

Vinícius da Eira Silva

**Avaliação da espectroscopia de ressonância magnética para
quantificação de carnosina muscular em humanos**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes
e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini
Artioli

SÃO PAULO
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Vinícius da Eira

Avaliação da espectroscopia de ressonância magnética para quantificação de carnosina muscular em humanos / Vinícius da Eira Silva. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos.

Orientador: Guilherme Giannini Artioli.

Descritores: 1.Carnosina 2.Espectroscopia de ressonância magnética 3.Fisiologia
4.Ciências da nutrição e do esporte 5.Exercício 6.Suplementação alimentar

Dedico esse trabalho à minha família (não só a de sangue)

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe por todo o suporte prestado durante os momentos difíceis e por toda alegria proporcionada durante todos os dias de minha vida.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por serem verdadeiras inspirações na minha vida, obrigado por tudo.

Agradeço aos meus colaboradores, Dra. Maria, Dr. Samuel, Kleiner, Felipe e Mari por todo auxílio prestado, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço aos funcionários e professores da Faculdade de Medicina da USP, em especial a Mayra, Angélica, as meninas do LIM 17 e a Dra. Walcy.

Agradeço a todos os funcionários e pesquisadores do INRAD-HCFMUSP.

Agradeço aos funcionários e médicas do LACRE-HCFMUSP por me acolherem e por todos os momentos de alegria e aprendizagem.

Agradeço aos professores Hamilton e Bruno pela oportunidade dada e por toda ajuda durante o processo.

Agradeço aos meus voluntários, vocês foram são verdadeiras estrelas desse projeto, sem vocês, eu nunca teria chegado até aqui.

Agradeço ao meu orientador Guilherme pela oportunidade, me acolhendo quando ninguém mais acreditou em mim.

Sumário

<u>Lista de abreviaturas</u>	ix
<u>Lista de tabelas</u>	X
<u>Lista de figuras e gráficos</u>	xi
<u>Resumo</u>	Erro! Indicador não definido. ii
<u>Abstract</u>	Erro! Indicador não definido. ii
<u>1. Introdução</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>2. Objetivos</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3. Revisão de literatura</u>	3
<u>3.1. Perspectiva histórica da pesquisa científica sobre carnosina</u>	3
<u>3.2. Principais funções da carnosina no músculo esquelético</u>	6
<u>3.3. Fatores que influenciam a concentração de Carnosina na musculatura esquelética</u>	11
<u>3.4. Principais vias metabólicas da carnosina</u>	15
<u>3.5. Metabolismo da β-alanina</u>	17
<u>3.6. Suplementação de β-alanina e desempenho físico</u>	17
<u>3.7. Aplicações terapêuticas da Carnosina</u>	24
<u>3.8. Métodos de mensuração da carnosina muscular</u>	27
<u>4. Metodologia</u>	30
<u>4.1. Participantes</u>	30
<u>4.2. Local e duração do estudo</u>	31
<u>4.3. Desenho experimental</u>	32
<u>4.4. Preparação dos fantasmas</u>	34
<u>4.5. Mensuração do sinal dos fantasmas por 1H RMN</u>	35
<u>4.6. Mensuração de carnosina muscular por 1H RNM</u>	36
<u>4.7. Biópsia muscular por agulha de sucção</u>	38
<u>4.8. Avaliação da concentração intramuscular de carnosina por HPLC</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4.9. Antropometria e composição corporal</u>	40
<u>4.10. Avaliação do consumo alimentar de carnosina</u>	40
<u>4.11. Protocolo de Suplementação</u>	40
<u>4.12. Análises estatísticas</u>	40
<u>5. Resultados</u>	41
<u>5.1. Investigação <i>in vitro</i></u>	41
<u>5.2. Investigação <i>in vivo</i></u>	45
<u>6. Discussão</u>	48
<u>7. Conclusão</u>	49

