

CAROLINE DE ANDRADE KRATZ

**Papel da insulina na captação de β -alanina pelo músculo
esquelético em concentrações sub-saturantes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção de título de
Doutora em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli

São Paulo

2022

CAROLINE DE ANDRADE KRATZ

**Papel da insulina na captação de β -alanina pelo músculo
esquelético em concentrações sub-saturantes**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção de título de
Doutora em Ciências

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kratz, Caroline de Andrade

Papel da insulina na captação de β -alanina pelo músculo esquelético em concentrações sub-saturantes / Caroline de Andrade Kratz. -- São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientador: Guilherme Giannini Artioli.

Descritores: 1.Beta-alanina 2.Insulina 3.Carnosina 4.Suplementos
nutricionais 5.Carnosina/metabolismo 6.Beta-alanina/administração & dosagem

USP/FM/DBD-209/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

A realização da presente tese, foi parte da concretização de um antigo sonho, onde contei com o apoio direto ou indireto de diversas pessoas, dessa forma, expresso meu agradecimento:

Ao meu orientador Guilherme Giannini Artioli, pela oportunidade, pelos ensinamentos prestados, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Além da gratidão, gostaria de dizer o quanto admiro o brilhantismo de suas ideias;

A Livia Gonçalves, por todo o apoio e por possibilitar a realização de todo o projeto e parabenizá-la por sua admirável trajetória na ciência;

A Livia Santos e a Nottingham Trent University;

A todo o grupo Applied Physiology & Nutrition e ao Laboratório de Genética Aplicada;

Aos professores Bruno Gualano e Hamilton Roschel;

Aos voluntários que participaram da pesquisa, cedendo seu tempo, cumprindo todos os protocolos e contribuindo de forma imprescindível para nossa investigação;

Aos professores participantes da banca de qualificação pelas valiosas contribuições;

Aos meus queridos amigos e colegas que contribuíram ou auxiliaram em todo o processo, não mencionarei nomes para que não corra o risco de esquecer alguém, no entanto, cada um com toda certeza sabe que fez parte importante não só no doutorado, mas em minha vida;

À minha família, em especial ao meu filho Luiz Augusto e minha mãe Rose, por todo apoio e compreensão, principalmente pelo meu distanciamento;

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a qual tive muito orgulho em fazer parte.

Agradeço imensamente a todos que contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor, mesmo em meio aos maiores desafios que enfrentei em minha vida.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com a *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 SÍNTESE DE B-ALANINA	6
3.2 FONTES ALIMENTARES DE B-ALANINA	6
3.3 TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE B-ALANINA	7
3.3.1 ATB ^{0,+} (transportador de aminoácido; SLC6A14)	7
3.3.2 Transportador de taurina – TauT	8
3.3.3 Isoforma 1 do transportador de íon de hidrogênio/aminoácidos – PAT1 (SLC36A1)	8
3.4 DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE B-ALANINA	9
3.5 TRANSPORTE DE B-ALANINA PARA AS CÉLULAS MUSCULARES E FORMAÇÃO DE CARNOSINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	10
3.6 SUPLEMENTAÇÃO DE B-ALANINA	10
3.6.1 Efeitos da suplementação de β-alanina no desempenho esportivo	12
3.6.2 Suplementação de β-alanina e <i>washout</i> da carnosina	13
3.6.3 Efeitos colaterais da suplementação de β-alanina	13
3.6.4 Segurança da suplementação de β-alanina	14
3.7 ENZIMAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE CARNOSINA	15

3.7.1 Carnosina sintase	15
3.7.2 Carnosinases	15
3.8 TRANSPORTADORES RELACIONADAS AO METABOLISMO DE CARNOSINA	17
3.9 FUNÇÕES ATRIBUÍDAS À CARNOSINA	18
3.9.1 Tampão de ácidos	18
3.9.2 Antioxidante.....	19
3.9.3 Antiglicante.....	19
3.9.4 Contratilidade muscular e o cálcio.....	20
3.10 POTENCIAIS PAPÉIS TERAPÊUTICOS DA CARNOSINA NA SAÚDE E NA DOENÇA.....	21
3.10.1 Carnosina e diabetes tipo II.....	21
3.10.2 Carnosina e envelhecimento	24
3.10.3 Carnosina e função cognitiva.....	25
3.10.4 Carnosina e doenças neurodegenerativas.....	27
3.10.5 Carnosina e insuficiência renal aguda.....	29
3.10.6 Carnosina e câncer	30
3.11 INSULINA	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 PARTICIPANTES	33
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	34
4.4 INFUSÃO DE INSULINA E GLICOSE	35
4.5 BIÓPSIA MUSCULAR POR AGULHA DE SUCÇÃO	36
4.6 SUPLEMENTAÇÃO DE B-ALANINA	36
4.7 DETERMINAÇÃO DE INSULINA E B-ALANINA PLASMÁTICAS	37
4.8 DETERMINAÇÃO DE B-ALANINA E CARNOSINA MUSCULAR E B-ALANINA PLASMÁTICA POR HPLC-ESI ⁺ -MS/MS.....	37
4.9 ESCALA DE AVALIAÇÃO DE PARESTESIA	39
4.10 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE B-ALANINA NA DIETA.....	40
4.11 ESTUDO <i>IN VITRO</i> EM MIOTUBOS DE CÉLULAS C2C12 CULTIVADAS	40
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41

5 RESULTADOS	42
5.1 EXPERIMENTO 1	42
5.2 EXPERIMENTO 2 (<i>IN VITRO</i>).....	44
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AGEs	– produtos finais de glicação avançada; <i>advanced glycoxidation end products</i>
AI	– alta insulina
ATB ^{0,+}	– transportador de aminoácido (SLC6A14)
ATP	– adenosina trifosfato
ATPase	– adenosinatrifosfatases
AUC	– área sob a curva
BI	– baixa insulina
Ca ²⁺	– íon cálcio
CAR-d4	– carnosina-d4
Cl ⁻	– íon cloreto
CN1	– carnosinase sérica
CN2	– carnosinase tecidual
CNDP1	– carnosina dipeptidase 1; <i>carnosine dipeptidase 1</i>
CNDP2	– carnosina dipeptidase 2; <i>carnosine dipeptidase 2</i>
CO ₂	– dióxido de carbono
DCHs	– dipeptídeos contendo histidina
DP	– desvio padrão
ESI	– ionização por eletropulverização; <i>electrospray ionization</i>
g/dia ⁻¹	– grama por dia
g/kg/min ⁻¹	– grama por quilo de peso corporal por minuto
H ⁺	– íon hidrogênio
HClO ₄	– ácido perclórico
HPLC	– cromatografia líquida de alta performance; <i>high-performance liquid chromatography</i>
IC	– intervalo de confiança
IRA	– insuficiência renal aguda
K ⁺	– íon potássio
KHCO ₃	– bicarbonato de potássio
K _M	– constante de Michaelis-Menten

M	– molar
m/z	– relação massa/carga
mg/dL ⁻¹	– miligrama por decilitro
mg/kg ⁻¹	– miligrama por quilo de peso corporal
mg/L ⁻¹	– miligrama por litro
Mg ²⁺	– íon magnésio
mM	– milimolar
mmol/kg ⁻¹	– milimol por quilo de peso corporal
mU/L	– miliunidade por litro
mU/m ² /min ⁻¹	– milliunidade por metro quadrado por minuto
Na ⁺	– íon sódio
OH ⁻	– íon hidróxido
PAT1	– isoforma 1 do transportador de íon de hidrogênio/aminoácidos; <i>proton-assisted amino acid transporter 1</i>
PEPT1	– transportador de peptídeos 1
PEPT2	– transportador de peptídeos 2
pH	– potencial hidrogeniônico
Pht1	– transportador de fosfato de cloroplasto 1
Pht2	– transportador de fosfato de cloroplasto 2
pKa	– constante de dissociação
psi	– libra-força por polegada quadrada
SLC	– família de transportadores de soluto; <i>solute carrier family</i>
SRM	– reação selecionada
TauT	– transportador de taurina
V _{max}	– velocidade máxima
μL	– microlitro
μM	– micromolar
μmol/h	– micromol por hora
μmol/L ⁻¹	– micromol por litro
μU/mL ⁻¹	– microunidade por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental e representação dos testes com a ingestão de doses típicas de β -alanina.	34
Figura 2 – Escala adaptada de avaliação parestesia.	39
Figura 3 – Concentrações plasmáticas de insulina durante 120 min de infusão de intravenosa de insulina (alta insulina – AI) ou insulina em jejum basal (baixa insulina – BI). Área sob a curva (AUC) ($p = 0,004$).	42
Figura 4 – Concentrações plasmáticas de β -alanina durante os 120 min após a ingestão de β -alanina, tanto em condições de alta insulina (AI) quanto de baixa insulina (BI) (gráfico à esquerda) e área sob a curva (AUC) em ambas as condições (gráfico à direita).	43
Figura 5 – Concentrações de β -alanina medidas em extratos musculares obtidos antes e após a ingestão de β -alanina nas condições alta insulina (AI) e baixa insulina (BI).	44
Figura 6 – Concentração intracelular de β -alanina determinada em mioblastos lisados tratados por 24 h com meio de diferenciação suplementado com β -alanina ($350 \mu\text{mol/L}^{-1}$) com ou sem insulina ($100 \mu\text{U/ml}^{-1}$) após o tratamento com hipotaurina (um inibidor de TauT) ou nenhum tratamento.	45
Figura 7 – Concentração intracelular de β -alanina determinada em mioblastos lisados tratados por 24 h com meio de diferenciação suplementado com β -alanina ($700 \mu\text{mol/L}^{-1}$) com ou sem insulina ($100 \mu\text{U/ml}^{-1}$) após tratamento com hipotaurina (um inibidor de TauT) ou nenhum tratamento.	46

RESUMO

Kratz C. *Papel da insulina na captação de β -alanina pelo músculo esquelético em concentrações sub-saturantes* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A carnosina (β -alanil-L-histidina) é um dipeptídeo intracelular citoplasmático abundante no tecido muscular esquelético. A manutenção da homeostase ácido-base durante exercícios de alta intensidade é um dos mais importantes papéis desempenhados pela carnosina. Sua síntese é dependente da disponibilidade de seu precursor β -alanina, sendo sua suplementação a forma mais eficiente de aumentar a síntese intramuscular de carnosina. Pesquisas anteriores demonstraram que outros compostos nitrogenados presentes na dieta, tais como a creatina e a carnitina, são transportados de forma mais eficiente ao músculo esquelético sob influência de altas concentrações de insulina. No entanto, a possível participação da insulina no acúmulo intramuscular de β -alanina ainda não estava bem elucidada, sobretudo quando as concentrações plasmáticas de β -alanina estão abaixo da saturação de seu transportador. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar se a captação de β -alanina pelo músculo esquelético, após a ingestão de doses típicas de β -alanina, é potencializada pela hiperinsulinemia. Foram avaliados 6 voluntários do sexo masculino em duas ocasiões. Em cada avaliação, os participantes ingeriram 10 mg/kg^{-1} de β -alanina. Em uma das avaliações, os participantes foram submetidos à técnica de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico após a ingestão de β -alanina; na outra avaliação, eles permaneceram em jejum (insulina basal). A ordem dos tratamentos foi aleatorizada e contrabalanceada, e o estudo seguiu o desenho cruzado. As avaliações foram separadas por um período de 1 semana de *washout*. Antes e após os procedimentos experimentais, os voluntários foram submetidos a um procedimento de biópsia do músculo vasto lateral para avaliação do conteúdo intramuscular de β -alanina e carnosina. O impacto da insulina na captação de β -alanina pelas células do músculo esquelético também foi investigado sob condições *in vitro* em duas concentrações ($350 \text{ } \mu\text{mol/L}^{-1}$ / $700 \text{ } \mu\text{mol/L}^{-1}$). Os dados foram analisados por modelos mistos (proc mixed, SAS, versão 9.3). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Não houve diferença entre as condições para as concentrações plasmáticas ou muscular de β -alanina ($p > 0,05$). Apesar do efeito significativo da insulina no estudo *in vitro* ($350 \text{ } \mu\text{mol/L}^{-1}$), a hiperinsulinemia não aumentou a captação de β -alanina suplementada em doses típicas em condições fisiológicas.

Descritores: Beta-alanina; Insulina; Carnosina; Suplementos nutricionais; Carnosina/metabolismo; Beta-alanina/administração & dosagem.

ABSTRACT

Kratz CA. *Role of insulin in the uptake of β -alanine by skeletal muscle in sub-saturating concentrations* [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Carnosine (β -alanyl-L-histidine) is an intracellular cytoplasmic dipeptide abundant in skeletal muscle tissue. Maintaining acid-base homeostasis during high-intensity exercise is one of the most important roles played by carnosine. Its synthesis is dependent on the availability of its precursor β -alanine, its supplementation being the most efficient way to increase the intramuscular synthesis of carnosine. Previous research has shown that other nitrogenous compounds present in the diet, such as creatine and carnitine, are transported more efficiently to skeletal muscle under the influence of high insulin concentrations. However, the possible participation of insulin in the intramuscular accumulation of β -alanine is still not well understood, especially when the plasma concentrations of β -alanine are below the saturation of its transporter. Thus, the objective of this study was to determine whether β -alanine uptake by skeletal muscle, after ingesting typical doses of β -alanine, is potentiated by hyperinsulinemia. Six male volunteers were evaluated on two occasions. At each assessment, participants ingested 10 mg/kg⁻¹ of β -alanine. In one of the evaluations, the participants were submitted to the hyperinsulinemic euglycemic clamp technique after ingesting β -alanine; in the other evaluation, they remained fasting (basal insulin). The order of treatments was randomized and balanced, and the study followed the crossover design. The evaluations were separated by a period of 1 week of *washout*. Before and after the experimental procedures, the volunteers were submitted to a biopsy procedure of the vastus lateralis muscle to evaluate the intramuscular content of β -alanine and carnosine. The impact of insulin on β -alanine uptake by skeletal muscle cells was also investigated under *in vitro* conditions in two concentrations (350 μ mol/L⁻¹/700 μ mol/L⁻¹). The data were analyzed using mixed models (proc mixed, SAS, version 9.3). The level of significance was set at $p < 0.05$. There was no difference between the conditions for plasma or muscle concentrations of β -alanine ($p > 0.05$). In despite of the significant effect of insulin in the *in vitro* study (350 μ mol/L⁻¹), the hyperinsulinemia did not increase the uptake of β -alanine supplemented in typical doses under physiological conditions.

Descriptors: Beta-alanine; Insuline; Carnosine; Dietary supplements; Carnosine/metabolism; Beta-alanine/administration & dosage.

1 INTRODUÇÃO

Os suplementos ergogênicos, aliados ao treinamento e a estratégias nutricionais, desempenham um papel importante na otimização do desempenho de atletas e praticantes de exercícios físicos. Dentre os suplementos dietéticos mais utilizados, a β -alanina vem se popularizando e sendo alvo de diversos estudos devido à sua capacidade de aumentar o conteúdo de carnosina muscular e melhorar o desempenho de exercícios de alta intensidade (Hill et al., 2007; Kelly et al., 2017; Roveratti et al., 2019).

A carnosina (β -alanil-L-histidina) é um dipeptídeo intracelular citoplasmático, encontrado em altas concentrações no músculo esquelético, com seu conteúdo variando aproximadamente entre 10 a 40 milimol por quilo de peso corporal (mmol/kg^{-1}) de músculo seco (Saunders; Elliott-Sale et al., 2017).

Dentre os papéis fisiológicos da carnosina, acredita-se que o mais relevante ao esporte seja a melhora do equilíbrio ácido-base em exercícios de alta intensidade (Abe, 2000; Artioli; Gualano et al., 2010; Dolan; Saunders et al., 2018). No entanto, outras funções importantes são atribuídas à carnosina, como defesa antioxidante e antiglicante (Boldyrev; Koldobski et al., 1993; Hipkiss et al., 1995), regulação do manejo e sensibilidade do íon cálcio (Ca^{2+}) durante a contração muscular (Hipkiss; Chana, 1998; Dutka; Lamb, 2004; Hannah et al., 2015), assim como eliminação de produtos tóxicos da peroxidação lipídica (Carvalho et al., 2018).

A síntese de carnosina ocorre a partir de seus dois aminoácidos constituintes β -alanina e L-histidina (Harris; Dunnett et al., 1998). Evidências sugerem que a carnosina não é transportada de forma intacta pelo músculo esquelético (Saunders; Elliott-Sale et al., 2017). Dessa forma, o músculo esquelético não é capaz de captar carnosina do meio extracelular (Bauer; Schulz, 1994), nem produzir seus aminoácidos precursores, pois a histidina é um aminoácido essencial e a produção de β -alanina (que se dá em níveis de traço) parece estar limitada ao fígado (Matthews; Traut, 1987). Portanto, sua síntese é dependente da captação desses aminoácidos pelas células musculares (Harris; Tallon et al., 2006), onde a enzima carnosina sintase catalisa a reação de síntese da β -alanina e histidina após o transporte realizado pelo transportador de taurina (TauT) e transportador de fosfato de cloroplasto 2 (Pht2) respectivamente (Drozak et al., 2010).

O fator limitante da síntese de carnosina é a disponibilidade de β -alanina (Harris; Tallon et al., 2006), devido ao fato da concentração de histidina (plasmática e intramuscular) ser aproximadamente 40 vezes maior que a de β -alanina, assim como a carnosina sintase demonstrar maior afinidade pela histidina (constante de Michaelis-Menten – K_M de 16,8 micromolar – μM) (Horinishi et al., 1978) em comparação à β -alanina (K_M de 1 a 2 milimolar – mM) (Ng; Marshall, 1978). Logo, aumentar o aporte de β -alanina torna-se importante no incremento do conteúdo muscular de carnosina (Harris; Tallon et al., 2006).

A β -alanina é encontrada na dieta habitual de onívoros, por estar presente nas carnes, peixes e aves. No entanto, a ingestão diária média na dieta (~ 500 mg em onívoros) (Painelli; Saunders et al., 2014; Kratz et al., 2017), encontra-se abaixo do necessário para se atingir o aumento no conteúdo muscular próximo aos níveis de saturação ($\sim 3,0$ - $6,0$ grama por dia – g/dia^{-1}) (Saunders; Elliott-Sale et al., 2017). Dessa maneira, utiliza-se a suplementação de β -alanina como forma eficaz de aumentar o conteúdo intramuscular de carnosina muscular em $\sim 40\%$ a 100% , de acordo com dose e tempo de suplementação (Baguet; Reyngoudt et al., 2009; Saunders; Elliott-Sale et al., 2017). O único efeito indesejado descrito relacionado ao consumo da suplementação de β -alanina é a parestesia, onde doses elevadas (ex.: 40 miligrama por quilo de peso corporal – mg/kg^{-1}) estão associadas a sintomas mais intensos. No entanto, este efeito é dose-dependente e pode ser evitado com o fracionamento de doses equivalentes a cerca de $10 mg/kg^{-1}$ de peso corporal (Harris; Tallon et al., 2006).

Apesar da β -alanina ser o precursor limitante da síntese de carnosina, estima-se que apenas 3-6% da dose ingerida seja incorporada ao músculo na forma de carnosina e cerca de 1-2% é excretada na urina (Stegen; Blancquaert et al., 2013; Blancquaert et al., 2016; Saunders; Elliott-Sale et al., 2017). Devido à baixa eficiência no uso de β -alanina para a síntese de carnosina, estratégias de aumento da captação têm potencial para aumentar a conversão de β -alanina em carnosina dentro das células musculares.

Stegen, Blancquaert et al. (2013) sugeriram uma relação entre a hiperinsulinemia e a captação de β -alanina, na qual postularam maior eficiência no transporte de β -alanina ao músculo esquelético sob a presença de altas concentrações de insulina. A captação de β -alanina pelas células musculares é realizada por transporte ativo secundário, por meio do TauT, um transportador de íon cloreto (Cl^-) e íon sódio (Na^+) que realiza cotransporte de β -alanina, Cl^- e Na^+ , na razão de 1:1:2, respectivamente

(Munck; Schultz, 1969; Anderson; Ganapathy et al., 2008). Sabe-se que a bomba de sódio e potássio ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$)* e o influxo de Na^+ são estimulados pela insulina (Rosić et al., 1985; Sweeney; Klip, 1998; Clausen, 2003). É também conhecido que a elevação na eficiência do transporte mediado pela insulina pode ocorrer tanto pela redução do K_M (Clausen; Kohn, 1977) quanto pelo aumento de velocidade máxima ($V_{\max}$) (Longo, 1996).

