ser menos eficientes na transferência de energia pelas vias aeróbias (CALBET, 2005), o que, em tese, aumentaria a importância da produção de energia anaeróbia durante a realização de esforço com membros superiores. Dessa forma, um aumento das concentrações intramusculares de carnosina induzido pela suplementação de beta-alanina poderia promover significativos benefícios em termos de desempenho para este grupo específico de atletas. Em favor disso, evidências produzidas no nosso laboratório mostraram que membros superiores parecem ser mais responsivos, em termos de ganho de capacidade, após suplementação com substâncias que aumentam a capacidade tamponante, como o bicarbonato de sódio e a beta-alanina (TOBIAS et al., 2013).

Diante do exposto, o presente estudo tem como principais objetivos: 1) verificar o efeito da inatividade crônica sobre o conteúdo muscular de carnosina, para tanto, obtendo

amostras de tecido muscular do músculo vasto lateral paralisado a serem comparadas com amostras do músculo deltoide ativo dos mesmos indivíduos, no período basal; 2) verificar se o aumento de carnosina muscular em resposta à suplementação de beta-alanina difere entre músculos inativos e ativos; 3) verificar o efeito da suplementação sobre a capacidade de realizar esforço de alta intensidade com membros superiores. Nossa hipótese é a de que o conteúdo de carnosina no músculo cronicamente inativo, a despeito da predominância de fibras do tipo II, esteja reduzido em função da ausência de estímulo contrátil. Da mesma forma, é esperado que a magnitude de resposta em termos de aumento de carnosina muscular, seja significativamente menor em relação à musculatura ativa, em resposta à suplementação de beta-alanina. Por outro lado, o aumento de carnosina muscular esperado para os membros superiores pode se traduzir em melhora na capacidade de alta intensidade dos membros superiores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vladimir Gulevich e a descoberta da carnosina

Vladimir era um bioquímico de origem russa e soviética que iniciou seus estudos de pós graduação já no final do século 19, quando ingressou na Universidade do Estado de Moscou. Tido como um jovem promissor no campo da pesquisa, interessou-se por investigar dois compostos químicos que teriam uma possível relação com o desencadeamento de distúrbios neurais. Após alguns anos de trabalho nas investigações Vladimir concluiu que os compostos, conhecidos como neurina e colina, na verdade possuíam estruturas idênticas e pareciam se acumular nos tecidos cerebrais como resultado de uma disfunção no metabolismo desse composto. Sua descoberta lhe rendeu uma honrosa premiação e a oportunidade de, posteriormente, dar seguimento a sua carreira como pesquisador numa das mais conceituadas escolas de bioquímica da época, a qual recebeu o nome de um importante bioquímico chamado Justus Liebig. Vladimir Gulevitch ingressara justamente no laboratório então liderado por um dos ex-alunos de Liebig, chamado Albrecht Kossel. Seus esforços se concentraram na tarefa de adquirir técnicas de quantificação utilizando, como objeto de estudo, um substrato conhecido com extrato de carne Liebig, constituído por diversos compostos ainda desconhecidos para a comunidade científica daquela época. Vladimir concluiu seu ciclo de estudos no laboratório de Kossel e retornou para a Rússia, onde acumulou as funções de professor e pesquisador. Na ocasião, continuou a explorar o extrato de carne Liebig, agora com o auxílio dos seus alunos de pós-graduação. Durante a condução dos experimentos, eles observaram que a quantidade de nitrogênio orgânico não-proteico presente no extrato de Liebig era significativamente maior do que a quantidade de nitrogênio proteico. Gulevitch verificou a presença desses mesmos compostos de nitrogênio orgânico não-proteico em tecidos musculares de animais. Dois desses compostos, até o momento desconhecidos, se destacavam por se apresentarem em concentrações significativamente maiores em relação aos demais. Assim, Vladimir suspeitou que tais compostos poderiam exercer importantes funções na composição do tecido muscular e os batizou com os nomes de carnitina e carnosina. Nos anos seguintes à descoberta desses compostos, diversos experimentos corroboraram a suspeita de Vladimir. À carnosina, especialmente, são atribuídas diversas funções, com destaque para a sua importante atuação no equilíbrio ácido-base intramuscular, além das potenciais propriedades antioxidante e antiglicante (ARTIOLI et al., 2010; HARRIS et al., 2012; BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013; SALE et al., 2013).

Ao longo desses cem anos desde a descoberta, diversos aspectos da carnosina foram estudados. Nesta revisão serão discutidos alguns deles: a estrutura química da carnosina (e dos seus compostos análogos), distribuição no reino animal e as principais funções atribuídas. Com ênfase no seu papel como tampão intramuscular, também serão abordados aspectos relacionados às questões nutricionais que influenciam diretamente o conteúdo intramuscular de carnosina. Os detalhes referentes a história da descoberta da carnosina foram relatados por Boldyrev (2012).

2.2 Estrutura e distribuição dos dipeptídeos histidínicos no reino animal

Embora tenha sido descoberta em 1900, apenas no ano seguinte a estrutura química da carnosina foi elucidada. Tratava-se de um dipeptídeo formado a partir da condensação de dois aminoácidos não-essencial e essencial, respectivamente: beta-alanina e L-histidina (BOLDYREV, 2012). A partir de 1929, outros compostos semelhantes a carnosina também foram descobertos mediante análise de amostras de tecido muscular de algumas espécies (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013). Pela semelhança estrutural, essas substâncias foram classificadas como análogos metilados da carnosina (os compostos análogos possuem um grupo metil atrelado ao anel imidazólico). Ainda, pelo fato comum de possuírem a histidina ligada a outro aminoácido, também são conhecidos como dipeptídeos histidínicos.

O primeiro análogo da carnosina a ser descoberto foi a anserina (em referência a *anser*, ganso em latim), encontrada em amostras de tecido muscular de gansos. A diferença estrutural entre a carnosina e a anserina se dá pela presença de um grupo metil no anel imidazólico da molécula, especificamente no resíduo histidínico (figura 1). Posteriormente, um outro composto metilado foi encontrado em tecidos musculares de baleias e golfinhos, o qual foi primeiramente denominado como balenina (em referência à baleia) e, posteriormente, ofidina (em referência a *dolphin*, golfinho em inglês) (BOLDYREV, 2012). Até o momento a literatura descreve cerca de 10 compostos análogos da carnosina, porém, como será visto adiante, os compostos metilados mais frequentemente observados e considerados de maior relevância fisiológica são a ofidina e a anserina.

O tecido muscular de algumas espécies pode conter os três compostos, é o caso do porco, do búfalo, do camelo e do cavalo, por exemplo), sempre em concentrações variadas. As atuais evidências indicam que as baleias são as espécies que exibem as maiores concentrações musculares de dipeptídeos histidínicos, com destaque para a ofidina (balenina), que aparece

somada a uma pequena fração de carnosina. O ser humano e o macaco pata, ao que parece, são os únicos mamíferos que apresentam apenas carnosina na composição do tecido muscular. Além destes, outras poucas espécies, como alguns anfíbios (rã e sapo), a tartaruga marinha e o esturjão, apresentam exclusivamente carnosina no tecido muscular (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013).

Em seres humanos, especula-se que a maior parte do total de carnosina distribuída pelos diferentes tecidos se encontra no músculo esquelético (cerca de 99% do conteúdo absoluto) (BOLDYREV, 2007). O restante está distribuído no bulbo olfatório, que também apresenta elevadas concentrações, e em menor proporção, noutras partes do sistema nervoso (KISH, PERRY e HANSEN, 1979). Além da carnosina, um outro dipeptídeo encontrado em tecidos do sistema nervoso humano é a homocarnosina. Este difere da carnosina pelo fato da histidina estar ligada a uma molécula de ácido gama-amino-butírico (GABA), que por sua vez é estruturalmente muito parecida com a beta-alanina e atua como um importante neurotransmissor (SNYDER, 1980). Por este motivo, acredita-se que a homocarnosina, a exemplo do GABA isolado, exerça algum papel relevante no funcionamento do sistema nervoso, embora investigações neste sentido ainda sejam escassas.

Em resumo, dipeptídeos histidínicos ocorrem apenas no reino animal. A carnosina, a balenina (ofidina) e a anserina são os dipeptídeos histidínicos mais comuns e, dependendo da espécie, a concentração destes compostos pode ser bastante expressiva no tecido muscular. Seres marinhos como a baleia, por exemplo, apresentam altas concentrações de balenina, o que corrobora uma das funções mais bem esclarecidas desses compostos: sua ação como tampão intramuscular.

Figura 1- Estrutura química da beta-alanina e histidina (parte de cima) e dos principais dipeptídeos histidínicos: anserina, carnosina e ofidina (balenina).

2.3 Metabolismo da carnosina

2.3.1 Hidrólise e transporte

A carnosina e compostos análogos podem ser encontrados em uma vasta gama de espécies marinhas e terrestres e, ao que as evidências indicam, não há vestígios de dipeptídeos histidínicos em vegetais. Portanto, tratam-se de compostos abundantemente presentes apenas em dietas onívoras. Estima-se que o consumo médio de carnosina por humanos varia de 50 a cerca de 4000 mg diárias, respectivamente partindo de uma dieta com baixo a elevado consumo de carnes (ABE, 2000).

Em humanos, diferente de outras espécies, a carnosina ingerida através da dieta parece não chegar até os tecidos alvos em sua forma íntegra, embora alguns pesquisas sugiram a ocorrência desta última possibilidade (PARK, VOLPE e DECKER, 2005). A maior parte da carnosina encontrada nos tecidos, portanto, parece ser resultante da síntese precedida da captação dos seus aminoácidos constituintes (beta-alanina e L-histidina) e posterior ação da enzima carnosina-sintase (HARRIS et al., 2006).

A hidrólise da carnosina e análogos se deve a ação de enzimas não-específicas para este fim, as quais são conhecidas como carnosinases. A carnosinase foi descoberta em 1949

pelos pesquisadores Hanson e Smith (HANSON e SMITH, 1949) e, desde então, foram identificadas duas isoformas da enzima, sendo a carnosinase 1 (CN1) encontrada no plasma sanguíneo e a CN2 exercendo ação no citoplasma de células teciduais (LENNEY, 1990; TEUFEL et al., 2003). Deste modo, a carnosina que chega ao intestino após a ingestão de alimentos que contém o composto, é hidrolisada pela ação da CN2, presente na mucosa jejunal (SADIKALI, DARWISH e WATSON, 1975). A fração de carnosina que ainda permanece intacta, atravessa os enterócitos e, prontamente, sofre ação da CN1 sérica, promovendo aumento das concentrações plasmáticas de beta-alanina e histidina (HARRIS et al., 2006). Apesar da crença de que algum vestígio de carnosina permaneça intacta por algumas horas na corrente sanguínea, nenhuma das técnicas até então utilizadas, foram capazes de detectar o composto em amostras de sangue colhidas momentos após a ingestão de alimentos ricos em dipeptídeos histidínicos (HARRIS et al., 2006).

O transporte da carnosina que ainda permanece intacta no jejuno se deve à mediação de transportadores dipeptídicos, dos quais o mais importante para o metabolismo da carnosina é o PEPT1 (GARDNER et al., 1991; BAUCHART et al., 2007). Estudos sugerem que sua ação é dependente de H^+ , apresentando baixa afinidade e alta capacidade. Portanto, o PEPT1 é responsável pelo transporte de centenas de dipeptídeos, além da carnosina, e milhares de tripeptídeos, ficando de fora aminoácidos simples (YAMASHITA et al., 1997). Assim, além da sua importância para o metabolismo da carnosina, o PEPT1 é considerado, de maneira geral, o transportador de maior importância no processo de absorção de nutrientes.

A beta-alanina e histidina resultantes da hidrólise ainda no jejuno, precisam ser transportadas através de outras proteínas que não a PEPT1. Para a beta-alanina são conhecidas três delas: TauT, PAT1 e ATB^{0,+} (NAVAB et al., 1984). A última tem sido considerada a mais importante para a tarefa, realizando a passagem da beta-alanina juntamente com íons Cl^- e Na^+ (ANDERSON, GANAPATHY e THWAITES, 2008).

Do sangue para os tecidos periféricos, o transporte de carnosina parece ser mediado por outra proteína transportadora, a PHT1. Apesar de não haver evidências consistentes a respeito da captação de carnosina intacta nestes tecidos, estudos em amostras de tecido muscular esquelético de humanos, revelaram alta expressão de genes codificadores da PHT1, sugerindo a presença desses transportadores e a possibilidade da carnosina ser captada integralmente para o interior das células musculares (EVERAERT et al., 2013).

As proteínas transportadoras TauT e PAT1, por sua vez, parecem ser responsáveis pela captação de beta-alanina pelo músculo, como sugerem Everaert e colaboradores em estudo

que reportou expressão de genes codificadores dessas proteínas em tecido muscular de humanos (EVERAERT et al., 2013). Vale salientar que a beta-alanina concorre com a taurina no processo de entrada no tecido muscular, uma vez que a TauT realiza o transporte de ambas (MIYAMOTO et al., 1990). A L-histidina parece ser transportada pela mesma proteína que supostamente realiza o transporte de carnosina em roedores, a PHT1, a qual também se mostrou expressa no tecido muscular de humanos (EVERAERT et al., 2013). A especificidade e localização de cada transportador relacionado ao metabolismo da carnosina, pode ser visualizado nas figuras 2 e 3.

Figura 2- Enzimas e transportadores atuantes no metabolismo da carnosina e seus aminoácidos constituintes. A carnosina proveniente de alimentos fonte (carnes) entra nos enterócitos através do **PEPT1**. No enterócito, sofre hidrólise pela ação da enzima **CN2** (carnosinase 2). As proteínas ATB^{0+} , **TAUT** e **PAT1**, transportam a beta-alanina do enterócitos para a corrente sanguínea. A carnosina não hidrolizada, por sua vez, segue através do **PEPT1**. No sangue, a **CN1** (carnosinase 1) realiza a hidrólise dos resíduos de carnosina ainda íntegros.

Uma vez no tecido alvo, os aminoácidos constituintes precisam ser condensados para então formar a molécula de carnosina. Este processo de síntese é discutido no próximo tópico.

Figura 3- Transportadores e enzimas atuantes no metabolismo da carnosina dentro do tecido muscular. O transporte de beta alanina do sangue para o tecido muscular é realizado pelas proteínas **TauT** e **PAT1**, enquanto a histidina é carregada pela **PHT1**. É possível que este último também realize o transporte de carnosina diretamente para o tecido muscular, embora as evidências sugiram que a mesma seja totalmente hidrolisada pela CN1 no fluxo sanguíneo.

2.3.2 Síntese de carnosina

A síntese de carnosina no tecido muscular esquelético, bem como nos demais locais de sua ocorrência (bulbo olfatório e tecido muscular cardíaco) é realizada pela ação da enzima Carnosina Sintase (CNS). A CNS foi descoberta em 1959 pelos pesquisadores Kalyanear e Meister, durante ensaios *in-vitro* realizados em tecido muscular de frangos. Na ocasião eles verificaram que a síntese de carnosina ocorria na presença Mg^{2+} e ATP, o que recentemente foi confirmado por Drozac Drozak et al. (2010), que adicionalmente reportaram a posterior formação de ADP e Pi resultantes da reação.

Embora a síntese de carnosina obrigatoriamente exija a junção da beta-alanina a uma molécula de histidina, a biodisponibilidade de beta-alanina é particularmente importante. Isto ocorre devido a diferença de afinidade existente entre a beta-alanina e histidina em relação à enzima CNS, medida através da Constante de Michaelis (K_m). Enquanto a K_m da histidina em relação à CNS é de apenas $\sim 16\mu M$ (HORINISHI, GRILLO e MARGOLIS, 1978), a beta-alanina está entre $\sim 1,2$ a 3 mM (HORINISHI, GRILLO e MARGOLIS, 1978). Isto significa que são necessários cerca de mil vezes mais beta-alanina do que histidina para que a síntese de

carnosina aconteça com eficiência. De fato, o aumento da biodisponibilidade de beta-alanina através da suplementação é comprovadamente eficaz no sentido de promover aumento do conteúdo muscular de carnosina (HARRIS et al., 2006). Entretanto, para alcançar este resultado, é necessária a ingestão de doses elevadas do aminoácido (em média, 6,4 g/dia). Estes dados justificam porque a suplementação de beta-alanina tem se mostrado um meio eficaz quando se pretende promover aumento do conteúdo de carnosina. Essa questão é tratada no tópico 3.4.

2.3.3 Síntese endógena de beta-alanina

A beta-alanina é considerada um aminoácido não essencial, pois além da possibilidade de ser adquirida através de fontes exógenas, o composto pode ser sintetizado no fígado (MATTHEWS e TRAUT, 1987) e, provavelmente, em outros órgãos como os rins (DEN, ROBINSON e COON, 1959), cérebro e indiretamente no intestino.

A síntese de beta-alanina no fígado ocorre em conjunto com a via de degradação da uracila, cujo produto final é o CO_2 . Entretanto, especialistas tem sugerido que o principal objetivo desta via é, de fato, a síntese de beta-alanina, uma vez que a taxa de conversão do substrato em CO_2 é bastante baixa (FRITZSON e PIHL, 1957). Além desta via, também tem sido proposto que o fígado sintetiza beta-alanina a partir de reação mediada pela enzima beta-alanina piruvato transaminase, que converte oxopropionato a piruvato e beta-alanina (BAKER et al., 2004). A mesma reação também parece ocorrer no cérebro e nos rins de ratos e porcos, uma vez que estudos anteriores reportaram expressão do gene codificador da enzima beta-alanina piruvato transaminase nesses animais (DEN, ROBINSON e COON, 1959; HAYAISHI et al., 1961). Em humanos, a expressão desses genes foi relatada somente em amostras do fígado (BAKER et al., 2004).

Uma outra via alternativa da produção endógena de beta-alanina parece ocorrer no próprio intestino. Entretanto, a reação é mediada por uma enzima cujos genes codificadores são expressos em bactérias *E. Coli*, que fazem parte da biota intestinal. Tal enzima, denominada aspartato descarboxilase, converte o aspartato a beta-alanina e CO_2 (WILLIAMSON e BROWN, 1979).