8. Referências	50
9. Anexo I.....	62

Lista de abreviaturas

- ¹H RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
- C2-H – Carbono 2 do anel imidazol.
- C4-H – Carbono 4 do anel imidazol.
- HPLC - cromatografia líquida de alto-desempenho (do inglês *high-performance liquid chromatography*).
- DCH – Dipeptídeos contendo histidina.
- Ka – Constante de dissociação ácido-base.
- pH – Escala ácido-base.
- H⁺ - Íon de hidrogênio.
- Ca⁺⁺ - Íon de cálcio.
- TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa.
- IL- Interleucina.
- AGEs - Compostos finais de glicação avançada.
- PK – logaritmo do inverso da constante de dissociação de um eletrólito.
- VO_{2p} – Consumo máximo de oxigênio atingido antes de haver estabilização da quantidade de oxigênio captado.
- VO_{2max} - Consumo máximo de oxigênio atingido havendo estabilização da quantidade de oxigênio captado.
- PCR – Ponto de compensação respiratória.
- INRAD - Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- ICHC - Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- T1 – Tempo de relaxamento longitudinal do sinal de ressonância magnética.
- T2 - Tempo de relaxamento transversal do sinal de ressonância magnética.
- PRESS – Point Resolved Spectroscopy.
- TE – Tempo de eco da ressonância magnética
- TR – tempo de repetição.
- HSVLD - Hankel Lanczos Squares Singular Values Decomposition.
- AMARES - Advanced method for accurate, robust and efficient spectral fitting.
- CV – Coeficiente de variação.
- ICC – Coeficiente de correlação interclasse.

IC – Intervalo de confiança.

LCS - limites de concordância superior.

LCI- Limite de concordância inferior.

Lista de tabelas

Tabela 1. Preparação dos Fantomas	<u>35</u>
Tabela 2 Amplitude do sinal de C2-H nos fantomas de imidazol, L-histidina e carnosina.....	<u>43</u>
Tabela 3 Reprodutibilidade da 1H RMN nas sub amostras “A” e “B”.....	<u>45</u>
Tabela 4 Concentração de carnosina muscular mensurada por ambos os métodos.....	<u>46</u>
Tabela 5 Quantificação da carnosina muscular por 1H RMN e HPLC (mmol.kg-1 músculo seco)..	<u>46</u>

Lista de figuras e gráficos

Figura 1. <u>Formula estrutural da carnosina..</u>	<u>4</u>
Figura 2. <u>Reação de protonação de um dos nitrogênios do anel imidazol..</u>	<u>7</u>
Figura 3. <u>Sequência da reação de Fenton .</u>	<u>9</u>
Figura 4. <u>Sinal de Indução livre.</u>	<u>29</u>
Figura 5. <u>Espectro de 1H RMN in vivo.</u>	<u>29</u>
Figura 6. <u>Organograma do número de voluntários em cada etapa do estudo..</u>	<u>31</u>
Figura 7. <u>Desenho experimental do Estudo..</u>	<u>33</u>
Figura 8. <u>Imagem referência para padronização do local do voxel.....</u>	<u>37</u>
Figura 9. <u>Conjunto contendo agulha de bergtrom e seringa de sucção..</u>	<u>38</u>
Figura 10. <u>Incisão biópsia de panturrilha .</u>	<u>39</u>
Figura 11. <u>Sinal do Espectro de imidazol na concentração de 50 mmol/L..</u>	<u>41</u>
Figura 12. <u>Sinal do Espectro de L-histidina na concentração de 50 mmol/L..</u> .	<u>42</u>
Figura 13. <u>Sinal do Espectro de carnosina na concentração de 50 mmol/L... </u>	<u>42</u>
Figura 14. <u>Sinal do Espectro de BSA na concentração de 0,36 mmol/L..</u>	<u>43</u>
Gráfico 1. <u>Concentração de carnosina vs. Sinal (C2-H)..</u> Erro! Indicador não definido.	
Gráfico 2. <u>Concentração de carnosina vs. Sinal (C4-H)..</u> Erro! Indicador não definido.	
Gráfico 3. <u>Curva utilizada para calcular o tempo de relaxação T1 da carnosina...</u> Erro! Indicador não definido.	<u>4</u>
Gráfico 4. <u>Curva utilizada para calcular o tempo de relaxação T2 da carnosina...</u> Erro! Indicador não definido.	<u>5</u>
Gráfico 5. <u>Análise de correlação dos valores de carnosina muscular mensuradas por HPLC e por 1H MRN (em mmol·kg-1 músculo seco)...</u>	Erro! Indicador não definido. <u>7</u>