Paul Greenhaff, professor da Faculty of Medicine & Health Science, University of Nottingham Medical School, coordenou estudos utilizando creatina e carnitina, suplementos transportados de maneira semelhante à β -alanina, via transporte ativo, os quais são acumulados de forma mais eficiente com a influência da insulina; em específico nos estudos de Steenge et al. (1998) e Stephens et al. (2006), observou-se que durante o estado de hiperinsulinemia ($\sim 100 \text{ mU/L}$) ocorreu um maior incremento no conteúdo intramuscular de creatina e carnitina.

Dessa maneira, Stegen, Blancquaert et al. (2013) sugeriram que o transporte de β -alanina poderia também sofrer influência da ação da insulina, e conduziram um estudo com um protocolo de suplementação de β -alanina ($3,2 \text{ g/dia}^{-1}$) por 46 dias, no qual um grupo de voluntários consumia o suplemento junto às refeições e o outro no intervalo das refeições. Os resultados apresentados demonstraram que o aumento no conteúdo muscular foi maior no grupo suplementado durante as refeições. No entanto, o incremento foi observado apenas no *m. soleus* e não no *gastrocnemius*. O desenho do estudo também não permitiu que a hipótese fosse diretamente testada, já que o método utilizado para quantificação da carnosina muscular apresenta baixa validade (Silva et al., 2019).

Para tentar elucidar os mecanismos e para fornecer mais informações acerca da captação de β -alanina, nosso grupo de pesquisa conduziu um estudo no qual 12 voluntários receberam a infusão por via intravenosa de β -alanina durante 150 min a uma taxa de $0,11 \text{ grama por quilo de peso corporal por minuto (g/kg/min}^{-1})$ em duas condições distintas: alta insulina (AI) (utilizando-se a técnica de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico) e baixa insulina (BI) (em jejum). Antes e após 30 min foram realizadas biópsias musculares para determinar o conteúdo de β -alanina e carnosina. Neste estudo a situação de hiperinsulinemia não apresentou diferença significativa ($p =$

* Íon potássio (K^+); adenosinatrifosfatases (ATPase).

0,82) em aumentar a captação de β -alanina para o músculo esquelético (Gonçalves et al., 2020). No entanto, a dose utilizada foi suprafisiológica. Considerando-se a hipótese dos efeitos estimulatórios da insulina ocorrerem por meio da redução do K_M ou pelo aumento da V_{max} , seria esperado um transporte mais eficiente em duas condições: 1) se ação da insulina ocorresse via redução do K_M , o transporte mais eficiente seria observado quando as concentrações do substrato estivessem abaixo dos níveis de saturação do transportador; 2) se ação da insulina ocorresse pelo aumento do V_{max} , a maior eficiência do transporte provavelmente seria observada quando as concentrações estivessem em níveis de saturação ou acima dele. Dessa maneira, só foi possível testar se a insulina estimularia o transporte de β -alanina devido ao aumento da V_{max} do TauT.

Diante disso, o presente estudo teve o propósito de verificar a influência da insulina sobre a captação intramuscular de β -alanina, mediante a suplementação de dose fisiológica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a captação de β -alanina pelo músculo esquelético de humanos após a suplementação de doses típicas de β -alanina (10 mg/kg^{-1} de peso corporal) é influenciada pela hiperinsulinemia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o conteúdo de β -alanina muscular antes e após administração oral de uma dose típica de β -alanina (10 mg/kg^{-1} de peso corporal), comparando a condição de alta insulina com baixa insulina circulante.

Avaliar as concentrações plasmáticas de β -alanina antes e após administração oral de dose típica de β -alanina (10 mg/kg^{-1} de peso corporal) durante condições de alta e baixa concentração de insulina.

Avaliar o impacto da insulina na captação de β -alanina pelas células do músculo esquelético em cultura de miotubos C2C12 (estudo *in vitro*).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SÍNTESE DE B-ALANINA

A β -alanina é um aminoácido não proteinogênico, não essencial, pois é sintetizada endogenamente pelo fígado na via de degradação da base nitrogenada uracila em dióxido de carbono (CO_2) (Fritzson, 1957; Fritzson; Efskind, 1965). No entanto, sua taxa de produção é baixa ($\sim 10 \mu\text{mol/h}$) e as concentrações plasmáticas de β -alanina usualmente se encontram abaixo dos limites das técnicas de detecção disponíveis (Artioli; Gualano et al., 2010). Logo, a ingestão deste aminoácido pela suplementação de β -alanina ou pelo consumo de alimentos-fonte via dieta são determinantes para aumentar sua disponibilidade no organismo (Harris; Tallon et al., 2006).

Existem indícios de que a β -alanina possa ser produzida por outras vias, como no intestino, por meio da enzima aspartato descarboxilase, responsável pela conversão do aspartato em β -alanina (Stuecker et al., 2012). Uma outra alternativa seria a produção nos rins, fígado e cérebro, pelo fato desses tecidos expressarem a enzima β -alanina-piruvato transaminase (Hayaishi et al., 1961; Baker et al., 2004). Contudo, ainda não há um consenso na literatura a respeito da síntese endógena da β -alanina por essas vias.

3.2 FONTES ALIMENTARES DE B-ALANINA

A principal fonte de β -alanina provém do meio exógeno, onde pode ser obtida via dieta por meio da ingestão de alimentos ricos em dipeptídeos que contenham β -alanina, como carnosina, anserina e balenina. As carnes se apresentam como os alimentos-fonte principais, sendo a carnosina presente em altas concentrações na carne de boi ou vaca, aves e peixes; a anserina no frango e atum; e a balenina predominantemente em cetáceos (Abe, 2000). Existe uma grande variação no conteúdo de carnosina, anserina e balenina nas carnes, o que dificulta a estimativa do total de β -alanina presente nesses alimentos. Essa variação é dependente de fatores tais como: corte da carne, raça, sexo e idade do animal (Jones et al., 2011). Apesar dessa variação,

Park et al. (2005) mostraram que, independentemente do método (assado, cozido ou frito), cocção não leva à degradação significativa e, portanto, à perda de carnosina, anserina e balenina.

3.3 TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE B-ALANINA

O transporte de aminoácidos através das membranas celulares é uma função fundamental de diversos tipos celulares, pois os aminoácidos desempenham papéis importantes em funções biológicas essenciais, tais como síntese proteica, crescimento celular, neurotransmissão e metabolismo do nitrogênio. Inicialmente, os sistemas de transporte de aminoácidos foram identificados e catalogados funcionalmente e, dessa forma, nomeados devido a algumas características funcionais principais como especificidade de substrato, dependência de íons ou propriedades de troca (Christensen, 1990; Palacín et al., 1998). Diversos nutrientes e moléculas possuem a absorção intestinal mediada por mecanismos de transporte, na membrana luminal de enterócitos, impulsionados por íons. A manutenção dos gradientes de íons transmembrana e transepitelial (forças motrizes) são essenciais para a máxima absorção (Thwaites; Ford et al., 1999).

3.3.1 $ATB^{0,+}$ (transportador de aminoácido; SLC6A14)

A proteína $ATB^{0,+}$ transporta inúmeros aminoácidos pelo lúmen intestinal (íleo), incluindo a β -alanina. Esse se apresenta como um transportador dependente de Cl^- e Na^+ que realiza o cotransporte de β -alanina, Cl^- e Na^+ na proporção 1:1:2, respectivamente (Munck; Schultz, 1969). O $ATB^{0,+}$ apresenta maior afinidade para aminoácidos como a leucina e lisina do que para a β -alanina (Anderson; Ganapathy et al., 2008). Sua função parece ser mais efetiva no intestino, não apresentando expressão no músculo esquelético em humanos.

3.3.2 Transportador de taurina – TauT

O TauT, conhecido por ser transportador da taurina, é expresso nos rins, intestino e músculo esquelético de humanos. Além da taurina, ele realiza o transporte de outros β -aminoácidos, incluindo a β -alanina, sendo apontado como o principal transportador de β -alanina para o interior das células musculares. O experimento de Jessen (1994) demonstrou que, realizando a suplementação de β -alanina, as concentrações plasmáticas da taurina se elevaram, sugerindo que ambos competem pelo mesmo transportador. Apesar disso, foi recentemente demonstrado, por Dolan, Swinton et al. (2019), que a suplementação de β -alanina em doses tipicamente utilizadas em humanos não afeta o conteúdo muscular de taurina e apresenta bom perfil de segurança.

O *down regulation* do TauT foi demonstrado pelo estudo de Saunders, Painelli et al. (2017) com suplementação de 6,4 g/dia⁻¹ de β -alanina por 24 semanas. Por meio do experimento, foi constatado que o aumento de carnosina muscular depende do transporte de β -alanina através do músculo, influenciando na disponibilidade de β -alanina para a síntese de carnosina intramuscular. A redução da atividade do TauT pode ser interpretada como um mecanismo regulatório para manter a homeostase intramuscular da carnosina limitando a captação de β -alanina pelo músculo esquelético.

3.3.3 Isoforma 1 do transportador de íon de hidrogênio/aminoácidos – PAT1 (SLC36A1)

Para a Organização Genoma Humano, os transportadores de soluto (SLCs) são conhecidos como um grupo de proteínas de transporte de membrana codificadas por 396 genes humanos diferentes. Esses transportadores são expressos em diversos tecidos, facilitando o transporte de nutrientes, vitaminas e minerais pela membrana (Fei et al., 1994). Eles também cumprem papel importante no transporte de substâncias medicamentosas, facilitando dessa forma a absorção via oral de alguns medicamentos (Nielsen et al., 2021).

A família do transportador de soluto (SLC36) possui 4 membros – SLC36A1, SLC36A2, SLC36A3 e SLC36A4 –, que estão envolvidos no movimento transmembrana de aminoácidos e derivados. O SLC36A1 (PAT1) é o mais amplamente

caracterizado; expresso na superfície luminal do intestino delgado, apresenta baixa afinidade (K_M 1-10 mM) para seus substratos, dentre eles aminoácidos zwitteriônicos e iminoácidos, aminoácidos heterocíclicos e medicamentos à base de aminoácidos (Thwaites; Anderson 2011).

O PAT1, assim como o Taut, atua no transporte de β -alanina no músculo esquelético e representa a isoforma 1 do transportador de íon hidrogênio (H^+)/aminoácidos. Diferencia-se do TauT em função desse transportador, não ser dependente de Cl^- e Na^+ (Fei et al., 1994).

3.4 DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE B-ALANINA

Quando a β -alanina é ingerida, seja na forma de suplemento ou por meio de alimentos-fonte de dipeptídeos histidínicos, ocorrerá um aumento na concentração intestinal de β -alanina. Aproximadamente 80 a 90% da sua digestão acontece no lúmen intestinal, tal qual ocorre com pequenos peptídeos e aminoácidos (Frenhani; Burini, 1999).

A β -alanina torna-se disponível para a absorção no jejuno e no íleo, pois a carnosina, é hidrolisada pela ação da enzima carnosinase tecidual (CN2) expressa nos enterócitos da mucosa jejunal. Essa enzima cliva a carnosina em β -alanina e L-histidina, sendo a β -alanina transportada para a circulação por meio do $ATB^{0,+}$ (Anderson; Ganapathy et al., 2008).

A carnosina não é completamente hidrolisada devido a limitação da ação da CN2 no lúmen intestinal. Logo, parte dessa carnosina intacta é transportada para a corrente sanguínea pelo transportador de peptídeos 1 (PEPT1) (Fei et al., 1994). Dessa forma, a concentração plasmática de β -alanina estará aumentada com a ingestão de suplementos de β -alanina. Já com a ingestão de alimentos contendo carnosina, haverá aumento tanto nas concentrações plasmáticas de β -alanina como de carnosina (Harris; Tallon et al., 2006). Após a ingestão de β -alanina, observa-se o pico de concentração na corrente sanguínea após cerca de 30 a 45 min, havendo retorno aos valores basais por volta de 3 hs após a ingestão (Harris; Tallon et al., 2006). Quando a carnosina atinge a corrente sanguínea, ela pode sofrer a clivagem pela carnosinase sérica (CN1), ou ser absorvida pelos tecidos periféricos, podendo, além disso, ser encontrada na urina em até 5 h após sua ingestão (Gardner et al., 1991).

3.5 TRANSPORTE DE B-ALANINA PARA AS CÉLULAS MUSCULARES E FORMAÇÃO DE CARNOSINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético não é capaz de produzir os aminoácidos precursores de carnosina, dado que a histidina é um aminoácido essencial e a produção de β -alanina parece estar essencialmente limitada ao fígado (Matthews; Traut, 1987). Portanto, a síntese de carnosina é totalmente dependente da captação desses aminoácidos pelas células musculares (Harris; Tallon et al., 2006).

A enzima carnosina sintase catalisa a reação de síntese de carnosina no músculo esquelético, após o transporte da β -alanina e histidina pelos seus respectivos transportadores, TauT e Pht2 (Drozak et al., 2010).

O principal fator limitante para a síntese de carnosina é a disponibilidade de β -alanina para o tecido muscular, isso ocorre porque a carnosina sintase apresenta maior afinidade pela histidina (K_M de 16,8 μ M) (Horinishi et al., 1978) em comparação à β -alanina (K_M de 1 a 2 mM) (Ng; Marshall, 1978), e a concentração plasmática e intramuscular de histidina é cerca de 40 vezes maior do que a de β -alanina. Dessa forma, a maneira mais eficaz para aumentar a síntese endógena de carnosina muscular é aumentar o aporte de β -alanina (Harris; Tallon et al., 2006).

3.6 SUPLEMENTAÇÃO DE B-ALANINA

Apesar da β -alanina ser sintetizada pelo organismo em pequenas quantidades e também ser obtida por meio da dieta, uma das formas mais eficazes de promover aumento do conteúdo intramuscular de carnosina é por meio da suplementação de β -alanina. Harris, Tallon et al. (2006), em um estudo pioneiro, verificaram que a suplementação de 6,4 g/dia⁻¹ de β -alanina por um período de quatro semanas aumentou em 65% (+13 mmol/kg⁻¹) o conteúdo intramuscular de carnosina. Em estudo realizado no ano seguinte, Hill et al., 2007 observaram um aumento de 59% (20 $\pm$ 2 para 30 $\pm$ 2 mmol/kg⁻¹ músculo seco) de carnosina intramuscular com a suplementação de 5,2 g/dia⁻¹ pelo mesmo período; quando prorrogado para dez semanas, o incremento na carnosina intramuscular foi de 80%.

A suplementação de β -alanina aumenta cerca de $\sim 40\%$ a 100% o conteúdo intramuscular de carnosina, dependendo da dose e tempo de suplementação administrados (Baguet; Bourgois et al., 2010; Saunders; Elliott-Sale et al., 2017). Um robusto corpo de evidências (Derave et al., 2007; Hill et al., 2007; Stout; Cramer; Zoeller et al., 2007; Kendrick et al., 2008; van Thienen et al., 2009; Baguet; Bourgois et al., 2010; Sale; Saunders et al., 2011; Bellinger et al., 2012; Painelli; Roschel et al., 2013; Painelli; Saunders et al., 2014; Tobias et al., 2013), incluindo meta-análises (Hobson et al., 2012; Saunders; Elliott-Sale et al., 2017), tem apoiado a hipótese de que a suplementação de β -alanina é capaz de melhorar o desempenho físico, em especial em atividades de alta intensidade e curta duração, atividades nas quais ocorre acentuada acidose muscular.

Um ponto importante a se observar é o tempo de suplementação e sua influência na concentração de carnosina intramuscular. Saunders, Painelli et al. (2017) estudaram os efeitos de 24 semana de suplementação de β -alanina ($6,4 \text{ g/dia}^{-1}$) e encontraram um aumento no conteúdo de carnosina muscular em 100% de seus participantes, apesar de considerável variabilidade interindividual nessas respostas. Interessantemente, esses dados parecem indicar uma tendência de saturação da carnosina muscular, já que a curva de aumento de carnosina apresentou crescimento logarítmico, com evidências de efeito platô nas semanas finais do protocolo de suplementação. Esses dados diferem um pouco dos de Stellingwerff et al. (2012) que mostraram aumentos dose-dependentes, porém lineares de carnosina muscular em função da dose total acumulada de β -alanina. No entanto, é provável que a dose total baixa oferecida pelos autores não tenha sido capaz de atingir a fase de platô de aumento da carnosina. Esse padrão saturável e dose-dependente de aumento de carnosina foi posteriormente confirmado em um estudo de revisão sistemática e meta-análise (Rezende et al., 2020).

As proporções entre o total de β -alanina consumido e aquilo que é absorvido pelo organismo e distribuído entre os diferentes tecidos periféricos, tais como músculo esquelético, cardíaco e cérebro ainda não estão totalmente elucidadas. No entanto, é estimado que aproximadamente 6% do total de β -alanina ingerido seja armazenado na forma de carnosina intramuscular (Stegen; Blancquaert et al., 2013), sendo uma pequena parte (aproximadamente 6%) excretada na urina (Harris; Tallon et al., 2006; Stegen et al., 2013). O estudo de Blancquaert et al. (2016) demonstrou que a β -alanina é um substrato adequado para as enzimas transaminases 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate

transaminase e alanine glyoxylate transaminase-2, levando a concluir que a β -alanina consumida seja parcialmente encaminhada para oxidação.

Apesar da baixa eficiência do uso da β -alanina consumida para a síntese de carnosina muscular, pesquisadores sugeriram que possa haver um incremento na captação de β -alanina quando consumida em condição de hiperinsulinemia (Stegen; Blancquaert et al., 2013).

3.6.1 Efeitos da suplementação de β -alanina no desempenho esportivo

A suplementação de β -alanina, atualmente muito utilizada por atletas e praticantes de exercícios físicos, tem sido despertado interesses devido a um corpo robusto de evidências que demonstra seus efeitos ergogênicos (Saunders; Elliott-Sale et al., 2017).

De acordo com a revisão sistemática e meta-análise realizada por Saunders, Elliott-Sale et al. (2017), dentre os fatores relacionados aos efeitos ergogênicos, a duração do exercício se apresenta como fator de elevada importância, sendo os de duração entre 0,5-10 min aqueles que apresentam maiores ganhos. Por outro lado, os de duração inferior a 0,5 min não se beneficiam do uso de β -alanina.

Em se tratando de nível de treinamento, os indivíduos não treinados parecem se beneficiar mais do que os indivíduos treinados, apresentando um tamanho de efeito maior, no entanto, quando é realizada a comparação entre exercícios de corpo inteiro ou de membros isolados parecem apresentar resultados similares (Saunders; Elliott-Sale et al., 2017).

De maneira interessante, a adição do bicarbonato de sódio à suplementação de β -alanina, com o intuito de elevar a capacidade de tamponamento extracelular e intracelular demonstrou evidências adicionais no desempenho físico quando suplementada juntamente ao bicarbonato de sódio (Saunders; Elliott-Sale et al., 2017). Segundo a recente revisão de Brisola e Zagatto (2019), com o objetivo de identificar os efeitos ergogênicos da suplementação de β -alanina em diferentes modalidades esportivas, foi descrito que as maiores evidências estão voltadas para: corrida de ciclismo de 4 km, corrida de remo de 2.000 m, corrida de natação de 100 m e 200 m, modalidades de combate e polo aquático.

3.6.2 Suplementação de β -alanina e *washout* da carnosina

O *washout* de carnosina é considerado o período entre a interrupção da suplementação de β -alanina e o consequente retorno das concentrações de carnosina muscular aos níveis basais pré-suplementação. Dentre os estudos com o objetivo de avaliar o *washout* de carnosina, o pioneiro foi do grupo de Harris, Tallon et al. (2006), os quais utilizaram a técnica de determinação cromatográfica de carnosina, após suplementarem uma dose de $6,4 \text{ g/dia}^{-1}$, de β -alanina durante 4 semanas. Nesse trabalho, os autores observaram um declínio exponencial aos níveis iniciais com meia-vida de 8,6 semanas. Em sequência, Baguet, Reyngoudt et al. (2009), em um estudo com protocolo de suplementação de β -alanina ($4,8 \text{ g/dia}^{-1}$ por 6 semanas), observaram, por meio da análise por espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio, uma redução de 31,8% nas concentrações médias de carnosina muscular após 3 semanas de interrupção do suplemento e o retorno aos níveis basais após 9 semanas. Apesar disso, os indivíduos considerados altos respondedores (aumento de carnosina muscular acima de 30%,) ainda apresentavam índices elevados na 9ª semana, com previsão de atingir os níveis basais na 15ª semana, já os baixos respondedores (aumentou de carnosina muscular <30%) retornaram aos níveis pré-suplementação em 6,5 semanas.