Embora evidências indiquem diversas vias para a produção endógena de beta-alanina, o conteúdo resultante parece irrisório. Em condições normais, a quantidade de beta-alanina sérica está muito abaixo dos valores detectáveis (HARRIS et al., 2006), o que sugere

uma baixa biodisponibilidade e a importância do consumo de fontes exógenas do aminoácido. Uma das principais causas da baixa biodisponibilidade de beta-alanina parece ser a transaminação desse substrato, assunto tratado no próximo tópico.

2.3.4 Transaminação da beta-alanina

Assim como ocorre a síntese endógena, havia a crença de que o inverso também era verdadeiro e importava para a manutenção da homeostase de beta-alanina e dipeptídeos histidínicos. Em 1955, Pihl e Fritzson demonstram indiretamente (PIHL e FRITZSON, 1955), a partir da injeção de beta-alanina com carbono marcado em ratos, que cerca de 90% do conteúdo era expirado na forma de CO₂ após um período de 5 horas seguintes a aplicação. Mais recentemente, Stegen e colaboradores (STEGEN et al., 2013), ao suplementar humanos com beta-alanina, estimaram que apenas 3 a 6 % do conteúdo total ingerido, era sintetizado em carnosina no tecido muscular esquelético. Em contrapartida, os autores reportaram uma alta taxa de retenção do substrato, uma vez que apenas 2% foi excretada pela urina. Esses resultados mostravam claramente a possibilidade de existirem outras vias metabólicas para a beta-alanina.

Recentemente, um grupo de pesquisadores Belgas finalmente descreveu a via metabólica pela qual a beta-alanina é degradada (BLANCQUAERT et al., 2016), que resulta no controle da síntese de carnosina e explica a baixa eficiência dos protocolos de suplementação. Desde 1990, haviam evidências indiretas de que a transaminação da beta-alanina ocorria no fígado e nos rins (TAMAKI et al., 1990; KONTANI et al., 1998; ITO et al., 2001). A partir dos estudos de Blancquaert e colaboradores, foi visto que a degradação também parece ocorrer no cérebro e, em menor magnitude, no tecido muscular esquelético e cardíaco.

A transaminação é possibilitada por intermédio de duas enzimas mitocondriais, a beta-alanina-2-oxoglutarato transaminase (GABA-T) e beta-alanina piruvato transaminase (AGXT2). A primeira também é responsável pela transaminação do GABA, molécula de estrutura semelhante a beta-alanina e importante neurotransmissor. De fato, o cérebro de roedores apresenta alta expressão apenas para esta enzima e parece ser isento de AGXT2. No processo de reação, as enzimas promovem a remoção do grupo amina da molécula de beta-alanina, resultando em um substrato que segue para ser oxidado no ciclo de Krebs, o malonato-semi-aldeído (MAS).

Os rins e o fígado parecem ser os principais órgãos responsáveis pela transaminação da beta-alanina, considerando a alta expressão de enzimas transaminadoras encontrada nesses

locais. No tecido muscular esquelético, por outro lado, a carnosina-sintase (CARNS) se encontra altamente expressa, ao passo que a expressão de AGXT2 e GABA-T parece irrisória. Assim, enquanto rins e fígado são os principais órgãos de degradação de beta-alanina, o tecido muscular esquelético parece ser o principal local de síntese. Outrossim, embora o tecido muscular componha cerca de metade da massa corporal de um indivíduo, esses dados sugerem que a via prioritária do metabolismo da beta-alanina é transaminação, em vez da síntese de dipeptídeos.

2.4 Papel da carnosina no tecido muscular

Tendo sido descoberta primariamente em amostras de carne, acreditava-se que a carnosina deveria exercer um importante papel no tecido muscular. Uma das primeiras teorias elaboradas propôs a existência de fosfatos de alta energia ligados a carnosina, possivelmente a fosforil-carnosina (GOODALL, 1956). Entretanto, esta hipótese fora descartada pelo fato do substrato, bem como a suposta enzima de degradação, nunca terem sido identificadas. Em vez disso, evidências indicavam a carnosina como um provável otimizador do processo contrátil (SEVERIN, KIRZON e KAFTANOVA, 1953), além de demonstrar capacidade antiglicante e antioxidante (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013). Todavia, o destaque dentre as funções propostas para a carnosina tem sido sua notável atuação como tamponante intramuscular, regulando a homeostase do tecido durante a contração.

2.4.1 Regulação do retículo sarcoplasmático e sensibilidade ao cálcio

Severin, um dos alunos de Vladimir, foi o primeiro pesquisador a produzir evidências que sugeriam a atuação da carnosina e anserina no processo de contração muscular (SEVERIN, KIRZON e KAFTANOVA, 1953). Juntamente com mais três colegas, Severin verificou que a adição de 10 mM de carnosina e anserina em músculo de rãs estimulados continuamente de maneira rítmica, impedia a interrupção das contrações, que normalmente ocorria sem a presença dos dipeptídeos. Portanto, os pesquisadores deduziram que os substratos exerciam alguma função no aparato contrátil, impedindo ou atrasando o processo de fadiga que leva a interrupção das contrações. Este acontecimento ficou conhecido como o “fenômeno de Severin”.

Mais tarde, Batrukova e Rubtsov (BATRUKOVA e RUBTSOV, 1997) buscaram esclarecer as causas do fenômeno de Severin. Na ocasião, os pesquisadores observaram que o

retículo sarcoplasmático (RS) extraído de músculo esquelético de coelhos, parecia ser estimulado quando na presença de carnosina/anserina, liberando íons de Ca^{2+} . A saber, o Ca^{2+} exerce uma importante função no processo de contração muscular, ligando-se a troponina para permitir o acoplamento das pontes cruzadas aos filamentos de actina (GORDON, HOMSHER e REGNIER, 2000). O RS, por sua vez, atua como uma vesícula armazenadora de Ca^{2+} , a qual é regulada pela estimulação dos receptores de rianodina (RyRs) (GORDON, HOMSHER e REGNIER, 2000). Embora esses resultados tenham sido contestados por Dutka e Lamb Dutka e Lamb (2004), os quais mostraram que tal comportamento não se repetia em preparos que mimetizavam as condições fisiológicas *in vivo*, o próprio Dutka, juntamente com outros colaboradores (DUTKA et al., 2012), recentemente demonstrou que a adição de carnosina em concentrações fisiológicas, parecia aumentar a sensibilidade dos RyRs, induzindo a liberação de Ca^{2+} pelo RS de fibras musculares tipo I de humanos.

Além do RS, a carnosina também parece atuar sobre as proteínas contráteis, especificamente no processo de ligação do Ca^{2+} . Lamont e Muller (LAMONT e MILLER, 1992) foram os primeiros pesquisadores a produzirem evidências a respeito, demonstrando que a adição de carnosina (15 mM) em preparos com músculo sartório de rãs, aumentava a produção de tensão desses, enquanto o inverso ocorria com a retirada do substrato. Dukta et al. (2012), mais tarde, corroboraram os resultados de Lamont e Muller ao demonstrar que o mesmo parecia ocorrer em amostra de músculo esquelético de humanos, tanto em fibras do tipo I quanto do tipo II.

Em suma, esses achados parecem indicar que a carnosina pode ser capaz de potencializar a liberação de Ca^{2+} pelo RS em fibras do tipo I, ao passo que, em ambos os tipos de fibra, parece aumentar a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} .

2.4.2 Carnosina como tampão intramuscular

Atualmente a função mais bem descrita da carnosina é a manutenção do equilíbrio ácido-base intramuscular (ARTIOLI et al., 2010). Além dos experimentos desenvolvidos para testar esta propriedade (SMITH, 1938), a própria distribuição da carnosina e seus análogos no reino animal (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013) leva a deduzir o seu importante papel para a homeostase dos tecidos nos quais atua. As maiores concentrações de dipeptídeos histidínicos são encontradas em músculos de baleias, animais estes que conseguem permanecer cerca de 30 minutos submersos (ABE, 2000). Também ocorre notável diferença entre a concentração de carnosina encontrada em músculos de cães ($33 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco) e

cavalos de corrida ($108 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de músculo seco), os quais são metabolicamente propensos a realizar esforços intensos, comparada a concentração apresentada em amostras de músculos humanos ($16 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de músculo seco), naturalmente menos ativos (HARRIS, 1998; DUNNETT e HARRIS, 1999).

A molécula de histidina apresenta, na sua estrutura, uma cadeia aromática denominada anel imidazólico (figura 1), justamente a parte ionizável (dentre outras) que é responsável pela capacidade tamponante da carnosina no tecido muscular. Na molécula isolada de histidina, o anel imidazólico apresenta uma constante de dissociação iônica (pK_a) de 6.1 (SMITH, 1938). Entretanto, quando ligada a beta-alanina (carnosina), o mesmo anel passa a apresentar uma pK_a de 6.83 (SMITH, 1938; ABE, 2000), valor considerado ideal para que um tampão atue na faixa de variação do pH muscular. Experimentos indicam que o pH muscular pode variar de 7.1, em repouso, a 6.5 em condições de fadiga (COSTILL et al., 1983). Quimicamente, um tampão é considerado ideal quando a sua pK_a apresenta um valor correspondente ao ponto médio da faixa de variação do pH em determinado meio. Portanto, uma pK_a de 6.8 é ideal para que uma substância tampão atue dentro da faixa de variação do pH no músculo.

Além da carnosina, outros compostos como fosfatos inorgânicos e proteínas atuam no processo de neutralização da acidose intramuscular, enquanto o bicarbonato de sódio age indiretamente a nível extracelular (SMITH, 1938). Entretanto, respondendo por cerca de 40% do tamponamento intracelular em alguns mamíferos (ABE, 2000), a carnosina tem sido considerada o principal dentre eles. Em humanos, no entanto, a contribuição é notadamente menor, dada a baixa concentração de carnosina, comparada a outros mamíferos mais ativos (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013). Estima-se que em fibras do tipo I e II de amostras retiradas do músculo vasto lateral, a carnosina responda por 4,5% e 9,4% do tamponamento intramuscular, respectivamente (MANNION et al., 1992). De fato, o aumento deliberado do conteúdo muscular de carnosina através da suplementação de beta-alanina, cuja biodisponibilidade é o principal fator limitante à síntese do composto (HARRIS et al., 2006; HARRIS et al., 2012), tem se mostrado um meio eficaz para melhorar a capacidade de humanos em realizar esforços intensos de alta intensidade (HOBSON et al., 2012; BELLINGER, 2014; SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017), muito embora esses ganhos sejam marginais e não proporcionais ao aumento relativo do conteúdo muscular de carnosina. Em uma meta-análise conduzida pelo nosso grupo, foi demonstrado que exercícios de alta intensidade com duração entre 1 e 10 minutos, onde a acidose intramuscular parece ser um dos principais fatores

limitantes, a suplementação de beta-alanina promoveu melhoras significativas em testes de desempenho e capacidade em atletas e pessoas fisicamente ativas (SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017).

Em conjunto, as evidências aqui destacadas corroboram o papel da carnosina como um importante agente regulador do pH intramuscular. Desde a sua distribuição em diferentes espécies do reino animal, até a especificidade dos efeitos do aumento induzido de carnosina muscular sobre o desempenho físico, os dados direcionam para essa conclusão. Portanto, a ação tamponante da carnosina, dentre outras, figura como a função mais bem descrita do composto até o momento.

2.5 Fatores determinantes do conteúdo muscular de carnosina

Observadas as informações constantes na sessão 3.2., é notável a grande variação do conteúdo muscular de carnosina e análogos metilados entre as espécies, tornando este o principal fator determinante. Tomando apenas a espécie humana, entretanto, dados de estudos transversais indicam que fatores como nível de aptidão física, dieta e o tipo de fibra, parecem ser determinantes (HARRIS, 1998; SUZUKI et al., 2002; EVERAERT et al., 2011). Adicionalmente, estudos longitudinais mostram que estratégias nutricionais como a suplementação de beta-alanina, promovem aumento do conteúdo muscular de carnosina (DUNNETT e HARRIS, 1999; HARRIS et al., 2006). Nos tópicos seguintes, são discutidos alguns desses fatores.

2.5.1 Tipo de fibra muscular

Uma das primeiras constatações a respeito da concentração de carnosina em fibras individuais data de 1995, em estudo conduzido por Dunnett e Harris (DUNNETT, 1995). Na ocasião, eles isolaram fibras musculares obtidas de amostras do glúteo médio de cavalos puro-sangue e observaram que as fibras do tipo IIb tinham 4 a 5 vezes mais carnosina do que fibras tipo I (Tipo I: $24,9 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco de músculo seco Tipo IIa: $94,8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco Tipo IIb: $104,3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco). Esse perfil parece se repetir entre os mamíferos, podendo ser verificado em menor proporção em camelos (DUNNETT et al., 1997) e no próprio ser humano (HARRIS, 1998). Neste último, a diferença tende a variar numa proporção de 1:2-3 entre fibras I:II (Tipo I: $10,5 \text{ mmol/kg}$ de MS; tipo II: $23,2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco). (KENDRICK et al. (2009)) verificaram diferenças ainda mais modestas, porém

significativas em humanos, com as fibras do tipo II apresentando 1,3 vezes mais carnosina em relação às fibras do tipo I (18 e 28 mmol·kg⁻¹ de músculo seco nas fibras do tipo I e II, respectivamente). Vale salientar que estes autores não encontraram diferenças significativas de concentração entre as fibras do tipo IIx, IIa e IIx/IIa.

A diferença de concentração de acordo com o tipo de fibra é mais um indicativo a respeito da função da carnosina no tecido muscular. As fibras de contração rápida (tipo IIx e IIa, em humanos) são naturalmente mais propensas a produzir energia por meio da glicólise anaeróbia, dada a necessidade imediata por grande quantidade de energia quando são acionadas. A produção de energia por meio da glicólise anaeróbia, quando há alta demanda, parece estar associada ao aumento da acidose no meio intracelular, o que pode reduzir a eficiência das reações enzimáticas atuantes no processo de contração muscular (ROBERGS, GHIASVAND e PARKER, 2004). Portanto, os mecanismos de tamponamento nestas células precisam ser tão eficientes quanto nas fibras de contração lenta (tipo I), justificando as concentrações maiores de carnosina.

2.5.2 Treinamento físico

Estudos transversais mostram que o conteúdo de carnosina pode variar entre atletas de diferentes modalidades. Parkhouse et al. (1995), por exemplo, verificaram que velocistas (4.93 mmol·kg⁻¹ de músculo seco) e remadores (5.04 mmol·kg⁻¹ de músculo úmido) apresentam maior conteúdo de carnosina no músculo vasto-lateral quando comparados com maratonistas (2.8 mmol·kg⁻¹ de músculo úmido) e pessoas não-treinadas (3.75 mmol·kg⁻¹ de músculo úmido). Ainda não é possível saber, entretanto, até que ponto tais diferenças podem ocorrer em decorrência do tipo de treinamento e/ou de características genéticas dos atletas. Tallon e colaboradores (2005), adicionalmente, verificaram que praticantes de *bodybuilding* exibem, em média, concentrações de carnosina duas vezes maiores (43 mmol/kg de músculo seco) em relação a homens fisicamente ativos (19.75 mmol·kg⁻¹ de músculo seco). Porém, esses dados não garantem que tal diferença ocorra em função do tipo de treinamento ao qual esses praticantes são submetidos; em vez disso, é possível que o uso de esteroides anabolizantes, comum neste meio, induza ao aumento do conteúdo de carnosina. Essa questão, entretanto, ainda é especulativa, dada a carência de investigações neste sentido.

Estudos longitudinais com intervenção de treinamento, por sua vez, tem demonstrado resultados conflitantes no tocante ao conteúdo de carnosina verificado após o

período de intervenção. Suzuki et al. (2004), submeteram homens fisicamente a um período de oito semanas de treinamento, sendo duas sessões por semana, compostas por um ou dois tiros máximos de 30 segundos (Wingate) em cicloergômetro. Ao final da intervenção, foi relatado um expressivo aumento do conteúdo de carnosina (de 5.17 para 11 mmol·kg⁻¹ de músculo úmido, em média). Por outro lado, Kendrick et al. (2008) não verificaram aumento de carnosina após submeter jovens fisicamente ativos a um período de 10 semanas de treinamento de força, a exemplo de outros dois experimentos (MANNION, JAKEMAN e WILLAN, 1994; KENDRICK et al., 2009) que também não relataram aumento de carnosina após um protocolo de treinamento isocinético.

Embora não haja justificativa consistente no sentido de solucionar a disparidade dos resultados encontrados, pode-se sugerir a possibilidade de falhas metodológicas, como tempo de intervenção insuficiente, bem como a influência de fatores intervenientes, a exemplo da dieta de cada participante. Neste sentido, Baguet et al. (2005) submeteram vegetarianos e indivíduos onívoros ao mesmo protocolo de treinamento utilizado no estudo de Suzuki et al. (2004) (1 a 2 tiros máximos de 30 segundos). Em nenhum dos grupos, entretanto, houve aumento de carnosina, contrariando os achados de Suzuki et al. (2004). Porém, em estudo conduzido recentemente em nosso laboratório, Salles Painelli et al. (2018) buscaram solucionar possíveis questões metodológicas que poderiam estar influenciando nos resultados obtidos nos estudos anteriores. Neste caso, um grupo de 10 homens vegetarianos e veganos, foram submetidos a um protocolo de 12 semanas (3 sessões por semana) de treinamento que consistia em séries de 6 a 12 repetições, realizadas em cicloergômetro, em intensidade correspondente a 140-170% do limar de lactato. As repetições tinham duração de 2 minutos e eram intercaladas por um intervalo de descanso passivo de 1 minuto. Ao adotar vegetarianismo/veganismo como critério de inclusão, excluímos o fator “dieta” como variável interveniente. Além disso, as cargas das sessões de treinamento eram ajustadas a cada sessão para garantir que os estímulos atingissem intensidade suficiente para promover acidose. Ao final da intervenção, além de melhorar as variáveis relacionadas a capacidade aeróbia e anaeróbia, o grupo treinado apresentou um aumento médio relativo de 36% no conteúdo muscular de carnosina (de 16 mmol·kg⁻¹ de músculo úmido para 20 mmol·kg⁻¹ de músculo úmido). Em contrapartida, não foram verificadas alterações na expressão de genes que codificam enzimas transportadoras relacionadas o metabolismo da carnosina. Este resultado sugere que, aparentemente, não houveram adaptações no sentido de aumentar a captação, pela célula muscular, de aminoácidos constituintes do dipeptídeo (histidina e beta-alanina). Esta última conclusão, entretanto, é meramente

especulativa, haja vista que fatores como o tempo decorrido desde a última sessão de treinamento até o momento da biópsia, ainda não foram estudados. Outra hipótese ainda em aberto pode estar relacionada com um possível aumento da produção endógena de beta-alanina pelo fígado em resposta ao treinamento, mas também se trata de uma especulação que ainda precisa ser investigada.

