

BRENO DUARTE COSTA

Efeitos agudos da ingestão de β -alanina sobre os mecanismos
reguladores do conteúdo de carnosina muscular

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

Programa de Ciências do Sistema do
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Bryan Saunders

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018m de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2022

BRENO DUARTE COSTA

Efeitos agudos da ingestão de β -alanina sobre os mecanismos
reguladores do conteúdo de carnosina muscular

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

Programa de Ciências do Sistema do
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Bryan Saunders

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018m de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

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

Costa, Breno Duarte

Efeitos agudos da ingestão de β -alanina sobre os mecanismos reguladores do conteúdo de carnosina muscular / Breno Duarte Costa. São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2022.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientador: Bryan Saunders.

Descritores: 1.Músculo esquelético 2.Suplementos nutricionais 3. Fadiga muscular 4.Carnosina 5.Beta-alanina 6.Fenômenos fisiológicos da nutrição esportiva

USP/FM/DBD-398/2022

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Breno Duarte Costa

Título: Efeitos agudos da ingestão de β -alanina sobre os mecanismos reguladores do conteúdo de carnosina muscular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof.

Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.

Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.

Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Este é um trabalho grande que não poderia ser realizado sozinho e, o mesmo teve a contribuição de inúmeras pessoas ao longo do processo. Ainda que não o tenha finalizado, gostaria de deixar os meus mais sinceros agradecimentos a diferentes pessoas que me auxiliaram de maneira direta e indireta nessa etapa da minha vida acadêmica.

Inicialmente, quero agradecer ao **Bryan** que acreditou em mim desde a Iniciação Científica. Que me ensinou o passo a passo dos procedimentos que eu teria que realizar em meu projeto e que se dispôs em me orientar desde o meu primeiro convite para palestrar até a minha atual banca. Obrigado por tanto, não somente como orientador, mas como amigo e, principalmente, como ser humano. “Curtir o processo”, foi o que você disse para mim quando entrei no mestrado e pode ter certeza que escutei o que você disse e tenho aproveitado ao máximo cada etapa. Cheers!

Para aqueles que me auxiliaram durante as coletas, muito obrigado! Não são todos que topam ficar até de madrugada coletando sangue, músculo, centrifugando e pipetando. Haja paciência, e vocês tiveram muita. Obrigado **Igor, André, Arthur, Mag e Rafael** por se prontificarem a me auxiliar, não seria possível chegar até aqui sem vocês! Meus mais sinceros agradecimentos também, a cada voluntário que se sujeitou a 6 biópsias musculares e 26 coletas de sangue, sei que não foi fácil, tampouco confortável. Vocês foram sensacionais!

Gostaria de deixar meus agradecimentos também a pessoas que foram imprescindíveis para a realização do meu projeto. Aos colaboradores do laboratório de genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Professora **Carla, Ligia e Natalia**) que me ajudaram com a realização dos experimentos de expressão gênica, muito obrigado. Agradeço também ao Professor **Álvaro** da USP – São Carlos por se prontificar em auxiliar com a realização do HPLC. Ao **Saulo** e a **Gabriela** pela contribuição com os Western Blots que estão sendo e foram realizados na FMUSP.

Obrigado também a banca (**Aline, Alessandro, Bruno e Hamilton**) por terem aceito o meu convite e contribuírem para a melhora da qualidade deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado por cada reunião e convite para colaborar em diferentes projetos, sempre aprendo algo novo graças a vocês. Todos foram fundamentais para que eu desenvolvesse meu senso crítico. Cada uma das nossas discussões contribuiu de alguma forma no meu desenvolvimento acadêmico.

Obrigado também a **Daniela**, minha namorada, por me suportar e me fazer acreditar, mesmo quando desacreditei do quão capaz eu era. Sem seu apoio esse processo teria sido muito mais difícil.

Aos meus pais, **Claudia e Marcos** pelo amor incondicional e pelo apoio em todas as horas da minha vida, por nunca perderem a fé em mim, acreditarem e fomentarem todos os meus sonhos, sou quem sou hoje graças a vocês.

Por último, gostaria de agradecer a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por me apoiar financeiramente desde a minha iniciação científica e, sobretudo, com mais uma bolsa durante esse período do mestrado (Processo: 2019/06140-5), é graças a esse apoio financeiro que todo esse trabalho foi possível.

RESUMO

Costa BD. Efeitos agudos da ingestão de β -alanina sobre os mecanismos reguladores do conteúdo de carnosina muscular [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

O objetivo desse estudo foi avaliar as respostas agudas à suplementação de beta-alanina (BA) na concentração plasmática de BA, na expressão de genes relacionados ao metabolismo da carnosina e no seu respectivo conteúdo no músculo esquelético, antes e depois da suplementação crônica de BA. Foram recrutados quatorze homens saudáveis e fisicamente ativos (participavam de exercícios físicos semanalmente, mas não eram envolvidos em um programa de treinamento estruturado) com idade entre 18 e 45 anos. Eles foram submetidos à suplementação aguda de 1600 mg de BA antes e após um período de suplementação crônica de 6400 mg/dia durante 4 semanas. Amostras musculares foram coletadas antes, 1-h e 4-h pós-suplementação aguda, antes e após o período de suplementação de 4 semanas para avaliar a expressão e o conteúdo de proteínas e genes relacionados ao metabolismo da carnosina (CARNS, TAUT, CNDP2, ABAT, PAT1). A ingestão aguda de 1600 mg de BA regulou a expressão gênica (expressão >2) de *CARNS1*, *ABAT*, *TAUT* e *PAT1* 1 hora após a suplementação na sessão 1 (semana 0). Entretanto, 4 semanas de suplementação de 6400 mg/dia de BA reduziram a expressão do gene *PAT1* 1 hora após a suplementação aguda significativamente (P=0.04) em relação ao baseline. O conteúdo de *CARNS1* (+246%; P=0.02) e *TAUT* (+644%; P=0.01) aumentaram agudamente 4 horas após uma dose aguda de 1600 mg de BA, no entanto após um período de suplementação crônica apenas *TAUT* aumentou seu conteúdo (+ 224%) 4 horas após a dose aguda (P=0.01). Mostramos que houve alterações agudas e crônicas na expressão gênica e no conteúdo de proteínas relacionadas ao metabolismo da carnosina muscular. Atualmente, ainda não está claro o que isso significa para a síntese de carnosina muscular, entretanto, os próximos resultados de BA sanguínea, muscular e carnosina muscular fornecerão mais informações e como eles interagem com esses achados.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Suplementos nutricionais. Fadiga muscular. Carnosina. Beta-alanina. Fenômenos fisiológicos da nutrição esportiva.