Posteriormente, Stellingwerff et al. (2012), igualmente utilizando técnica de ressonância magnética de hidrogênio, após a suplementação de doses de $1,6$ ou $3,2 \text{ g/dia}^{-1}$ de β -alanina durante 8 semanas, observaram um *washout* mais prolongado, resultando em um período de 15-20 semanas e uma taxa de redução de aproximadamente 2% por semana. Recentemente, Yamaguchi et al. (2021) realizaram um estudo para elucidar a cinética do decaimento da carnosina muscular após a suplementação de $6,4 \text{ g/dia}^{-1}$ de β -alanina por 8 semanas e observaram um tempo médio de ~ 12 semanas para o *washout* e meia-vida de 4,6 semanas, bem como demonstraram que o *washout* pode ser explicado tanto pelo decaimento linear, quanto exponencial, ao longo de um período de *washout* de 16 semanas.

3.6.3 Efeitos colaterais da suplementação de β -alanina

A parestesia, sensação indolor semelhante a um formigamento na pele, é o único efeito colateral descrito na literatura com a suplementação aguda de β -alanina em doses

acima de 10 mg/kg^{-1} (Artioli; Gualano et al., 2010). Esses sintomas não provocam danos à saúde e são mais frequentes nas regiões do rosto e cabeça, pescoço, braços e mãos. Uma das hipóteses relacionadas à parestesia causada pela β -alanina seria o reconhecimento do aminoácido por receptores sensitivos localizados na pele denominados MrgD, altamente expressos em um subconjunto de neurônios localizados nos gânglios da raiz dorsal, responsáveis pela inervação da pele. Os MrgD fazem parte do grupo dos receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptors – GPCR), que dentre as funções fisiológicas está a percepção sensorial (Dong et al., 2001).

3.6.4 Segurança da suplementação de β -alanina

Estudos têm demonstrado a segurança da suplementação de β -alanina para indivíduos saudáveis. Na primeira investigação em humanos, conduzida por Harris, Tallon et al. (2006), os autores utilizaram marcadores sanguíneos relacionados à saúde renal e hepática e não foram constatadas nenhuma alteração. Hill et al. (2007), ao suplementar $6,4 \text{ g/dia}^{-1}$ de β -alanina por 10 semanas em indivíduos fisicamente ativos, não observaram efeitos colaterais. A suplementação também se mostrou segura por Stellingwerff et al. (2012), no qual além de marcadores bioquímicos e hematológicos, avaliaram humor e estado de ansiedade. A segurança não foi avaliada apenas em indivíduos jovens, mas também em um estudo com indivíduos idosos de 60 a 80 anos com a suplementação de $3,2 \text{ g/dia}^{-1}$ de β -alanina durante 4 semanas, o qual nenhuma alteração ou efeitos colaterais foram relatados (del Favero et al., 2012).

Considerando-se um período mais prolongado de suplementação de β -alanina, Saunders, Painelli et al. (2017) realizaram um estudo crônico de 24 semanas com doses de $6,4 \text{ g/dia}^{-1}$ de carnosina, onde nenhum efeito colateral ou mudanças em parâmetros bioquímicos e hematológicos foi observado. Recentemente, uma avaliação de risco sistemática e meta-análise realizada por Dolan, Swinton et al. (2019), incluindo 101 estudos em humanos e 50 em modelo animal, os dados não demonstraram efeitos adversos da suplementação de β -alanina em humanos saudáveis. A parestesia (fenômeno sem resultados adversos) foi o único efeito colateral relatado. Em conjunto, todas as evidências disponíveis, indicam segurança no consumo humano de β -alanina na forma de suplementação, dentro das dosagens usuais e períodos relatados na literatura até o momento.

3.7 ENZIMAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE CARNOSINA

3.7.1 Carnosina sintase

A carnosina sintase é encontrada no citoplasma das células do músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro (Drozak et al., 2010), e é responsável pela síntese de carnosina a partir de seus aminoácidos constituintes β -alanina e L-histidina (Baumann; Ingvaldsen 1918). Além da síntese de carnosina, os autores ressaltam que a enzima carnosina sintase realiza a síntese de um análogo da carnosina, a homocarnosina.

A primeira descrição do mecanismo de ação da carnosina sintase ocorreu em 1959, por meio de experimentos realizados *in vitro* com músculo esquelético de frango, onde foi identificado a demanda de adenosina trifosfato (ATP) e Mg^{2+} na síntese de carnosina (Kalyankar; Meister, 1959). Posteriormente, Drozak et al. (2010) demonstraram que há a formação de adenosina difosfato e fosfato por meio da hidrólise de ATP durante a reação de catálise para a formação de carnosina. Um dos fatores determinantes para que a síntese de carnosina ocorra é a disponibilidade de β -alanina (Harris; Tallon et al., 2006), devido ao fato da carnosina sintase no músculo esquelético apresentar uma maior afinidade (mais de 100 vezes) com a L-histidina em comparação à β -alanina (Pavlov et al., 1993; Sale; Artioli et al., 2013).

3.7.2 Carnosinases

As carnosinases atuam na degradação (hidrólise) da carnosina em seus aminoácidos constituintes e foram descritas inicialmente por meio de experimentos *in vitro*, utilizando rins de suínos (Hanson; Smith, 1949). Existem dois subtipos de carnosinases, a CN1 e a CN2 (Hanson; Smith, 1949; Lenney, 1990):

a) CN1:

A CN1 é uma carnosinase seletiva para dipeptídeos histidínicos, especialmente a carnosina e homocarnosina (Teufel et al., 2003). Essa enzima foi descoberta, em 1968

por pesquisadores que estudavam crianças com distúrbios neurológicos e observaram aumento da carnosinemia (Perry et al., 1968). Ainda não há um consenso na literatura sobre o local principal de produção no organismo de CN1. Perry et al. (1968) sugerem ser o fígado, pois pacientes com disfunção hepática apresentaram baixa atividade da CN1. Já Teufel et al. (2003) demonstraram que a atividade do gene da CN1 (carnosina dipeptidase 1 – CNDP1) foi maior no sistema nervoso central.

A atividade da carnosinase é elevada no sangue, consequentemente a hidrólise ocorre com rapidez, resultando em concentrações séricas baixas e eventualmente indetectáveis pelos métodos de quantificação de carnosina ($< 0,1 \mu\text{M}$) (Harding et al., 1977). Diversos fatores estão relacionados à atividade da CN1 e as variações entre os indivíduos estão relacionados à: 1) Genética (polimorfismo no gene – CNDP1) (Riedl et al., 2007); 2) Idade (pouca expressão ao nascimento, aumento gradativo da adolescência até a vida adulta) (Everaert; Mooyaart et al., 2011); 3) Sexo (atividade da carnosinase maior entre as mulheres) (Asatoor et al., 1970; Lenney et al., 1985; Baguet; Reyngoudt et al., 2009).

b) CN2:

A CN2 é considerada uma dipeptidase não-específica citosólica, pois apresenta afinidade para diversos dipeptídeos, e foi inicialmente descrita por Lenney et al. (1985) em experimento com rins humanos. Sua presença é notada em tecidos humanos variados, como intestino e músculo esquelético, no entanto não é encontrada na circulação sanguínea e cérebro (Teufel et al., 2003).

Em potencial hidrogeniônico (pH) alcalino (9,5) a CN2 é capaz de degradar a carnosina, porém em pH fisiológico (7,5), apresenta dificuldade em clivar a carnosina, o que não acontece com outros dipeptídeos. Ao contrário de outros substratos tal como para serina-glicina que em pH fisiológico apresenta K_M de $1,4 \text{ mM}$, o K_M da CN2 para a carnosina é considerado elevado ($15 \mu\text{M}$) (Teufel et al., 2003).

A atividade da CN2 parece depender do tecido no qual é encontrada, apresentando-se bastante lenta no músculo esquelético (Baguet; Reyngoudt et al., 2009). No entanto, a CN2 parece ter alta expressão nos enterócitos, na mucosa intestinal, onde ocorre a clivagem da carnosina, anserina e balenina em β -alanina e L-histidina. Dessa maneira, a β -alanina é disponibilizada para absorção no intestino e sequencialmente transportada pelos enterócitos para circulação sanguínea (Teufel et al., 2003).

Parte da carnosina, anserina e balenina são absorvidas de forma intacta pelos enterócitos, e permanecem por algumas horas na corrente sanguínea, sugerindo que a carnosina consumida na alimentação pode ser disponível a tecidos capazes de captá-la. Posteriormente a carnosina é excretada sem hidrólise pela urina, no entanto, um percentual de 5% e 15% é reabsorvida (Asatoor et al., 1970; Hama et al., 1976).

3.8 TRANSPORTADORES RELACIONADAS AO METABOLISMO DE CARNOSINA

A absorção da carnosina e outros dipeptídeos no intestino delgado através da membrana plasmática é realizada por meio de transportadores, esses transportadores são proteínas membros da família SLC15 ou *proton-coupled oligopeptide transporters*, sendo integrantes do grupo: PEPT1, transportador de peptídeos 2 (PEPT2), transportador de fosfato de cloroplasto 1 (Pht1) e Pht2 (Daniel; Kottra, 2004):

a) PEPT1 (SLC15A1):

A principal proteína encarregada pelo transporte da carnosina de forma intacta do intestino à corrente sanguínea é a PEPT1. Esse processo ocorre por meio do transporte ativo, ou seja, com gasto de ATP. O transportador PEPT1 atua evitando que a carnosina seja totalmente hidrolisada pela CN2 (Yamashita et al., 1997), e o transportador pode ser encontrado também nos rins (segmento S1 do túbulo renal), contribuindo na reabsorção tubular de peptídeos e aminoácidos juntamente a outros transportadores (Adibi, 1997).

b) PEPT2:

O PEPT2 realiza o transporte da carnosina no rim e no cérebro, podendo exercer atividade em outros tecidos (Sleisenger; Kim, 1979). Encontra-se localizado na região S2 e S3 do túbulo renal e, assim como o PEPT1 (localizado na porção S1), auxilia na reabsorção tubular de peptídeos e aminoácidos. A carnosina parece ter um acúmulo importante nas células renais, como demonstrado em um experimento *in vitro*, entretanto, a reabsorção tubular para o sangue é pequena, sendo o influxo da carnosina por meio do PEPT2 superior à taxa de efluxo. Dessa maneira, mesmo com esse importante papel de reabsorção da carnosina, seu fluxo através da membrana é parcial e,

quando chega à corrente sanguínea, a integridade da carnosina pode ser perdida pela ação da carnosinase (Jappan et al., 2009).

c) Pht1 e Pht2:

A principal função atribuída ao Pht1 e Pht2 está relacionada ao transporte do aminoácido histidina através da membrana plasmática, sendo também capazes de transportar a carnosina e alguns dipeptídeos (Everaert; De Naeyer et al., 2013). No entanto, ainda não se pode afirmar se a carnosina pode ser transportada intacta para o músculo esquelético por essas proteínas, mesmo com alguns estudos mostrando uma alta expressão do gene do Pht1 no músculo esquelético, rim, coração e fígado e do Pht2 no músculo esquelético (Botka et al., 2000; Daniel; Kottra, 2004; Boldyrev; Aldini et al., 2013).

3.9 FUNÇÕES ATRIBUÍDAS À CARNOSINA

3.9.1 Tampão de ácidos

Dentre as diversas funções metabólicas atribuídas à carnosina, uma das mais amplamente aceitas é o tamponamento de ácidos. O músculo esquelético humano apresenta, em repouso, valores de pH que variam entre 7,0 e 7,1, sendo sua manutenção essencial para os processos contráteis e para manutenção das funções enzimáticas (Fabiato; Fabiato, 1978).

A prática de exercícios físicos de elevada intensidade pode reduzir esse valor de pH para aproximadamente 6,5 (Costill et al., 1984), pois durante o exercício a taxa de hidrólise do ATP necessita ser suficiente para atender a elevada demanda energética da contração muscular. Com a hidrólise do ATP, ocorre a liberação de energia para a contração muscular, bem como outros processos metabólicos, e forma-se adenosina difosfato e fosfato inorgânico. Essa reação demanda uma molécula de água que será dissociada em H^+ e OH^- , seguida do acoplamento do radical hidroxil ao fosfato inorgânico e consequentemente deixando livre o íon de hidrogênio (Robergs et al., 2004).

É demonstrado que o acúmulo de íons H^+ no interior da célula muscular pode atuar na inibição de etapas do metabolismo anaeróbico (ressíntese de fosforilcreatina e a

atividade da fosfofrutoquinase), prejudicando a produção de energia na contração muscular (Harris; Edwards et al., 1976; Sutton et al., 1981). Os íons H^+ excedentes levam ao desenvolvimento de fadiga, e o músculo esquelético dispõe de mecanismos de defesas contra a acidose. Para neutralizar o acúmulo de ácidos, a primeira linha de defesa são os tampões químicos intracelulares. A carnosina com o valor da pK_a de 6,83, atua como um tampão químico adequado para atuar na faixa de variação fisiológica do pH muscular (Harris; Tallon et al., 2006; Artioli; Gualano et al., 2010).

3.9.2 Antioxidante

Uma das prováveis funções da carnosina é a proteção contra radicais livres. Em 1988, um estudo foi pioneiro ao demonstrar que a diminuição das taxas de peroxidação lipídica da membrana plasmática foi obtida com esse dipeptídeo (Boldyrev; Dupin et al., 1988). Em concentrações fisiológicas, a carnosina no músculo esquelético pode sequestrar radicais peroxil (Kohen et al., 1988) e ânions superóxido (Pavlov et al., 1993), bem como participar do processo de detoxificação do 4-hidroxinonenal e o malonildialdeído (Hipkiss; Brownson, 2000; Aldini; Carini et al., 2002; Bispo et al., 2016). Somada a esses possíveis papéis da carnosina como antioxidante está também a ação na quelatação de metais (Kohen et al., 1988).

3.9.3 Antiglicante

A carnosina vem despertando interesse no contexto clínico por apresentar ação protetora na glicação, e tem sido estudada em experimentos com animais e humanos (Burcham et al., 2002; Yan; Harding 2005).

O processo de glicação acontece com a ligação covalente de açúcares a proteínas, gerando alterações das propriedades funcionais, o que causa danos ao metabolismo celular e contribui para o envelhecimento, bem como para a geração de doenças (Hipkiss et al., 1995). A glicação, apesar de inerente ao processo de envelhecimento, quando se apresenta excessiva ocasiona o aumento da inflamação e estresse oxidativo (Babizhayev et al., 2013).

Reações iniciais de glicação podem levar à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), a chamada “reação de Maillard”, descrita pelo pesquisador Louis Camille Maillard (1878-1936), em 1912, que é uma sequência de reações não-enzimáticas na qual uma molécula de açúcar com a função aldeído reage com um grupo tiol ou com grupos amino, resultando em uma base de Schiff (Maillard, 1912). Em sequência as bases de Schiff produzem os produtos de Amadori, os quais após desidratação e rearranjos e outras reações irão gerar os AGEs (Vistoli et al., 2013).

Os AGEs são moléculas estáveis que se acumulam nos tecidos e paredes dos vasos sanguíneos. A condição de hiperglicemia encontrada no diabetes é uma das causas mais comuns da produção excessiva de AGEs (Sakurai et al., 2003; Brownlee, 2005), e está associada a um maior risco de mortalidade por doenças cardiovasculares (Kilhovd et al., 2007). Por suas propriedades antiglicantes, a carnosina atua na redução das lipoproteínas de baixa densidade oxidada (contribui para formação de placas arteriais), o que pode potencialmente minimizar o risco de aterosclerose associada ao diabetes (Rashid et al., 2007; Jandeleit-Dahm; Cooper 2008).

3.9.4 Contratilidade muscular e o cálcio

É descrito na literatura que alterações na liberação ou recaptção do Ca^{2+} pelos retículos sarcoplasmáticos durante a contração muscular impactam no desenvolvimento da fadiga (Lamb, 2002). Existe uma relação entre o declínio da força e o declínio das concentrações sarcoplasmáticas de Ca^{2+} em músculos fadigados (Favero et al., 1993). Com a redução da concentração de Ca^{2+} e consequente diminuição da interação do Ca^{2+} com a troponina C, o número de pontes cruzadas actina-miosina declinam, acarretando menor produção de força durante a contração, gerando fadiga muscular (Begum et al., 2005; Allen et al., 2008).

Para o adequado funcionamento celular é essencial haver homeostase do cálcio intracelular (Armstrong, 1990; Falvo; Bloomer, 2006). Desequilíbrio homeostático do Ca^{2+} podem resultar em processos auto catalíticos pela ativação da enzima fosfolipase A2 e de outras proteases sensíveis ao Ca^{2+} que geram danos às estruturas da membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, degradação de estruturas proteicas, e alteração da função mitocondrial (Jackson et al., 1984; Duan et al., 1990).

As primeiras evidências do papel da carnosina na regulação da concentração de Ca^{2+} foram obtidas em experimentos *in vitro*, onde foi observado que o aumento de carnosina e anserina foram capazes de potencializar a liberação de Ca^{2+} dos retículos sarcoplasmáticos por meio da ativação dos canais de liberação de Ca^{2+} do receptor de rianodina (Batrukova; Rubtsov, 1997).

Para a confirmação dos achados *in vitro*, foram realizados estudos com ratos em humanos, no entanto, apresentando discordância nos resultados (Dutka; Lamb, 2004; Dutka et al., 2012). Para esses autores, embora exista divergências no papel da carnosina em potencializar a liberação de Ca^{2+} dos retículos sarcoplasmáticos, há um consenso de que esse dipeptídeo aumente a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} .

3.10 POTENCIAIS PAPEIS TERAPÊUTICOS DA CARNOSINA NA SAÚDE E NA DOENÇA

Devido às funções atribuídas (antioxidante e antiglicante), a carnosina vem sendo estudada pelo seu potencial terapêutico na manutenção da saúde, bem como prevenção de envelhecimento, adjuvante no tratamento de condições como doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes e comorbidades relacionadas, situações em que a glicação e o estresse oxidativo estão exacerbadas. Apesar deste dipeptídeo ter sido identificado inicialmente há mais de 100 anos, as pesquisas de seus potenciais efeitos na saúde são relativamente recentes e algumas perguntas permanecem em aberto, especialmente as relacionadas aos mecanismos de ação da carnosina e seu potencial impacto na manutenção da saúde e prevenção e/ou tratamento complementar de doenças (Artioli; Sale et al., 2019).

3.10.1 Carnosina e diabetes tipo II

O diabetes tipo II, na década de 1920, era reconhecido unicamente como um distúrbio pancreático (Banting et al., 2007; Polonsky, 2012), no entanto, atualmente é considerada uma doença multissistêmica complexa e heterogênea, afetando não apenas o pâncreas, mas também o tecido muscular, o fígado, as células adiposas, os rins e o

cérebro, além de apresentar associação com múltiplas comorbidades, as quais exigem um tratamento de abordagem multifacetada e individualizada (Brunton, 2016).

Grande parte das complicações relacionadas ao diabetes tipo II está associada aos danos celulares e teciduais ocasionados, a longo prazo, pela elevada formação de AGEs, resultantes da condição crônica de hiperglicemia (Brownlee, 2001). O acúmulo de AGEs gera um aumento na formação de radicais livres e ligações cruzadas com proteínas, resultando em elevado estresse oxidativo, alterações morfofuncionais de células e inflamação sistêmica (Jakuš; Rietbrock, 2004; Ahmed, 2005).

A carnosina, por ter potencial ação antiglicante e antioxidante, tornou-se alvo de pesquisas em animais e humanos como um potencial agente terapêutico no diabetes. Modelos animais de diabetes (tipo I e II) mostraram diminuição da carnosina no plasma, retina, fígado e rins (Sauerhöfer et al., 2007). Em humanos, os resultados ainda não são conclusivos, pois se limitam à análise da carnosina no músculo esquelético. Gualano et al. (2012) observaram 45% menos carnosina muscular em pacientes com diabetes tipo II quando comparados aos indivíduos controle saudáveis. No entanto, o mesmo não foi observado no diabetes tipo I, resultado o qual foi atribuído a um incremento no consumo de carnosina pela elevada concentração de AGEs, situação de hiperglicemia, resistência à insulina e estresse oxidativo elevado, presentes no diabetes tipo II.