Infelizmente os estudos conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos do treinamento físico sobre o conteúdo de carnosina envolvem períodos muito curtos de intervenção. A ausência de experimentos de longo prazo se justifica por serem dispendiosas e de difícil logística, além da dificuldade em se manter os voluntários até o final do período planejado. Portanto, ainda não é possível saber o quanto o treinamento, a longo prazo, pode interferir diretamente sobre o aumento, manutenção ou redução do conteúdo de carnosina. Outrossim, não se sabe até que ponto a predisposição genética de atletas de diferentes modalidades, a exemplo de fundistas e velocistas, é responsável pela expressiva diferença de conteúdo apresentada entre os mesmos.

2.5.3 Dieta

A síntese de carnosina depende prioritariamente da biodisponibilidade de beta-alanina, sendo este um fator limitante ao processo. A beta-alanina, além de não essencial, é um aminoácido não proteinogênico, ou seja, não compõe a estrutura de proteínas. Portanto, as únicas fontes exógenas naturais de beta-alanina são carnes que contenham o aminoácido na sua composição (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013). Outra opção é o consumo do composto isolado como suplemento alimentar (assunto que será tratado no tópico seguinte). De fato, o consumo de carnes parece exercer importante influência sobre o conteúdo de carnosina em humanos. (EVERAERT et al 2011), por exemplo, mostraram que indivíduos vegetarianos apresentavam cerca de 26% menos carnosina do que indivíduos onívoros. Esses dados, no entanto, não devem ser considerados representativos de uma população como um todo, dado o número limitado de participantes.

Em face da remota possibilidade quanto a realização de estudos associativos abrangendo grandes populações, a relação “consumo de carnes vs conteúdo muscular de carnosina” em diferentes populações ainda não pôde ser determinada. Entretanto, existem hoje estimativas do consumo diário de beta-alanina baseado no consumo médio de carnes em diferentes países. Desta forma, foi possível constatar que a ingestão de beta-alanina em uma

dieta onívora é normalmente muito baixa. Na América Latina, por exemplo, a Guiana é o país onde mais se consome alimentos fontes do aminoácido, mas o montante estimado não ultrapassa o limite de 1,1 g de beta-alanina ingerida diariamente. No Brasil este montante é ainda menor (0,7 mg/dia), embora o país figure entre os maiores consumidores de alimentos ricos em dipeptídeos histidínicos na América Latina. Estas estimativas foram processadas e cedidas pelo Professor Roger Harris a partir de dados fornecidos pela Organização de Agricultura e alimentos (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*).

Para aumentar a biodisponibilidade de beta-alanina, até o momento nenhum outro método se mostrou tão efetivo quanto o consumo do substrato como suplemento alimentar (DUNNETT e HARRIS, 1999; HARRIS et al., 2006). Este fato foi comprovado em estudo pioneiro publicado no ano de 2006, quando Harris et al. (2006) mostraram que a ingestão crônica de beta-alanina promovia aumento do conteúdo muscular de carnosina. Este assunto é detalhado no tópico seguinte, onde são discutidos diversos aspectos relativos a suplementação de beta-alanina e suas implicações.

2.6 Suplementação de beta-alanina

A primeira pesquisa envolvendo suplementação de beta-alanina em humanos foi liderada pelo então Professor Roger Harris (HARRIS et al., 2006). Antes desse estudo, no entanto, evidências já indicavam que a beta-alanina poderia ser o principal fator limitante à síntese de carnosina (DUNNETT e HARRIS, 1999), como detalhado no tópico 2.3.3. O experimento do Professor Roger Harris, cujos resultados foram publicados em 2006 (HARRIS et al., 2006), envolveu testes que verificaram desde a farmacocinética da ingestão aguda até os efeitos da suplementação crônica sobre o conteúdo muscular de carnosina. Ainda, os pesquisadores compararam possíveis diferenças farmacocinéticas entre a ingestão de beta-alanina isolada e a ingestão de um caldo feito à base de filé de frango (assim, extraíndo os compostos presentes no filé de frango, inclusive os dipeptídeos histidínicos como a carnosina e a anserina).

Neste tópico são discutidos aspectos relativos à cinética de absorção da beta-alanina e suas implicações para a ingestão aguda do composto. Também são abordadas estratégias de consumo crônico e os efeitos da suplementação sobre o conteúdo muscular de carnosina.

2.6.1 Primeiros testes com humanos: cinética de absorção e dosagens

O primeiro experimento científico elaborado para testar a suplementação de beta-alanina em humanos teve seus resultados publicados em 2006 (HARRIS et al., 2006). Na ocasião, os pesquisadores testaram uma dosagem aguda de $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal, a qual fora diluída em água antes de ser oferecida aos participantes. Um indivíduo com 80 kg de massa corporal, por exemplo, deveria ingerir 3.2 g do aminoácido. No dia-a-dia, entretanto, dificilmente encontramos alimentos tão ricos em beta-alanina a ponto de oferecer $\sim 3 \text{ g}$ do aminoácido em uma única refeição. Assim, os pesquisadores também desenvolveram um caldo feito à base de filé de frango muito rico em carnosina, de modo que o conteúdo de beta-alanina sob a forma de carnosina e anserina, fosse equivalente aos mesmos $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal oferecidos de maneira isolada. Esta foi a solução elaborada pelos pesquisadores na tentativa de verificar possíveis diferenças farmacocinéticas entre o consumo da beta-alanina pura, como um suplemento alimentar, e o seu consumo tal como disponível nos alimentos.

Quando esse teste foi conduzido, não se tinha conhecimento sobre os possíveis efeitos colaterais associados ao consumo de altas doses de beta-alanina. A descoberta se deu quando na ingestão $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal de beta-alanina isolada. Os primeiros participantes relataram fortes e indesejados sintomas de parestesia, fazendo com que os pesquisadores optassem por experimentar doses menores do suplemento. Assim, foram testadas doses agudas de $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sendo esta última estabelecida como a dose limite para que os efeitos de parestesia fossem evitados.

Figura 4- Variação da concentração sanguínea de beta-alanina ao longo de seis horas após a ingestão de $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal de beta-alanina. Adaptado de Harris et al. (2006).

Diferente da beta-alanina pura, o caldo de filé de frango elaborado pelos pesquisadores caracterizava uma fonte natural do substrato, contendo uma pequena quantidade de beta-alanina livre ($5.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e outra parte, a maior delas ($74.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), sob a forma de dipeptídeos histidínicos (carnosina e anserina). A porção de caldo oferecida foi calculada de modo que o mesmo fornecesse exatamente a mesma quantidade de beta-alanina pura utilizada no experimento anterior, ou seja, $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal.

Ao contrário do que aconteceu no teste anterior, as pessoas que ingeriram o caldo de filé de frango não relataram qualquer efeito indesejado. Interessante notar que a concentração do aminoácido no plasma atingiu seu pico apenas uma hora e meia após a ingestão do caldo, chegando a $428 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sangue (figura 5), valor este bastante inferior ao que foi relatado após a ingestão da mesma dose de beta-alanina pura ($835 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sangue).

Figura 5- Variação da concentração sanguínea de beta-alanina ao longo de seis horas seguintes a ingestão do caldo de filé de frango (com equivalente, em beta-alanina, a $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal). Adaptado de Harris et al. (2006).

O pico de concentração sanguínea de beta-alanina após a ingestão do caldo foi apenas metade daquele verificado após a ingestão da mesma quantidade de beta-alanina pura. Entretanto, o cálculo da área sobre a curva representada pelo gráfico, mostrou não haver diferença entre a quantidade de beta-alanina que fora supostamente absorvida. Para o caldo, o conteúdo total estimado foi de $44.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de sangue, enquanto que para a beta-alanina

pura, esse valor foi de $47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de sangue. Esse resultado levou os pesquisadores a deduzir que o efeito de parestesia é provocado pela rápida absorção da beta-alanina quando ingerida pura, o que eleva rapidamente a sua concentração na circulação. O efeito de parestesia foi amenizado apenas com doses de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal.

Esses experimentos possibilitaram a elaboração de uma estratégia que viabilizava aumento do consumo diário de beta-alanina e, por consequência, a sua utilização como suplemento alimentar. Agora sabendo que as concentrações séricas retornam aos valores basais cerca de três horas após a ingestão, os pesquisadores testaram o consumo dessas doses obedecendo o intervalo de três horas (figura 6).

Figura 6- Variação da concentração sanguínea de β -alanina ao longo de nove horas durante a ingestão de três doses de beta-alanina ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal) nos momentos 0, 3 e 6 horas. As análises foram realizadas no 1º (▲) e no 15º (◇) dia de suplementação. Adaptado de Harris et al. (2006).

2.6.2 Efeitos sobre o conteúdo muscular de carnosina

A disponibilidade de beta-alanina é o principal fator limitante para a síntese de carnosina, dada sua baixa afinidade à enzima carnosina sintase (HORINISHI, GRILLO e MARGOLIS, 1978). Portanto, a suplementação de beta-alanina tem se mostrado extremamente eficaz na tarefa de promover aumento das concentrações musculares de carnosina (DUNNETT e HARRIS, 1999; HARRIS et al., 2006; HILL et al., 2007). Em humanos, Harris et al. (2006) foram os primeiros a testar a suplementação de beta-alanina e, como mostrado no tópico anterior, descobriram o efeito de parestesia, que ocorre quando são ingeridas doses acima de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal.

Subsequentemente, Hill et al. (2007) mostraram que o consumo diário de $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal, quatro vezes ao dia durante quatro semanas, promoveu aumentos de aproximadamente 60% do conteúdo muscular de carnosina. Estendendo o consumo por mais quatro semanas, foi reportado um aumento ainda mais expressivo, de aproximadamente 80%. Além desse, diversos outros estudos nos quais os pesquisadores quantificaram o conteúdo de carnosina após um protocolo de suplementação, seja por ressonância magnética (DERAVE et al., 2007; BAGUET et al., 2009; DEL FAVERO et al., 2012; BEX et al., 2014) ou biópsia muscular (HARRIS et al., 2006; SALE, SAUNDERS e HARRIS, 2010; SAUNDERS, V, et al., 2017), mostraram respostas semelhantes. Em praticamente 100% dos participantes alocados nos grupos que receberam beta-alanina como suplemento, foi reportado aumento de carnosina, atestando a efetividade do protocolo.

No tópico 2.5 foram discutidos fatores que parecem ser determinantes para o conteúdo muscular de carnosina em condições basais, como o sexo, idade, dieta e nível de condicionamento físico. A resposta à suplementação de beta-alanina, por sua vez, ainda não foi profundamente estudada entre populações em termos de magnitude de resposta. A esse respeito existem poucas informações na literatura. Nos próximos tópicos, são discutidos os efeitos da suplementação em idosos e uma possível evidência a respeito da magnitude de resposta a suplementação em indivíduos treinados.

2.6.3 Efeito sobre o conteúdo muscular de carnosina em idosos

O envelhecimento está naturalmente associado à perda de massa muscular e, consequentemente, à redução da quantidade de proteínas e aminoácidos importantes para a função muscular (WILKINSON, PIASECKI e ATHERTON, 2018). A carnosina parece figurar dentre um dos compostos musculares cuja abundância vai sendo reduzida ao longo do envelhecimento. Dados todos os potenciais papéis exercidos pela carnosina, é plausível assumir que evitar suas perdas ou até induzir ganhos no conteúdo de carnosina muscular pode ser importante para preservar a função e homeostase musculares durante o envelhecimento. Por esse motivo, a suplementação de β -alanina na terceira idade pode ser um estratégia interessante no sentido de auxiliar no melhora da qualidade de vida dessa população.

Em um trabalho realizado no nosso laboratório (DEL FAVERO et al., 2012), 12 idosos receberam de β -alanina ($3.2 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$) por 12 semanas, totalizando 268.8 g de beta-alanina. Antes e após o período de suplementação, o conteúdo de carnosina foi mensurado através de

um exame de ressonância magnética. As análises revelaram aumento de 85% no conteúdo muscular de carnosina, resultados bastante semelhantes aos observados em jovens saudáveis. Assim, parece que a capacidade dos idosos em responder à suplementação de beta-alanina é preservada, deixando em aberto as razões pelas quais idosos aparentam ter menores concentrações de carnosina em comparação com seus pares jovens.

2.6.4 Efeito sobre o conteúdo de carnosina em atletas

Até o momento tem sido reportado que a ação tamponante da carnosina representa a sua principal função dentro do tecido muscular esquelético (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013). De fato, acreditava-se que o treinamento físico, em especial os de alta intensidade, poderiam promover adaptações no sentido de elevar a capacidade tamponante muscular através do aumento da síntese de carnosina. Recentemente, em outro estudo conduzido no nosso laboratório, foi mostrado que o treinamento intervalado de alta intensidade promove aumento do conteúdo muscular de carnosina independentemente da ingestão de alimentos fontes de dipeptídeos histidínicos (SALLES PAINELLI et al., 2018). Portanto, acreditava-se que em atletas, a resposta a suplementação poderia ocorrer em menor magnitude, considerando que nestes indivíduos o conteúdo muscular de carnosina em condições basais geralmente está acima da média do restante da população. Entretanto as evidências parecem não corroborar esta hipótese.

O primeiro experimento envolvendo suplementação de beta-alanina para atletas foi publicado em 2007 por um grupo de pesquisadores belgas (DERAIVE et al., 2007). Nesse estudo, participaram corredores de curtas distância (100 m e 400 m), os quais foram submetidos a quatro semanas de suplementação de β -alanina em doses diárias de 4.2 g. Por meio de ressonância magnética, os pesquisadores mediram o conteúdo de carnosina dos músculos sóleo e gastrocnêmio antes e após as quatro semanas de suplementação, encontrando um aumento de, respectivamente, 47% e 37%. De forma semelhante, Baguet e colaboradores (BAGUET et al., 2010) encontraram aumentos relativos de 45% e 28% nos músculos sóleo e gastrocnêmio, respectivamente, de remadores submetidos a sete semanas de suplementação. Esses dados concordam com resultados previamente obtidos em estudos envolvendo indivíduos fisicamente ativos.

Entretanto, algumas evidências sugerem que a musculatura treinada parece responder de maneira um pouco diferente à suplementação de beta-alanina. Recentemente

pesquisadores verificaram que, de acordo com a modalidade praticada, atletas submetidos a suplementação de beta-alanina exibem aumentos de carnosina mais expressivos nos músculos mais solicitados durante a atividade praticada (BEX et al., 2014). Em ciclistas, por exemplo, nos quais os membros inferiores são mais exigidos, os pesquisadores observaram aumentos maiores de carnosina na musculatura da perna em comparação com o deltoide. A figura 7 apresenta com mais detalhes os resultados desse estudo que avaliou o conteúdo muscular de carnosina de ciclistas, remadores, nadadores e não-atletas antes e após 23 dias de suplementação de β -alanina ($6.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$).

Figura 7- Aumento do conteúdo muscular de carnosina nos músculos gastrocnêmio e deltoide de atletas (ciclistas, caiaquistas e nadadores) e não atletas. Adaptado de Bex et al. (2014).

Embora os resultados acima pareçam contrariar a hipótese de que indivíduos treinados responderiam em menor magnitude a suplementação de beta-alanina, é importante salientar que Bex et al. (2014) utilizaram um método indireto (ressonância magnética) para quantificar a carnosina muscular. Apesar de ser uma técnica não invasiva, a ressonância magnética parece ter uma precisão muito abaixo daquela considerada padrão ouro, a saber, cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Dados ainda não publicados, obtidos em estudo conduzido no nosso laboratório, mostraram que as estimativas obtidas a partir de avaliações realizadas por meio de ressonância magnética, mostraram importante discrepâncias na comparação com análises realizadas em HPLC. Portanto, não é possível afirmar seguramente que o condicionamento físico possa ter alguma influência sobre a resposta à suplementação de beta-alanina.

2.7 Lesão medular

A lesão medular é uma das condições de saúde incapacitante de maior prevalência no mundo. No Brasil, apesar de não haverem dados oficiais, estima-se que a ocorrência anual por causas diversas está em torno de 71 novos casos por milhão de habitantes (MASINI, 2001). Além de prejuízos sociais e financeiros para o paciente e familiares, a lesão medular pode ocasionar sequelas que afetam significativamente as condições de capacidade física e a saúde da vítima (SEKHON e FEHLINGS, 2001), fatos estes que reforçam a necessidade de ensaios clínicos no sentido de melhorar o entendimento a respeito do problema e, consequentemente, otimizar a qualidade dos procedimentos médicos a serem aplicados nesses casos.