ABSTRACT

Costa. BD. Acute effects of β -alanina intake on regulatory mechanisms of muscle carnosine content [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

The aim of this study was to evaluate the acute responses to beta-alanine (BA) supplementation on the plasma concentration of BA, on the expression of genes related to carnosine metabolism and on their respective content in skeletal muscle, before and after chronic BA supplementation. Fourteen healthy and physically active men (participating in weekly physical exercise, but not involved in a structured training program) aged between 18 and 45 years participated. They underwent acute supplementation of 1600 mg of BA before and after a chronic supplementation period of 6400 mg/day for 4 weeks. Muscle samples were collected before, 1-h and 4-h post-acute supplementation, before and after the 4-week supplementation period to assess expression and content of proteins and genes related to carnosine metabolism (*CARNS*, *TAUT*, *CNDP2*, *ABAT*, *PAT1*). Acute ingestion of 1600 mg BA up-regulated gene expression (expression >2) of *CARNS1*, *ABAT*, *TAUT* and *PAT1* 1-hr after supplementation in session 1 (week 0). However, 4 weeks of supplementation of 6400 mg/day BA reduced *PAT1* gene expression at 1-hr after acute supplementation) significantly ($P=0.04$) from baseline. The content of *CARNS1* (+246%; $P=0.02$) and *TAUT* (+644%; $P=0.01$) increased acutely 4-h after an acute dose of 1600 mg BA, however after chronic supplementation only *TAUT* increased its content (+224%) 4-h after the acute dose ($P=0.01$). We showed that there were acute and chronic changes in gene expression and protein content related to muscle carnosine metabolism. Currently, it is still unclear what this means for muscle carnosine synthesis, however, results of blood BA and muscle carnosine will provide further information depending on how they interact with these findings.

Keywords: Muscle skeletal. Dietary supplements. Muscle fatigue. Carnosine. beta-alanine. Sports nutritional physiological phenomena.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Desenho do estudo (Painel A: Desenho ao longo de 4 semanas. Painel B: Protocolo executado na sessão 1 e 2).	32
Figure 2. Fold Change ao longo da Sessão 1 e Sessão 2 para ABAT, CARNS1, CNDP2, PAT1, TAUT. (P=0.45)	38
Figure 3. Média das mudanças intra-sessões em pixels (px) ao longo da Sessão 1 e Sessão 2 para ABAT, CARNS1, CNDP2, TAUT. *P=0.02,**P=0.01	40
Figure 4. Fold change dos dados individuais : Baseline da sessão 1 vs. Baseline da sessão 2 para ABAT, CARNS1, CNDP2, TAUT. Sem diferenças significativas (todos P>0.05).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados antropométricos dos participantes (N=14)	30
Tabela 2. Média da soma das pontuações de cada sessão (N = 14) Todos os dados estão em unidades arbitrárias.	37
Tabela 3. Ingestão dietética no dia anterior e no dia sessões (N=14).....	42
Tabela 4. Disciplinas cursadas	47

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Carnosina e dipeptídeos que contém histidina.....	15
2.2	Distribuição nos tecidos.....	16
2.3	Metabolismo da carnosina	16
2.4	Fatores que influenciam no conteúdo de carnosina muscular	19
2.5	Fontes alimentares de BA	20
2.6	Suplementação de beta-alanina.....	21
2.7	Variações nos aumentos do conteúdo de carnosina muscular com suplementação de BA.	22
2.8	Dose e Duração	23
2.9	Dose e Efeito colateral	24
2.10	Variabilidade de respostas farmacocinéticas com a suplementação de BA	24
2.11	Por que existe tanta variação?.....	27
2.12	Direções futuras: o que ainda precisamos saber?	27
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4.	HIPOTESE	30
5.	MÉTODOS.....	30
5.1	Participantes.....	30
5.2	Desenho experimental.....	31
5.3	Biópsia muscular por agulha de sucção	33
5.4	Avaliação de efeitos colaterais	34

5.5	Cromatografia líquida de alta potência para determinação de dipeptídeos que contém histidina e de BA no sangue.	34
5.6	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR).	34
5.7	Western blot.....	35
5.8	Avaliação da ingestão dietética.....	35
5.9	Análise estatística	36
6.	RESULTADOS	37
6.1	Efeitos colaterais.....	37
6.2	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)	38
6.3	Western Blot	39
6.4	Avaliação da ingestão dietética.....	42
7.	DISCUSSÃO.....	43
8.	DISCIPLINAS CURSADAS	47
9.	PUBLICAÇÕES.....	47
9.1	Artigos	47
9.2	Livros	48
10.	COLABORAÇÃO EM PROJETOS	48
11.	PARTICIPAÇÃO COMO OUVINTE	48
12.	APRESENTAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM MESA REDONDA.....	49
13.	REFERÊNCIAS	52
14.	ANEXOS.....	57
14.1	Escala de intensidade dos efeitos colaterais	57
14.2	Tabela de efeitos colaterais.....	58
14.3	Termo de consentimento livre esclarecido	59
14.4	Parecer consubstanciado do comitê de ética e pesquisa (CEP)	63