Posteriormente, Stegen, Everaert et al. (2015) relataram resultados divergentes, onde observaram maiores concentrações de carnosina muscular (músculo vasto lateral) em indivíduos diabéticos tipo II (+39%) e pré-diabéticos (+30%) em relação ao grupo controle. No entanto, este achado pode estar relacionado à distribuição elevada de fibras do tipo II nesses indivíduos e não necessariamente à resistência à insulina. Os autores sugeriram que o incremento na carnosina muscular poderia estar relacionado a um mecanismo compensatório do organismo, decorrente do elevado consumo de carnosina por elevado estresse oxidativo, estresse carbonílico e glicação excessiva.

Cripps et al. (2017) observaram que a carnosina resultou em aumento da secreção de insulina nas ilhotas de camundongo isoladas e células INS⁻¹ β , além de elevar a captação de glicose em células de músculo esquelético C2C12 e reverter a inibição glucolipotóxica da secreção de insulina.

A constatação de adutos de carnosina com subprodutos de aldeído (ex.: acroleína), sugere o possível consumo da carnosina por subprodutos relacionados à patogênese das complicações do diabetes (Bispo et al., 2016).

Estudos em humanos (Janssen et al., 2005), e em animais (Lee et al., 2005) indicam que a carnosina pode ter um papel promissor no retardo da progressão do diabetes. Em estudo com modelo murino de diabetes tipo II, foi observada uma melhora no controle glicêmico e redução da hemoglobina glicada após a suplementação de carnosina (Sauerhöfer et al., 2007). No que se relaciona a suplementação, outro estudo utilizando a administração de carnosina por 18 semanas em ratos obesos que desenvolveram diabetes, também apresentou melhora no controle glicêmico, redução da glicemia, além de preservar a integridade dos rins (Albrecht et al., 2017).

Em concordância com esses resultados, a suplementação de carnosina por 24 semanas em ratos Zucker obesos, inibiu o desenvolvimento de dislipidemia e hipertensão, protegeu a deterioração da função renal (Aldini; Orioli et al., 2011).

As evidências pioneiras sobre os efeitos protetores da carnosina na progressão e complicações do diabetes vieram de estudos em humanos, com pacientes portadores de polimorfismos nos genes que codificam para carnosinases séricas (CNDP1) e teciduais (carnosina dipeptidase 2 – CNDP2). Esses genes estão localizados em um locus previamente associado à nefropatia diabética (Vardarli et al., 2002). O polimorfismo mais associado às complicações diabéticas se encontra no exon 2 do gene CNDP1 e apresenta diferentes repetições de trinucleotídeos procedendo um número diferente de repetições de leucina variando de 5 a 7 (Janssen et al., 2005). Dentre os polimorfismos descritos, os de repetições mais curtas foram associados a atividade plasmática da carnosinase reduzida, ao ponto que os de repetições mais longas foram relacionados a atividade elevada de carnosinase plasmática (Janssen et al., 2005). Logo, indivíduos com alelos de repetições curtos tendem a um menor risco para nefropatia diabética, indicando um papel protetor da carnosina no diabetes (Janssen et al., 2005; Freedman et al., 2007).

Os pesquisadores de Courten et al. (2016) realizaram um estudo com adultos com sobrepeso e obesidade, os quais foram alocados em 2 grupos (placebo ou suplementação de carnosina 2 g/dia) durante 12 semanas. Foi observada uma melhor resposta no teste oral de glicose (níveis reduzidos de glicose e insulina) no grupo que recebeu carnosina. No entanto, isso foi encontrado apenas em indivíduos que apresentavam previamente tolerância à glicose diminuída. Aumento na insulina em jejum e na resistência à insulina foi relatado apenas no grupo placebo, demonstrando

evidências da capacidade da suplementação de carnosina de oferecer proteção contra o desenvolvimento de diabetes em indivíduos obesos não diabéticos.

3.10.2 Carnosina e envelhecimento

O envelhecimento faz parte de um processo de ocorrência natural, inerente ao desenvolvimento, e é acompanhado por modificações físicas, metabólicas e cognitivas (Bugajska et al., 2007).

Estudos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar o papel da carnosina como um agente antienvelhecimento. McFarland e Holliday (1994, 1999) relataram potencial da carnosina em promover rejuvenescimento das células senescentes e melhorias no limite de Hayflick (limite de replicação celular). Também foram relatados resultados positivos em espécies reativas (Kohen et al., 1988), efeitos estimulantes na atividade mitocondrial (Renner; Asperger et al., 2010), efeitos inibitórios na glicólise em células tumorais (Iovine et al., 2012), redução do metabólito tóxico e formação de metilglioal (Hipkiss et al., 1995) e retardo no encurtamento do telômero (Shao et al., 2004). No entanto, uma das limitações encontradas é que em sua maioria, as evidências são de modelos *in vitro* e cultura de células.

Foi observado que o envelhecimento é acompanhado de menores taxas de conteúdo de carnosina muscular, tanto em humanos (Tallon et al., 2007), quanto animais (Johnson; Hammer, 1992). Dessa forma, o incremento da carnosina muscular pode ser benéfico para essa população, onde evidências demonstram que a suplementação de β -alanina em idosos eleva o conteúdo de carnosina muscular (incremento de $\sim 85\%$; del Favero et al., 2012), com responsividade similar à encontrada em indivíduos mais jovens (Stellingwerff et al., 2012). Em estudo de del Favero et al. (2012) a elevação da carnosina no músculo esquelético foi procedida de uma melhor tolerância ao exercício em testes submáximos e incrementais de carga constante. Em adição, a suplementação de β -alanina demonstrou atrasar o início da fadiga neuromuscular em adultos mais velhos (Stout; Graves et al., 2008), e incremento de desempenho superior ao atingido por indivíduos mais jovens (Stout; Cramer; Mielke et al., 2006).

Contudo, embora a elevação da tolerância ao exercício e o retardo da fadiga possam inferir que a função muscular e a qualidade de vida podem ser melhoradas,

medidas associadas à função do músculo esquelético (força cronometrada e de preensão manual) e a qualidade de vida não foram afetados por concentrações aumentadas de carnosina no músculo esquelético (del Favero et al., 2012), resultado o qual pode ser limitado pela sensibilidade dos testes. Dessa forma, alterações relacionadas à saúde e medidas funcionais podem ser mais aparentes em indivíduos considerados frágeis ou com déficits mais contrastantes na função física, o que não ocorreu na população avaliada (del Favero et al., 2012). Apesar de existirem lacunas a serem respondidas, o aumento no conteúdo de carnosina no músculo esquelético pode ser capaz de melhorar a função muscular, e aprimorando a mobilidade de indivíduos mais velhos, consequentemente, reduzindo o declínio funcional e melhorando a qualidade de vida.

3.10.3 Carnosina e função cognitiva

A carnosina vem sendo estudada há mais de 20 anos por seu potencial função antienvelhecimento. Esse dipeptídeo pode ser encontrado em concentrações mM ao nível do cérebro e diferentes estudos em modelos animais da doença de Alzheimer sugeriram sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, e antiagregante com efeitos neuroprotetores, além da associação encontrada entre declínio cognitivo de um déficit seletivo de carnosina (Caruso et al., 2021). Nessa mesma recente revisão sistemática com meta-análise, os autores investigaram o potencial efeito terapêutico da carnosina contra o declínio cognitivo e sintomas depressivos em idosos e os dados encontrados sugerem que a administração de carnosina/anserina melhorou a função cognitiva global, no entanto não demonstrou efeito nos sintomas depressivos.

A presença da enzima carnosina sintase foi observada em diferentes áreas do cérebro de mamíferos (Murakami; Furuse, 2010). Essa enzima dependente de ATP é capaz de sintetizar a carnosina, bem como a homocarnosina (embora com menor eficiência). É sugerido ocorra absorção de carnosina pelas regiões do cérebro após sua liberação das células gliais, considerando que os neurônios, principalmente os do bulbo olfatório, não possuem a capacidade de sintetizar a carnosina (Hoffmann et al., 1996).

A β -alanina, aminoácido constituinte do dipeptídeo carnosina, pode ser transportada para o cérebro de forma rápida, pesquisas em modelo animal relataram que a suplementação de β -alanina promoveu um incremento do conteúdo de carnosina no córtex cerebral e hipotálamo (Murakami; Furuse, 2010).

No entanto, ainda não é claro o papel da suplementação de β -alanina no aumento da carnosina cerebral. Em um estudo *in vivo*, não foi observado aumento da carnosina no córtex cingulado posterior de humanos, após a suplementação de β -alanina por quatro semanas, muito embora, a quantificação não invasiva no cérebro humano apresenta limitações, tal como a distinção entre sinais de homocarnosina e carnosina (Solis et al., 2015).

Apesar das incertezas ainda presentes sobre as áreas cerebrais que podem se beneficiar da suplementação de β -alanina, desde a identificação da presença de dipeptídeos contendo histidina (DCHs) no cérebro, foi sugerido que aumentar sua disponibilidade teria potencial de alterar a função cognitiva e/ou medidas neuropsicológicas. Em modelo animal de roedores sob condições estressantes, o aumento do conteúdo de carnosina cerebral obtido por meio da suplementação de β -alanina, apresentou melhorias com o passar do tempo no labirinto (Murakami; Furuse, 2010), um indício de potencial ação na aprendizagem e memória.

Em estudo com suplementação de carnosina e anserina (3 meses) em indivíduos de meia-idade e mais velhos, onde utilizaram avaliações neuropsicológicas e exame de ressonância magnética funcional, foram observados aperfeiçoamento no desempenho da memória episódica verbal e diminuição da conectividade na rede neural de modo padrão (Rokicki et al., 2015).

A elevação dos níveis de DCHs por meio da suplementação de β -alanina e seus potenciais efeitos na função cognitiva também foram investigadas em indivíduos saudáveis, em um estudo conduzido em 2 partes, sendo o efeito da suplementação no sinal de homocarnosina/carnosina e o efeito agudo do exercício sobre a função cognitiva com a suplementação de β -alanina. No entanto, não foram encontradas alterações no sinal de homocarnosina/carnosina no cérebro, tanto de vegetarianos quanto onívoros, bem como não foram observados efeitos da suplementação de 4 semanas de β -alanina na função cognitiva (em repouso ou após o exercício) (Solis et al., 2015).

Em concordância com este estudo, também não foram observadas resposta na função cognitiva de militares suplementados com β -alanina por quatro semanas (Hoffman; Landau; Stout; Dabora et al., 2014), porém, as concentrações de carnosina muscular e cerebral não foram mensuradas após o período de suplementação.

Hoffman, Landau, Stout, Hoffman et al. (2015) também realizaram um estudo com indivíduos militares submetidos a 30 dias de suplementação de β -alanina e

avaliaram seu efeito em testes fisiológicos (corrida de 2,5 km, corrida de 1 min, carregamento de vítimas de 50 m, *sprints* repetidos de 30 m com tiro ao alvo) e mensuraram o conteúdo de carnosina no músculo gastrocnêmio e no cérebro. Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram a elevação do conteúdo de carnosina muscular com a suplementação de β -alanina, melhora no desempenho fisiológico (carregamento de uma vítima de 50 m) e a função cognitiva (teste de subtração em série de 2 min) quando comparado ao placebo; no entanto não foi detectado alteração no conteúdo de carnosina cerebral pós-suplementação.

3.10.4 Carnosina e doenças neurodegenerativas

Os transtornos neurodegenerativos, neurológicos e psiquiátricos representam uma preocupação na área da saúde devido à sua elevada prevalência, risco de incapacidade e escassez de tratamentos eficazes. As evidências encontradas na literatura, sugerem que a carnosina possa exercer um potencial papel como agente terapêutico em distúrbios cerebrais (Schön et al., 2019).

Dentre as doenças neurodegenerativas, a doença de Alzheimer e o Parkinson se apresentam como as mais comumente encontradas, nas quais estão presentes distúrbios energéticos mitocondriais que direcionam ao aumento do estresse oxidativo, disfunção celular, inflamação crônica, fatos que evoluem para perda gradativa de função celular e morte de neurônios (Schapira, 2008, 2009).

A Alzheimer, distúrbio neurodegenerativo primário, representa 70% dos casos de demência. Dados recentes em modelo humano de intervenção com suplementação de carnosina e anserina evidenciam que esses dipeptídeos podem melhorar a perda de memória em idosos e reduzir o risco de desenvolvimento da doença (Masuoka et al., 2021). Além disso, a carnosina em cultura de células neuronais inibiu os efeitos tóxicos de β -amiloide (Preston et al., 1998), bem como inibiu a reticulação e agregação de proteínas mediada por AGEs (Corona et al., 2011).

Em modelo animal, um estudo foi conduzido com a suplementação de carnosina em camundongos transgênicos da doença de Alzheimer e observaram uma supressão da disfunção mitocondrial e do acúmulo de β -amiloide (Corona et al., 2011). A carnosina também se mostrou eficaz na prevenção de declínio cognitivo em modelo murino

semelhante, ação atribuída à inibição da polimerização da proteína β -amiloide, realizada pela carnosina (Herculano et al., 2013).

Uma característica observada na doença de Alzheimer é um fluxo sanguíneo para o cérebro prejudicado ocasionado por defeitos microvasculares nos vasos sanguíneos e seguida por eliminação deficiente de neurotoxinas. Hisatsune et al. (2016) conduziram um estudo com voluntários idosos saudáveis e a suplementação de uma fórmula contendo anserina e carnosina e os resultados demonstraram o potencial dos DCHs na melhora do fluxo cerebral, além de melhor preservação da memória no grupo estudado. Resultados semelhantes foram observados também com a suplementação de anserina por 8 semanas em modelo animal, onde foi relatada melhora no comprometimento da memória no teste do labirinto aquático de Morris e em testes de condicionamento contextual do medo. No entanto, não foram observados efeitos nas placas β -amilóides (Kaneko et al., 2017). Contudo, apesar das evidências, são necessários estudos clínicos para elucidar o papel do tratamento com carnosina na evolução da doença de Alzheimer.

Um outro distúrbio degenerativo comum, a doença de Parkinson, afeta cerca de 1% da população acima de 60 anos e sua causa está relacionada à perda de neurônios dopaminérgicos, resultando em um controle reduzido da musculatura lisa e dos movimentos corporais gerando tremores, rigidez e bradicinesia (Tysnes; Storstein, 2017).

Em um estudo com portadores da doença de Parkinson, Boldyrev; Fedorova et al. (2008) realizaram durante 30 dias um tratamento com dihidroxifenilalanina ou dihidroxifenilalanina + carnosina (1,5 g/dia) e observaram uma melhora clínica significativa (+36%), avaliada pela Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson, comparando-se ao tratamento convencional isolado (+16%). Também foram relatadas melhoras nos sintomas físicos como tremores, rigidez e aumento da atividade de Cu-Zn-superóxido dismutase nos glóbulos vermelhos e redução das proteínas carbonilas e hidroxiperoxídeos lipídicos plasmático.

Com o objetivo de investigar os efeitos da carnosina, um estudo usou um modelo celular da doença de Parkinson e foi observado uma redução de apoptose e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) derivada da mitocôndria nas células endoteliais do cérebro, além da normalização dos níveis de enzimas antioxidantes e de peroxidação lipídica (malondialdeído) (Zhao et al., 2017).

Apesar dos resultados presentes na literatura, sugerirem que a carnosina possa ter um potencial como adjuvante no tratamento da doença de Parkinson, mais estudos são necessários para evidenciar os efeitos terapêuticos, bem como os mecanismos envolvidos.

3.10.5 Carnosina e insuficiência renal aguda

Insuficiência renal aguda (IRA) ou lesão renal aguda é uma síndrome clínica comum caracterizada pelo rápido comprometimento da função renal (Abdel-Rahman et al., 2021) e está associada ao aumento da morbidade e redução da sobrevida, por vezes considerada como um continuum à doença renal crônica (Verma; Kellum, 2021).

A etiologia da IRA pode ser considerada multifatorial (Abdel-Rahman et al., 2021), sendo a lesão renal induzida por isquemia / reperfusão um fator chave envolvido na patogênese, o que pode ocorrer em algumas condições clínicas como transplante renal, recuperação de parada cardíaca e nefrectomia parcial, originando redução da taxa de filtração glomerular, desequilíbrio eletrolítico, queda do volume urinário e alterações na regulação do pH (Thadhani et al., 1996). Dentre as consequências da IRA, destacam-se o aumento da resistência vascular e a necrose tubular aguda (Thadhani et al., 1996), podendo em muitos casos haver fluxo sanguíneo renal prejudicado (Basile et al., 2012).

Várias reações como o dano oxidativo, a depleção de ATP, a ativação da fosfolipase, a elevação da atividade adrenérgica e a infiltração de neutrófilos estão diretamente relacionadas com a patogênese da insuficiência renal aguda (Basile et al., 2012) e substâncias com a capacidade de agir atenuando esses processos envolvidos na patogênese podem ser importantes em situações de falência aguda, reduzindo a extensão das lesões celulares letais nos rins (Fujii et al., 2003). Tal redução de lesões letais é de elevada importância na recuperação e regeneração renal (Basile et al., 2012).

A carnosina está presente nos rins. É sugerido o papel da carnosina na redução do nível de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, inibição de AGEs e redução da proliferação de células mesangiais. Bem como, atuar como um eliminador de radicais peroxila e hidroxila e um inibidor natural da enzima de conversão da angiotensina (Kilis-Pstrusinska, 2020).

Dessa forma, a carnosina pode exercer um efeito protetor, como demonstrado por Kurata et al. (2006), em um estudo com modelo animal de insuficiência renal aguda induzida por isquemia / reperfusão, no qual a injeção intra-cerebroventricular de carnosina (previamente à insuficiência renal aguda) suprimiu o aumento da atividade adrenérgica nos nervos simpáticos renais e atenuou a disfunção renal. Em concordância com este estudo, mais evidências foram observadas por (Fujii et al., 2003), que relataram melhora da ativação adrenérgica ao reduzir a liberação de epinefrina dos rins em animais com IRA tratados com carnosina.

Em recente revisão sobre os papéis da carnosina em doenças renais, Kilis-Pstrusinska (2020) sugeriram que esse dipeptídeo tem propriedades nefroprotetoras, apresentando-se como um potencial agente terapêutico no tratamento e prevenção de doenças relacionadas aos rins, embora mais estudos clínicos sejam necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos associados.

3.10.6 Carnosina e câncer

Nagai e Suda (1986) foram pioneiros ao estudar os efeitos antineoplásicos da carnosina, em um estudo com camundongos, onde realizaram a administração de carnosina e β -alanina e um controle salino via subcutânea, próximo a um tumor previamente desenvolvido por meio da implantação de células tumorais de sarcoma 180. Foi observada redução de mortalidade e da evolução do tumor nos animais que receberam a administração de β -alanina e carnosina em relação aos tratados apenas com carnosina. Após 10 anos desta descoberta, Holliday e McFarland (1996) demonstraram que 20 mM de carnosina inibiu seletivamente o crescimento de células neoplásicas.

Um laboratório da Universidade de Leipzig demonstrou que a carnosina atuou de maneira positiva na redução do crescimento de células humanas de glioblastoma (Renner; Seyffarth et al., 2008). Posteriormente, Renner, Asperger et al. (2010) conduziram um estudo no qual fibroblastos NIH3T3 (que expressam o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) foram implantados, por via subcutânea em camundongos, gerando crescimento de tumores sólidos. Foram realizadas duas séries de experimentos com o tratamento diário com e sem carnosina (controle – NaCl) e o tamanho dos tumores foi mensurado diariamente por várias semanas. Os resultados

demonstraram que apesar da carnosina não ter sido capaz de reverter completamente o desenvolvimento e crescimento do tumor, houve um atraso no crescimento agressivo quando comparado com os controles em ambos os experimentos. Em adição, foi observado no exame microscópico dos tumores que os animais tratados com carnosina tinham um número significativamente reduzido de mitoses, revelando uma atividade antiproliferativa da carnosina em modelo *in vivo*.

Evidências sobre os efeitos antiproliferativo da carnosina, foram descritas em estudos de diversas linhas de células cancerosas, como as do cólon (Iovine et al., 2012), intestino (Shen et al., 2014) e ovários Mikula-Pietrasik e Książek (2016), demonstrando possíveis ações antitumorais da carnosina.