Uma das consequências mais marcantes decorrentes da lesão medular é a perda completa ou parcial de função motora e/ou sensorial em um ou mais membros. A gravidade da sequela depende das características e circunstâncias da lesão, além dos procedimentos adotados imediatamente após a ocorrência (nos casos de lesão por trauma) e durante o tratamento pós-trauma. A depender do seguimento espinal acometido, a Associação Americana de Lesão Medular (ASIA, do inglês: *American Spinal Injury Association*) classifica a perda de função sensorial e/ou motora como tetraplegia ou paraplegia (MAYNARD et al., 1997). Tetraplegia corresponde a lesões ocorridas no seguimento cervical da coluna espinal, enquanto que a paraplegia corresponde a lesões que acometem os seguimentos torácico, lombar ou sacral.

Embora as características do dano provocado a medula sejam bastante variadas entre os indivíduos, Bunge et al. (1993) classificaram quatro tipos básicos deles: 1- lesão medular sólida: quando a medula espinhal não apresenta mudança morfológica aparente, mas o dano é facilmente detectado através de análise histológica; 2- contusão/cavidade: quando a área afetada apresenta pontos de hemorragia, necrose e cavitação, mas sem haver ruptura da medula; 3- laceração: quando há ruptura na medula, mas não necessariamente a ruptura completa; 4- compressão massiva: quando ocorre maceração, em diferentes graus, da região atingida. Apesar dessas classificações auxiliarem no diagnóstico, não é possível associar tais características à gravidade das sequelas apresentadas pelos pacientes. Em um caso no qual dois indivíduos sofrem laceração da medula, por exemplo, um pode apresentar apenas perda de função motora em um dos membros inferiores, enquanto o segundo pode sofrer perda de função sensorial e motora nos dois membros inferiores. Este fato demonstra a complexidade do problema e a necessidade de avanços neste campo da medicina.

Nos casos de paraplegia e tetraplegia, o tecido muscular afetado sofre alterações morfofuncionais importantes ao longo do período no qual permanece inativado. Além disso, o

sistema circulatório local e sistêmico podem sofrer adaptações em função da secção nervosa decorrente da lesão. Essas questões são discutidas nos tópicos seguintes.

2.7.1 Impacto da perda de função motora sobre o tecido muscular

Em pessoas acometidas por lesão medular acompanhada de perda de função motora, a primeira consequência visivelmente notável é a atrofia da musculatura paralisada. Entretanto, analisar as consequências da inatividade sobre o perfil morfológico e metabólico daquele tecido requer a utilização de técnicas invasivas como a biópsia muscular. Neste sentido, Grimby et al. (1976) parecem ter sido os primeiros a avaliar amostras de tecido muscular de indivíduos com paraplegia. Na ocasião, os pesquisadores colheram amostras dos músculos gastrocnêmio, soleo e vasto lateral, e compararam com amostras retiradas do músculo deltoide dos mesmos indivíduos. Dessa forma, por meio de análise histológica, foi observado que as fibras musculares dos membros inferiores apresentavam diâmetro significativamente menor, quando comparadas com fibras musculares do deltoide, este com função motora íntegra. Além disso, as amostras de tecido muscular inativo apresentavam uma predominância praticamente absoluta de fibras de contração rápida (tipo II).

Embora os achados de (GRIMBY et al. (1976)) tenham representado um marco para a literatura científica na época, ainda não era possível identificar os estágios dessas mudanças no tecido muscular e os mecanismos envolvidos, uma vez que o tempo médio de lesão dos participantes era de aproximadamente 10 anos. Mas (SCELSI et al. (1982)), em outro trabalho pioneiro, selecionaram pacientes com tempo de lesão entre 1 e 17 meses, buscando identificar diferentes fases desde 4 semanas pós-lesão até 1 ano e meio após. Os experimentos mostraram uma clara correlação entre a espessura das fibras e o tempo de lesão, o que sugeria uma atrofia progressiva. Outro dado interessante, corroborando os achados de (GRIMBY et al., 1976) , mostrava o progressivo aumento da proporção de fibras do tipo II em relação às fibras do tipo I. Entretanto, não era possível concluir se de fato havia um *shift* de fibras do tipo I para fibras do tipo II ou se as fibras do tipo I atrofiavam a ponto de restarem apenas fibras de característica glicolítica. Burnham et al. (1997) elucidaram essa questão ao acompanharem, durante 14 semanas, pacientes que haviam acabado de sofrer lesão medular e consequente perda de função motora nos membros inferiores. Na ocasião, os pesquisadores retiravam uma amostra de tecido muscular a cada mês pós-lesão. Isto permitiu avaliar a transformação do tecido desde os primeiros momentos até 18 anos após a ocorrência (obtendo amostras isoladas de pacientes

mais antigos). Deste modo, foi possível observar um padrão de transformação que se iniciava com atrofia progressiva das fibras de contração rápida (tipo II), seguida por uma progressiva transformação das fibras do tipo I em fibras do tipo II.

Outra consequência inerente a atrofia muscular é o aumento da intolerância ao esforço, característica que tem implicações importantes sobre a utilização de intervenções que visem atenuar o processo de atrofia (CASTRO et al., 1999). Em diversos experimentos, pesquisadores buscaram maneiras de desacelerar as perdas por meio da eletroestimulação (CARRARO et al., 2005; MODLIN et al., 2005; NAKAGAWA et al., 2017). Porém, embora alguns resultados tenham mostrado pequenos avanços neste sentido, a fadigabilidade aumentada nos músculos afetados é uma das limitações enfrentadas neste tipo de intervenção. Na literatura está bem estabelecido que fibras de contração rápida são metabolicamente menos eficientes no processo de produção de energia, quando comparadas às fibras de contração lenta (KRUSTRUP et al., 2008; KRUSTRUP et al., 2009). Portanto, uma vez que o desuso culmina em atrofia da fibra muscular e conversão do tecido em fibras de contração rápida praticamente na sua totalidade, é esperado que nestas condições a musculatura apresente significativa perda em termos de tolerância ao esforço. Apesar dessa limitação, a eletroestimulação crônica parece desacelerar o processo de atrofia nos primeiros momentos pós lesão (NAKAGAWA et al., 2017) e, em casos mais tardios, tem sido reportados pequenos mas significativos ganhos de tolerância a fadiga e aumento modesto na quantidade de fibras do tipo I (CRAMERI et al., 2002).

A lesão medular acompanhada de perda de função motora, portanto, provoca mudanças profundas na musculatura em desuso. Em resumo, são observadas perdas significativas de massa muscular, com redução do diâmetro das fibras musculares e conversão de praticamente todo o tecido em fibras de contração rápida. Boa parte dos estudos são conduzidos no sentido de reverter, no caso de indivíduos lesionados há anos, ou desacelerar o processo de atrofia em casos recentes de acometimento. Os resultados, embora significativos, ainda são modestos, mas representam avanços e reforçam a necessidade de mais investigações neste campo.

2.8 Considerações finais

Duas questões a respeito da carnosina já estão bem estabelecidas na literatura atual: o seu papel no equilíbrio ácido-base intramuscular e a biodisponibilidade do aminoácido beta-

alanina como principal fator limitante à síntese do composto (HARRIS et al., 2006; HILL et al., 2007; ARTIOLI et al., 2010; BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013; SAUNDERS, V, et al., 2017). No entanto, outras funções atribuídas à carnosina ainda precisam ser amplamente investigadas. Se no desempenho físico tem sido demonstrado que o aumento do conteúdo de carnosina promove ganhos modestos, mas significativos (principalmente em esforços prolongados de alta intensidade) (HOBSON et al., 2012; BELLINGER, 2014; SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017), ainda há um vasto campo a ser explorado no âmbito da saúde, dado o potencial efeito antiglicante e antioxidante do composto (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013).

No tocante à suplementação de beta-alanina, já está bem estabelecido que o seu consumo crônico como suplemento alimentar promove aumento significativo do conteúdo muscular de carnosina em diferentes populações, com concomitante melhora de performance (DEL FAVERO et al., 2012; BEX et al., 2014; SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017). Entretanto, uma das principais questões ainda em aberto diz respeito a magnitude de resposta em diferentes níveis de condicionamento físico. A esse respeito, apenas BEX et al. (2014) produziram dados evidenciando que o estado de condicionamento físico ou o treinamento associado à suplementação (BEX et al., 2015) otimizam a síntese de carnosina muscular em resposta à suplementação, porém são necessários estudos adicionais, inclusive com técnicas de quantificação padrão a partir da obtenção de amostras de tecido muscular, a fim de confirmar tal hipótese e elucidar os mecanismos que interagem nesse sentido.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da inatividade crônica sobre o conteúdo de carnosina muscular basal (total e por tipo de fibra), bem como a resposta à suplementação de beta-alanina em homens fisicamente ativos e atletas com lesão medular. Também é objetivo desse estudo, verificar os efeitos da suplementação sobre a capacidade de alta intensidade nos membros superiores desses participantes.

3.1 Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito da suplementação de beta-alanina sobre:

- o aumento absoluto da concentração de carnosina nos músculos deltoide ativo e vasto lateral inativo;
- o aumento absoluto da concentração de carnosina por tipo de fibra nos músculos deltoide ativo e vasto lateral inativo;
- Comparar a magnitude de resposta à suplementação de beta-alanina entre os músculos deltoide e vasto lateral (concentração muscular total e por tipo de fibra);

2) Avaliar os efeitos da suplementação de beta-alanina sobre:

- O tempo até a exaustão e o trabalho total realizado em teste supramáximo de carga constante;
- Trabalho total e potência pico em um teste de Wingate de série única.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Participantes

O projeto foi previamente encaminhado ao comitê de ética em pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. Uma vez aprovado (CAAE: 41495115.0.0000.5391), foram iniciadas as divulgações por meio de mídia impressa e eletrônica. Ao todo, 23 interessados entraram em contato. Destes, 1 não atendeu aos critérios de inclusão e outros 6 não retornaram às tentativas de contato. Dos 16 interessados que aceitaram fazer parte do estudo, 13 se declararam, pelo menos, atletas amadores, e outros 3, fisicamente ativos. Dois dos 16 descontinuaram a participação após a primeira sessão de biópsias.

Figura 8- fluxograma de recrutamento.

Antes do início dos experimentos, cada participante recebeu uma explicação detalhada acerca dos objetivos do estudo, bem como de todos os procedimentos, riscos e benefícios envolvidos. Em seguida, aqueles que aceitaram participar receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após leitura do mesmo e aceitação de seus termos, foram solicitados a assiná-lo.

Para caracterização dos participantes em relação ao grau de lesão medular, foram considerados os parâmetros definidos pela ASIA (American Spinal Cord Injury Association), a qual estabelece quatro níveis de comprometimento das funções sensoriais e motoras (ASIA Impairment scale [AIS]). Os níveis vão de AIS=A a AIS=E, respectivamente do maior para o menor nível de comprometimento (detalhes em: http://asia-spinalinjury.org/wp-content/uploads/2016/02/International_Std_Diagram_Worksheet.pdf). Para participar do estudo, os voluntários deveriam atender aos seguintes critérios: 1) ser, no mínimo, fisicamente ativo ou estar engajado em programa estruturado de exercício físico; 2) apresentar lesão medular traumática acompanhada de perda de função motora nos membros inferiores (classificação AIS=A ou AIS=B) há pelo menos 1 ano; 5) ter disponibilidade para comparecer ao laboratório em, no mínimo, quatro ocasiões; 6) ter idade entre 18 e 45 anos. Não eram incluídos os voluntários que: 1) fizeram uso de creatina e/ou beta-alanina até 3 e 6 meses antes do início do estudo, respectivamente; 2) apresentassem fatores de risco associados a doença cardiovascular ou respiratória; 3) apresentassem condições clínicas que resultassem em má absorção de nutrientes, ou 4) qualquer outra condição clínica que impedisse a realização dos procedimentos experimentais.

Na tabela 1 são apresentados dados individuais referentes às características individuais da lesão. A tabela 2 mostra os dados relativos às características gerais dos participantes.

Tabela 1- Características individuais da lesão e nível de condicionamento.

	Classificação AIS	Nível da lesão	Condicionamento
Beta alanina	A	T12	Atleta
	B	C6-C7	Fisic. ativo
	B	T12-L1	Atleta
	B	L1-L2	Atleta
	B	C6-C7	Fisic. ativo
	B	T3	Atleta
	B	C6-C7	Atleta
	B	T2-T3	Atleta
	A	C7	Atleta
	A	C5	Atleta
	A	C6-C7	Atleta
Placebo	B	T12-L1	Atleta
	B	T5-T6	Atleta
	B	L2	Atleta
	B	T9	Fisc. ativo
	B	C7	Atleta

Tabela 2- características gerais dos participantes.

	Beta Alanina	Placebo	P
	(N=11)	(N=5)	
Idade (anos)	36,1 ± 3,9	34,6 ± 8,1	0,62
Massa corporal (Kg)	71,9 ± 11,8	67,8 ± 11,9	0,52
Estatura (cm)	176 ± 8,6	172 ± 6,9	0,38
IMC (kg/m²)	23,2 ± 3,0	22,9 ± 3,8	0,89
Tempo de lesão	14,1 ± 3,7	13,4 ± 7,3	0,80
VO₂pico	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,8	0,30
Carga_{máx}	0,8 ± 0,5	1,1 ± 0,6	0,42

IMC: índice de massa corporal.

4.2 Desenho experimental

No presente estudo foi adotado o desenho de grupos paralelos, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, na proporção de 2:1 (beta-alanina [BA] / placebo [PL]). Um pesquisador não diretamente envolvido com as coletas e análises de dados, elaborou a aleatorização e alocação dos participantes nos grupos experimentais. A aleatorização foi composta por blocos de 3 indivíduos. A alocação nos grupos foi equalizada de acordo com o VO_{2pico} e potência pico aferidas através do teste incremental máximo. Os participantes foram solicitados a comparecer ao laboratório em quatro ocasiões diferentes. Na primeira visita, foi mensurada a massa corporal. Em seguida, um teste incremental máximo em cicloergômetro para membros superiores (Cefise EB4100, Nova Odessa, São Paulo) foi aplicado para a determinação da potência pico e VO_{2pico} . Na segunda sessão foram realizados os testes de familiarização. Na ocasião, os voluntários foram submetidos a um teste de carga constante até a exaustão (TCC) a 110% do VO_{2pico} e, em seguida, a um teste de Wingate de série única. Entre o TCC e a série de Wingate, houve um intervalo de 10 minutos para recuperação passiva. Na terceira visita, obedecendo um intervalo mínimo de quatro dias e máximo de sete, os voluntários realizaram os testes PRÉ suplementação, ou seja, um TCC em cicloergômetro para membros superiores, seguido por um teste de Wingate de série única. Antes da aplicação dos testes, entretanto, foram realizadas as biópsias musculares de deltoide e vasto lateral, posteriormente utilizadas para a quantificação da concentração de carnosina muscular.

Após a terceira visita, os participantes receberam quantidade suficiente de tabletes de beta-alanina ou placebo (dextrose) para um período de 28 dias de suplementação, fornecidos em potes plásticos identificados apenas com o nome do participante e datas de início e término da suplementação. A quarta visita ocorreu 28 dias após o início da suplementação, quando os participantes foram submetidos aos mesmos procedimentos aplicados na sessão anterior (isto é, biópsia muscular de vasto lateral e deltoide, TCC e um teste de Wingate de série única).

Os voluntários foram instruídos a abster-se de exercícios extenuantes, ingestão de bebidas alcoólicas e cafeinadas nas 24 horas que antecederam as visitas ao laboratório. Além disso, receberam orientações de um nutricionista para preencherem um diário alimentar de 3 dias não consecutivos. Eles também foram instruídos a repetir, na medida do possível, as mesmas refeições nas vésperas das sessões experimentais PRÉ e PÓS.

Figura 9- Desenho experimental. INCREM.: teste incremental máximo; FAM: familiarização; BIOPs: biópsias de vasto lateral e deltoide; TCC: teste de carga constante até a exaustão; WING.: teste de Wingate de série única; - suplementação de beta-alanina (6.4 g·dia⁻¹).

4.3. Teste incremental máximo

Antes de dar início ao teste incremental, a massa corporal do participante foi mensurada. Para isso, uma cadeira com os pés apoio dentro das dimensões da balança foi previamente pesada sem o voluntário. Em seguida, o participante era transferido para a cadeira devidamente posicionada sobre balança. A massa do participante era determinada subtraindo-se o valor da massa da cadeira sem participante, do valor total da cadeira+participante.

O teste incremental máximo foi realizado em um cicloergômetro para membros superiores (EB 4100, Cefise, Brasil). As trocas gasosas foram mensuradas a cada respiração através de um analisador de gases estacionário (Quark CPET, Cosmed, Roma, Italia). Para o registro frequência cardíaca, foi utilizado um cardiofrequencímetro acoplado ao analisador de gases (Polar, Kempele, Finlândia). O analisador de gases foi previamente calibrado utilizando-se uma seringa com o volume de ar de 3 litros, ar ambiente e um cilindro com concentrações conhecidas de O₂ (12%) e CO₂ (5%). O procedimento de calibração seguiu as recomendações descritas no manual fornecido pelo fabricante.

Após conclusão dos procedimentos descritos anteriormente, os participantes realizaram três minutos de aquecimento contra uma carga de 300 g. Após os três minutos iniciais de aquecimento, a carga foi acrescida em 300 g a cada minuto até exaustão voluntária ou quando o participante não conseguia manter a cadência entre 85 e 90 RPM. O VO_{2pico} foi calculado a partir da média aritmética dos últimos 30 segundos do teste.

4.4 Teste de carga constante até a exaustão e teste de Wingate

O teste de carga constante até exaustão (TCC) foi realizado no mesmo equipamento utilizado para o teste incremental máximo (EB 4100, Cefise, Brasil). Previamente, os participantes realizaram um aquecimento de 3 minutos contra uma carga de 300 g. Após descanso passivo de um minuto, era acrescida uma carga supramáxima correspondente a 110% da potência pico aferida no teste incremental. O voluntário foi instruído a iniciar a tarefa após uma contagem regressiva de 3 segundos, exibida em um monitor posicionado a sua frente. Durante o teste, era solicitado que o participante mantivesse a cadência entre 85 e 90 RPM. O tempo de exaustão foi determinado através de um software acoplado ao cicloergômetro (Ergometric 6.0), considerando as três últimas tentativas de manutenção da cadência acima de 85 RPM.