1. INTRODUÇÃO

A carnosina (β -alanyl-L-Histidina) é um dipeptídeo citoplasmático encontrado em diversos tecidos, tais como o cardíaco, cerebral e musculo esquelético (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Esse dipeptídeo é sintetizado *in situ* a partir dos aminoácidos L-histidina e beta-alanina (BA) e pode ser obtido por meio da dieta através de diversos tipos de carnes (bovina, suína, frango e peixes) (ABE, 2000). No entanto, ela e outros dipeptídeos que contém histidina (DCH), que também são determinantes para o conteúdo de carnosina muscular não são absorvidos em sua forma íntegra para a corrente sanguínea, já que a enzima carnosinase presente no lúmen intestinal e no plasma sanguíneo rapidamente hidrolisa estes dipeptídeos (HARRIS et al., 2012).

Diversas ações fisiológicas têm sido associadas à carnosina no músculo esquelético (BOLDYREV; KURELLA; STVOLINSKY, 1994). Porém, sua função mais aceita é o tamponamento do pH, devido à sua constante de dissociação de ácidos estar dentro da faixa de variação do pH intramuscular (ABE, 2000). Esse papel é particularmente importante em atletas engajados em atividades e esforços de alta intensidade e curta duração, já que tais esforços conhecidamente levam a um acúmulo de íons hidrogênio (H^+) no interior da célula muscular, gerando uma queda do pH muscular, a qual pode levar à inibição da ressíntese de fosforilcreatina (SAHLIN; HARRIS; HULTMAN, 1975) e à inibição de enzimas importantes da via glicolítica (J. R. SUTTON, 1981), limitando o processo de produção de energia para a contração muscular.

Embora sejam determinantes para o conteúdo de carnosina muscular, o fornecimento dietético de DCH não é uma estratégia viável para aumentar as concentrações musculares de carnosina, tendo em vista a presença de enzimas que rapidamente os hidrolisam (HARRIS et al., 2012). Além disso, o aumento da concentração de carnosina muscular causado por meio da suplementação de BA é amplamente conhecido e ocorre em todos os indivíduos (REZENDE et al., 2020). No entanto, são observadas grandes variações no aumento do conteúdo total e, o tempo para se atingir esse conteúdo de carnosina muscular entre indivíduos suplementados com 6,4g/dia de BA durante 24 semanas (SAUNDERS et al., 2017a). Diversos genes e proteínas regulam os processos que afetam o conteúdo de carnosina muscular. Dentre

os quais, destacam-se: aquelas proteínas envolvidas na captação de BA e de carnosina pelo músculo esquelético; na síntese e hidrólise local de carnosina; além da oxidação de BA via transaminação. Os genes envolvidos no controle dessas funções são: *CARNS* (síntese de carnosina), *TAUT*, *PAT1*, *ATB0,+* (transporte de BA), *CNDP1*, *CNDP2* (hidrólise de carnosina), *ABAT* (transaminação de carnosina). Atualmente, não se sabe a importância de cada um desses transportadores e proteínas para a síntese de carnosina muscular após a suplementação aguda e crônica de BA e se sua expressão ou conteúdo pode alterar. Isso pode ser relevante, uma vez que deve fornecer informações adicionais sobre a importância de certos passos envolvidos no metabolismo da carnosina e, poderia contribuir no entendimento da grande variação interindividual relacionada aos aumentos do conteúdo de carnosina muscular através da suplementação de BA (SAUNDERS et al., 2017).

Portanto, há uma necessidade de avaliar a resposta aguda de uma dose típica de BA em relação a expressão gênica e conteúdo proteico de enzimas e transportadores relacionados ao metabolismo da carnosina, para quantificar sua importância relativa a possíveis mudanças e determinar como isso muda com a suplementação crônica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carnosina e dipeptídeos que contém histidina

A carnosina é um dipeptídeo citoplasmático formado através dos aminoácidos beta-alanina e L-Histidina. A mesma desempenha diferentes funções, podendo atuar como um antioxidante (BOLDYREV, 1993), antiglicante (HIPKISS; MICHAELIS; SYRRIS, 1995), regulador da sensibilidade de cálcio (DUTKA et al., 2015) e, também como um ótimo tampão intracelular para populações atléticas devido à sua constante de dissociação de ácidos (pKa) de 6,83 (próximo da variação fisiológica do pH muscular: 7,1 e 6,5) em seu anel imidazol, derivado do aminoácido L-histidina que compõem a sua estrutura (LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, 2014; SAUNDERS et al., 2017b). Além de seu anel aromático, a L-histidina se destaca por ser considerado um aminoácido essencial, diferentemente da beta-alanina que não é essencial e proteinogênico (LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, 2014). Sendo assim, é possível obter esse aminoácido através da dieta, diferentemente da BA. Ademais, outros dipeptídeos são compostos pela L-histidina, como é o caso da anserina e balenina (ofidina). Esses dipeptídeos que contém histidina se assemelham em relação a carnosina

em termos de estrutura e função, tendo em vista que a estrutura da anserina e da balenina são compostas por carnosina e um grupo metil (BOLDYREV; KURELLA; STVOLINSKY, 1994). Enquanto no organismo humano encontramos apenas carnosina em diferentes tecidos, a carnosina, anserina e balenina são encontradas no organismo de outros animais (mamíferos terrestres e marinhos, peixes e aves) (ABE, 2000).