3.11 INSULINA

A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas pancreáticas. É descrito que este hormônio tem a capacidade de facilitar a captação de algumas substâncias para o interior de diversos tipos celulares (como exemplo a creatina e a carnitina no músculo esquelético) (Steenge et al., 1998; Stephens et al., 2006).

Tanto fatores agudos quanto crônicos apresentam-se como reguladores da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ no músculo esquelético e a insulina faz parte do grupo de hormônios que influenciam de forma aguda na regulação da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (Sweeney; Klip, 1998; Clausen, 2003).

É sugerido que a regulação aguda da bomba de sódio-potássio envolve efeitos diretos nas propriedades cinéticas e/ou na translocação entre a membrana plasmática e seus estoques intracelulares (Clausen, 2003). A $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ é dividida em 2 subunidades, sendo α e β , a subunidade α possui os locais de ligação para os íons Na^+ e K^+ , e para o ATP, e realiza a atividade catalítica da bomba (Hundal et al., 1992). Dentre as isoformas da subunidade α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), a $\alpha 2$ é predominante no músculo esquelético. Já a subunidade β que também apresenta 3 isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), tem como função transferir uma enzima do seu local de síntese, no retículo endoplasmático, para seu local de inserção na membrana plasmática. Estudos *in vitro* demonstraram que a isoforma $\beta 1$ (no músculo esquelético) é mais expressa nas fibras oxidativas, enquanto a isoforma $\beta 2$ é mais expressa em fibras glicolíticas (Hundal et al., 1992; Marette et al., 1993).

Foi observado, em um estudo realizado com ratos, que a isoforma $\alpha 2$ é preferencialmente translocada com a presença de insulina e após isolamento dos músculos esqueléticos, percebe-se maior presença de isoformas $\alpha 2$ e $\beta 1$ na membrana plasmática, sendo um maior recrutamento dessas subunidades no *m. soleus* em detrimento do *m. gastrocnemius* (maior expressão de $\alpha 1$ e $\beta 2$) (Marette et al., 1993). Considerando-se o músculo vasto lateral, não há dados que demonstrem a atividade dessas isoformas (Hill et al., 2007).

Somados às evidências relacionadas a ação da insulina no aumento da translocação de subunidades específicas da bomba sódio-potássio para membrana plasmática, estudos realizados *in vitro* mostram também aumento da afinidade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ pelo Na^+ intracelular. É conhecido que o Na^+ intracelular isoladamente tem eficiência em elevar a atividade da bomba, e a insulina tem o potencial de estimular maior influxo de Na^+ , portanto, aumentando o cotransporte de outras substâncias para o meio intracelular (Marette et al., 1993; Sweeney; Klip, 1998; Clausen, 2003).

Dessa forma, a literatura ainda apresenta lacunas relacionadas aos mecanismos envolvidos na ação da insulina sobre a bomba sódio-potássio. No entanto alguns estudos *in vitro* têm mostrado que a insulina pode estimular a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, por elevar a afinidade do Na^+ intracelular, enquanto outros estudos relacionam sua ação ao aumento da V_{max} sugerindo também que a ação da insulina ocorre de acordo com a espécie e tecido com a qual está envolvida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PARTICIPANTES

Este estudo foi realizado na Universidade de São Paulo. Foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo CAAE: 19489919.3.0000.0065, número do parecer: 3.848.184.

Foram recrutados 6 voluntários do sexo masculino (idade: 25 ± 3 anos, massa corporal: $78,7 \pm 10,1$ kg, altura: $1,76 \pm 0,03$ m, ingestão habitual de β -alanina na dieta: 636 ± 196 mg/dia⁻¹), fisicamente ativos, com idade entre 18 e 35 anos. Todos os voluntários cumpriram todo o protocolo do estudo. Os critérios de exclusão foram: uso de suplementos alimentares contendo β -alanina, carnosina, ou creatina nos últimos 6 meses; diagnóstico de diabetes tipo I ou tipo II, diagnóstico de intolerância a glicose e uso de drogas que interferem na sensibilidade à ação da insulina, ou na secreção de insulina.

Os voluntários foram recrutados na própria instituição de ensino (Universidade de São Paulo), por meio de cartazes e panfletos com informações sobre a pesquisa e contato do pesquisador, bem como, por contato direto com os alunos de graduação e pós-graduação do *campus*.

Antes do início do estudo, os indivíduos foram informados sobre todos os objetivos e procedimentos realizados, os benefícios oferecidos e os possíveis riscos envolvidos. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Uma vez selecionados para participarem do estudo, todos os voluntários passaram por uma anamnese para verificação dos critérios de elegibilidade. O estudo seguiu o desenho cruzado, sendo a ordem das condições (isto é, insulina basal ou hiperinsulinemia) definida de forma aleatória, mantendo-se perfeito contrabalanceamento. Os voluntários compareceram ao laboratório em 2 dias diferentes,

separados por um período de 7 dias (tempo suficiente para o *washout* da β -alanina ingerida), para realização dos ensaios que consistiram em ingestão oral de β -alanina em pó, dissolvida em 200 ml de água (10 mg/kg^{-1} de peso corporal) em duas condições distintas: AI e BI. Não houve vendamento dos participantes e dos pesquisadores, pois isso não foi possível devido às diferentes configurações necessária para infusão de insulina e glicose. No entanto, todas as amostras foram analisadas com devido cegamento dos pesquisadores (Figura 1).

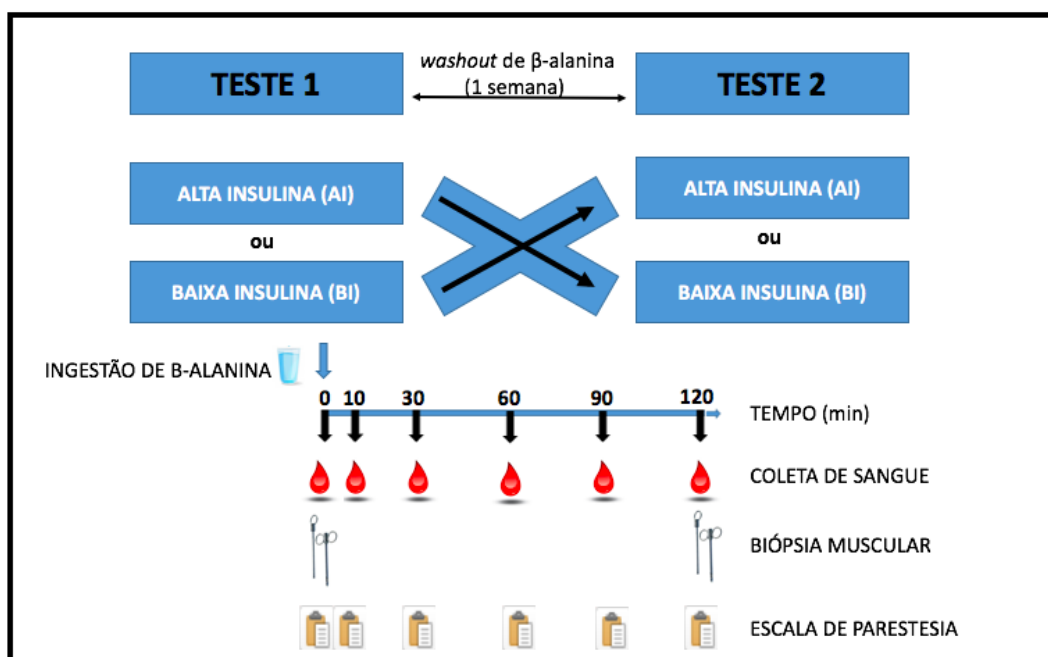


Figura 1 – Desenho experimental e representação dos testes com a ingestão de doses típicas de β -alanina.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foi solicitado aos participantes que chegassem ao laboratório após um período de jejum de 12 h, e que nas 24 h anteriores precedentes aos testes, abstivessem-se de alimentos contendo carnosina (carnes, peixes e aves), e de bebidas alcoólicas. No primeiro dia, o peso corporal e a estatura foram aferidos para calcular a área de superfície corporal, um parâmetro necessário para o cálculo das taxas de infusão de insulina e glicose.

Os participantes foram então acomodados em um leito para a inserção de cânulas. Na condição AI, duas cânulas foram inseridas em diferentes veias do braço direito para a infusão de insulina e glicose, enquanto uma cânula foi inserida no braço esquerdo para coleta sanguínea. Na condição BI, apenas uma cânula foi inserida no braço esquerdo para coleta sanguínea.

O sistema de coleta sanguínea foi mantido permeável com infusão de solução salina, e uma manta térmica a 55 °C foi colocada no braço esquerdo para arterialização do sangue venoso (Gallen; Macdonald, 1990).

Após a inserção das cânulas, uma amostra foi retirada do *m. vastus lateralis* por meio de biópsia por agulha de sucção para determinação de β -alanina e carnosina. Após a biópsia, os voluntários ingeriram β -alanina (10 mg/kg⁻¹ de peso corporal). Em seguida, iniciou-se o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, conforme proposto por (DeFronzo et al., 1979).

O *clamp* foi realizado apenas na condição AI, sendo que, na condição BI, não houve infusão de insulina ou glicose, mantendo-se apenas as coletas de sangue nos mesmos períodos de tempo. As amostras de sangue foram coletadas para análise de β -alanina e insulina nos seguintes momentos: antes da ingestão (0), 10, 30, 60, 90 e 120 min após a ingestão de β -alanina.

A avaliação subjetiva de parestesia foi realizada usando uma escala de 0 a 3 pontos nesses mesmos momentos. As biópsias musculares foram realizadas antes e 120 min após a ingestão de β -alanina.

4.4 INFUSÃO DE INSULINA E GLICOSE

Insulina e glicose foram infundidas apenas na condição AI, seguindo-se os procedimentos descritos por DeFronzo et al. (1979) para realização do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico. A insulina foi infundida na taxa constante de 40 mU/m²/min⁻¹ (de área de superfície corporal) para atingir a concentração alvo de ~ 100 microunidade por mililitro (μ U/ml⁻¹). Para esses autores, a infusão de solução fisiológica estéril contendo glicose a 10% iniciou-se juntamente com a infusão de insulina e foi ajustada a cada 5 min para manter a glicemia entre 70 e 100 mg/dL⁻¹.

4.5 BIÓPSIA MUSCULAR POR AGULHA DE SUCÇÃO

Os participantes foram submetidos a biópsias musculares (antes e após a infusão, sendo 2 biópsias por visita, totalizando 4 biópsias ao término do experimento) usando a técnica de biópsia por agulha percutânea (Bergström, 1975), com sucção (Neves et al., 2012), a fim de obter uma amostra de ~ 70-150 mg da porção média do *m. vastus lateralis*. Os participantes deitaram em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. Todos os procedimentos foram realizados por um médico treinado e com ampla experiência no procedimento. Após limpeza e assepsia do local, foi feita a anestesia local com xilocaína 2% (3 mL), aplicada na porção subcutânea por meio de agulhas hipodérmicas descartáveis. Após anestesia local, foi realizada a incisão na pele e na fáscia muscular de ~ 1 cm de comprimento, para posterior entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. A profundidade da incisão foi aquela necessária para que se fizesse um corte na fáscia muscular. A agulha de biópsia, devidamente limpa (em solução germicida) e esterilizada (em autoclave), foi então inserida através da incisão previamente feita. A agulha é conectada a uma seringa de 60 mL, que foi utilizada para sucção e geração de pressão negativa. Após uma sucção, uma pequena quantidade de músculo é forçada adentro da janela da agulha. Ao fechar a janela acionando-se a lâmina interna de corte, o músculo é cortado e a amostra é retida dentro da agulha, que então é retirada da perna do participante. O tempo de duração total do procedimento é de cerca de 2-5 segundos, contando-se a partir do momento em que a agulha é inserida no músculo do participante. Após a retirada da agulha, a incisão era fechada com bandagem esterilizada e coberta com uma pequena atadura para prevenir o seu desprendimento. Imediatamente após a coleta, sangue, gordura e tecido conjuntivo foram removidos das amostras, que foram então congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise.

4.6 SUPLEMENTAÇÃO DE B-ALANINA

Após a primeira biópsia, 10 mg/kg⁻¹ de β -alanina em pó (> 99% de pureza; Sigma-Aldrich) foi diluída em 200 mL de água potável e consumida por via oral.

4.7 DETERMINAÇÃO DE INSULINA E B-ALANINA PLASMÁTICAS

Amostras de sangue foram coletadas à vácuo em tubos (BD Vacutainer®) contendo ativador de coágulo para determinação de insulina plasmática, e K-EDTA para determinação de β -alanina. As amostras destinadas à análise de insulina foram mantidas em temperatura ambiente até o final do procedimento de infusão e, em seguida, levadas imediatamente ao Laboratório Central do Hospital das Clínicas para processamento e análise pelo método imunofluorométrico. As amostras destinadas para análise de β -alanina foram imediatamente centrifugadas e os plasmas armazenados a -80 °C para posterior análise.

4.8 DETERMINAÇÃO DE B-ALANINA E CARNOSINA MUSCULAR E B-ALANINA PLASMÁTICA POR HPLC-ESI⁺-MS/MS*

Vinte microlitros de plasma foram extraídos em 980 microlitro (μ L) de tampão de extração (metanol:acetonitrila:água 5:3:2 v/v). Os extratos foram vortexados por 10 min (intercalados por períodos de 30 seg) e centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4 °C (Nemkov et al., 2015). Os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C para posterior análise.

Aproximadamente 3-4 mg de músculo liofilizado foram transformados em pó e desproteinizados com HClO₄ a 0,5 molar (M). Posteriormente, foram vortexados durante 15 min (intercalados por períodos de 30 seg) e centrifugados a 5.000 g a 4 °C por 3 min (Dunnett; Harris, 1997). As amostras foram neutralizadas com KHCO₃ a 2,1 M, centrifugadas a 5.000 g a 4 °C por 3 min, e os sobrenadantes armazenados a -80 °C para posterior análise.

Os padrões e as amostras de plasma e músculo foram quantificados em duplicata e analisados por HPLC-ESI⁺-MS/MS *on-line*, utilizando carnosina-d4 (CAR-d4) como padrão interno (Carvalho et al., 2018).

* HPLC-ESI⁺-MS/MS – Cromatografia líquida de alta performance acoplado à ionização de eletropulverização *tandem* espectrometria de massa; *high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry*.

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo API 6500 (Sciex, Washington D.C., WA), utilizando monitoramento de reação selecionada (SRM). Para injeção da amostra, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta performance – HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado com um amostrador automático (1200 – alto desempenho), um forno de coluna a 45 °C (1200 G1216B), uma válvula de comutação de fluxo de alta pressão automatizada, uma bomba binária 1200 SL, uma bomba isocrática Shimadzu10-AVp (Shimadzu, Tóquio, Japão) e limpeza em duas colunas: coluna Kinetex C18 (100 × 4,6 mm); diâmetro de partícula de 2,6 µM (Phenomenex, Torrance, CA) e Coluna Kinetex C18 (100 x 2,1 mm); diâmetro de partícula 2,6 µM (Phenomenex, Torrance, CA). A fase móvel consistiu em 5 mM de acetato de amônio pH 5,5 (A) e acetonitrila (B). Antes do uso, ambas as soluções foram filtradas através de uma membrana *polyvinylidene difluoride* de 0,22 µM (Millipore, Bedford, MA). A condição de separação foi: de 0 a 6 min, 10% de acetonitrila e 150 µL/min; de 6 a 10 min, 10-90% de acetonitrila e 150-300 µL/min; de 10 a 15 min, 90% de acetonitrila e 300 µL/min; de 15 a 20 min, 90-10% de acetonitrila e 300-150 µL/min permitindo que a primeira coluna seja reequilibrada até 30 min. Uma válvula de comutação de fluxo de alta pressão composta de 2 posições e 6 portas foi inserida entre as duas colunas. A válvula descartou o eluente da primeira coluna até 3 min de corrida enquanto mantém a segunda coluna suprida com uma solução de água: acetonitrila (9:1, v/v) a um fluxo constante de 100 µL/min, usando uma bomba isocrática AVp – Shimadzu 10. Após 3 min de funcionamento, a válvula troca a posição, permitindo que o eluente da primeira coluna entre na segunda coluna. Após eluição da segunda coluna, as amostras foram injetadas no espectrômetro de massa. Após 14 min de corrida, a válvula retorna à posição inicial, permitindo que ambas as colunas sejam reequilibradas.

β-alanina e carnosina foram analisadas por ionização por eletropulverização no modo positivo, e a detecção foi feita usando monitoramento de SRM no espectrômetro de massas triplo quadrupolo API 6500. Turbo Ionspray Voltage foi mantido em 5500 V, cortina de gás a 15 libra-força por polegada quadrada (psi) e o nebulizador e gás auxiliar a 50 psi. A temperatura foi ajustada para 500 °C e a pressão de nitrogênio na célula de colisão ajustada para alta. A relação sinal/ruído de ≥ 7 foi utilizada como critério de quantificação. As transições sinal/ruído para β-alanina, carnosina e CAR-d4 foram monitoradas usando um tempo de permanência de 150 ms.

β -alanina não foi derivatizada antes da análise e as transições de SRM monitoradas foram relação massa/carga (m/z) $90 \rightarrow 72$ (transições de quantificação), m/z $90 \rightarrow 45$ e m/z $90 \rightarrow 30$ (transições de confirmação). A transição de quantificação m/z $90 \rightarrow 72$ é exclusiva da β -alanina e pode ser usada para diferenciar os isômeros α e β (Parker; Hercules, 1985). As transições de SRM monitoradas para carnosina foram m/z $227 \rightarrow 110$ (transições de quantificação) e m/z $227 \rightarrow 210$ (transições de confirmação). As transições de SRM monitoradas para CAR-d4 serão m/z $231 \rightarrow 110$ (transições de quantificação) e m/z $231 \rightarrow 214$ (transições de confirmação).

4.9 ESCALA DE AVALIAÇÃO DE PARESTESIA

A presença e a intensidade da parestesia foram avaliadas nos seguintes momentos: antes da ingestão oral do suplemento, 10, 30, 60, 90, 120, 150 min após a ingestão, utilizando uma escala de 0 a 3 adaptada de Lingjærde et al. (1987) (Figura 2).

ESCALA ADAPTADA DE AVALIAÇÃO DE PARESTESIA

Sensações na pele de formigamento dormência ou outras sensações desagradáveis

0	Não tenho nenhuma parestesia ou não tenho certeza de que sinto parestesia
1	Parestesia leve, que quase não me incomoda
2	Parestesia moderada, que claramente me incomoda
3	Parestesia intensa, que me incomoda muito

FONTE: adaptado de Lingjærde O et al., 1987.

Figura 2 – Escala adaptada de avaliação parestesia.

4.10 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE β -ALANINA NA DIETA

Os participantes preencheram diários alimentares de 3 dias não consecutivos (dois dias de semana e um dia no final de semana), seguindo as instruções de um nutricionista registrado. A ingestão de β -alanina por meio do consumo de peixe, aves e carne foi estimada a partir dos dados de (Jones et al., 2011).

4.11 ESTUDO *IN VITRO* EM MIOTUBOS DE CÉLULAS C2C12 CULTIVADAS

O impacto da insulina na captação de β -alanina pelas células do músculo esquelético foi investigado em condições *in vitro*. Mioblastos de camundongo (C2C12, ATCC) ($n = 3$ poços por condição) foram cultivados em condições padrão de cultura de células em uma atmosfera umedecida 5% CO_2 a 37 °C em meio de crescimento *dulbecco's modified eagle's medium* com alto teor de glicose (4.500 mg/L⁻¹), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 100 $\mu\text{U}/\text{ml}^{-1}$ penicilina/estreptomicina até confluência. O meio foi transferido para o meio de diferenciação (*dulbecco's modified eagle's medium* com alta glicose suplementado com 2% de soro de cavalo e 100 $\mu\text{U}/\text{ml}^{-1}$ de penicilina / estreptomicina) e as células foram diferenciadas por 6 dias. Em seguida, a β -alanina foi dissolvida em meio de diferenciação para uma concentração final de 350 $\mu\text{mol}/\text{L}^{-1}$ ou 700 $\mu\text{mol}/\text{L}^{-1}$. Em um conjunto de experimentos, a insulina foi adicionada ao meio de diferenciação para uma concentração final de 100 $\mu\text{U}/\text{ml}^{-1}$, enquanto em outro conjunto de experimentos, nenhuma insulina foi adicionada. Para confirmar se o efeito da insulina, se houver, é mediado por TauT, os mioblastos de camundongo foram diferenciados conforme descrito acima e, em seguida, tratados com 1 $\mu\text{mol}/\text{L}^{-1}$ de hipotaurina (um inibidor de TauT) por 24 h em meio de diferenciação para inibir a captação de β -alanina. Em seguida, a hipotaurina foi descartada, as células foram lavadas com PBS e incubadas com uma concentração final de 350 ou 700 $\mu\text{mol}/\text{L}^{-1}$ de β -alanina com ou sem insulina (100 $\mu\text{U}/\text{ml}^{-1}$) em meio de diferenciação. As células foram então incubadas nessas formulações por 24 h sob condições padrão de cultura de células. A concentração de β -

alanina foi escolhida por estar muito acima do limite de saturação de TauT e imitar a concentração plasmática observada após a ingestão oral de alta dose de β -alanina (Harris; Tallon et al., 2006). A concentração de insulina foi escolhida para imitar picos fisiológicos de insulina após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos (Stegen; Blancquaert et al., 2013).