Finalizado o TCC, eram contados oito minutos de intervalo para recuperação passiva. Após o descanso, cada participante realizou um teste de Wingate de série única, ou seja, um tiro máximo de 30 segundos contra uma carga correspondente a 4% da sua massa corporal. Durante o teste eram mensuradas a potência pico e o trabalho realizado a cada segundo.

Durante o intervalo entre os testes (oito minutos) e após a série de Wingate, eram retiradas quatro amostras sanguíneas (25 μ L) da ponta de um dos dedos da mão, nos seguintes momentos: imediatamente após, três, cinco e sete minutos após o teste. Essas amostras foram centrifugadas, o plasma separado e armazenado a -20° C para posterior análise das concentrações de lactato.

4.5 Protocolo de suplementação, verificação da aderência, vendamento e efeitos colaterais

Os participantes suplementaram com beta-alanina ou placebo (dextrose) durante 28 dias, ingerindo doses de $6.4 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$. Os suplementos foram fornecidos em de tabletes de absorção lenta (figura 10), os quais continham 800 mg de beta-alanina ou dextrose (NAI Inc, EUA). Um nutricionista orientou os participantes para que consumissem 4 doses diárias de 1.6 g, totalizando $6.4 \text{ g}\cdot\text{dia}^{-1}$ (isto é, 4 doses de 2 tabletes, totalizando 8 tabletes ao dia), preferencialmente durante ou após as refeições (café da manhã, almoço, lanche da tarde e jantar), observando um intervalo de três a quatro horas entre cada dose. Esses cuidados se fazem necessários porque o consumo de beta-alanina associado às refeições parece potencializar o acúmulo de carnosina intramuscular (STEGEN et al., 2013). Já o fracionamento das doses

respeitando o intervalo de três a quatro horas entre elas é a mais efetiva estratégia para evitar parestesia (DECOMBAZ et al., 2012), único efeito indesejado associado ao consumo de beta-alanina. Tanto os tabletes de beta-alanina quanto os de placebo eram idênticos em aparência (figura 10) e fornecidos em mesmo número aos participantes.

Os tabletes de absorção lenta são comprovadamente eficazes em reduzir ou evitar a sensação de parestesia, tornando viável a ingestão simultânea de dois tabletes de 800 mg (DECOMBAZ et al., 2012). Assim, pode-se atingir a maior dose diária possível (6.4 g), o que se torna relevante à medida em que os aumentos de carnosina muscular são primariamente dependentes da disponibilidade de beta-alanina (DUNNETT e HARRIS, 1999; STELLINGWERFF, ANWANDER, et al., 2012). Diversos estudos têm utilizado o mesmo protocolo de suplementação, encontrando de forma consistente aumentos na carnosina muscular e melhoras no desempenho físico (HILL et al., 2007; ZOELLER et al., 2007; KENDRICK et al., 2009). Ao final dos testes PÓS, cada participante foi questionado a respeito do suplemento que acreditava ter consumido (isto é, beta-alanina ou placebo) para fins de avaliação do sucesso do vendamento. Também foram questionados sobre possíveis efeitos indesejados.

Figura 10- tabletes de beta-alanina e placebo utilizados neste estudo.

4.6 Análise do consumo alimentar

Antes e após o período de suplementação, os voluntários foram instruídos a preencher diários alimentares em três dias não consecutivos, sendo um deles no fim de semana. Esse procedimento foi realizado sob a orientação de um nutricionista, que posteriormente estimou o consumo médio de macronutrientes (carboidratos, proteína e gordura) através do

software Virtual NutriTM (São Paulo, Brasil). A ingestão de beta-alanina foi estimada com base nos dados de Jones (2011).

4.7 Biopsias musculares

4.7.1 Biópsia muscular de vasto lateral por agulha de sucção

Para obtenção de uma amostra de 100-150 mg do músculo vasto lateral, os participantes foram submetidos à biópsia por agulha de sucção, conforme descrito por Neves Jr. et al. (NEVES et al., 2012). A amostra foi obtida da porção mais volumosa do músculo vasto lateral, utilizando-se uma agulha especialmente desenvolvida para esse fim (BERGSTROM, 1962).

Durante o procedimento, o voluntário foi transferido para uma maca, na qual permaneceu deitado e com os joelhos estendidos. Após o médico examinar, por meio de palpação, e identificar a porção mais volumosa do músculo vasto lateral, uma assepsia foi feita no local de incisão (aproximadamente entre o ponto médio da patela e do trocânter maior). Para isto, foi utilizado um antisséptico líquido (Iodopovidona [Riodeine] dermo suave). Em seguida, foram administrados 3 mL de xilocaína 1% de maneira subcutânea com agulha hipodérmica descartável.

Após assepsia e anestesia, uma pequena incisão de ~0,5 cm de comprimento foi feita até a fáscia muscular para a entrada da agulha de biópsia. Para isso, o médico responsável utilizou uma lâmina de bisturi nº 11, estéril e de uso único. A agulha de biópsia devidamente limpa e esterilizada, foi então inserida através do pequeno orifício gerado pela incisão. Uma vez posicionada a ponta da agulha no interior do músculo, uma força de sucção era aplicada, por um auxiliar, na extremidade superior externa da agulha, a qual é acoplada a uma seringa de 60 mL através de um tubo cirúrgico flexível. Nesse momento, um pequeno pedaço de músculo é puxado para o interior da agulha e cortado pela sua lâmina interna. Após a retirada da agulha, era aplicada uma pressão sobre o ponto de incisão para evitar sangramentos. A incisão era então fechada com bandagem estéril e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. As amostras colhidas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em um tambor criogênico até que fossem submetidas às análises.

4.7.2 Biópsia muscular de deltoide por microagulha e por agulha de sucção

A princípio, as amostras de tecido muscular do deltoide foram obtidas por meio de microbiópsia, realizada através de um sistema automático descartável (Bard® Max-core®). Entretanto, devido ao tempo dispendido durante a aplicação desse método, optamos por utilizar o procedimento de biópsia por agulha de sucção, o mesmo descrito no tópico anterior. Apesar de requerer uma abertura de incisão maior, este método permite a retirada uma quantidade maior de tecido com apenas uma incisão (~100-150 mg), enquanto o método por microagulha requer três incisões para somar apenas ~60 mg de tecido. A mudança reduziu significativamente o tempo da sessão, além de promover maior conforto para os participantes. Portanto, o método por microagulha foi utilizado apenas para os sete primeiros voluntários dentre os 16. A descrição detalhada do método de microbiópsia é apresentada a seguir.

Para obtenção de uma amostra de ~ 60 mg do músculo deltoide, foi utilizado o método de biópsia por microagulha, realizado com o Sistema de Biópsia Bard® Max-core® (figura 11). Trata-se de uma agulha descartável de núcleo, calibre 16 (comprimento de secção de amostra de 19 mm; curso de 22 mm) e uma cânula de inserção (calibre 14), a qual permite a realização de múltiplas biópsias a partir de uma única punção.

Primeiramente o médico responsável examinava a região do deltoide a fim de determinar o ponto de incisão, localizado na porção mais volumosa do músculo (extremidade lateral, no ponto médio entre a origem e inserção). Após assepsia e aplicação de 2 mL de liloína a 2% com agulha hipodérmica descartável, o médico puncionava a pele com a cânula de inserção, em posição perpendicular ao músculo, até a perfuração da fáscia. Em seguida, a agulha de biópsia fixada no dispositivo (Bard® Max-core®) era inserida através da cânula após a retirada do núcleo. Nesse momento, o botão de disparo do dispositivo era acionado, ativando a agulha para coleta de ~ 20 mg de tecido muscular. A canaleta era mantida até que o médico retirasse mais duas amostras, totalizando ~ 60 mg de amostra. Por fim, a canaleta era retirada e aplicava-se pressão sobre o ponto de incisão para conter sangramento. A incisão era então fechada com bandagem estéril e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento.

Os procedimentos de armazenagem e tratamento das amostras seguiram o mesmo padrão utilizado para as amostras do vasto lateral, descrito na sessão anterior.

Figura 11- Sistema descartável de biopsia Bard® Max-core®.

4.8 Determinação da concentração de carnosina em fibras individuais

4.8.1 Dissecção e pesagem das fibras

Antes de proceder com a dissecção, as amostras foram liofilizadas em vácuo, a -60° , por um período de 24 horas. Aproximadamente 30 fibras musculares de cada amostra foram dissecadas manualmente e separadas com o auxílio de duas pinças finas, sob magnificação de 4 x em microscópio. As fibras individuais eram cortadas a partir da extremidade em porções 1 a 2 mm. Uma das metades era imediatamente guardada em microtubo de 0,6 mL devidamente identificado para posterior determinação do tipo de fibra. A outra metade era pesada em balança do tipo “vara de pesca”, de fibra de quartzo, e armazenada da mesma forma em microtubo de 0,6 mL para posterior análise do conteúdo de carnosina.

Para a pesagem das fibras foi utilizada uma balança de fio de quartzo desenvolvida para este fim. O equipamento consiste em uma base com mecanismo anti vibração para evitar interferências externas. Acoplada à base, há uma plataforma contendo um tubo retangular no qual se encontra a fibra de quartzo (Figura 11). Um microscópio posicionado à frente da plataforma, possibilita a visualização da ponta da fibra de quartzo e de uma escala, a través da qual é medida a deflexão da fibra de quartzo. Antes da pesagem a balança foi calibrada usando-se tiras de sal de DNA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO - n° de catálogo: D-1501). Primeiramente, concentrações conhecidas do material foram diluídas em 1 mL de água. Em seguida, foram medidas as respectivas absorbâncias a um comprimento de onda de 260 nm. Desse mesmo material, foram seccionados vários seguimentos em dimensões que se assemelhavam às fibras musculares dissecadas. Cada seguimento foi posteriormente diluído em 1 mL de água para, em seguida, serem medidas as absorbâncias. Esses valores foram comparados com aqueles obtidos a partir das dissoluções com concentrações conhecidas de sal de DNA.

Figura 12- Balança de fibra de quartzo. Painel A: vista geral da balança e seus componentes; painel B: capela de vidro, dentro da qual está a fibra de quartzo. Sua disposição lembra uma vara de pesca; painel C: fibras musculares dissecadas, vista através do microscópio óptico, com magnificação de 2 vezes; painel D: pesagem de uma fibra muscular vista através do microscópio acoplado à balança. Na imagem é possível observar a fibra muscular repousando sobre a fibra de quartzo. O peso da fibra muscular ocasiona uma deflexão da fibra de quartzo. Esse deslocamento é medido através da escala fixada na lente do microscópio.

4.8.2 Determinação do tipo de fibra

Para a determinação do tipo de fibra, a outra metade foi dissolvida em solução com 10 μ L de tampão de extração (tris-hydroximetil-aminometano a 0.06 M (pH 6.8), dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1%, EDTA a 0.6%, glicerol a 18%, mercaptoetanol a 5%, e uma pequena quantidade de azul de bromofenol) a 4°C para a caracterização subsequente da isoforma de miosina de cabeça pesada (MHC, do inglês *Myosin Heavy Chain*) por meio eletroforese em gel de poliacrilamida (TALMADGE e ROY, 1993). A corrida dos géis durava aproximadamente 28 horas, sendo mantida dentro da geladeira por esse período para preservação das proteínas e para evitar aquecimento pela corrente elétrica. As proteínas foram visualizadas utilizando-se um kit de coloração de prata (PlosOne® Silver Staining kit). A diferenciação dos tipos de fibras foi feita visualmente pela presença das bandas correspondes a cada uma das isoformas de MHC, as quais foram comparadas com bandas de referência, geradas a partir de um extrato de diafragma de rato(figura 13).

Figura 13- caracterização das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) por meio de gel de poliacrilamida. Ref.: amostra de referência, composta por um extrato de músculo diafragma de rato selvagem. Os demais poços são extratos de fibras isoladas de músculo humano, especificamente do deltoide.

4.8.3 Análise da concentração de carnosina em fibras individuais

Extração

Após a tipagem de todas as fibras, as respectivas metades complementares foram juntadas em *pools* de acordo com o tipo de MHC que expressavam (I, IIx ou IIa). Os pools foram armazenados também em microtubos de 0.6 mL, guardados em freezer -20° até o momento da extração das proteínas. Para tanto, era adicionado 60 ou 70 µL de água, de acordo com a quantidade total de massa de cada pool (até 10 µg – 60 µL; acima de 10 µg – 70 µL). Em seguida, o conteúdo era agitado em vórtex na máxima velocidade durante três minutos. Durante a agitação, pequenas pausas eram feitas para garantir que todas as fibras estavam imersas na água. Quando constatado que haviam fibras presas a parede do tubo, as mesmas eram novamente imersas com o auxílio de uma pinça.

Análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para analisar o conteúdo de carnosina em fibras isoladas foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*). As medidas foram realizadas em um cromatógrafo (Hitachi, Schaumburg, IL) acoplado a um detector de fluorescência, seguindo uma adaptação do método descrito por DUNNETT et al. (1997). A adaptação foi a mesma utilizada por SALLES PAINELLI et al. (2018). Para a separação dos metabólitos, foi utilizada uma coluna de 5 µ, com 4.6 mm de diâmetro por 150 mm de comprimento (Agilent ZORBAX ODS, USA).

A cromatografia foi realizada sempre a uma temperatura constante de 25 °C utilizando-se um gradiente binário com fases móveis A e B. A fase móvel A era composta por: tampão acetato de sódio a 12.5 mM e pH 7.2; e tetrahydrofurano, numa proporção v/v de 995:5, respectivamente). A fase móvel B, por sua vez, era composta por: tampão acetato de sódio (o

mesmo utilizado para a fase A); metanol e acetonitrila, a uma proporção v/v de 500:350:150, respectivamente. O tampão acetato de sódio utilizado na composição das fases móveis, foi preparado da seguinte forma: primeiro foram misturadas quantidades isomolares de acetato de sódio ($1.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e ácido acético glacial ($0.751 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) em água ultrapura. O pH inicial desta solução apresentava valores próximos de 4.8, o qual era ajustado para 7.2 adicionando gradativamente uma solução de hidróxido de sódio a 5 M. Uma vez prontas, as fases eram filtradas em bomba de vácuo através de um filtro de membrana com poros de $0.22 \mu\text{m}$ (Merck Milipore, MA, EUA). Por fim, eram degaseificadas em sonificador durante cinco minutos.

A adaptação de SALLES PAINELLI et al. (2018) ao método descrito por Dunnett et al. (1997) permitiu a otimização do tempo de análise, o qual foi reduzido de 60 para 45 minutos por amostra. Assim, o gradiente utilizado foi configurado da seguinte forma: 0% de solvente B de 0 a 1,5 minutos; 35% de solvente B de 1,5 a 10 minutos; 60% do solvente B de 10 a 26 minutos; 100% do solvente B de 26 a 30 minutos; 100% do solvente B de 30 a 35 minutos; 0% do solvente B de 35 a 45 minutos. O fluxo, por sua vez, era mantido a $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ do início até 10 minutos, quando era reduzido gradativamente para $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ até o minuto 26. Este fluxo então era mantido até o final da análise (45 minutos).

Preparo das amostras

Imediatamente antes de proceder com a análise, o extrato do *pool* precisava ser misturado a um reagente de derivatização na proporção de 1:1. Esta etapa se faz necessária para tornar viável a detecção do analito de interesse (carnosina) pelo detector de fluorescência. Além disso, foi incluído um padrão de $6 \mu\text{M}$ de norleucina junto a cada amostra, na proporção de 2:1:1 (reagente de derivatização : amostra : padrão de norleucina) a fim de compensar possíveis erros decorrentes da reação de derivatização.

O reagente de derivatização foi preparado da seguinte forma: primeiramente foi feita uma solução de tampão borato de sódio anidro a 0.4 M e pH 9.5. Para isto, foi necessário diluir 8,084 g de borato de sódio anidro em 100 mL de água, a qual fora aquecida a 100°C em agitador, para permitir a dissolução total do borato de sódio. Em separado, foi preparada uma outra solução contendo optaldeído (OPA - Sigma Aldrich, St. Louis, MO) + etanol absoluto, na proporção de 40 mg de OPA para $800 \mu\text{L}$ de etanol absoluto. Por fim, o reagente derivatização era preparado misturando estes componentes nas seguintes proporções: $4 \mu\text{L}$ de β -

mercaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); 80 μL de OPA + etanol absoluto e 1000 μL de tampão borato de sódio.

Uma vez pronto, o reagente de derivatização era armazenado em geladeira a 4 °C e protegido da luz, sendo retirado apenas no momento de preparar cada amostra. Imediatamente antes da injeção, 10 μL do extrato da amostra era misturado em um *insert* com mais 10 μL de norleucina a 6 μM . Logo em seguida, eram pipetados 20 μL do reagente de derivatização. Antes de ser injetada no aparelho, aguardava-se um período de 90 segundos para permitir a ação do reagente de derivatização junto aos analitos.

Para quantificar o conteúdo de carnosina, foram produzidos cromatogramas a partir de padrões de 1 μM , 5 μM , 10 μM e 25 μM , através dos quais eram comparadas as áreas integradas para obter o valor correspondente a concentração de cada amostra. Este procedimento era realizado em todas as sessões de análise. Os padrões, bem como as amostras foram analisados em duplicata. O coeficiente de variação intra-ensaio para essa análise foi de 8,8%.