Gráfico 6. Análise de Bland-Altman dos valores de carnosina muscular mensuradas por HPLC e por 1H MRN (em mmol·kg⁻¹ músculo seco). Erro! Indicador não definido.7

Resumo

Silva VE. Avaliação da espectroscopia de ressonância magnética para quantificação de carnosina muscular em humanos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: A carnosina (β -Alanil-L-Histidina) é um dipeptídeo encontrado em altas concentrações em diversos tecidos excitáveis, tais como o coração, cérebro e músculo. Embora o número de evidências sobre os efeitos benéficos da carnosina esteja aumentando, muitos desses estudos apresentam uma importante limitação: a falta de mensuração da carnosina intramuscular. O principal motivo é a necessidade de realização de biópsias musculares. Nesse sentido, um novo método não invasivo baseado na ressonância magnética de hidrogênio (1H RMN) foi apresentado como alternativa. **Objetivos:** Determinar a reprodutibilidade, acurácia e sensibilidade do 1H MRN na determinação do conteúdo de carnosina muscular em seres humanos contra a referência "padrão-ouro" de quantificação de carnosina, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em extratos musculares obtidas por biópsia muscular. **Métodos:** O estudo foi dividido em duas sub-investigações, sendo a primeira delas uma investigação *in vitro* que testou a linearidade do sinal da carnosina na 1H RMN. Para a segunda investigação dezesseis homens fisicamente ativos (18 - 35 anos) sem doença crônico-degenerativa ou qualquer disfunção no aparelho locomotor se voluntariaram. Os participantes foram submetidos a duas sessões no total. Na sessão inicial, características antropométricas e de composição corporal foram mensuradas, cada indivíduo teve sua concentração de carnosina muscular do gastrocnêmio avaliada através da análise 1H MRN (um teste-reteste foi realizado com uma sub amostra para verificar a reprodutibilidade do método), em seguida uma biópsia muscular do gastrocnêmio foi realizada. Os voluntários então se submeteram a um período de quatro semanas de suplementação de 6,4 g. de beta-alanina por dia, estímulo que comprovadamente aumenta a carnosina muscular, durante esse período também foi realizada uma avaliação nutricional para determinar a quantidade carnosina ingerida em suas dietas. Na segunda sessão os indivíduos mais uma vez tiveram suas composições corporais avaliadas e realizaram o teste de 1H RMN e biópsia muscular para acessar suas concentrações de carnosina muscular. **Resultados:** *In vitro:* A linearidade de sinal de 1H RMN para as concentrações de carnosina testadas apresentou valores de R^2 de 0,9771. *In vivo:* O teste-reteste da 1H RMN apresentou coeficiente de variação médio de $9,9 \pm 10,34\%$ e coeficiente de correlação interclasse de $= 0,775$ (95% C.I.: 0,324-0,939). Comparando-se os dois métodos: As concentrações de carnosina (em mmol/kg músculo seco) não foram estatisticamente diferentes tanto no pré (1H RMN $-20,8 \pm 6,2$; HPLC $-23,3 \pm 10,5$; $p=0,45$; 95% CI= $-4,5 -9,6$) quanto no pós-suplementação (1H RMN $-35,2 \pm 13,2$; HPLC $-27,8 \pm 11,7$; $p=0,15$; 95% CI= $-3,5 - 17,8$) (n=13). Os

valores de delta da concentração de carnosina muscular (em %) também não foram estatisticamente diferentes (1H RMN - $69,7 \pm 66,7$; HPLC $-38,2 \pm 58,2$ $p=0,16$; 95% CI= $-14,5 -77,5$; ES=0,90). Ao observar os dados individuais, nota-se também baixa correlação dos dados individuais entre os métodos ($R^2 = 0,0448$; $r = 0,212$; $p = 0,229$). **Conclusão:** A 1H RMN apresentou baixa reprodutibilidade e acurácia quando comparada ao padrão ouro (HPLC), não sendo possível sua utilização para mensuração de carnosina muscular.