Após a conclusão dos experimentos, o meio de cultura foi coletado e as células lavadas com PBS e lisadas com 2 mL de Triton X-100 a 0,5% em NaCl a 0,2 M. Foram adicionados cem microlitros de uma solução de ácido 5-sulfossalicílico a 5% contendo 500 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ de norleucina (padrão interno) e o lisado homogeneizado. Após incubação por 30 min a 4 °C, o lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado e filtrado através de um tubo de filtro de 0,22 μm . As concentrações intracelulares de β -alanina foram determinadas pela injeção de 40 μL do sobrenadante filtrado por meio de um sistema de troca iônica de cromatografia líquida de alta eficiência Biochrom 30+ com derivatização de fluoraldeído-o-ftaldialdeído.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ 1 desvio padrão (DP). Análise de modelos mistos (*proc mixed*, SAS, versão 9.3) foi utilizada para comparar o conteúdo de β -alanina e carnosina muscular entre as condições, assim como as concentrações plasmáticas de insulina e β -alanina e as classificações de parestesia. Os participantes foram incluídos como sendo fatores aleatórios e as condições (AI e BI) e o tempo como fatores fixos. O ajuste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas foi realizado sempre que um valor F significativo foi obtido. A área sob a curva (AUC) foi calculada pelo método trapezoidal linear. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

No experimento *in vitro* os dados são apresentados como média $\pm$ DP (com intervalo de confiança de 95% – IC 95%) e foram analisados no *software* estatístico SAS (versão 9.3; SAS Institute, Cary, NC). ANOVA *one way* foi utilizada para analisar dados relacionados à incubação com 350 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ ou 700 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina. O ajuste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas foi realizado sempre que um valor F significativo foi obtido. A significância estatística foi aceita em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1

Insulina plasmática:

As concentrações de insulina plasmática foram significativamente maiores na condição AI do que na BI (interação condição por tempo: $p < 0,0001$) em todos os momentos (*pairwise* todos $p < 0,001$), exceto na linha de base ($p > 0,999$). Uma AUC significativamente maior foi demonstrada na AI do que na BI ($p = 0,004$; IC 95% + 117.260 – -6.214). Esses dados confirmam que a técnica de *clamp* foi capaz de sustentar a hiperinsulinemia fisiológica durante todo o procedimento (Figura 3).

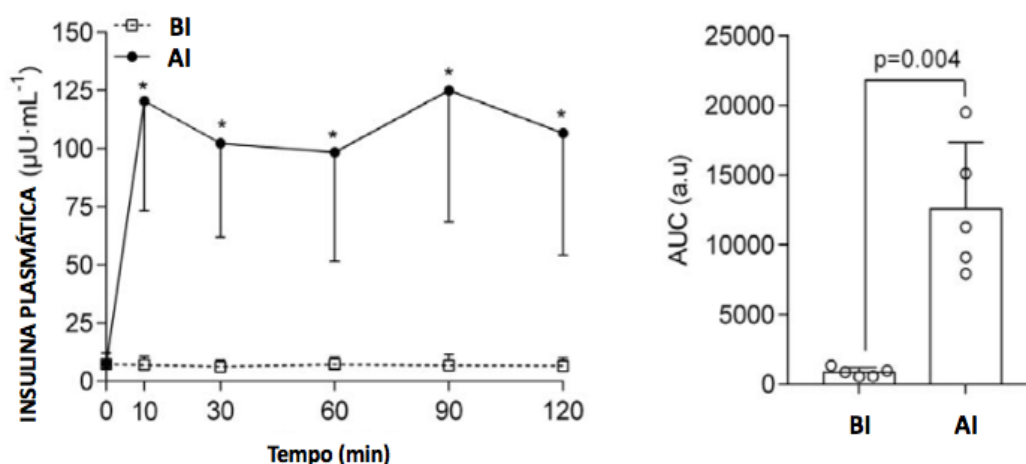


Figura 3 – Concentrações plasmáticas de insulina durante 120 min de infusão de intravenosa de insulina (alta insulina – AI) ou insulina em jejum basal (baixa insulina – BI). Área sob a curva (AUC) ($p = 0,004$).

β -alanina plasmática:

As concentrações plasmáticas de β -alanina aumentaram rapidamente após a ingestão de β -alanina e tenderam a retornar aos níveis de pré-ingestão até o final do período de 120 min (efeito principal de tempo: $p < 0,0001$). Não foram mostradas diferenças entre BI e AI (interação condição por tempo: $p = 0,58$; análise pareada: todos $p > 0,05$) e não houve diferenças significativas entre as condições para a AUC da β -alanina ($p = 0,23$; IC 95% = -935 a -3.070) (Figura 4).

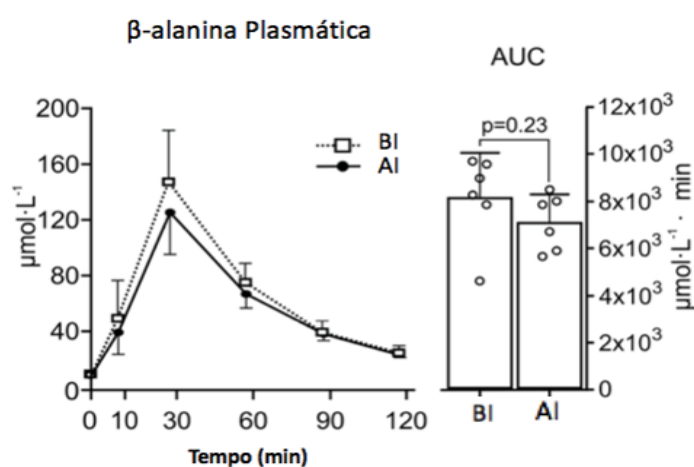


Figura 4 – Concentrações plasmáticas de β -alanina durante os 120 min após a ingestão de β -alanina, tanto em condições de alta insulina (AI) quanto de baixa insulina (BI) (gráfico à esquerda) e área sob a curva (AUC) em ambas as condições (gráfico à direita).

Não foram mostradas diferenças entre AI e BI em nenhum momento (todos $p > 0,05$).

β -alanina muscular:

A ingestão de β -alanina resultou em um aumento de $\sim 1,5$ vezes no conteúdo de β -alanina muscular (efeito principal do tempo: $p = 0,0003$), sem diferenças significativas entre AI e BI (efeito principal da condição: $p = 0,37$; condição por interação tempo-tempo: $p = 0,32$) (Figura 5).

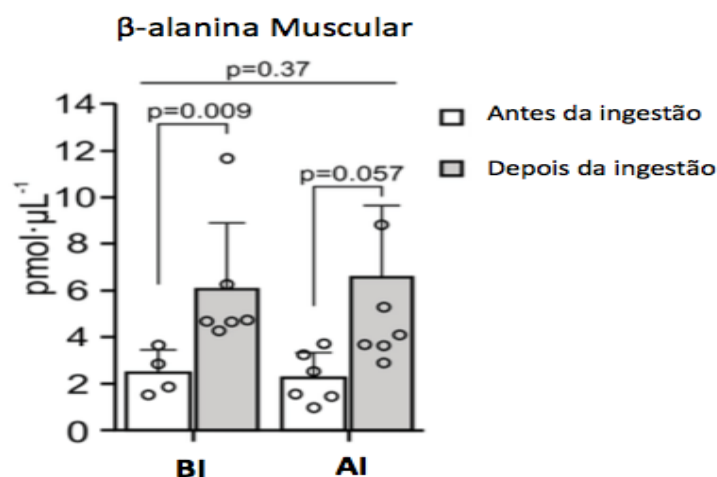


Figura 5 – Concentrações de β -alanina medidas em extratos musculares obtidos antes e após a ingestão de β -alanina nas condições alta insulina (AI) e baixa insulina (BI).

Os valores de p referem-se à interação condição por tempo e comparação pareada ajustada por Tukey-Kraemer versus antes da ingestão. Dois participantes foram avaliados por estudo, o que significa que foram realizados 6 experimentos independentes, totalizando 12 observações.

5.2 EXPERIMENTO 2 (*IN VITRO*)

Concentração de $350 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina:

A incubação com $350 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina levou a um aumento significativo na concentração de β -alanina, medida em células lisadas em todas as condições, quando comparadas ao controle ($F = 339,13$; todos $p < 0,0001$). A concentração intracelular de β -alanina foi maior nos mioblastos de camundongos tratados com meio de diferenciação suplementado com β -alanina e insulina do que no meio de diferenciação com β -alanina

e sem insulina ($t = -5,56$; $p = 0,002$; IC 95%: -157,96 a -43,93). O tratamento com hipotaurina resultou em uma concentração significativamente menor de β -alanina nas células lisadas em comparação com as células que não foram tratadas com hipotaurina, em ambos, tanto ausência ($t = 18,37$; $p < 0,0001$; IC 95%: 246,17 a 360,20) ou presença ($t = 21,01$; $p < 0,0001$; IC 95%: 289,77 a 403,80) de insulina. No entanto, a adição de insulina ao meio de cultura com hipotaurina resultou em aumento significativo na concentração de β -alanina ($t = -3,48$; $p = 0,008$; IC 95%: -114,37 a -0,34) em comparação com as células que foram tratadas com hipotaurina, mas sem insulina (Figura 6).

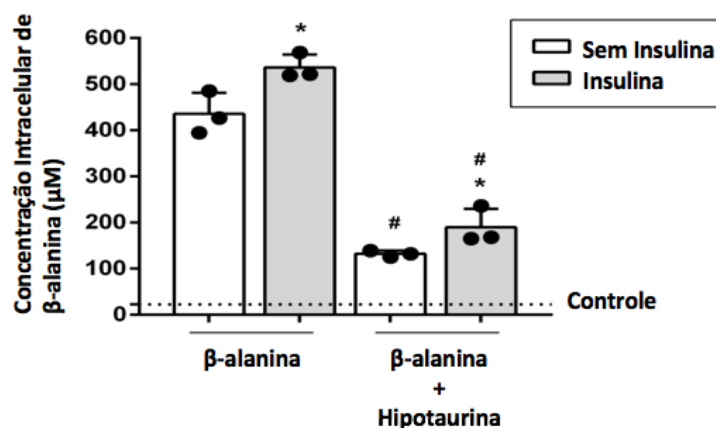


Figura 6 – Concentração intracelular de β -alanina determinada em mioblastos lisados tratados por 24 h com meio de diferenciação suplementado com β -alanina ($350 \mu\text{mol/L}^{-1}$) com ou sem insulina ($100 \mu\text{U/ml}^{-1}$) após o tratamento com hipotaurina (um inibidor de TauT) ou nenhum tratamento.

Legenda: Tukey *post-hoc*: sem insulina vs. insulina: $*p = 0,002$; sem insulina vs. sem insulina + hipotaurina $\#p < 0,001$; insulina vs. insulina + hipotaurina $\#p < 0,001$; sem insulina + hipotaurina vs. insulina + hipotaurina: $*p = 0,04$. $n = 3$ por condição.

Para referência, os valores médios mensurados nas amostras de controle são mostrados em linhas pontilhadas. *One-way* ANOVA: Todas as condições são significativamente diferentes do controle (todas $p < 0,0001$).

Concentração de $700 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina:

A incubação com $700 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina levou a um aumento significativo na concentração de β -alanina, medida em células lisadas em todas as condições, quando comparada ao controle ($F = 104,68$; todos $p < 0,0001$). Não houve diferença na

concentração intracelular de β -alanina entre os mioblastos de camundongos tratados com $700 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina com ou sem insulina ($t = -2,56$; $p = 0,17$; IC 95%: -181,77 a 27,18). O tratamento com hipotaurina resultou em uma concentração significativamente menor de β -alanina nas células lisadas em comparação com as células que não foram tratadas com hipotaurina, em ambas, tanto na ausência ($t = 8,92$; $p = 0,0001$; IC 95%: 165,19 a 374,14) ou presença ($t = 9,13$; $p = 0,0001$; IC 95%: 171,75 a 380,71) de insulina. A adição de insulina ao meio de cultura com hipotaurina não resultou em aumento da concentração de β -alanina quando comparada ao meio de cultura com hipotaurina sem insulina ($t = -2,34$; $p = 0,23$; IC 95%: -175,20 a 33,75) (Figura 7).

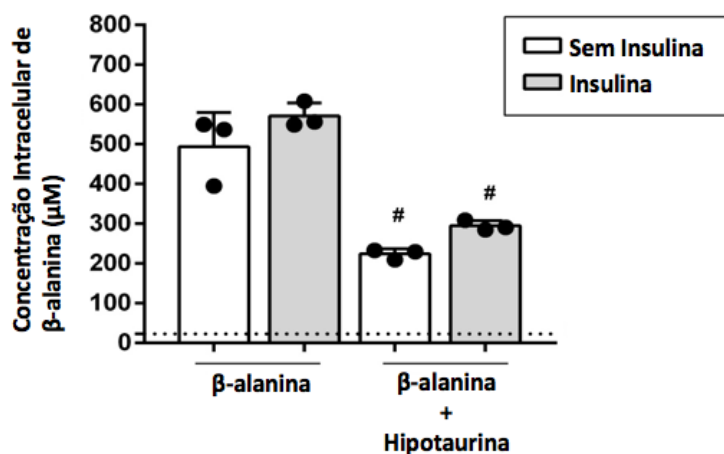


Figura 7 – Concentração intracelular de β -alanina determinada em mioblastos lisados tratados por 24 h com meio de diferenciação suplementado com β -alanina ($700 \mu\text{mol/L}^{-1}$) com ou sem insulina ($100 \mu\text{U/mL}^{-1}$) após tratamento com hipotaurina (um inibidor de TauT) ou nenhum tratamento.

Legenda: Tukey *post-hoc*: sem insulina vs. sem insulina+hipotaurina [#] $p = 0,0001$; insulina vs. insulina + hipotaurina [#] $p = 0,0001$. $n=3$ por condição.

Para referência, os valores médios medidos nas amostras de controle são mostrados em linhas pontilhadas. ANOVA *One-way*: Todas as condições são significativamente diferentes do controle (todas $p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a hiperinsulinemia poderia potencializar a captação de β -alanina para o músculo esquelético quando em concentrações sub-saturantes. A suplementação realizada foi próxima à ingestão dietética diária de β -alanina de indivíduos onívoros e mimetiza o fracionamento usual de suplementação, na qual a ingestão de 800 mg de β -alanina por dose evita a parestesia. O experimento realizado permitiu um controle rigoroso sobre as concentrações de insulina no sangue. Conforme os resultados apresentados no Experimento 1, os dados fornecem evidências de que a hiperinsulinemia não aumenta a captação de β -alanina pelas células musculares quando as concentrações de substrato se apresentam em um nível abaixo da saturação dos transportadores de β -alanina.

Dentre os três transportadores de β -alanina conhecidos, TauT (SLC6A6), PAT1 (SLC36A1) e ATB^{0,+} (SLC6A14) (Anderson; Howard et al., 2009), somente os genes que codificam TauT e PAT1 são expressos no músculo esquelético humano (Everaert; De Naeyer et al., 2013). O TauT é um transportador dependente de Cl^- e Na^+ , na proporção de 1:1:2, apresenta alta afinidade e baixa capacidade e realiza o transporte de β -alanina e taurina através das membranas (Jessen 1994; Anderson; Howard et al., 2009). Ocasionalmente pela dependência iônica, o TauT realiza um sistema de transporte ativo secundário, no qual a energia transportada é obtida por meio de um gradiente eletroquímico de íons de sódio, mantido pela atividade da bomba de sódio e potássio (Han et al., 2006). Já o PAT1 realiza o transporte de aminoácidos zwitteriônicos (dentre elas a prolina, taurina e β -alanina), e é considerado um transportador de alta capacidade e baixa afinidade, dependente de H^+ e independente de Na^+ (Boll et al., 2002; Chen et al., 2003). Apesar da independência de Na^+ , apresentada pelo transportador PAT1, existem evidências que sugerem que o Na^+ pode estimular a atividade PAT1 (Anderson; Grenade et al., 2004). Isso indica que a atividade de PAT1 é acoplada à atividade do trocador Na^+/H^+ , devido ao aumento do gradiente de H^+ realizado pelo trocador Na^+/H^+ , por meio da membrana, otimizando assim a força motriz do PAT1 (Iñigo et al., 2006).

Estudos sugerem existir a ação do hormônio insulina no estímulo da atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, aumentando a afinidade intracelular de Na^+ , tanto em sapos usando o m. sartório (Moore, 1973), quanto em ratos avaliando o m. sóleo (Clausen;

Kohn, 1977). Em experimento utilizando fibroblastos humanos foi observado que a insulina aumentou a atividade da bomba e o co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ aumentando a V_{max} dos transportadores sem alterar seu K_M (Longo, 1996). Considerando-se o estímulo da insulina, tanto na atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (Rosić et al., 1985; Sweeney; Klip, 1998; Clausen, 2003), quanto do trocador Na^+/H^+ (Kliscic et al., 2002), foi levantada a hipótese de que a hiperinsulinemia poderia estimular o transporte de β -alanina no músculo esquelético humano, levando a um incremento no acúmulo de carnosina muscular frente a suplementação de β -alanina (Stegen; Blancquaert et al., 2013). Do ponto de vista prático, uma maior taxa de conversão de β -alanina em carnosina, traria como benefício a otimização da suplementação (com maior estoque de carnosina muscular durante o período), bem como redução do tempo necessário para atingir o incremento de carnosina muscular.

O aprimoramento dos mecanismos de transporte pode ocorrer com o aumento da V_{max} do transportador ou da afinidade entre o transportador e seu substrato (K_M diminuído). A maior capacidade de transporte é observada quando as concentrações de substrato estão acima do limite de saturação do transportador, enquanto a afinidade aumentada é observada quando as concentrações de substrato estão abaixo da saturação do transportador. Previamente, para testar a condição de hiperinsulinemia frente à saturação do transportador, nosso grupo de pesquisa realizou um experimento em que a abordagem experimental era essencialmente a mesma deste estudo, no entanto com a infusão intravenosa de uma elevada dose de β -alanina ($0,11 \text{ g/kg/min}^{-1}$ por 150 min), com e sem insulina, sendo a taxa de infusão de β -alanina praticamente a máxima tolerável, considerando o grau de parestesia desencadeada (Gonçalves et al., 2020). Conforme os resultados demonstrados no estudo de Gonçalves et al. (2020), a elevação nas concentrações plasmáticas de β -alanina ($\sim 3000\text{-}4000 \text{ }\mu\text{mol/L}^{-1}$) certamente excedeu a capacidade máxima de TauT (cujo K_M é relatado como sendo ~ 100 vezes menor), mas sugestivamente estava abaixo da saturação de PAT1 (cujo K_M para um β -dipeptidemimético é ~ 0 vezes maior) (Frølund et al., 2010). Dessa forma, é improvável simular uma condição experimental que permita determinar se a insulina pode aumentar a capacidade já elevada do transportador PAT1, mediante ao fato que concentrações maiores de β -alanina no plasma não teria relevância prática por superar qualquer condição fisiológica (Gonçalves et al., 2020).