4.9 Determinação da concentração intramuscular total de carnosina

Após liofilizadas, as amostras passaram por um processo de dissecação através do qual foram retirados todos os vestígios visíveis de tecido conjuntivo e sangue. Em seguida, foram separadas alíquotas de aproximadamente 3 mg, as quais foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e trituradas com auxílio de uma pinça. Em seguida, essas amostras foram homogeneizadas em solução contendo ácido perclórico (HClO_4 Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 0,4 M e EDTA (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) a 1 mM. Eram adicionados 50 μL da solução para cada mg de tecido. Após a adição do reagente, a mistura foi agitada em *vórtex* em velocidade máxima durante 15 minutos, alternando com imersão em gelo por 30 segundos para cada 30 segundos de agitação. Subsequentemente, o homogenato foi centrifugado a 5000 g durante 3 minutos em centrífuga refrigerada a 4° C e, em seguida, o sobrenadante foi então separado e pesado para determinar o volume do extrato. Uma vez determinado o volume, foi adicionada ao extrato uma solução de bicarbonato de potássio (KHCO_3 - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 2,1 M, na proporção correspondente a $\frac{1}{4}$ do volume do extrato. Finalmente esta solução foi novamente centrifugada a 5000 g, em temperatura de 4° C, durante 3 minutos. O sobrenadante foi então separado e filtrado através

de filtros de seringa. O extrato final foi armazenado em freezer -80°C até serem submetidos a análise da concentração de carnosina.

Os extratos obtidos na etapa anterior foram analisados através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu (Japão) acoplado a um detector ultravioleta (UV) (SPD-10AV vp). O protocolo empregado seguiu a metodologia descrita por Mora, Sentandreu e Toldra (2007). Para separação dos analitos de interesse, foi utilizada uma coluna de sílica Atlatis HILIC (4.6 x 150 mm, 3 μm) da empresa Waters (Miliford, MA) acoplada a uma guarda de coluna de sílica Atlantis (5 x 2,1 mm, 3 μm) (Waters, Miliford, MA). Para proceder com as análises, foram utilizadas duas fases móveis (A e B), cujos preparos seguiram as seguintes receitas de acordo com Mora, Sentandreu e Toldra (2007):

Fase móvel A: acetato de amônia a 0.65 mM em solução de água/acetonitrila na proporção 25:75 (v/v). Uma vez pronta, o pH da solução foi ajustado para 5.5 através da adição de ácido clorídrico (HCL) a 2 M. Em seguida, a solução foi filtrada através de um filtro de membrana (0.2 μm) com o auxílio de uma bomba de vácuo.

Fase móvel B: acetato de amônio a 4,55 mM em solução de água/acetonitrila na proporção de 70:30 (v/v). Após o preparo o pH também foi ajustado para 5.5 adicionando-se solução de HCL a 2 M. Por fim, a solução foi filtrada através de um filtro de membrana (0.2 μm) com o auxílio de uma bomba de vácuo.

A condição de separação compreendeu um gradiente linear de 0 a 100% do solvente B em 13 minutos, sob um fluxo de $1.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A fim de detectar a substância fracionada, a separação foi monitorada utilizando-se o detector UV ajustado a um comprimento de onda de 214 nm. A concentração de carnosina nos extratos foi determinada através da quantificação da área dos picos correspondentes ao desprendimento da carnosina durante a separação. As áreas foram calculadas por meio de um software (Class VP, Japão) acoplado ao cromatógrafo. Os valores das áreas dos picos de cada amostra foram interpolados em uma equação de regressão gerada a partir de padrões de carnosina previamente injetados (nas concentrações de 50, 100, 500, 1000, 2500 μM). Todas as injeções foram feitas em duplicata. O coeficiente de variação intra ensaio foi de 2.03%.

Figura 14- cromatograma correspondente ao padrão de 50 µM de carnosina.

Figura 15- cromatograma correspondente ao padrão de 100 µM de carnosina.

Figura 16- cromatograma correspondente ao padrão de 500 μM de carnosina.

Figura 17- cromatograma correspondente ao padrão de 1000 μM de carnosina.

Figura 18- cromatograma correspondente ao padrão de 2500 μ M de carnosina.

4.10 Determinação das proporções dos tipos de fibra

Para proceder esta análise, foi aplicada a mesma técnica utilizada para a tipagem das fibras isoladas, descrita no tópico 4.8.2. Uma vez finalizada a corrida e o processo de coloração dos géis, estes foram fotografados e as imagens tratadas através do software gratuito ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). As proporções foram determinadas de acordo com a intensidade das bandas correspondentes a cada isoforma de MHC. Essas intensidades eram convertidas em sinais gráficos, dos quais foram calculadas as áreas abaixo das curvas e determinadas as proporções (figura 19).

Figura 19- Determinação das proporções dos tipos de fibra. À direita, os gráficos gerados a partir das intensidades das bandas. No exemplo, uma amostra de músculo deltoide.

4.11 Tratamento estatístico

Os dados são reportados como média e desvio padrão ($\pm$). As características gerais dos participantes no momento PRÉ, como idade, massa corporal, estatura, índice de massa corporal (IMC), tempo de lesão $\text{VO}_{2\text{pico}}$ e carga máxima foram comparadas entre os grupos através de um teste t para amostras independentes. Nos casos de distribuição não paramétrica, detectada através da aplicação do teste de Shapiro Wilk, foi utilizada a comparação de Mann-Whitney. O teste t para amostras independentes também foi aplicado para comparar a concentração basal de carnosina entre os músculos vasto lateral e deltoide de todos os voluntários. Entretanto, de três voluntários dentre os 16, não foi possível obter amostras do músculo vasto lateral. Portanto, para esta comparação, foram incluídos apenas os 13 demais participantes.

Para verificar o efeito da suplementação de beta-alanina sobre a concentração de carnosina em cada músculo (vasto lateral e deltoide) e sobre as variáveis de desempenho, foi aplicado o Modelo Misto tendo “grupo” e “tempo” como fatores. O mesmo teste foi aplicado para comparar as concentrações de carnosina por tipo de fibra muscular, neste caso, tendo “grupo”, “tempo” e “tipo de fibra” como fatores. Quando detectados valores de F significantes, análise de comparações múltiplas com correção de Tukey-Kraemer foi empregada para identificar diferenças entre grupos, tempos e tipos de fibra.

Para comparar a magnitude de resposta à suplementação entre cada músculo, primeiramente foi calculado a variação absoluta da concentração de carnosina para cada músculo (PÓS-PRÉ). Os valores então foram comparados aplicando-se um teste t para amostras independentes.

Também foi comparada a variação absoluta por tipo de fibra muscular. Neste caso, foi aplicado o Modelo misto tendo “grupo” e “tipo de fibra” como fatores.

Para todas as análises foi adotado o nível de significância $p < 0.05$. Os dados são apresentados como média e desvio padrão ($\pm$). Todos os procedimentos foram realizados no software SAS versão 9.3.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo alimentar

Os dados do consumo alimentar são apresentados na tabela 3. Ela contempla a ingestão média diária de macronutrientes (proteína, carboidratos e lipídeos), bem como a estimativa do consumo de beta-alanina a partir da ingestão de alimentos fontes de dipeptídeos histidínicos. Para esta última variável, a análise estatística não detectou qualquer efeito de interação “grupo x tempo” ($P = 0.7$), indicando que os voluntários mantiveram o consumo habitual estimado de beta-alanina entre os momentos PRE e PÓS suplementação. Apenas para o consumo relativo de carboidratos e lipídeos foi verificado efeito de interação “grupo x tempo”. Especificamente, houve uma diferença intra-grupo, para o grupo PL, entre os momentos PRE e POS suplementação. Para as demais variáveis, não foram detectadas diferenças significativas.

Tabela 3- Consumo alimentar estimado dos participantes.

	BA		PL		P
	PRE	POS	PRE	POS	
Et (kcal)	2005.8 ± 496.7	1756.7 ± 469.7	1547.6 ± 494.7	1407.9 ± 587.6	0.7
Ba (g)	0.8 ± 0.6	1.1 ± 1	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.7
Prot (g)	97.2 ± 25.4	90 ± 18	80.3 ± 36.4	70.6 ± 22.2	0.8
Prot (%)	20.4 ± 7.5	21.3 ± 5	20.7 ± 9.8	21.8 ± 7	0.9
Cho (g)	248.5 ± 83.2	214.3 ± 77.3	217.8 ± 86.8	137.7 ± 75.7	0.3
Cho (%)	49.2 ± 8.1	48 ± 8.6	55.2 ± 5.4	36.9 ± 9.6	0.01*
Lip (g)	69.2 ± 28.2	60 ± 23.3	39.5 ± 7.3	63.8 ± 26.3	0.06
Lip (%)	30.4 ± 9	32.3 ± 8.9	24 ± 6	41.2 ± 5	0.04*

Os dados são expressos como média e desvio padrão. BA: grupo Beta-Alanina; PL: grupo Placebo; Et: energia total; Ba: beta-alanina; Prot: proteína; Cho: carboidrato; Lip: lipídeos; Kcal: quilocaloria. O símbolo * indica interação “grupo” x “tempo” significativa.

5.2 Proporções dos tipos de fibra nos músculos vasto lateral e deltoide

A análise das proporções dos tipos de fibra através de gel de poliacrilamida, identificou grande predominância de fibras do tipo II no músculo vasto lateral dos participantes, numa proporção de $95.1 \pm 10.1\%$ para $4.9 \pm 10.6\%$ de fibras do tipo I. Por outro lado, no

músculo deltoide, as proporções se mostraram equilibradas: $50.3 \pm 15.7\%$ do tipo I e $48.1 \pm 15.1\%$ do tipo II.

5.3 Aderência à suplementação, eficácia do vendamento e efeitos colaterais

De acordo com o relato dos voluntários, colhidos através de uma tabela preenchida conforme orientações passadas por um nutricionista, a aderência à suplementação foi considerada alta. Em média, os participantes do grupo BA ingeriram $98 \pm 2\%$ das doses. No grupo PL este percentual foi de $97 \pm 1.5\%$.

Dos 10 participantes alocados no grupo BA e que completaram o estudo, apenas três acertaram a substância ingerida quando questionados. No grupo PL, por outro lado, dois dos quatro participantes corretamente afirmaram ter ingerido PL. A análise dessas proporções pelo teste exato de Fisher, entretanto, mostrou eficácia do vendamento ($P = 0.6$).

Apenas um participante alocado no grupo BA reportou efeito leve de parestesia. Todos os outros, inclusive do grupo PL, não relataram qualquer efeito colateral. Esse resultado atesta a eficácia das cápsulas de absorção lenta utilizadas neste estudo, desenvolvidas especificamente para evitar os efeitos de parestesia.

5.4 Concentração basal de carnosina muscular

Na comparação entre músculos inativo (vasto lateral) e ativo (deltoide), foi identificada uma significativa diferença na concentração basal de carnosina (respectivamente, 32.0 ± 12 vs 20.5 ± 6.1 mmol·kg⁻¹ de músculo seco; $P = 0.02$). Embora dois voluntários tenham apresentado valores de concentração muito acima da média, para o músculo vasto lateral, a diferença se manteve mesmo com a exclusão dos mesmos (figura 18, painel B). Dos 13 participantes incluídos nesta avaliação, um deles apresentou maior concentração de carnosina no músculo deltoide, enquanto outros dois apresentaram concentrações semelhantes entre os músculos. Cabe ressaltar que foram excluídos desta análise os voluntários dos quais não foi possível obter amostras do músculo vasto lateral.

Figura 20- Dados individuais referentes à concentração basal de carnosina nos músculos vasto lateral (VL) inativo e deltoide (DE) ativo. Painel A mostra os dados com *outliers*, os quais foram excluídos da análise apresentada no painel B.

5.5 Efeito da suplementação sobre a concentração de carnosina muscular

A análise pelo Modelo Misto identificou um significativo efeito de interação “grupo” x “tempo” ($F = 14.41$; $P = 0.0009$) sobre a concentração de carnosina no músculo deltoide. Especificamente, foi detectado um aumento de $90.5 \pm 51.4 \%$ entre os momentos PRÉ e PÓS suplementação no grupo BA (de 19.6 ± 6.5 para 35.6 ± 6.9 mmol·kg⁻¹ de músculo seco; $P = 0.0001$). No grupo PL, por sua vez, não houve variação significativa ($9.4 \pm 13.2 \%$) entre os momentos PRE e POS suplementação (de 22.4 ± 5.4 para 22.7 ± 4.5 ; mmol·kg⁻¹ de músculo seco; $P = 0.9$).

A análise para o músculo vasto lateral (figura 21, painel B), por outro lado, não detectou efeito de interação “grupo” x “tempo” significativo ($F = 4.7$; $P = 0.057$), muito embora o grupo BA tenha demonstrado um aumento relativo de $68.9 \pm 55.1 \%$ (de 32.3 ± 13.8 para 46.5 ± 12.7 mmol·kg⁻¹ de músculo seco) na concentração de carnosina. No PL, todavia, essa variação foi de apenas $7.9 \pm 7.2 \%$ (de 30.8 ± 1 para 33.2 ± 3.7 mmol·kg⁻¹ de músculo seco). Cabe destacar que houve aumento em oito das nove amostras analisadas no grupo BA. Em números individuais absolutos, o mínimo e máximo aumento observados foram de 11.6 e 28 mmol·kg⁻¹ de músculo seco, respectivamente (ver figura 22).

Figura 21- Concentração de carnosina nos músculos deltoide (painel A) e vasto lateral (painel B) nos momentos PRE e POS suplementação. Legenda: o símbolo “*” indica diferença intra-grupo significativa em relação ao momento PRE; “#” indica diferença entre-grupos significativa em relação ao momento PRE; “&” indica diferença significativa entre-grupos em relação ao momento PÓS.

5.6 Variação absoluta da concentração de carnosina muscular

Para verificar possíveis diferenças entre as respostas de músculos ativos (deltoide) e inativos (vasto lateral) à suplementação de beta-alanina, foram comparados os deltas (Δ) de variação (POS - PRE) entre os músculos vasto lateral e deltoide. Interessantemente, o teste *t* para amostras independentes não identificou para essa variável entre os músculos (vasto lateral e deltoide, respectivamente: 17.6 ± 10.4 vs 15.7 ± 6.8 mmol·kg⁻¹ de músculo seco; $P = 0.6$) (figura 22). Esse resultado indica que a resposta à suplementação, em termos de aumento de carnosina muscular, ocorreu na mesma magnitude, independentemente da condição de ativo (deltoide) ou inativo (vasto lateral) do músculo analisado.

A fim de verificar uma provável influência da concentração de carnosina basal sobre a variação absoluta, foi aplicada uma análise de covariância, considerando a concentração de carnosina basal como covariável. Os resultados indicaram que não houve interferência da

concentração de carnosina basal sobre a variação absoluta verificada entre os músculos ($F = 1.3$; $P = 0.3$).

Figura 22- Dados individuais referentes à variação absoluta (Δ POS – PRE) da concentração de carnosina muscular. Legenda: BA – grupo beta alanina; PL: grupo placebo; VL: músculo vasto lateral; DE: músculo deltoide.

Um teste t independente também foi aplicado para identificar possíveis diferenças sobre os deltas percentuais. A análise não identificou diferença significativa para essa variável entre os músculos vasto lateral e deltoide (respectivamente, $68.9 \pm 55.1\%$ vs $90.5 \pm 51.4\%$; $P = 0.4$).

Figura 23- Dados individuais referentes à variação relativa da concentração de carnosina muscular. Legenda: BA – grupo beta alanina; PL: grupo placebo; VL: músculo vasto lateral; DE: músculo deltoide.

5.7 Efeito da suplementação sobre a concentração de carnosina por tipo de fibra

Para proceder com a análise estatística por tipo de fibra muscular, foram consideradas as seguintes informações: para o músculo deltoide, não houve número suficiente de fibras do tipo IIa e IIx/IIa (híbridas) que permitissem a formação de pares para comparação. Nesse caso, foram incluídas na análise apenas as fibras do tipo I e IIx. Para o músculo vasto lateral, o baixo número de fibras do tipo I e IIx permitiu apenas a formação de pares entre as fibras do tipo IIa e IIx/IIa, as quais foram incluídas na análise. Pelos mesmos motivos, não foi possível realizar a comparação do conteúdo basal entre vasto lateral e deltoide, por tipo de fibra.

Para o músculo deltoide (tabela 3), o Modelo Misto considerando “grupo”, “tipo de fibra” e “tempo” como fatores, não detectou efeito de interação ($F = 0.89$; $P = 0.5$). Especificamente no grupo BA, no entanto, foi observado um aumento relativo de 82.4 ± 87.7 % nas concentrações de carnosina em fibras do tipo I (de 27.3 ± 12.6 para 39.6 ± 16.3 mmol·kg⁻¹ de ms) e de 62.5 ± 30.2 % em fibras do tipo IIx (de 35.9 ± 20.3 para 48.5 ± 23.9 mmol·kg⁻¹ de ms). No grupo PL, por sua vez, houve apenas uma pequena variação de 3.4 ± 10.6 % em fibras do tipo I (de 27.3 ± 10.5 para 27.6 ± 5.6 mmol·kg⁻¹ de ms) e de 1.5 ± 21.6 % em fibras do tipo IIx (de 31.9 ± 14.9 para 31.3 ± 12.4 mmol·kg⁻¹ de ms). Adicionalmente, a análise pelo modelo misto não detectou efeito principal para o tipo de fibra ($F = 3.44$; $P = 0.07$), o que sugere não haver diferença significativa entre as concentrações de carnosina verificadas em fibras do tipo I e IIx no músculo deltoide. Os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4- concentração de carnosina nos tipos de fibra I e IIx do músculo deltoide.

	PRE		PÓS	
	Tipo I	Tipo IIx	Tipo I	Tipo IIx
BA	27.3 ± 12.6	35.9 ± 20.3	39.6 ± 16.3	48.5 ± 23.9
PL	27.3 ± 10.5	31.9 ± 14.9	27.6 ± 8.6	31.3 ± 12.4

Os dados são expressos como média e desvio padrão ($\pm$) e correspondem a concentração de carnosina em mmol·kg⁻¹ de músculo seco. BA: grupo beta-alanina; PL: grupo placebo.