Descritores: carnosina; espectroscopia de ressonância magnética; fisiologia; ciências da nutrição e do esporte; exercício; suplementação alimentar

Abstract

Silva VE. Evaluation of magnetic resonance spectroscopy for quantification of muscle carnosine in humans [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Carnosine (β -Alanyl-L-Histidine) is a dipeptide found in high-concentrations in human tissue, such as heart, brain and muscle tissue. Although the body of evidence relating beneficial effects of carnosine is increasing, most of these studies have an important limitation: the lack of intramuscular carnosine measurement. The main reason for the absence of this measurement is the method of analysis; a muscle sample must be obtained via a muscle biopsy. In this regard, a new method non-invasive based on hydrogen magnetic resonance (1H NMR) has been used as an alternative. **Objectives:** The present study aims to determine the reproducibility, accuracy, and sensitivity of H-MRS in the determination of muscle carnosine content in humans; comparative data analysis will be performed against the "standard" reference of HPLC carnosine quantification in muscle extracts obtained by muscle biopsy. **Methods:** The study was divided into two sub-investigations. The first of which was an *in vitro* investigation that tested the linearity of the carnosine signal at 1 H NMR. For the second investigation, sixteen physically active men (18-35 years) without chronic-degenerative disease or any dysfunction in the locomotor apparatus volunteered. The participants were submitted to 2 sessions in total; Upon arrival to the initial session, anthropometric and body composition characteristics were collected before each individual underwent a muscle carnosine measurement of the gastrocnemius via H-MRS analysis (a test-retest was performed with a sub-sample to verify the reproducibility of the method) followed by a gastrocnemius muscle biopsy. Thereafter volunteers were submitted to a 4-week supplementation period of 6.4 g. of beta-alanine per day, a stimulus proven to increase muscle carnosine, during this period, volunteers had their carnosine dietary ingestion evaluated as well. Following the supplementation period, individuals were subjected to another body composition evaluation, 1H RMN and muscle biopsy. **Results:** *In vitro:* The linearity of 1 H NMR signal for carnosine concentrations tested showed R^2 values of 0.9771. *In vivo:* 1 H NMR test-retest showed a mean coefficient of variation of $9.9 \pm 10.34\%$ and ICC= 0.775 (95% C.I.: 0.324-0.939). Comparing the methods: Carnosine concentrations (in mmol / kg dry muscle) were not significant difference either the in pre (1 H NMR -20.8 ± 6.2 , HPLC $-23.3 \pm 10, 5$, $p = 0.45$, 95% CI = $-4.5 -9.6$) and post-supplementation (1 H NMR $- 35.2 \pm 13.2$, HPLC -27.8 ± 11.7 , $p = 0.15$, 95% CI = $-3.5-17.8$) . The delta values of muscle carnosine concentration (in %) were not statistically different (1 H NMR - 69.7 ± 66.7 ; HPLC -38.2 ± 58.2 $p = 0.16$; 95 % CI = $-14.5 -77.5$; ES = 0.90). Comparing the individual data,

there was a low correlation between the methods ($R^2 = 0.0448$, $r = 0.212$, $p = 0.229$). **Conclusion:** ^1H NMR showed low reproducibility and accuracy when compared to the gold standard (HPLC), not being possible its use for carnosine quantification.

Descriptors: carnosine; magnetic resonance spectroscopy; physiology; sports nutritional sciences; exercise; supplementary feeding.