Embora os efeitos no $V_{\max}$ de PAT1 permaneçam não testados, a plausibilidade fisiológica de uma concentração tão alta de β -alanina no plasma é praticamente inexistente, de modo que tem muito pouca relevância prática. A ausência de efeitos da insulina na atividade de transporte de PAT1 pode, no entanto, ser ocasionada pela condição de que em pH intracelular ácido (variando de 5,5 a 6,0) o Na^+ poderia aumentar a atividade de PAT1 por meio de um gradiente de prótons elevado (Daniel et al., 1991; Boll et al., 2002; Chen et al., 2003; Iñigo et al., 2006). Como essas condições de pH intracelular ácido não são fisiológicas, bem como, não são observáveis no músculo em repouso (pH $\sim$ 7,0), especulamos que efeitos na atividade PAT1, não seria observável.

Como não foram observadas evidências do estímulo da insulina no transporte de β -alanina no experimento com doses supersaturantes é possível a conclusão de que a insulina não atuaria no aumento do $V_{\max}$ de TauT ou no K_M de PAT1 (Gonçalves et al., 2020). Contudo, esse resultado, não descartou a possibilidade da insulina incrementar o transporte de β -alanina em concentrações abaixo da saturação do TauT, surgindo então a hipótese deste estudo, de que a insulina poderia aumentar a afinidade entre a β -alanina e o TauT, diminuindo assim o seu K_M . No entanto, os resultados encontrados sugerem que a insulina não atue na redução do K_M de TauT.

Coletivamente, os resultados tanto deste estudo com suplementação em dose usual de β -alanina, quanto do realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando concentrações saturantes demonstram a falta de efeito da insulina no transporte de β -alanina. Todavia, nossos resultados divergem dos encontrados por Stegen, Blancquaert et al. (2013), que mostraram que a suplementação de 4 doses diárias de 800 mg de β -alanina ($3,2 \text{ g/d}^{-1}$) durante 46 dias elevou significativamente a concentração de carnosina muscular no grupo que suplementou β -alanina juntamente às refeições quando comparado ao grupo que consumiu β -alanina entre as refeições. Embora este estudo não tenha sido desenhado para avaliar diretamente o transporte de β -alanina ou os efeitos da insulina, o aumento da acumulação de carnosina muscular levou à sugestão de que a insulina poderia estimular o transporte de β -alanina para o músculo esquelético. Apesar disso, esse efeito foi demonstrado apenas no *m. soleus* e não no *m. gastrocnemius*.

Uma suposta explicação para os achados de Stegen, Blancquaert et al. (2013) é que, em vez de um efeito de hiperinsulinemia, a ingestão de alimentos pode ter

aumentado a disponibilidade de substratos para as enzimas que degradam a β -alanina (4-aminobutirato-2-oxoglutarato transaminase e alanina-glioxilato transaminase), o que aumentaria a competição pelo local de ligação das enzimas, resultando em maior disponibilidade de β -alanina para sintetizar carnosina. Essa hipótese, no entanto, é apenas especulativa e requer confirmação experimental. Dessa forma, frente aos dados contrastantes observados entre os estudos, realizamos um estudo *in vitro* com mioblastos de camundongos cultivados, com o controle das concentrações de β -alanina e insulina para tentar compreender os mecanismos envolvidos na ação da insulina no transporte de β -alanina para as células musculares.

Este estudo realizado por meio de um modelo experimental *in vitro* mostrou que a insulina não aumenta o transporte de β -alanina quando as concentrações de β -alanina ($700 \mu\text{mol/L}^{-1}$) estão acima do V_{max} de TauT, indicando que a insulina não estimula o aumento do transporte de β -alanina para as células musculares quando o TauT está saturado, confirmando os resultados encontrados em humanos com infusão suprafisiológica de β -alanina (Gonçalves et al., 2020). No entanto, em concentrações subsaturantes de β -alanina ($350 \mu\text{mol/L}^{-1}$), as condições *in vitro* demonstraram efeito significativo da insulina no aumento do transporte de β -alanina, tanto na presença ou ausência de hipotaurina. Um ponto importante a se observar é que em ambas concentrações, tanto 350 quanto $700 \mu\text{mol/L}^{-1}$, apesar do tratamento com hipotaurina ter resultado em menores concentrações de β -alanina, não houve a inibição da entrada do aminoácido. Um dos fatores a ser considerado é que a hipotaurina é um inibidor competitivo, o que pode não excluir a ação do TauT no transporte, mas apenas reduzir a afinidade (K_M aumentado), competindo pelo sítio. Pode-se supor que as evidências na ação da insulina na concentração de $350 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina, tenham relação com a capacidade da insulina em estimular o influxo de Na^+ , o qual eleva a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, aumentando o cotransporte de substâncias para o meio intracelular. Estudos *in vitro* têm mostrado a ação da insulina tanto o estímulo da atividade da bomba por elevar a afinidade do Na^+ intracelular, quanto sua ação no aumento da V_{max} . (Marette et al., 1993; Sweeney; Klip, 1998; Clausen, 2003).

Por outro lado, apesar de o TauT ser considerado o principal transportador, o PAT1 também pode exercer papel importante. A atividade do PAT1 está ligada ao trocador Na^+/H^+ , em função de sua dependência de íons de H^+ , e apesar de ele ser um transportador de baixa afinidade, podemos hipotetizar um aumento em sua ação

ocasionado pela insulina, considerando-se que é descrito que este hormônio estimula o trocador Na^+/H^+ de maneira dependente de tempo e da concentração (Kliscic et al., 2002).

Embora a insulina tenha apresentado resultado significativo com a concentração de $350 \mu\text{mol/L}^{-1}$ de β -alanina no modelo *in vitro*, existe uma limitação a ser considerada, de que as células de camundongos cultivadas podem apresentar comportamentos diferentes em relação às células musculares esqueléticas humanas que trabalham em um sistema integrado, além do fato de que variações entre valores de K_M e $V_{\max}$, ocorrem entre diferentes tipos celulares e fases de maturação. Essa limitação, se soma à divergência entre o tempo de incubação das células (24 h) e o tempo no experimento realizado em humanos que foi de 2 h, entre a ingestão do suplemento e a biópsia muscular, logo, considerando-se a importância do fator tempo na ação da insulina (Kliscic et al., 2002) e a possibilidade de que ao longo das 24 h a progressiva utilização do substrato (β -alanina) pode ter permitido um período em que os transportadores não se encontravam saturados pode ser uma possível explicação para o resultado encontrado. Dessa forma ainda existe uma lacuna a ser elucidada e mais estudos são necessários para caracterizar com precisão os papéis específicos de TauT e PAT1 na captação de β -alanina muscular.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que apesar da condição de hiperinsulinemia ter apresentado resultado significativo no aumento da captação de β -alanina (concentração de $350 \mu\text{mol/L}^{-1}$) no modelo *in vitro*, quando testada em humanos, não demonstrou estimular o aumento do transporte de β -alanina para o músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman EM, Turgut F, Gautam JK, Gautam SC. Determinants of outcomes of acute kidney injury: Clinical predictors and beyond. *J Clin Med*. 2021;10(6):1175.
- Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(7):757-65.
- Adibi SA. Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 1):E723-36.
- Ahmed N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;67(1):3-21.
- Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu J, Rodriguez A, Pastene DO, Krämer BK, Köppel H, Baelde H, de Heer E, Anna Altomare A, Regazzoni L, Denisi A, Aldini G, van den Born J, Yard BA, Hauske SJ. Carnosine attenuates the development of both type 2 diabetes and diabetic nephropathy in BTBR ob/ob mice. *Sci Rep*. 2017;7:44492.
- Aldini G, Carini M, Beretta G, Bradamante S, Facino RM. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: Through what mechanism of reaction? *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(5):699-706.
- Aldini G, Orioli M, Rossoni G, Savi F, Braidotti P, Vistoli G, Yeum KJ, Negrisoli G, Carini M. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1339-54.
- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: Cellular mechanisms. *Physiol Rev*. 2008;88(1):287-332.
- Anderson CM, Ganapathy V, Thwaites DT. Human solute carrier SLC6A14 is the beta-alanine carrier. *J Physiol*. 2008;586(17):4061-7.
- Anderson CM, Grenade DS, Boll M, Foltz M, Wake KA, Kennedy DJ, Munck LK, Miyauchi S, Taylor PM, Campbell FC, Munck BG, Daniel H, Ganapathy V, Thwaites DT. H⁺/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1410-22.
- Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V, Thwaites DT. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol*. 2009;587(Pt 4):731-44.
- Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(4):429-35.

Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha AH Jr. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(6):1162-73.

Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. *Eur J Sport Sci.* 2019;19(1):30-39.

Asatoor AM, Bando JK, Lant AF, Milne MD, Navab F. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. *Gut.* 1970;11(3):250-4.

Babizhayev MA, Lankin VZ, Savel'Yeva EL, Deyev AI, Yegorov YE. Diabetes mellitus: novel insights, analysis and interpretation of pathophysiology and complications management with imidazole-containing peptidomimetic antioxidants. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2013;7(3):216-56.

Baguet A, Bourgois J, Vanhee L, Achten E, Derave W. Important role of muscle carnosine in rowing performance. *J Appl Physiol* (1985). 2010;109(4):1096-101.

Baguet A, Reyngoudt H, Pottier A, Everaert I, Callens S, Achten E, Derave W. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106(3):837-42.

Baker PR, Cramer SD, Kennedy M, Assimios DG, Holmes RP. Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(5):C1359-65.

Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. 1922. *Indian J Med Res.* 2007;125(3):141-6.

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012;2(2):1303-53.

Batrukova MA, Rubtsov AM. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1324(1):142-50.

Bauer K, Schulz M. Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. *Eur J Biochem.* 1994;219(1-2):43-7.

Baumann L, Ingvaldsen T. Concerning histidine and carnosine. The synthesis of carnosine. *J Biol Chem.* 1918;35(2):263-76.

Begum G, Cunliffe A, Leveritt M. Physiological role of carnosine in contracting muscle. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2005;15(5):493-514.

Bellinger PM, Howe ST, Shing CM, Fell JW. Effect of combined β -alanine and sodium bicarbonate supplementation on cycling performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(8):1545-51.

Bergström J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest.* 1975;35(7):609-16.

- Bispo VS, de Arruda Campos IP, Di Mascio P, Medeiros MH. Structural elucidation of a carnosine-acrolein adduct and its quantification in human urine samples. *Sci Rep*. 2016;6:19348.
- Blancquaert L, Baba SP, Kwiatkowski S, Stautemas J, Stegen S, Barbaresi S, Chung W, Boakye AA, Hoetker JD, Bhatnagar A, Delanghe J, Vanheel B, Veiga-da-Cunha M, Derave W, Everaert I. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. *J Physiol*. 2016;594(17):4849-63.
- Boldyrev A, Fedorova T, Stepanova M, Dobrotvorskaya I, Kozlova E, Boldanova N, Bagyeva G, Ivanova-Smolenskaya I, Illarioshkin S. Carnosine [corrected] increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Res*. 2008;11(4):821-7.
- Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1803-45.
- Boldyrev AA, Dupin AM, Pindel EV, Severin SE. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. *Comp Biochem Physiol B*. 1988;89(2):245-50.
- Boldyrev AA, Koldobski A, Kurella E, Maltseva V, Stvolinski S. Natural histidine-containing dipeptide carnosine as a potent hydrophilic antioxidant with membrane stabilizing function. A biomedical aspect. *Mol Chem Neuropathol*. 1993;19(1-2):185-92.
- Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G, Daniel H. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J Biol Chem*. 2002;277(25):22966-73.
- Botka CW, Wittig TW, Graul RC, Nielsen CU, Higaka K, Amidon GL, Sadée W. Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS PharmSci*. 2000;2(2):E16.
- Brisola GMP, Zagatto AM. Ergogenic effects of β -alanine supplementation on different sports modalities: Strong evidence or only incipient findings? *J Strength Cond Res*. 2019;33(1):253-282.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
- Brunton S. Pathophysiology of type 2 diabetes: The evolution of our understanding. *J Fam Pract*. 2016;65(4 Suppl):supp_az_0416.
- Bugajska A, Clarys D, Jarry C, Taconnat L, Tapia G, Vanneste S, Isingrini M. The effect of aging in recollective experience: the processing speed and executive functioning hypothesis. *Conscious Cogn*. 2007;16(4):797-808.

- Burcham PC, Kaminskas LM, Fontaine FR, Petersen DR, Pyke SM. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. *Toxicology*. 2002;181-182:229-36.
- Caruso G, Godos J, Castellano S, Micek A, Murabito P, Galvano F, Ferri R, Grosso G, Caraci F. The therapeutic potential of carnosine/anserine supplementation against cognitive decline: A systematic review with meta-analysis. *Biomedicines*. 2021;9(3):253.
- Carvalho VH, Oliveira AHS, de Oliveira LF, da Silva RP, Di Mascio P, Gualano B, Artioli GG, Medeiros MHG. Exercise and β -alanine supplementation on carnosine-acrolein adduct in skeletal muscle. *Redox Biol*. 2018;18:222-8.
- Chen Z, Fei YJ, Anderson CM, Wake KA, Miyauchi S, Huang W, Thwaites DT, Ganapathy V. Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J Physiol*. 2003;546(Pt 2):349-61.
- Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev*. 1990;70(1):43-77.
- Clausen T, Kohn PG. The effect of insulin on the transport of sodium and potassium in rat soleus muscle. *J Physiol*. 1977;265(1):19-42.
- Clausen T. Na^+ - K^+ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1269-324.
- Corona C, Frazzini V, Silvestri E, Lattanzio R, La Sorda R, Piantelli M, Canzoniero LM, Ciavardelli D, Rizzarelli E, Sensi SL. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PLoS One*. 2011;6(3):e17971.
- Costill DL, Verstappen F, Kuipers H, Janssen E, Fink W. Acid-base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO_3^- . *Int J Sports Med*. 1984;5(5):228-31.
- Cripps MJ, Hanna K, Lavilla C Jr, Sayers SR, Caton PW, Sims C, De Girolamo L, Sale C, Turner MD. Carnosine scavenging of glucolipotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake. *Sci Rep*. 2017;7(1):13313.
- Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):610-8.
- Daniel H, Morse EL, Adibi SA. The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J Biol Chem*. 1991;266(30):19917-24.
- De Courten B, Jakubova M, de Courten MP, Kukurova IJ, Vallova S, Krumpolec P, Valkovic L, Kurdiova T, Garzon D, Barbaresi S, Teede HJ, Derave W, Krssak M, Aldini G, Ukropec J, Ukropcova B. Effects of carnosine supplementation on glucose metabolism: Pilot clinical trial. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(5):1027-34.

- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979;237(3):E214-23.
- Del Favero S, Roschel H, Solis MY, Hayashi AP, Artioli GG, Otaduy MC, Benatti FB, Harris RC, Wise JA, Leite CC, Pereira RM, Sá-Pinto AL, Lancha-Junior AH, Gualano B. Beta-alanine (Carnosyn™) supplementation in elderly subjects (60-80 years): Effects on muscle carnosine content and physical capacity. *Amino Acids*. 2012;43(1):49-56.
- Derave W, Ozdemir MS, Harris RC, Pottier A, Reyngoudt H, Koppo K, Wise JA, Achten E. β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;103(5):1736-43.
- Dolan E, Saunders B, Dantas WS, Murai IH, Roschel H, Artioli GG, Harris R, Bicudo JEPW, Sale C, Gualano B. A Comparative Study of Hummingbirds and Chickens Provides Mechanistic Insight on the Histidine Containing Dipeptide Role in Skeletal Muscle Metabolism. *Sci Rep*. 2018;8(1):14788.
- Dolan E, Swinton PA, Painelli VS, Stephens Hemingway B, Mazzolani B, Infante Smaira F, Saunders B, Artioli GG, Gualano B. A Systematic Risk Assessment and Meta-Analysis on the Use of Oral β -Alanine Supplementation. *Adv Nutr*. 2019;10(3):452-463.
- Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*. 2001;106(5):619-32.
- Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, van Schaftingen E. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem*. 2010;285(13):9346-56.
- Duan C, Delp MD, Hayes DA, Delp PD, Armstrong RB. Rat skeletal muscle mitochondrial $[Ca^{2+}]$ and injury from downhill walking. *J Appl Physiol (1985)*. 1990;68(3):1241-51.
- Dunnett M, Harris RC. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;688(1):47-55.
- Dutka TL, Lamb GD. Effect of carnosine on excitation-contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2004;25(3):203-13.
- Dutka TL, Lambole CR, McKenna MJ, Murphy RM, Lamb GD. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol (1985)*. 2012;112(5):728-36.
- Everaert I, De Naeyer H, Taes Y, Derave W. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(5):1169-79.

Everaert I, Mooyaart A, Baguet A, Zutinic A, Baelde H, Achten E, Taes Y, De Heer E, Derave W. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNBP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*. 2011;40(4):1221-9.

Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*. 1978;276:233-55.

Falvo MJ, Bloomer RJ. Review of exercise-induced muscle injury: relevance for athletic populations. *Res Sports Med*. 2006;14(1):65-82.

Favero TG, Pessah IN, Klug GA. Prolonged exercise reduces Ca^{2+} release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch*. 1993;422(5):472-5.

Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*. 1994;368(6471):563-6.

Freedman BI, Hicks PJ, Sale MM, Pierson ED, Langefeld CD, Rich SS, Xu J, McDonough C, Janssen B, Yard BA, van der Woude FJ, Bowden DW. A leucine repeat in the carnosinase gene CNBP1 is associated with diabetic end-stage renal disease in European Americans. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(4):1131-5.

Frenhani PB, Burini RC. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana [Mechanisms of absorption of amino acids and oligopeptides. Control and implications in human diet therapy]. *Arq Gastroenterol*. 1999;36(4):227-37. Portuguese.

Fritzson P, Efskind J. The effect of dietary 2-acetylaminofluorene on the uracil-degrading enzymes in rat liver. *Cancer Res*. 1965;25:703-7.

Fritzson P. The catabolism of C^{14} -labeled uracil, dihydrouracil, and beta-ureidopropionic acid in rat liver slices. *J Biol Chem*. 1957;226(1):223-8.

Frølund S, Holm R, Brodin B, Nielsen CU. The proton-coupled amino acid transporter, SLC36A1 (hPAT1), transports Gly-Gly, Gly-Sar and other Gly-Gly mimetics. *Br J Pharmacol*. 2010;161(3):589-600.

Fujii T, Takaoka M, Muraoka T, Kurata H, Tsuruoka N, Ono H, Kiso Y, Tanaka T, Matsumura Y. Preventive effect of L-carnosine on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol*. 2003;474(2-3):261-7.

Gallen IW, Macdonald IA. Effect of two methods of hand heating on body temperature, forearm blood flow, and deep venous oxygen saturation. *Am J Physiol*. 1990;259(5 Pt 1):E639-43.

Gardner ML, Illingworth KM, Kelleher J, Wood D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol*. 1991;439:411-22.

- Gonçalves LS, Kratz C, Santos L, Carvalho VH, Sales LP, Nemezio K, Longobardi I, Riani LA, Lima MMO, Saito T, Fernandes AL, Rodrigues J, James RM, Sale C, Gualano B, Geloneze B, de Medeiros MHG, Artioli GG. Insulin does not stimulate β -alanine transport into human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;318(4):C777-86.
- Gualano B, Everaert I, Stegen S, Artioli GG, Taes Y, Roschel H, Achten E, Otaduy MC, Junior AH, Harris R, Derave W. Reduced muscle carnosine content in type 2, but not in type 1 diabetic patients. *Amino Acids*. 2012;43(1):21-4.
- Hama T, Tamaki N, Miyamoto F, Kita M, Tsunemori F. Intestinal absorption of β -alanine, anserine and carnosine in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1976;22(2):147-57.
- Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006;187(1-2):61-73.
- Hannah R, Stannard RL, Minshull C, Artioli GG, Harris RC, Sale C. β -alanine supplementation enhances human skeletal muscle relaxation speed but not force production capacity. *J Appl Physiol (1985)*. 2015;118(5):604-12.
- Hanson HT, Smith EL. Carnosinase; an enzyme of swine kidney. *J Biol Chem*. 1949;179(2):789-801.
- Harding J, Graziadei PP, Monti Graziadei GA, Margolis FL. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res*. 1977;132(1):11-28.
- Harris RC, Dunnett M, Greenhaff PL. Carnosine and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle. *J Sports Sci*. 1998;16(7):639-43.
- Harris RC, Edwards RH, Hultman E, Nordesjö LO, Ny Lind B, Sahlin K. The time course of phosphorylcreatine resynthesis during recovery of the quadriceps muscle in man. *Pflugers Arch*. 1976;367(2):137-42.
- Harris RC, Tallon MJ, Dunnett M, Boobis L, Coakley J, Kim HJ, Fallowfield JL, Hill CA, Sale C, Wise JA. The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*. 2006;30(3):279-89.
- Hayaishi O, Nishizuka Y, Tatibana M, Takeshita M, Kuno S. Enzymatic studies on the metabolism of β -alanine. *J Biol Chem*. 1961;236:781-90.
- Herculano B, Tamura M, Ohba A, Shimatani M, Kutsuna N, Hisatsune T. β -alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2013;33(4):983-97.
- Hill CA, Harris RC, Kim HJ, Harris BD, Sale C, Boobis LH, Kim CK, Wise JA. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*. 2007;32(2):225-33.