2.2 Distribuição nos tecidos

A carnosina pode ser encontrada em diferentes tecidos, entre os quais destacam-se o coração, cérebro e, principalmente o músculo esquelético, local onde há abundância desse dipeptídeo (BIFFO; GRILLO; MARGOLIS, 1990; HARRIS et al., 2006; O'DOWD; ROBINS; MILLER, 1988). No cérebro a carnosina é encontrada predominantemente no formato de homo-carnosina (L-histidina ligado a um GABA) e N-acetilcarnosina (produto da descarboxilação da carnosina), que são análogos da carnosina (não considerado um dipeptídeo que contém histidina) (BOLDYREV et al., 2004). No coração a carnosina é encontrada em concentrações de 2 a 10 μ M (O'DOWD; ROBINS; MILLER, 1988), já no músculo esquelético esse dipeptídeo está presente em altas concentrações, aproximadamente 20 mmol/kg de músculo seco em humanos (HARRIS et al., 2006).

2.3 Metabolismo da carnosina

A ingestão de BA parece ser de grande importância para os aumentos de carnosina no músculo esquelético, já que esse aminoácido possui uma alta afinidade pela enzima Carnosina Sintase (CARNS). Essa enzima presente no citoplasma é responsável pela síntese da carnosina nos diferentes tecidos a partir dos aminoácidos BA e L-Histidina (DROZAK et al., 2010). Devido a sua constante de equilíbrio (K_m) de 1,0 a 2,3 Mm (NG; MARSHALL, 1978) e por estar presente em baixas concentrações no músculo esquelético (~0,2 mmol/kg). Essa enzima apresenta uma alta afinidade pela BA, o que vai de encontro com as concentrações de L-histidina, que são superiores no músculo e no plasma sanguíneo (~0,4 mmol/kg), mas apresenta baixa afinidade pela Carnosina Sintase (K_m de 16 μ M). (HORINISHI; GRILLO; MARGOLIS, 1978; VARANOSKE et al., 2017, 2019) Essa alta afinidade da carnosina sintase pela BA vai ao encontro de dados publicados por Harris et al. (2006) que demonstram que a BA é o fator limitante da síntese de carnosina muscular.

No entanto, a disponibilidade de BA em seres humanos é baixa, sendo produzida em pequenas concentrações no fígado em resposta a degradação da uracila (FRITZSON, 1957). Isso torna necessário o consumo de fontes exógenas desse aminoácido através de fontes alimentares que contenham DCH, como as carnes ou mesmo pela suplementação de BA propriamente dita quando o objetivo é aumentar as concentrações de carnosina dos diferentes tecidos (HARRIS et al., 2006).

Ao chegar no intestino delgado, a carnosina e seus análogos que contém histidina sofrem hidrólise por carnosinases teciduais (CN2) presentes no lúmen intestinal, essas enzimas apresentam afinidade para inúmeros dipeptídeos, não somente para carnosina e seus análogos (TEUFEL et al., 2003). Após a passagem para a corrente sanguínea os dipeptídeos remanescentes (aqueles que não sofreram hidrólise pelas CN2) são hidrolisados pelas carnosinases séricas (CN1) que apresentam afinidade apenas para DCH. Além disso, as CN1 apresentam alta atividade enzimática devido a sua alta eficiência catalítica, o que justifica as concentrações extremamente baixas de carnosina no sangue. Alguns trabalhos já demonstraram que a atividade das CN1 pode variar entre os indivíduos devido a fatores genéticos (polimorfismo do gene *CNDPI*), idade e sexo (EVERAERT et al., 2011; RIEDL et al., 2007). Diferentemente da CN1, a CN2 pode ser expressa no intestino e no músculo esquelético e pode apresentar atividade enzimática distinta a depender do tecido em que está localizada (TEUFEL et al., 2003). No músculo esquelético a atividade da CN2 é lenta, o que justifica uma maior estabilização dos níveis de carnosina muscular em relação a um período de washout dessa substância (BAGUET et al., 2009). No intestino delgado a CN2 apresenta maior expressão e maior atividade em relação ao músculo esquelético, onde hidrolisa a carnosina e seus análogos que contém histidina (anserina e balenina) em seus aminoácidos constituintes (ASATOOR et al., 1970; HAMA et al., 1976).

A BA ingerida ou gerada a partir da hidrólise dos DCH, podem ser captadas no intestino pelo PEPT1 ou ATB0+, uma proteína transportadora dependente de sódio e cloreto, que realiza o transporte de diferentes aminoácidos no intestino (MUNCK AND SCHULTZ, 1969), entretanto com baixa afinidade para BA em comparação a α -aminoácidos. Já o PEPT1, uma proteína de transporte de peptídeos que demanda gasto de ATP durante o processo de transporte (transporte ativo). É responsável pelo transporte da carnosina, DCH e outros peptídeos do intestino para a corrente sanguínea (EVERAERT et al., 2012; YAMASHITA et al., 1997). Esse transportador também pode

ser encontrado nos rins, atuando na reabsorção tubular de peptídeos). Assim como sua isoforma PEPT2, que além de apresentar as mesmas funções do PEPT1, ainda realiza o transporte de carnosina para o cérebro (ADIBI, 1997).

A BA circulante, transportada para a corrente sanguínea via suplementação ou resultado da hidrólise dos DCH, é captada por diferentes tecidos e sua captação pode ser mediada por diferentes transportadores (EVERAERT et al., 2012). Entre os transportadores que mais se destacam no transporte de BA, pode-se citar o TAUT, um transportador dependente de sódio e cloreto e o PAT1. Isso porque, no músculo esquelético o TAUT apresenta alta especificidade para taurina e BA. Esse transportador apresenta um Km de 40 μ M nos miócitos (BAKARDJIEV; BAUER, 1994), o que é relativamente alto em comparação ao conteúdo de BA normalmente encontrado no sangue (HARRIS et al., 2006). No estudo de Saunders (2017a) foi demonstrado que 24 semanas de suplementação de BA através de doses de 6,4g/dia gerou uma redução da expressão do gene *TAUT*. O que sugere um mecanismo regulatório para manter a homeostase intramuscular de carnosina, limitando assim, a captação de BA pelo músculo esquelético. Já o PAT1, apresenta alta especificidade para a captação de BA e não depende de sódio e cloreto para realizar o seu transporte para o músculo esquelético, entretanto, esse transportador contribui para os aumentos de carnosina muscular de forma menos significativa (EVERAERT et al., 2013; FEI et al., 1994).