A análise por tipo de fibra para o músculo vasto lateral (tabela 4), por outro lado, detectou significativo efeito de interação “grupo” x “tipo de fibra” x “tempo” ($F = 3.51$; $P = 0.02$). Especificamente no grupo BA, foi verificado significativo efeito intra-grupo entre os

momentos PRE e POS suplementação, tanto para as fibras do tipo IIa (de 40.1 ± 11 para $55.8 \pm 11.2 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ms; $P = 0.04$) como para fibras do tipo IIa/IIx (de 34.8 ± 12.5 para $54.2 \pm 14.7 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ms; $P = 0.0003$). Em números relativos, as fibras do tipo IIa apresentaram aumento médio de $34.6 \pm 27.3\%$, enquanto que nas fibras do tipo IIa/IIx esse aumento foi de $63.1 \pm 42.5\%$. No grupo placebo não foram detectados qualquer efeito intra-grupo para fibras do tipo IIa (de 35.6 ± 3.1 para $33.9 \pm 9 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ms; $+9.2 \pm 25.9\%$; $P = 1$) e fibras do tipo IIa/IIx (variação de $10.1 \pm 19.8\%$) (de 39.45 ± 5.6 para $34.9 \pm 2.8 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ms; $+10.1 \pm 19.8\%$; $P = 0.9$). Esses resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5- concentração de carnosina nos tipos de fibra IIa e IIa/IIx do músculo vasto lateral

	PRE		PÓS	
	Tipo IIa	Tipo IIa/IIx	Tipo IIa	Tipo IIa/IIx
BA	40.1 ± 11	34.8 ± 12.5	$55.8 \pm 11.2^*$	$54.2 \pm 14.7^*$
PL	35.6 ± 3.1	39.4 ± 5.6	33.9 ± 9	34.9 ± 2.8

Os dados são expressos como média e desvio padrão ($\pm$) e correspondem a concentração de carnosina em $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ de músculo seco. O símbolo * indica significativo efeito intra-grupo em relação ao momento PRE. BA: grupo beta-alanina; PL: grupo placebo.

Ainda para verificar possíveis diferenças na variação absoluta entre os tipos de fibra, uma análise por Modelo Misto foi executada para cada um dos músculos, considerando “tipo de fibra” e “grupo” como fatores. Como resultado, não foram verificados efeitos de interação “tipo de fibra” x “grupo” para o músculo vasto lateral ($F = 0.37$; $P = 0.5$) ou deltoide ($F = 0.09$; $P = 0.8$). Porém, um significativo efeito principal de “grupo” foi detectado em ambos os casos (vasto lateral: $F = 13.4$, $P = 0.003$; deltoide: $F = 6$, $P = 0.02$), o que indica diferença nas variações absolutas entre os grupos BA e PL. Adicionalmente, a ausência de efeito principal para o tipo de fibra (vasto lateral: $F = 0.17$, $P = 0.7$; deltoide: $F = 0.01$, $P = 0.9$) indica que a variação absoluta da concentração de carnosina ocorreu em magnitude semelhante entre os diferentes tipos de fibra. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6- Variação absoluta da concentração de carnosina nos diferentes tipos fibras dos músculos vasto lateral e deltoide.

	VASTO LATERAL		DELTOIDE	
	Δ Tipo IIa	Δ Tipo IIa/IIx	Δ Tipo I	Δ Tipo IIx
BA	$+13.4 \pm 9.3^*$	$+19 \pm 9.9^*$	$+14.3 \pm 20.9^*$	$+16.9 \pm 6^*$
PL	-3.5 ± 9.8	-4.5 ± 5.9	$+0.7 \pm 2.2$	$+0.7 \pm 4.2$

Os dados correspondem à variação absoluta no conteúdo de carnosina em $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de ms. BA: grupo beta-alanina; PL: grupo placebo. O símbolo “*” indica efeito principal de grupo significativo.

5.8 Testes de capacidade

5.8.1 Teste de carga constante

A análise pelo Modelo Misto não detectou qualquer efeito de interação “grupo” x “tempo” ($F = 3.3$; $P = 0.1$) sobre o tempo total. Não houve, portanto, diferença significativa entre os momentos PRE e POS suplementação para o grupo BA (de 84.6 ± 25.4 para 75.6 ± 27.8 segundos) ou para o grupo PL (de 99.5 ± 28.2 para 105.7 ± 28.4 segundos). Os resultados são apresentados na figura 24 (painel A). Da mesma maneira, não foram verificados efeitos de interação “grupo” x “tempo” ($F = 3.2$; $P = 0.1$) sobre o trabalho total realizado (figura 24, painel B). As médias PRÉ e PÓS suplementação para os grupos BA (de 9.8 ± 4.8 para 8.9 ± 5.1 kJ) e PL (de 12.7 ± 6 para 10.6 ± 3.6 kJ), portanto, não sofreram variações significativas. Em concordância, também não foi detectada interação significativa ($F = 0.7$; $P = 0.7$) sobre a concentração de lactato pós esforço (figura 25).

Figura 24- Tempo até a exaustão (painel A) e trabalho total realizado (painel B) realizado antes (PRE) e após (POS) suplementação de beta-alanina.

Figura 25- Concentração de lactato nos grupos BA (painel A) e PL (painel B), antes (PRE) a após (POS) suplementação de beta-alanina. As medidas foram realizadas antes do teste de carga constante (repouso) e 3, 5 e 7 minutos após a tarefa.

5.8.2 Teste de Wingate com série única

A análise pelo Modelo Misto não detectou efeito de interação “grupo” x “tempo” ($F = 2.2$; $P = 0.9$) sobre a potência pico, indicando que não houve qualquer variação entre os momentos PRÉ e PÓS suplementação no grupo BA (de 235.7 ± 109.7 para 332 ± 167.2 W) ou no grupo PL (de 329.6 ± 165.3 para 270.9 ± 38.2 W). A mesma ausência de interação foi verificada sobre o trabalho total realizado ($F = 1.47$; $P = 0.3$), indicando não haver variação entre os momentos PRE e POS suplementação tanto no grupo BA (de 6.5 ± 2.6 para 6.6 ± 2.7 W), como no grupo PL (de 7.3 ± 3.3 para 6.3 ± 6.3 W). A concentração de lactato pós esforço, consequentemente, não variou e ambos os grupos ($F = 0.72$; $P = 0.7$). Os resultados são apresentados nas figuras 26 e 27.

Figura 26- Potência pico (painel A) e trabalho total realizado (painel B) realizado antes (PRE) e após (POS) suplementação de beta-alanina.

Figura 27- Concentração de lactato nos grupos BA (painel A) e PL (painel B), antes (PRE) a após (POS) suplementação de beta-alanina. As medidas foram realizadas no repouso e 3, 5 e 7 minutos após o teste de Wingate de série única.

6 DISCUSSÃO

O aumento do conteúdo muscular de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina é reportado em um robusto corpo de evidências produzidas desde 2006, quando foi publicado o primeiro estudo que atestou esse fato em humanos (HARRIS et al., 2006; HILL et al., 2007; KENDRICK et al., 2008; BAGUET et al., 2009; KENDRICK et al., 2009; DEL FAVERO et al., 2012; STELLINGWERFF, DECOMBAZ, et al., 2012; SAUNDERS, V, et al., 2017). A esse respeito, pouquíssimas evidências (BEX et al., 2014; BEX et al., 2015) envolvendo atletas e pessoas sedentárias, sugeriam que músculos cronicamente treinados ou o treinamento físico concomitante à suplementação, promoveriam síntese mais expressiva de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina. A fim de testar essa hipótese, optamos por um modelo extremo, através do qual foi possível verificar pela primeira vez, no mesmo indivíduo, a resposta de um músculo cronicamente ativo do membro superior, o deltoide, em comparação com um músculo cronicamente inativo do membro inferior, o vasto lateral. Além disso, esse experimento apresenta dados transversais inéditos a respeito dos efeitos crônicos do desuso por inativação sobre a concentração de carnosina muscular. Outro grande diferencial do presente estudo foi o uso de biópsias musculares, o que permitiu a análise direta das concentrações de carnosina muscular total e por tipo de fibra, através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), método considerado padrão ouro para esse tipo de avaliação.

O primeiro dos principais achados desse trabalho diz respeito à concentração de carnosina muscular total no período basal. Curiosamente, foi verificada uma significativa diferença entre os músculos, onde a média de concentração de carnosina no vasto lateral (inativo) era 56% maior em relação à média de concentração no músculo deltoide (ativo). Embora contrarie a associação entre o conteúdo de carnosina e os efeitos crônicos do exercício, esse resultado corrobora achados clássicos como o de Dunnett (1995) e mais recentes, a exemplo de Kendrick et al. (2009) e Salles Painelli et al. (2018). Em conjunto, esses estudos mostraram que fibras de característica glicolítica (tipo II), as quais são mais susceptíveis ao acúmulo de íons H^+ resultantes do processo de produção energética por vias anaeróbias, possuem até duas vezes mais carnosina do que fibras de característica oxidativa (tipo I). Em indivíduos acometidos por lesão medular acompanhada de perda de função motora nos membros inferiores, por sua vez, profundas mudanças ocorrem naquele tecido afetado, as quais vão desde transformações morfológicas a modificações metabólicas e fenotípicas (GRIMBY et al., 1976; SCELSE et al., 1982). Uma das mudanças mais importantes, refere-se à transformação do tipo de fibra, que ocorre no sentido de predominância praticamente total de fibras do tipo II

(BURNHAM et al., 1997). Nos membros superiores, entretanto, a proporção equilibrada entre os dois tipos permanece preservada, como mostraram Grimby et al. (1976) e tal como foi mostrado no presente estudo. É provável, portanto, que a elevada concentração de carnosina verificada no vasto lateral inativo, ocorra em função da absoluta predominância de fibras do tipo II. Nesse sentido, nosso estudo incluiu análise da concentração de carnosina isoladamente nos diferentes tipos de fibra. De fato, os resultados mostraram concentrações basais semelhantes entre fibras do tipo II no deltoide (IIx: $35.9 \pm 20.3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco) e no vasto lateral (IIa: 40.1 ± 11 ; IIa/IIx: $34.8 \pm 12.5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco). Infelizmente não foi possível separar fibras do tipo I em número suficiente que permitisse medir a concentração de carnosina nesse tipo específico para o vasto lateral. Porém, tal limitação se justifica em função da absoluta predominância de fibras do tipo II, condição inerente ao músculo inativo. Ainda considerando que o tempo de lesão entre os participantes era, em média, de 14 anos, a detecção de elevadas concentrações de carnosina no tecido inativo parece sugerir que o destreinamento ou desuso, cronicamente, não interfere nos mecanismos de síntese de carnosina e transporte dos seus aminoácidos constituintes para dentro da célula muscular. Infelizmente esse estudo não contemplou a análise da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo da carnosina no tecido muscular, a exemplo da CS (carnosina sintase), TauT e PHT1, responsáveis pela síntese de carnosina, transporte de beta-alanina e de histidina, respectivamente (NAVAB et al., 1984; DROZAK et al., 2010; EVERAERT et al., 2013). Porém, de acordo com os nossos resultados, é razoável assumir que tais proteínas se mantêm expressas assim como em tecidos musculares íntegros, mantendo dessa forma a homeostase do dipeptídeo no músculo inativo.

A dieta é um importante fator que, cronicamente, pode afetar a concentração de carnosina muscular, considerando que a biodisponibilidade de beta-alanina é o principal fator limitante à síntese muscular do composto (HARRIS et al., 2006). Por esse motivo, o consumo de alimentos ricos em dipeptídeos histidínicos, como é o caso da maioria das carnes de animais terrestres e aquáticos incluídas em dietas onívoras, interfere de maneira significativa no conteúdo muscular de carnosina (BOLDYREV, ALDINI e DERAIVE, 2013; DOLAN et al., 2018). A fim controlar essa variável, um dos critérios de inclusão adotados nesse estudo exigia que os participantes não fossem vegetarianos, uma vez que nesses indivíduos o conteúdo de carnosina muscular tende a ser cerca de 26% menor em relação aos onívoros (EVERAERT et al., 2011). De acordo com estimativas elaboradas a partir de dados fornecidos pela Organização de Agricultura e Alimentos, a média diária de ingestão de beta-alanina pelos brasileiros, a partir do consumo de alimentos fontes de dipeptídeos histidínicos, é de aproximadamente 0.7 g, o que

caracteriza apenas 11% da dose comumente usada nos protocolos de suplementação ($6.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$). De fato, em nosso estudo, a estimativa obtida através dos diários alimentares mostrou que, entre os participantes, o consumo médio de beta-alanina na dieta variou de $0.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$ no grupo PL a $1.1 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$ grupo BA, valores que, portanto, se aproximam do padrão médio brasileiro. Em concordância, a concentração basal de carnosina no músculo deltoide desses mesmos participantes ($20.5 \pm 6.1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco) não diferente daquelas encontradas em vasto lateral de sujeitos onívoros e andantes, como reportaram MANNION et al. (1992): 21.3 ± 4.3 a $6.1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; HARRIS et al. (2006): 19.6 a $23.6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco; HILL et al. (2007): 19.9 ± 1.9 a $23.6 \pm 2.4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco e KENDRICK et al. (2008): $23.9 \pm 5.9 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco. Essas informações fornecem base consistente para descartar um possível efeito crônico da dieta sobre as elevadas concentrações de carnosina verificadas no tecido muscular inativo dos nossos voluntários, ao passo reforçam a influência da predominância de fibras do tipo II nesse resultado.

No tocante à responsividade do músculo vasto lateral, cronicamente inativo, à 28 dias de suplementação de beta-alanina ($6.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$), nossos resultados curiosamente mostraram que a magnitude de resposta, em termos de aumento absoluto nas concentrações musculares de carnosina ($\Delta = 17.6 \pm 10.4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco), não foi diferente daquela verificada no músculo deltoide ativo ($\Delta = 15.7 \pm 6.8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo seco). Até a conclusão desse estudo, somente três trabalhos anteriores se propuseram avaliar os efeitos do treinamento físico sobre o aumento de carnosina muscular em resposta à suplementação de beta-alanina (KENDRICK et al., 2009; BEX et al., 2014; BEX et al., 2015). Esses experimentos foram idealizados com base em achados relativos à suplementação de creatina, através dos quais foi verificado que o implemento do exercício físico associado a suplementação, era capaz de aumentar a eficiência do protocolo ao induzir maior acúmulo do substrato pela célula muscular (HARRIS, SODERLUND e HULTMAN, 1992; ROBINSON et al., 1999). Os primeiros a testarem essa hipótese aplicada à suplementação de beta-alanina foram KENDRICK et al. (2009), os quais verificaram que o aumento de carnosina muscular após 10 semanas de suplementação de beta-alanina, não sofreu qualquer influência das sessões de treino isocinético, compostas por 10 séries de 10 contrações máximas. Embora o nosso estudo seja de natureza observacional, uma vez que não há emprego de exercício, mas somente a comparação entre dois músculos cronicamente ativo e inativo, é plausível assumir que os nossos resultados corroboram as investigações de Kendrick et al. (2009), propondo a nulidade da influência do exercício sobre a eficiência da suplementação de beta-alanina, além de atestar a ausência de

prejuízo da inatividade crônica sobre a capacidade de captação dos aminoácidos constituintes e síntese de carnosina muscular.

Por outro lado, nossos achados contrastam com o que foi verificado por Bex et al. (2014) em estudo também de característica observacional. Na ocasião os autores compararam o aumento de carnosina muscular, induzido por suplementação de beta-alanina, entre não-atletas e atletas que teoricamente treinavam membros superiores (caiaquistas), inferiores (ciclistas) ou ambos (nadadores). Enquanto músculos treinados expressaram um aumento de 78% no conteúdo muscular de carnosina, esse percentual em não treinados foi de apenas 43%, sugerindo uma possível influência das adaptações crônicas ao exercício, sobre a síntese de carnosina muscular em resposta à suplementação de beta-alanina. Convém ressaltar, entretanto, limitações inerentes ao trabalho em questão. A mais importante delas se deve ao uso da ressonância magnética de hidrogênio (^1H RMN) como método de quantificação da carnosina muscular. Apesar de caracterizar uma técnica não invasiva, um estudo conduzido pelo nosso grupo (dados não publicados) mostrou baixa acurácia do método ao comparar com resultados obtidos a partir de análise direta por HPLC, padrão ouro para esse tipo de medida. Em adição, esse método de análise não permite diferenciar o tipo de fibra muscular, fator que poderia influenciar a magnitude de resposta. Além disso, o treinamento de atletas normalmente envolve atividades não específicas da modalidade praticada, onde caiaquistas, por exemplo, costumam realizar treinamento de força e potência para membros inferiores (NILSSON e ROSDAHL, 2016). Portanto, pode ser inadequado assumir que tal comparação fora realizada entre dois grupamentos musculares treinado e não treinado em um mesmo indivíduo.

Em contrapartida às limitações mencionadas anteriormente, ao incluir atletas e homens fisicamente ativos com lesão medular no nosso estudo, foi possível anular qualquer influência da contração muscular e do exercício crônico sobre a variável de interesse no músculo vasto lateral inativo, ao passo que viabilizou a comparação com um músculo cronicamente ativo no mesmo indivíduo. Além disso, a quantificação direta do conteúdo muscular de carnosina por HPLC, garantiu maior acurácia às nossas medidas, reforçando a confiabilidade dos valores verificados. Por conseguinte, também foi possível medir essa variação isoladamente nos diferentes tipos de fibra muscular, o que permitiu checar a possibilidade de respostas variadas de acordo com o fenótipo. A esse respeito, no grupo suplementado, foi observado um aumento absoluto significativo em ambos os tipos de fibra para ambos os músculos (tabela 6). Portanto, fibras do tipo I e IIx, no músculo deltoide ativo, e fibras do tipo IIa e IIa/IIx, no músculo vasto lateral inativo, obtiveram aumento de carnosina

muscular em magnitudes semelhantes após 28 dias de suplementação. Esses achados reforçam evidências anteriores, a exemplo de HILL et al. (2007) e Kendrick et al. (2009), que também não reportaram diferenças no acúmulo de carnosina entre os diferentes tipos de fibra. Somados a esses, nossos resultados atestam que, apesar de ser determinante para o conteúdo basal, o tipo de fibra não diferencia a magnitude de aumento de carnosina em resposta à suplementação de beta-alanina.