- Hipkiss AR, Brownson C. Carnosine reacts with protein carbonyl groups: Another possible role for the anti-ageing peptide? *Biogerontology*. 2000;1(3):217-23.
- Hipkiss AR, Chana H. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248(1):28-32.
- Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett*. 1995;371(1):81-5.
- Hisatsune T, Kaneko J, Kurashige H, Cao Y, Satsu H, Totsuka M, Katakura Y, Imabayashi E, Matsuda H. Effect of anserine/carnosine supplementation on verbal episodic memory in elderly people. *J Alzheimers Dis*. 2016;50(1):149-59.
- Hobson RM, Saunders B, Ball G, Harris RC, Sale C. Effects of β -alanine supplementation on exercise performance: A meta-analysis. *Amino Acids*. 2012;43(1):25-37.
- Hoffman JR, Landau G, Stout JR, Dabora M, Moran DS, Sharvit N, Hoffman MW, Ben Moshe Y, McCormack WP, Hirschhorn G, Ostfeld I. β -alanine supplementation improves tactical performance but not cognitive function in combat soldiers. *J Int Soc Sports Nutr*. 2014;11(1):15.
- Hoffman JR, Landau G, Stout JR, Hoffman MW, Shavit N, Rosen P, Moran DS, Fukuda DH, Shelef I, Carmom E, Ostfeld I. β -Alanine ingestion increases muscle carnosine content and combat specific performance in soldiers. *Amino Acids*. 2015;47(3):627-36.
- Hoffmann AM, Bakardjiev A, Bauer K. Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neurosci Lett*. 1996;215(1):29-32.
- Holliday R, McFarland GA. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br J Cancer*. 1996;73(8):966-71.
- Horinishi H, Grillo M, Margolis FL. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem*. 1978;31(4):909-19.
- Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramlal T, Blostein R, Klip A. Insulin induces translocation of the $\alpha 2$ and $\beta 1$ subunits of the Na^+/K^+ -ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1992;267(8):5040-3.
- Iñigo C, Barber A, Lostao MP. Na^+ and pH dependence of proline and beta-alanine absorption in rat small intestine. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006;186(4):271-8.
- Iovine B, Iannella ML, Nocella F, Pricolo MR, Bevilacqua MA. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett*. 2012;315(2):122-8.
- Jackson MJ, Jones DA, Edwards RH. Experimental skeletal muscle damage: The nature of the calcium-activated degenerative processes. *Eur J Clin Invest*. 1984;14(5):369-74.

Jakuš V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):131-42.

Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10):979-86.

Janssen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P, Peters V, Rind N, Fischer C, Rychlik I, Cerna M, Romzova M, de Heer E, Baelde H, Bakker SJ, Zirie M, Rondeau E, Mathieson P, Saleem MA, Meyer J, Köppel H, Sauerhoefer S, Bartram CR, Nawroth P, Hammes HP, Yard BA, Zschocke J, van der Woude FJ. Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: Association with a leucine repeat of the carnosinase gene CNDP1. *Diabetes*. 2005;54(8):2320-7.

Jappar D, Hu Y, Keep RF, Smith DE. Transport mechanisms of carnosine in SKPT cells: Contribution of apical and basolateral membrane transporters. *Pharm Res*. 2009;26(1):172-81.

Jessen H. Taurine and β -alanine transport in an established human kidney cell line derived from the proximal tubule. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1194(1):44-52.

Johnson P, Hammer JL. Histidine dipeptide levels in ageing and hypertensive rat skeletal and cardiac muscles. *Comp Biochem Physiol B*. 1992;103(4):981-4.

Jones G, Smith M, Harris R. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. *Proc Nutr Soc (Cambr)*. 2011;70(OCE6):E363.

Kalyankar GD, Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. *J Biol Chem*. 1959;234:3210-8.

Kaneko J, Enya A, Enomoto K, Ding Q, Hisatsune T. Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged A β PPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):12571.

Kelly VG, Leveritt MD, Brennan CT, Slater GJ, Jenkins DG. Prevalence, knowledge and attitudes relating to β -alanine use among professional footballers. *J Sci Med Sport*. 2017;20(1):12-16.

Kendrick IP, Harris RC, Kim HJ, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, Bui TT, Smith M, Wise JA. The effects of 10 weeks of resistance training combined with β -alanine supplementation on whole body strength, force production, muscular endurance and body composition. *Amino Acids*. 2008;34(4):547-54.

Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Torjesen PA, Hanssen KF, Laakso M. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: A population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*. 2007;50(7):1409-17.

Kilis-Pstrusinska K. Carnosine and kidney diseases: What we currently know? *Curr Med Chem*. 2020;27(11):1764-81.

- Kliscic J, Hu MC, Nief V, Reyes L, Fuster D, Moe OW, Ambühl PM. Insulin activates Na^+/H^+ exchanger 3: Biphasic response and glucocorticoid dependence. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283(3):F532-9.
- Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85(9):3175-9.
- Kratz CA, Painelli VS, Nemezio KMA, Pires da Silva R, Franchini E, Zagatto AM, Gualano B, Artioli GG. Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in highly-trained athletes. *J Sci Med Sport*. 2017;20(4):403-408.
- Kurata H, Fujii T, Tsutsui H, Katayama T, Ohkita M, Takaoka M, Tsuruoka N, Kiso Y, Ohno Y, Fujisawa Y, Shokoji T, Nishiyama A, Abe Y, Matsumura Y. Renoprotective effects of *l*-carnosine on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(2):640-7.
- Lamb GD. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23(1):81-91.
- Lee YT, Hsu CC, Lin MH, Liu KS, Yin MC. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol*. 2005;513(1-2):145-50.
- Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM, George RP. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J*. 1985;228(3):653-60.
- Lenney JF. Separation and characterization of two carnosine-splitting cytosolic dipeptidases from hog kidney (carnosinase and non-specific dipeptidase). *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1990;371(5):433-40.
- Lingjærde O, Ahlfors UG, Bech P, Dencker SJ, Elgen K. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1987;334:1-100.
- Longo N. Insulin stimulates the Na^+/K^+ -ATPase and the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter of human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1281(1):38-44.
- Maillard LC. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C R Acad Sci*. 1912;154:66-8.
- Marette A, Krischer J, Lavoie L, Ackerley C, Carpentier JL, Klip A. Insulin increases the Na^+/K^+ -ATPase α 2-subunit in the surface of rat skeletal muscle: Morphological evidence. *Am J Physiol*. 1993;265(6 Pt 1):C1716-22.
- Masuoka N, Lei C, Li H, Hisatsune T. Influence of imidazole-dipeptides on cognitive status and preservation in elders: A narrative review. *Nutrients*. 2021;13(2):397.
- Matthews MM, Traut TW. Regulation of *N*-carbamoyl- β -alanine amidohydrolase, the terminal enzyme in pyrimidine catabolism, by ligand-induced change in polymerization. *J Biol Chem*. 1987;262(15):7232-7.

- McFarland GA, Holliday R. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol*. 1999;34(1):35-45.
- McFarland GA, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp Cell Res*. 1994;212(2):167-75.
- Mikuła-Pietrasik J, Książek K. L-carnosine prevents the pro-cancerogenic activity of senescent peritoneal mesothelium towards ovarian cancer cells. *Anticancer Res*. 2016;36(2):665-71.
- Moore RD. Effect of insulin upon the sodium pump in frog skeletal muscle. *J Physiol*. 1973;232(1):23-45.
- Munck BG, Schultz SG. Interactions between leucine and lysine transport in rabbit ileum. *Biochim Biophys Acta*. 1969;183(1):182-93.
- Murakami T, Furuse M. The impact of taurine- and beta-alanine-supplemented diets on behavioral and neurochemical parameters in mice: antidepressant versus anxiolytic-like effects. *Amino Acids*. 2010;39(2):427-34.
- Nagai K, Suda T. [Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine--physiological considerations of its antineoplastic effects]. *Nihon Seirigaku Zasshi*. 1986;48(11):741-7. Japanese.
- Nemkov T, D'Alessandro A, Hansen KC. Three-minute method for amino acid analysis by UHPLC and high-resolution quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Amino Acids*. 2015;47(11):2345-57.
- Neves M Jr, Barreto G, Boobis L, Harris R, Roschel H, Tricoli V, Ugrinowitsch C, Negrão C, Gualano B. Incidence of adverse events associated with percutaneous muscular biopsy among healthy and diseased subjects. *Scand J Med Sci Sports*. 2012;22(2):175-8.
- Ng RH, Marshall FD. Regional and subcellular distribution of homocarnosine-carnosine synthetase in the central nervous system of rats. *J Neurochem*. 1978;30(1):187-90.
- Nielsen CU, Pedersen M, Müller S, Kæstel T, Bjerg M, Ulaganathan N, Nielsen S, Carlsen KL, Nøhr MK, Holm R. Inhibitory Effects of 17- α -ethinyl-estradiol and 17- β -estradiol on transport via the intestinal Proton-Coupled Amino Acid Transporter (PAT1) investigated *in vitro* and *in vivo*. *J Pharm Sci*. 2021;110(1):354-64.
- Painelli VS, Roschel H, Jesus F, Sale C, Harris RC, Solis MY, Benatti FB, Gualano B, Lancha AH Jr, Artioli GG. The ergogenic effect of beta-alanine combined with sodium bicarbonate on high-intensity swimming performance. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013;38(5):525-32.
- Painelli VS, Saunders B, Sale C, Harris RC, Solis MY, Roschel H, Gualano B, Artioli GG, Lancha AH Jr. Influence of training status on high-intensity intermittent performance in response to β -alanine supplementation. *Amino Acids*. 2014;46(5):1207-15.

- Palacín M, Estévez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 1998;78(4):969-1054.
- Park YJ, Volpe SL, Decker EA. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J Agric Food Chem.* 2005;53(12):4736-9.
- Parker CD, Hercules DM. Laser mass spectra of simple aliphatic and aromatic amino acids. *Anal. Chem.* 1985;57(3):698-704.
- Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM, Boldyrev AA, Yaropolov AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1157(3):304-12.
- Perry TL, Hansen S, Love DL. Serum-carnosinase deficiency in carnosinaemia. *Lancet.* 1968;1(7554):1229-30.
- Polonsky KS. The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med.* 2012;367(14):1332-40.
- Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DT, Romero IA, Abbott JN. Toxic effects of β -amyloid(25–35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and β -alanine. *Neurosci Lett.* 1998;242(2):105-8.
- Rashid I, van Reyk DM, Davies MJ. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation in vitro. *FEBS Lett.* 2007;581(5):1067-70.
- Renner C, Asperger A, Seyffarth A, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F. Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. *Neurol Res.* 2010;32(1):101-5.
- Renner C, Seyffarth A, Garcia de Arriba S, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F. Carnosine inhibits growth of cells isolated from human glioblastoma multiforme. *Int J Pept Res Ther.* 2008;14(2):127-35.
- Rezende NS, Swinton P, Oliveira LF, Silva RP, Eira Silva V, Nemezio K, Yamaguchi G, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Dolan E. The muscle carnosine response to beta-alanine supplementation: a systematic review with bayesian individual and aggregate data E-Max model and meta-analysis. *Front Physiol.* 2020;11:913.
- Riedl E, Koeppel H, Brinkkoetter P, Sternik P, Steinbeisser H, Sauerhoefer S, Janssen B, van der Woude FJ, Yard BA. A CTG polymorphism in the CNDP1 gene determines the secretion of serum carnosinase in Cos-7 transfected cells. *Diabetes.* 2007;56(9):2410-3.
- Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(3):R502-16.
- Rokicki J, Li L, Imabayashi E, Kaneko J, Hisatsune T, Matsuda H. Daily carnosine and anserine supplementation alters verbal episodic memory and resting state network connectivity in healthy elderly adults. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:219.

- Rosić NK, Standaert ML, Pollet RJ. The mechanism of insulin stimulation of (Na⁺,K⁺)-ATPase transport activity in muscle. *J Biol Chem*. 1985;260(10):6206-12
- Roveratti MC, Jacinto JL, Oliveira DB, Silva RA, Andraus RAC, Oliveira EP, Ribeiro AS, Aguiar AF. Effects of beta-alanine supplementation on muscle function during recovery from resistance exercise in young adults. *Amino Acids*. 2019;51(4):589-97.
- Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H. The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8 Suppl 3):S259-63.
- Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM, Harris RC. Carnosine: FROM exercise performance to health. *Amino Acids*. 2013;44(6):1477-91.
- Sale C, Saunders B, Hudson S, Wise JA, Harris RC, Sunderland CD. Effect of β -alanine plus sodium bicarbonate on high-intensity cycling capacity. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(10):1972-8.
- Sauerhöfer S, Yuan G, Braun GS, Deinzer M, Neumaier M, Gretz N, Floege J, Kriz W, van der Woude F, Moeller MJ. L-carnosine, a substrate of carnosinase⁻¹, influences glucose metabolism. *Diabetes*. 2007;56(10):2425-32.
- Saunders B, Elliott-Sale K, Artioli GG, Swinton PA, Dolan E, Roschel H, Sale C, Gualano B. β -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2017;51(8):658-69.
- Saunders B, Painelli VS, Oliveira LF, Eira Silva V, Silva RP, Riani L, Franchi M, Gonçalves LS, Harris RC, Roschel H, Artioli GG, Sale C, Gualano B. Twenty-four weeks of β -alanine supplementation on carnosine content, related genes, and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2017;49(5):896-906.
- Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2008;7(1):97-109.
- Schapira AH. Molecular and clinical pathways to neuroprotection of dopaminergic drugs in Parkinson disease. *Neurology*. 2009;72(7 Suppl):S44-50.
- Schön M, Mousa A, Berk M, Chia WL, Ukropec J, Majid A, Ukropcová B, de Courten B. The potential of carnosine in brain-related disorders: A comprehensive review of current evidence. *Nutrients*. 2019;11(6):1196.
- Shao L, Li QH, Tan Z. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):931-6.
- Shen Y, Yang J, Li J, Shi X, Ouyang L, Tian Y, Lu J. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS One*. 2014;9(8):e104632.
- Silva VE, Painelli VS, Shinjo SK, Ribeiro Pereira W, Cilli EM, Sale C, Gualano B, Otaduy MC, Artioli GG. Magnetic resonance spectroscopy as a non-invasive method to quantify muscle carnosine in humans: A comprehensive validity assessment. *Sci Rep*. 2020;10(1):4908.

Sleisenger MH, Kim YS. Protein digestion and absorption. *N Engl J Med*. 1979;300(12):659-63.

Solis MY, Cooper S, Hobson RM, Artioli GG, Otaduy MC, Roschel H, Robertson J, Martin D, S Painelli V, Harris RC, Gualano B, Sale C. Effects of beta-alanine supplementation on brain homocarnosine/carnosine signal and cognitive function: an exploratory study. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123857.

Steenge GR, Lambourne J, Casey A, Macdonald IA, Greenhaff PL. Stimulatory effect of insulin on creatine accumulation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1998;275(6):E974-9.

Stegen S, Blancquaert L, Everaert I, Bex T, Taes Y, Calders P, Achten E, Derave W. Meal and beta-alanine coingestion enhances muscle carnosine loading. *Med Sci Sports Exerc*. 2013;45(8):1478-85.

Stegen S, Everaert I, Deldicque L, Vallova S, de Courten B, Ukropcova B, Ukropec J, Derave W. Muscle histidine-containing dipeptides are elevated by glucose intolerance in both rodents and men. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121062.

Stellingwerff T, Anwender H, Egger A, Buehler T, Kreis R, Decombaz J, Boesch C. Effect of two β -alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. *Amino Acids*. 2012;42(6):2461-72.

Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Laithwaite D, Simpson EJ, Greenhaff PL. Insulin stimulates L-carnitine accumulation in human skeletal muscle. *FASEB J*. 2006;20(2):377-9.

Stout JR, Cramer JT, Mielke M, O'Kroy J, Torok DJ, Zoeller RF. Effects of twenty-eight days of beta-alanine and creatine monohydrate supplementation on the physical working capacity at neuromuscular fatigue threshold. *J Strength Cond Res*. 2006;20(4):928-31.

Stout JR, Cramer JT, Zoeller RF, Torok D, Costa P, Hoffman JR, Harris RC, O'Kroy J. Effects of β -alanine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue and ventilatory threshold in women. *Amino Acids*. 2007;32(3):381-6.

Stout JR, Graves BS, Smith AE, Hartman MJ, Cramer JT, Beck TW, Harris RC. The effect of beta-alanine supplementation on neuromuscular fatigue in elderly (55-92 Years): A double-blind randomized study. *J Int Soc Sports Nutr*. 2008;5:21.

Stuecker TN, Hodge KM, Escalante-Semerena JC. The missing link in coenzyme A biosynthesis: PanM (formerly YhhK), a yeast GCN5 acetyltransferase homologue triggers aspartate decarboxylase (PanD) maturation in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2012;84(4):608-19.

Sutton JR, Jones NL, Toews CJ. Effect of PH on muscle glycolysis during exercise. *Clin Sci (Lond)*. 1981;61(3):331-8.

Sweeney G, Klip A. Regulation of the Na^+/K^+ -ATPase by insulin: Why and how? *Mol Cell Biochem*. 1998;182(1-2):121-33.

- Tallon MJ, Harris RC, Maffulli N, Tarnopolsky MA. Carnosine, taurine and enzyme activities of human skeletal muscle fibres from elderly subjects with osteoarthritis and young moderately active subjects. *Biogerontology*. 2007;8(2):129-37.
- Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, Cairns NJ, Carter C, Cowley DJ, Duverger D, Ganzhorn AJ, Guenet C, Heintzelmann B, Laucher V, Sauvage C, Smirnova T. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6521-31.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;334(22):1448-60.
- Thwaites DT, Anderson CM. The SLC36 family of proton-coupled amino acid transporters and their potential role in drug transport. *Br J Pharmacol*. 2011;164(7):1802-16.
- Thwaites DT, Ford D, Glanville M, Simmons NL. H⁺/solute-induced intracellular acidification leads to selective activation of apical Na⁺/H⁺ exchange in human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*. 1999;104(5):629-35.
- Tobias G, Benatti FB, de Salles Painelli V, Roschel H, Gualano B, Sale C, Harris RC, Lancha AH Jr, Artioli GG. Additive effects of beta-alanine and sodium bicarbonate on upper-body intermittent performance. *Amino Acids*. 2013;45(2):309-17.
- Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(8):901-5.
- Van Thienen R, van Proeyen K, Vanden Eynde B, Puype J, Lefere T, Hespel P. β -alanine improves sprint performance in endurance cycling. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(4):898-903.
- Vardarli I, Baier LJ, Hanson RL, Akkoyun I, Fischer C, Rohmeiss P, Basci A, Bartram CR, van der Woude FJ, Janssen B. Gene for susceptibility to diabetic nephropathy in type 2 diabetes maps to 18q22.3-23. *Kidney Int*. 2002;62(6):2176-83.
- Verma S, Kellum JA. Defining acute kidney injury. *Crit Care Clin*. 2021;37(2):251-66.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013;47(Suppl 1):3-27.
- Yamaguchi GC, Nemezio K, Schulz ML, Natali J, Cesar JE, Riani LA, Gonçalves LS, Möller GB, Sale C, DE Medeiros MHG, Gualano B, Artioli GG. Kinetics of muscle carnosine decay after β -alanine supplementation: A 16-wk washout study. *Med Sci Sports Exerc*. 2021;53(5):1079-1088.
- Yamashita T, Shimada S, Guo W, Sato K, Kohmura E, Hayakawa T, Takagi T, Tohyama M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem*. 1997;272(15):10205-11.

Yan H, Harding JJ. Carnosine protects against the inactivation of esterase induced by glycation and a steroid. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1741(1-2):120-6.

Zhao J, Shi L, Zhang LR. Neuroprotective effect of carnosine against salsolinol-induced Parkinson's disease. *Exp Ther Med*. 2017;14(1):664-70.