A medida que ocorre um aumento excessivo da disponibilidade de BA no músculo esquelético, ocorre também uma maior transaminação de BA devido a presença da enzima ABAT, que catalisa a BA em malonato semi-aldeído (EVERAERT et al., 2013). Everaert et al. (2013) sugeriu que a expressão muscular de ABAT evoluiu em omnívoros e carnívoros, onde a BA representa uma porção significativa dos aminoácidos da dieta e, pode contribuir para o fornecimento de energia em condições de aumento da disponibilidade de aminoácidos. Afinal, sabe-se que a contribuição na produção de ATP provinda da oxidação de aminoácidos é relativamente baixa, entretanto, existente em situações de disponibilidade aumentada.

Um trabalho anterior avaliou a expressão de genes envolvidos no metabolismo da carnosina (*CARNS*, *TAUT*, *PAT1*, *ABAT*, *CNDP2*) antes e após um programa de treinamento de HIIT de 12 semanas, mas não demonstrou diferença significativa na expressão desses genes (DE SALLES PAINELLI et al., 2018). Entretanto, essa falta de mudança na expressão dos genes envolvidos no metabolismo da carnosina, pode ser

devido à ausência de suplementação com BA, que é sabidamente o fator limitante da síntese de carnosina muscular (HARRIS et al., 2006), podendo desempenhar um papel relevante na alteração da expressão de gênica e conteúdo de proteico de enzimas e transportadores. Além disso, os indivíduos recrutados para participar desse estudo eram vegetarianos, população que tende a ingerir menores quantidades de BA pela dieta (DE SALLES PAINELLI et al., 2018). O que pode impactar no conteúdo de carnosina muscular e, conseqüentemente na expressão gênica e conteúdo de proteico de enzimas e transportadores.

2.4 Fatores que influenciam no conteúdo de carnosina muscular

Seres humanos onívoros apresentam aproximadamente 20 mmol/kg de carnosina em musculo seco (HARRIS et al., 2006) e alguns fatores podem influenciar nesse conteúdo de carnosina muscular. Entre alguns deles, é observado que a distribuição de carnosina no músculo esquelético humano é diferente no que se diz respeito às fibras musculares, sendo o seu conteúdo predominante em fibras musculares do tipo II em relação àquelas do tipo I. O conteúdo de carnosina em fibras musculares do tipo I do músculo vasto lateral humano é de $10,5 \pm 7,6$ mmol/kg de músculo seco enquanto as fibras musculares do tipo II apresentam $23,2 \pm 17,8$ mmol/kg de músculo seco (HARRIS; DUNNETT; GREENHAFF, 2010). Essa diferença na distribuição do conteúdo de carnosina por tipo de fibra faz sentido quando pensamos na importância da função tamponante intramuscular que a carnosina desempenha sobre o metabolismo glicolítico, quando a fuga e a caça eram um fator decisivo de sobrevivência durante a evolução do ser humano.

Para saber se o treinamento físico de alguma forma poderia contribuir para os aumentos de carnosina muscular, um estudo conduzido em 2018 avaliou os efeitos de 12 semanas de treinamento intermitente sobre o conteúdo de carnosina muscular. Nesse estudo foram incluídos apenas indivíduos vegetarianos e ovolactovegetarianos. Após o período do estudo foi observado um aumento de 36% do conteúdo de carnosina muscular dos indivíduos que foram treinados, enquanto aqueles que não foram treinados não apresentaram alteração significativa (DE SALLES PAINELLI et al., 2018). Vale ressaltar que como os indivíduos eram vegetarianos, não houve consumo de carne, que sabidamente poderia influenciar nas concentrações de carnosina muscular.

Além das variações da concentração de carnosina muscular decorrente do tipo de fibra muscular e do treinamento físico, o gênero é um outro fator determinante do conteúdo intramuscular desse dipeptídeo. Indivíduos do sexo masculino e feminino foram submetidos a biópsia do músculo vasto lateral e foi observado que as mulheres apresentavam aproximadamente 22% a 25% menos carnosina muscular em relação aos indivíduos do sexo masculino, elas apresentavam $17,5 \pm 4,8$ mmol/kg de músculo seco e eles $21,3 \pm 4,2$ mmol/kg de músculo seco. O que poderia ser explicado pela quantidade de massa muscular e, principalmente a quantidade de testosterona que ambos os sexos possuem (VINGREN et al., 2010).

A dieta é um outro importante fator a se considerar, afinal estudos que avaliaram indivíduos que haviam adotado um estilo de vida vegetariano a anos (≥ 1 ano e ≥ 8 anos) relataram uma redução de aproximadamente 17% a 26% e 35% menos carnosina muscular em comparação a indivíduos onívoros (DE SALLES PAINELLI et al., 2018; EVERAERT et al., 2011). Isso mostra que extremos podem influenciar no conteúdo de carnosina muscular, no entanto uma alimentação omnívora pode ser que não leve a grandes variações do conteúdo de carnosina muscular.