Como se sabe, as propriedades químicas da carnosina a classificam como um tampão ideal para atuar na faixa de variação do pH muscular (SMITH, 1938), fato que vem sendo confirmado ao longo de cem anos desde a sua descoberta (SEVERIN, KIRZON e KAFTANOVA, 1953; DOLAN et al., 2018). Por consequência, o aumento do conteúdo muscular de carnosina através da suplementação de beta-alanina resulta em melhora na capacidade de realizar esforços de característica acidótica (HOBSON et al., 2012; BELLINGER, 2014; SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017). No presente estudo, entretanto, o aumento de carnosina muscular não se traduziu em melhora sobre tempo até a exaustão dispendido em um teste supramáximo de carga constante. Também não resultou em melhora sobre a potência pico e trabalho total realizado no subsequente teste de Wingate de série única. A ausência de variação nas concentrações de lactato pós exercício, entre os momentos PRE e POS suplementação, também confirmam, indiretamente, que não houve produção energética adicional por via anaeróbia glicolítica. Esse resultado contraria a maior parte dos achados que até o momento reforçam a efetividade ergogênica da suplementação de beta-alanina, em especial naqueles exercícios de alta intensidade e com duração média de 30 segundos a 10 minutos (SAUNDERS, ELLIOTT-SALE, et al., 2017), intervalo de tempo condizente com o protocolo de testes aplicado no nosso estudo. Ademais, uma investigação conduzida em nosso laboratório produziu evidências no sentido de atribuir aos membros superiores maior responsividade à ação de suplementos que aumentam a capacidade tamponante, a exemplo do bicarbonato de sódio e da própria beta-alanina (TOBIAS et al., 2013). Por esse motivo, nossa hipótese era a de que homens na condição de cadeirantes poderiam se beneficiar de maneira significativa desses efeitos. Entretanto, a despeito do aumento absoluto das concentrações de carnosina no músculo deltoide, não foram detectadas melhoras nos testes de esforço.

Cabe destacar algumas limitações que permearam a condução desse estudo. A mais importante delas concerne ao baixo número amostral, fator que acaba reduzindo o poder estatístico das análises. Entretanto, a quantidade limitada de participantes era uma questão de

antemão prevista, considerando tratar-se de um grupo populacional minoritário. A fim de reduzir o impacto desse fator nas nossas análises, optamos por distribuir os participantes entre os grupos na proporção de 2:1 (BA:PL). Entretanto, apesar de aumentar o número de observações possíveis no grupo BA, esta opção limita a quantidade amostral no grupo PL. Vicissitudes como a desistência de dois voluntários após a primeira sessão de biópsias (um de cada grupo), bem como a impossibilidade quanto a retirada de tecido muscular do vasto lateral em dois casos (também um em cada grupo), certamente impactaram o trabalho. Os resultados relacionados à capacidade física foram os mais afetados pelas limitações, considerando que apenas metade dos participantes completaram as sessões de testes físicos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão esse estudo mostrou, pela primeira vez, que a inatividade muscular crônica não afeta a capacidade de captação dos aminoácidos constituintes (beta-alanina e L-histidina) e de síntese de carnosina nesse tecido, fato deduzido pelas concentrações basais detectadas no músculo vasto lateral. Também foi atestado que o aumento de carnosina muscular, induzido pela suplementação de beta-alanina, é indiferente à inatividade e atividade muscular crônica, o que sugere a irrelevância do estado de treinamento ou da contração muscular sobre a capacidade de captar precursores da carnosina e sintetizar o dipeptídeo. O aumento de carnosina muscular em resposta a suplementação de beta-alanina, entretanto, não se traduziu em melhora na capacidade de realizar esforços de alta intensidade.

REFERÊNCIAS

- ABE, H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. **Biochemistry (Mosc)**, v. 65, n. 7, p. 757-765, 2000.
- ANDERSON, C. M.; GANAPATHY, V.; THWAITES, D. T. Human solute carrier SLC6A14 is the beta-alanine carrier. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 17, p. 4061-4067, 2008.
- ARTIOLI, G. G. et al. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 6, p. 1162-1173, 2010.
- BAGUET, A. et al. Important role of muscle carnosine in rowing performance. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 109, n. 4, p. 1096-1101, 2010.
- BAGUET, A. et al. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 106, n. 3, p. 837-842, 2009.
- BAKER, P. R. et al. Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 5, p. C1359-1365, 2004.
- BATRUKOVA, M. A.; RUBTSOV, A. M. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1324, n. 1, p. 142-150, 1997.
- BAUCHART, C. et al. Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 589-593, 2007.
- BEGUM, G.; CUNLIFFE, A.; LEVERITT, M. Physiological role of carnosine in contracting muscle. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 493-514, 2005.
- BELLINGER, P. M. beta-Alanine supplementation for athletic performance: an update. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 28, n. 6, p. 1751-1770, 2014.
- BERGSTROM, J. Muscle electrolytes in man determination by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 14, p. 100-110, 1962.
- BEX, T. et al. Exercise training and Beta-alanine-induced muscle carnosine loading. **Frontiers in Nutrition**, v. 2, p. 13, 2015.
- BEX, T. et al. Muscle carnosine loading by beta-alanine supplementation is more pronounced in trained vs. untrained muscles. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 116, n. 2, p. 204-209, 2014.
- BLANCQUAERT, L. et al. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by beta-alanine transamination. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4849-4863, 2016.
- BOLDYREV, A. A. Carnosine and oxidative stress in cells and tissues. **Nove York: Nova Science Publishers**, 2007.
- _____. Carnosine: new concept for the function of an old molecule. **Biochemistry (Mosc)**, v. 77, n. 4, p. 313-326 2012.

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

BUDZEN, S.; RYMASZEWSKA, J. The biological role of carnosine and its possible applications in medicine. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 22, n. 5, p. 739-744, 2013.

BUNGE, R. P. et al. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. **Advances in Neurology**, v. 59, p. 75-89, 1993.

BURNHAM, R. et al. Skeletal muscle fibre type transformation following spinal cord injury. **Spinal Cord**, v. 35, n. 2, p. 86-91, 1997.

CALBET, J. A. L. H., H. C.; ROSDAHL, H.; VAN HALL, G.; JANSEN-URSTAD. Why do arms extract less oxygen than legs during exercise? **Am Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. R1448-R1458, 2005.

CARRARO, U. et al. Muscle fiber regeneration in human permanent lower motoneuron denervation: relevance to safety and effectiveness of FES-training, which induces muscle recovery in SCI subjects. **Artificial Organs**, v. 29, n. 3, p. 187-191, 2005.

CARVALHO, V. H. et al. Exercise and beta-alanine supplementation on carnosine-acrolein adduct in skeletal muscle. **Redox Biology**, v. 18, p. 222-228, 2018.

CASTRO, M. J. et al. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle within 6 mo of injury. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 86, n. 1, p. 350-358, 1999.

COSTILL, D. L. et al. Leg muscle pH following sprint running. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 15, n. 4, p. 325-329, 1983.

CRAMERI, R. M. et al. Effects of electrical stimulation-induced leg training on skeletal muscle adaptability in spinal cord injury. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 12, n. 5, p. 316-322, 2002.

CULBERTSON, J. Y. et al. Effects of beta-alanine on muscle carnosine and exercise performance: a review of the current literature. **Nutrients**, v. 2, n. 1, p. 75-98, 2010.

DE SALLES PAINELLI, V. et al. Influence of training status on high-intensity intermittent performance in response to beta-alanine supplementation. **Amino Acids**, v. 46, n. 5, p. 1207-1215, 2014.

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, 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, 2012.

DEN, H.; ROBINSON, W. G.; COON, M. J. Enzymatic conversion of beta-hydroxypropionate to malonic semialdehyde. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 7, p. 1666-1671, 1959.

DERAVE, W. et al. Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 247-263, 2010.

DERAVE, W. et al. beta-Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. **Journal of Applied Physiology** (1985), v. 103, n. 5, p. 1736-1743, 2007.

DOLAN, E. et al. A Comparative Study of Hummingbirds and Chickens Provides Mechanistic Insight on the Histidine Containing Dipeptide Role in Skeletal Muscle Metabolism. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14788, 2018.

DROZAK, J. et al. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 13, p. 9346-9356, 2010.

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

DUNNETT, M. et al. Carnosine, anserine and taurine contents in individual fibres from the middle gluteal muscle of the camel. **Research in Veterinary Sciences**, v. 62, n. 3, p. 213-216, 1997.

DUNNETT, M. H., R. C. Carnosine and Taurine contents of typeI, IIA and IIB fibres in the middle gluteal muscle of theThoroughbred horse. **Equine Veterinart Journal**, v. 18, p. 214-217, 1995.

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

DUTKA, T. L. et al. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca(2)(+) sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca(2)(+) release in human skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology** (1985), v. 112, n. 5, p. 728-736, 2012.

EVERAERT, I. et al. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 5, p. 1169-1179, 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. 1221-1229, 2011.

FRITZSON, P.; PIHL, A. The catabolism of C14-labeled uracil, dihydrouracil, and beta-ureidopropionic acid in the intact rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 229-235, 1957.

GARDNER, M. L. et al. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. **Journal of Physiology**, v. 439, p. 411-422, 1991.

GOODALL, M. C. Carnosine phosphates as phosphate donor in muscular contraction. **Nature**, v. 178, n. 4532, p. 539-540, 1956.

GORDON, A. M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 853-924, 2000.

GRIMBY, G. et al. Muscle fiber composition in patients with traumatic cord lesion. **Scandinavian Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37-42, 1976.

HANSON, H. T.; SMITH, E. L. Carnosinase; an enzyme of swine kidney. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 179, n. 2, p. 789-801, 1949.

HARRIS, R. C.; SODERLUND, K.; HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. **Clin Sci (Lond)**, v. 83, n. 3, p. 367-374, 1992.

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. 279-289, 2006.

HARRIS, R. C. et al. Determinants of muscle carnosine content. **Amino Acids**, v. 43, n. 1, p. 5-12, 2012.

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

HAYAISHI, O. et al. Enzymatic studies on the metabolism of beta-alanine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, p. 781-790, 1961.

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. 225-233, 2007.

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, 2012.

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

ITO, S. et al. Influence of dietary protein levels on beta-alanine aminotransferase expression and activity in rats. **Journal of Nutritional Science Vitaminology (Tokyo)**, v. 47, n. 4, p. 275-282, 2001.

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

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. 547-554, 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. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 1, p. 131-138, 2009.

KIM, H. J. Comparison of the carnosine and taurine contents of vastus lateralis of elderly Korean males, with impaired glucose tolerance, and young elite Korean swimmers. **Amino Acids**, v. 36, n. 2, p. 359-363, 2009.

KISH, S. J.; PERRY, T. L.; HANSEN, S. Regional distribution of homocarnosine, homocarnosine-carnosine synthetase and homocarnosinase in human brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1629-1636, 1979.

KO, R. et al. Evidence-based evaluation of potential benefits and safety of beta-alanine supplementation for military personnel. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 3, p. 217-225, 2014.

KONTANI, Y. et al. Inhibitory effect of ethanol administration on beta-alanine-2-oxoglutarate aminotransferase (GABA aminotransferase) in disulfiram-pretreated rats. **Journal of Nutritional Science Vitaminology (Tokyo)**, v. 44, n. 1, p. 165-176, 1998.

KRUSTRUP, P. et al. Neuromuscular blockade of slow twitch muscle fibres elevates muscle oxygen uptake and energy turnover during submaximal exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 586, n. Pt 24, p. 6037-6048, 2008.

KRUSTRUP, P. et al. Heterogeneous recruitment of quadriceps muscle portions and fibre types during moderate intensity knee-extensor exercise: effect of thigh occlusion. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 19, n. 4, p. 576-584, 2009.

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

LENNEY, J. F. Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase). **Biol Chem Hoppe-Seyler**, v. 371, n. 5, p. 433-440, 1990.

MANNION, A. F. et al. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 64, n. 1, p. 47-50, 1992.

MANNION, A. F.; JAKEMAN, P. M.; WILLAN, P. L. Effects of isokinetic training of the knee extensors on high-intensity exercise performance and skeletal muscle buffering. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 68, n. 4, p. 356-361, 1994.

MASINI, M. Estimativa da Incidência e prevalência de lesão medular no Brasil. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 12, p. 97-100, 2001.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 15, p. 7232-7237, 1987.

MAYNARD, F. M., JR. et al. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. **Spinal Cord**, v. 35, n. 5, p. 266-274, 1997.

MIYAMOTO, Y. et al. Uphill transport of beta-alanine in intestinal brush-border membrane vesicles. **American Journal of Physiology**, v. 259, n. 3 Pt 1, p. G372-379, 1990.

MODLIN, M. et al. Electrical stimulation of denervated muscles: first results of a clinical study. **Artificial Organs**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2005.

- MORA, L.; SENTANDREU, M. A.; TOLDRA, F. Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4664-4669, 2007.
- NAKAGAWA, K. et al. Electrical Stimulation of Denervated Rat Skeletal Muscle Retards Capillary and Muscle Loss in Early Stages of Disuse Atrophy. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 5695217, 2017.
- NAVAB, F. et al. Mechanisms of transport of L-histidine and beta-alanine in hamster small intestine. **American Journal of Physiology**, v. 247, n. 1 Pt 1, p. G43-51, 1984.
- NEVES, M., JR. et al. Incidence of adverse events associated with percutaneous muscular biopsy among healthy and diseased subjects. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 22, n. 2, p. 175-178, 2012.
- NG, R. H.; MARSHALL, F. D. Regional and subcellular distribution of homocarnosine-carnosine synthetase in the central nervous system of rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 30, n. 1, p. I87-90, 1978.
- NILSSON, J. E.; ROSDAHL, H. G. Contribution of Leg-Muscle Forces to Paddle Force and Kayak Speed During Maximal-Effort Flat-Water Paddling. **Int J Sports Physiol Perform**, v. 11, n. 1, p. 22-27, 2016.
- PARK, Y. J.; VOLPE, S. L.; DECKER, E. A. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4736-4739, 2005.
- PARKHOUSE, W. S. et al. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 58, n. 1, p. 14-17, 1985.
- PIHL, A.; FRITZSON, P. The catabolism of C14-labeled beta-alanine in the intact rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 215, n. 1, p. 345-351, 1955.
- QUESNELE, J. J. et al. The effects of beta-alanine supplementation on performance: a systematic review of the literature. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 14-27, 2014.
- ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 3, p. R502-516, 2004.
- ROBINSON, T. M. et al. Role of submaximal exercise in promoting creatine and glycogen accumulation in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 87, n. 2, p. 598-604, 1999.
- SADIKALI, F.; DARWISH, R.; WATSON, W. C. Carnosinase activity of human gastrointestinal mucosa. **Gut**, v. 16, n. 8, p. 585-589, 1975.
- SALE, C. et al. Carnosine: from exercise performance to health. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1477-1491, 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. 321-333, 2010.

SALLES PAINELLI, V. et al. HIIT Augments Muscle Carnosine in the Absence of Dietary Beta-Alanine Intake. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 50, n. 11, p. 2242-2252, 2018.

SAUNDERS, B. et al. beta-alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. **British Journal Sports Medicine**, v. 51, n. 8, p. 658-669, 2017.

SAUNDERS, B. et al. Twenty-four Weeks of beta-Alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 49, n. 5, p. 896-906, 2017.

SCELSI, R. et al. Muscle fiber type morphology and distribution in paraplegic patients with traumatic cord lesion. Histochemical and ultrastructural aspects of rectus femoris muscle. **Acta Neuropathologica**, v. 57, n. 4, p. 243-248, 1982.

SEKHON, L. H.; FEHLINGS, M. G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 26, n. 24 Suppl, p. S2-12, 2001.

SEVERIN, S. E.; KIRZON, M. V.; KAFTANOVA, T. M. Effect of carnosine and anserine on action of isolated frog muscles. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v. 91, n. 3, p. 691-694, 1953.

SMITH, E. C. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. **Journal of Physiology**, v. 92, n. 3, p. 336-343 1938.

SNYDER, S. H. Brain peptides as neurotransmitters. **Science**, v. 209, n. 4460, p. 976-983, 1980.

STEGEN, S. et al. beta-Alanine dose for maintaining moderately elevated muscle carnosine levels. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 46, n. 7, p. 1426-1432, 2014.

STEGEN, S. et al. Meal and beta-alanine coingestion enhances muscle carnosine loading. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 8, p. 1478-1485, 2013.

STELLINGWERFF, T. et al. Effect of two beta-alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. **Amino Acids**, v. 42, n. 6, p. 2461-2472, 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, 2012.

SUZUKI, Y. et al. High level of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 52, n. 2, p. 199-205, 2002.

TALLON, M. J. et al. The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 19, n. 4, p. 725-729, 2005.

TALMADGE, R. J.; ROY, R. R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 75, n. 5, p. 2337-2340, 1993.

TAMAKI, N. et al. Purification, characterization and inhibition of D-3-aminoisobutyrate aminotransferase from the rat liver. **European Journal of Biochemistry**, v. 189, n. 1, p. 39-45, 1990.

TEUFEL, M. et al. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 6521-6531, 2003.

TOBIAS, G. et al. Additive effects of beta-alanine and sodium bicarbonate on upper-body intermittent performance. **Amino Acids**, v. 45, n. 2, p. 309-317, 2013.

WILKINSON, D. J.; PIASECKI, M.; ATHERTON, P. J. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: measurement and mechanisms of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. **Ageing Research Reviews**, p. 123-132, 2018.

WILLIAMSON, J. M.; BROWN, G. M. Purification and properties of L-Aspartate-alpha-decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of beta-alanine in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 16, p. 8074-8082, 1979.

YAMASHITA, T. et al. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 10205-10211, 1997.

ZOELLER, R. F. et al. Effects of 28 days of beta-alanine and creatine monohydrate supplementation on aerobic power, ventilatory and lactate thresholds, and time to exhaustion. **Amino Acids**, v. 33, n. 3, p. 505-510, 2007.