2.5 Fontes alimentares de BA

A BA está presente em diferentes tipos de alimento, podendo ser encontrada no formato de dipeptídeos que contém histidina ou como o β -aminoácido propriamente dito. Entre algumas das fontes alimentares com maior conteúdo de BA estão as carnes, afinal existem altas concentrações de carnosina, anserina e balenina dentro da célula muscular de mamíferos, aves e peixes. Sabe-se que 100 g de peito de frango possui em média 380 mg de BA (ABE, 2000; JONES; SMITH; HARRIS, 2011).

Embora os alimentos de origem animal sejam aqueles que apresentam maior conteúdo de BA no formato de dipeptídeos que contém histidina. Alguns vegetais também podem apresentar baixas concentrações desse aminoácido. Sendo assim, é possível se obter BA através de alimentos de origem vegetal, como é o caso das nozes, alguns feijões, ervilhas, grãos de café, amendoim e pinhão (OH et al., 1995). Entretanto, esses alimentos podem apresentar uma concentração relativamente baixa desse aminoácido, algo irrelevante quando o objetivo é aumentar as concentrações de carnosina muscular (PARTHASARATHY; SAVKA; HUDSON, 2019). Assim, a suplementação com BA parece ser o método mais efetivo para aumentar o conteúdo de carnosina muscular.

2.6 Suplementação de beta-alanina

Como foi citado anteriormente, os aumentos de carnosina muscular dependem da disponibilidade da BA e carnosina disponível no organismo. No entanto, a suplementação de carnosina ou de seus análogos não é vantajosa, já que esses são imediatamente hidrolisados em BA e L-histidina pelas carnosinases presentes no lúmen intestinal e na corrente sanguínea. Isso foi demonstrado através de um estudo pioneiro realizado por Harris et al (2006), onde os participantes ingeriram uma dose aguda de BA de 40 mg/kg de massa corporal e 40 mg/kg de anserina e carnosina no formato de caldo de peito de frango com o objetivo de avaliar a farmacocinética da ingestão de BA, foi observado através da coleta de amostras de sangue que houve um aumento da quantidade de BA na corrente sanguínea através da suplementação da substância propriamente dita. No entanto, não foi observado quantidades significativas desses dipeptídeos que contém histidina na corrente sanguínea, o que corrobora o que foi relatado anteriormente, onde foi dito que existe uma grande quantidade de carnosinases presentes no plasma e essas hidrolisam esses dipeptídeos que contém histidina, não permitindo que se acumulem no sangue (PERRY; HANSEN; LOVE, 1968).

Na segunda parte desse mesmo estudo os voluntários foram separados em grupos distintos e receberam diferentes protocolos de suplementação durante 28 dias. Enquanto o grupo que suplementou placebo teve um aumento de 9,9% do conteúdo de carnosina muscular, o grupo que suplementou BA em 3,2 g/dia durante 4 semanas teve um aumento de 42,1% de carnosina muscular ($P < 0.05$). Mas o que mais chama a atenção nesse estudo é a suplementação do terceiro grupo com uma dose de carnosina

(total de 364g de carnosina, equivalente a 162 g de BA) e do quarto grupo com uma dose similar em BA (162 g), o que levou ambos a obterem aumentos similares de carnosina muscular 64,2% e 65,8%. Demonstrando mais uma vez que a BA é o fator limitante da síntese de carnosina. Sendo assim, a suplementação de beta-alanina é uma estratégia bem aceita para aumentar o conteúdo de carnosina muscular, enquanto a carnosina por si, é hidrolisada ao chegar no plasma.

2.7 Variações nos aumentos do conteúdo de carnosina muscular com suplementação de BA.

Alguns indivíduos apresentam grande variabilidade em termos de aumento das concentrações de carnosina muscular a partir da suplementação de BA (SAUNDERS et al., 2017a). Segundo Stautemas. (2019), isso poderia explicado parcialmente (30%) a partir de um protocolo de suplementação com dose fixa ou dose relativa em indivíduos com diferentes características antropométricas. No entanto, somente a resposta farmacocinética foi avaliada, sendo necessário avaliar o conteúdo de carnosina muscular. No estudo conduzido por Saunders et al. (2017a) os voluntários foram suplementados ao longo de 24 semanas com 6,4 g/dia de BA, e foi relatado que em um mesmo indivíduo, as concentrações pré e pós suplementação registradas variaram de 8,76 a 41,32 mmol/kg e o conteúdo máximo intramuscular atingido variou de 31,79 a 63,92 mmol/kg entre os indivíduos avaliados. Tendo em vista essa discrepância da variação do conteúdo máximo intramuscular de carnosina, acredita-se que essa inconstância é determinada por outros fatores além da disponibilidade de BA.

Embora também acredite-se que essa resposta variável em relação aos aumentos de carnosina muscular após a suplementação de BA possam estar relacionadas aos determinantes do conteúdo de carnosina muscular como o tipo de fibra muscular, gênero do indivíduo e dieta, uma meta-análise recente mostrou que o músculo esquelético humano tem grande capacidade de acúmulo de carnosina muscular e que os valores basais não parecem influenciar a resposta subsequente à suplementação e a resposta não linear à suplementação. Foi observado também que a carnosina muscular é relativamente estável na ausência de intervenção, sendo que efetivamente todos (99,3% [95% CrI: 96,2–100]) os participantes respondem à suplementação de BA (REZENDE et al., 2020). Sendo assim, outros fatores desconhecidos podem contribuir para a grande

variabilidade interindividual dos aumentos de carnosina muscular em resposta a suplementação de BA.

2.8 Dose e Duração

No estudo clássico publicado por Harris et al. (2006), foi observado que quando os indivíduos consumiam doses totais de 162 g de BA durante 28 dias, ocorriam aumentos de até 64,2% da concentração da carnosina muscular (HARRIS et al., 2006). Entretanto, um outro trabalho conduzido por Saunders et al. (2017a) mostrou que a maioria dos indivíduos que foram suplementados durante 24 semanas com 6,4 g/dia apresentavam um ponto de saturação somente a partir da 20ª semana de suplementação, no entanto outros voluntários continuavam a apresentar aumentos do conteúdo de carnosina muscular mesmo após a 20ª semana. Esse mesmo estudo ainda mostrou que já na quarta semana de suplementação com BA, parece haver uma redução da expressão gênica do *TAUT*, que vai ao encontro da fase (0 a 4 semanas) onde ocorre o aumento de maior magnitude da carnosina muscular que é demonstrado ao longo das 24 semanas de suplementação (SAUNDERS et al., 2017a). Isso fornece evidências de que quantidades relativamente altas de BA são necessárias para aumentar a carnosina muscular, assim como um longo período de suplementação, o que justifica a maior parte dos estudos utilizarem protocolos de suplementação de duração similar com doses fixas de 3,2 a 6,4 g/dia (SAUNDERS et al., 2017b, 2017a).

Um trabalho publicado por Stellingwerff et al, (2012) avaliou o efeito de dois protocolos de suplementação diferentes e, verificou que no primeiro protocolo de suplementação onde os indivíduos foram suplementados durante 4 semanas com 3,2 g/dia de BA e mais 4 semanas de 1,6g/dia, houve um aumento de 35% do conteúdo de carnosina muscular quando comparado com um grupo que suplementou durante 8 semanas 1,6 g/dia de BA. Na quarta semana, quando os dois grupos passaram a suplementar a mesma quantidade de BA, o conteúdo de carnosina muscular continuava aumentando, mas desta vez por estarem suplementando a mesma quantidade de BA (1,6g/dia) passam a ter aumentos similares do conteúdo de carnosina muscular. Após 8 semanas de suplementação o grupo que passou pelo primeiro protocolo teve um aumento de 44% de carnosina muscular enquanto aquele que passou pelo segundo protocolo teve um aumento de 35%. O que fornece evidências de que quanto maior a quantidade de BA acumulada ao longo do período de suplementação, maiores são os

aumentos de carnosina muscular. Além disso, outro estudo realizado por esse mesmo grupo, publicado no ano de 2012, testou a suplementação de BA em jovens fisicamente ativos e mostrou que doses superiores acumuladas, puderam aumentar o conteúdo de carnosina muscular após a suplementação em até 88%. Isso corrobora a ideia de que quanto mais BA é ingerida maior é o aumento de carnosina muscular (STELLINGWERFF et al., 2012).

2.9 Dose e Efeito colateral

O único efeito colateral relatado pela suplementação com BA é a parestesia, uma sensação de formigamento desconfortável na pele que pode durar até uma hora que pode ocorrer quando um indivíduo ingere de maneira aguda doses acima de 10 mg /kg (HARRIS et al., 2006). No estudo conduzido por Harris et al (2006) os primeiros voluntários que foram submetidos a suplementação de 40 mg/kg de BA isolada e apresentaram fortes desconfortos na pele relacionados a parestesia, a partir disso, doses menores foram testadas. Foi observado que a dosagem de 10 mg/kg de BA era a dosagem limite para que os indivíduos que ingerissem o suplemento não apresentassem esse efeito adverso. Sendo assim, novos protocolos que pudessem otimizar os aumentos do conteúdo de carnosina muscular e reduzissem a parestesia gerada pela suplementação de BA eram de grande interesse.

Atualmente uma das recomendações de dosagem para a suplementação BA é um protocolo de dose fixa de cerca de 800 a 1600 mg, três a quatro vezes ao dia, dessa forma é possível que ocorra um aumento dos níveis de carnosina muscular e que o indivíduo submetido a suplementação tenha uma redução da incidência e gravidade da parestesia (HARRIS et al., 2006). Contudo, embora seja menos frequente, ainda é observado a utilização de dosagens relativas ao peso: 65 mg/kg, 80 mg/kg em alguns estudos (DUCKER; DAWSON; WALLMAN, 2013; HOWE et al., 2013).

2.10 Variabilidade de respostas farmacocinéticas com a suplementação de BA

A maioria dos estudos utiliza uma dose absoluta padronizada de suplementação de BA (3,2 a 6,4 g/dia) para aumentar a carnosina muscular, no entanto ainda há uma resposta interindividual altamente variável em relação a carnosina muscular. Por não existir um consenso sobre qual o melhor protocolo de suplementação a ser utilizado, um grupo conduziu um estudo onde suplementaram BA através de protocolos de dose fixa

de 1400 mg e dose relativa ao peso (10 mg/kg) em indivíduos de diferentes características antropométricas (46 a 105 kg) e sexos diferentes. A área incremental sob a curva (iAUC) de uma dose fixa (1400 mg) foi negativamente correlacionada ao peso corporal, indicando que pessoas mais pesadas tiveram uma resposta farmacocinética inferior em relação a pessoas leves. Contudo, após a suplementação de dose relativa ao peso houve uma correlação positiva entre a resposta farmacocinética e o peso corporal. Mostrando que cerca de 30% da resposta fisiológica poderia ser decorrente da variação do peso do indivíduo suplementado, esses achados poderiam estar correlacionados ao aumento da gravidade da sensação de parestesia por indivíduos mais leves ao utilizar protocolos de dose fixa, e uma menor incorporação de BA no músculo por indivíduos mais pesados (STAUTEMAS et al., 2018). Uma limitação desse estudo é que eles não mediram a carnosina muscular ou alterações nas enzimas relacionadas à carnosina. Este tipo de dado forneceria informações importantes sobre o metabolismo da carnosina muscular com a suplementação de beta-alanina.

Esse mesmo grupo conduziu recentemente um estudo onde além de uma dose fixa de 1,6g e uma dose relativa ao peso de 20 mg / kg, também foi adicionado uma dose fragmentada de 800 mg + 10 mg /kg de peso corporal. Os indivíduos de diferentes características antropométricas (48 kg a 139 kg) foram suplementados, e foi observado que a iAUC foi novamente negativamente correlacionada com o peso corporal ao ingerir uma dose fixa, enquanto, após a dosagem relativa ao peso, foi observada uma correlação positiva com o peso corporal. Em contraponto a isso, não houve correlação com o peso corporal quando os indivíduos foram suplementados com a dosagem fragmentada. O peso corporal foi capaz de explicar 47% e 28% da variação no iAUC seguindo a estratégia de dose fixa e relativa ao peso, o que confirma a existência de uma variabilidade gerada pela suplementação de BA em indivíduos com diferentes características antropométricas (STAUTEMAS et al., 2019). No entanto, apesar disso, eles não mediram os aumentos do conteúdo de carnosina muscular e o conteúdo das proteínas envolvidas no metabolismo da carnosina (por exemplo, TAUT e PAT1), o que poderia nos fornecer informações importantes sobre um possível caminho para a individualização da dose a ser suplementada. Além disso, o trabalho mais longo com suplementação de beta-alanina utilizou um protocolo de dose fixa de 6,4g/dia durante 24 semanas e demonstrou que há uma grande variabilidade de respostas em relação aos

aumentos do conteúdo de carnosina, e a expressão dos genes envolvidos no metabolismo da carnosina. (SAUNDERS et al., 2017a).

2.11 Por que existe tanta variação?

Entre algumas das possibilidades para essa variação, um estudo sugeriu um mecanismo recém descoberto, a enzima Alanina glioxilato transaminase 2 (AGXT2), que tem como um de seus substratos a BA. Foi observado que em ratos com uma super expressão dessa enzima houve uma redução dos níveis de dipeptídeos que contém histidina circulantes e do músculo. O que poderia sugerir que um aumento da expressão do gene que codifica essa enzima poderia levar a uma redução do conteúdo de carnosina muscular. No entanto, em humanos os resultados atuais sugerem que os polimorfismos desse gene não contribuem de forma relevante para a resposta farmacocinética altamente variável (STAUTEMAS et al., 2020).

Além das variações interindividuais das concentrações da carnosina muscular relatados após 24 semanas de suplementação de BA, também foi observado que a magnitude do aumento desse dipeptídeo intramuscular era maior nas primeiras 4 semanas de suplementação e, então reduzia progressivamente. O que poderia ser explicado por uma redução da expressão do gene que codifica o *TAUT*, que foi relatado nesse estudo (SAUNDERS et al., 2017a).

O trabalho de Saunders et al (2017a) sugere que *TAUT* pode desempenhar um papel importante no metabolismo da carnosina muscular, tendo em vista a diminuição da expressão deste gene ao longo do período de suplementação com BA. No entanto, este estudo não determinou a associação entre a mudança na expressão de *TAUT* e a mudança no conteúdo de carnosina muscular. Ademais, este estudo também não mediu o conteúdo de proteínas de transporte no músculo esquelético e se isso está associado a alterações no conteúdo de carnosina muscular com a suplementação de BA. Afinal, pode ser que uma maior quantidade de proteínas de transporte esteja relacionada a uma maior quantidade de carnosina muscular através da suplementação de BA. Esse estudo também não mediu o conteúdo da Carnosina sintase, que em maiores quantidades poderia estar relacionada com um aumento do conteúdo de carnosina muscular ao se suplementar BA. Sendo assim, é de grande interesse a análise da expressão dos genes e conteúdo de proteínas relacionadas ao metabolismo da carnosina.

2.12 Direções futuras: o que ainda precisamos saber?

Embora o estudo de Saunders et al. (2017a) tenha nos mostrado que o *TAUT* pode apresentar um importante papel no metabolismo da carnosina muscular, não é

possível afirmar a associação entre a mudança do conteúdo de carnosina muscular e a redução da sua expressão gênica. Afinal, pode ser que o aumento ou a redução das concentrações de BA plasmática possa estar associado ao número de proteínas transportadoras.

Isto irá fornecer informações importantes e esclarecimentos sobre o motivo pelo qual existe uma diminuição da magnitude do aumento da carnosina muscular com suplementação de BA ao longo do tempo. Além disso, os dois trabalhos de Stautemas et al. (2017, 2018) não relacionaram as respostas agudas de BA a mudanças crônicas na carnosina muscular e quanto ela poderia prever ou explicar a resposta crônica da carnosina muscular. No entanto, como limitação, eles não mediram os aumentos do conteúdo de carnosina muscular e sua relação com a farmacocinética. Também não há informações sobre o conteúdo das proteínas e expressão dos genes relacionados ao metabolismo da carnosina. O que poderia nos fornecer informações importantes sobre essa relação e a necessidade de individualização da dose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as respostas agudas de indivíduos recreativamente ativos à suplementação de BA através de uma única dose de 1600 mg antes e após um período de suplementação crônica de 4 semanas à 6400 mg/dia, no que tange a expressão de genes e o conteúdo de proteínas relacionadas ao metabolismo da carnosina no músculo esquelético.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as respostas relacionadas as mudanças na expressão dos genes *CARNS*, *TAUT*, *ABAT*, *CNDP2*, *PATI*, envolvidos no metabolismo de carnosina após ingestão de uma dose única de 1600mg de BA após um período de suplementação crônica (6400mg/dia durante 4 semanas) de BA.

- Avaliar as respostas relacionadas as mudanças no conteúdo de transportadores e proteínas (*CARNS*, *TAUT*, *ABAT*, *CNDP2*), envolvidos no metabolismo de carnosina após ingestão de uma dose única de 1600mg de BA após um período de suplementação crônica (6400mg/dia durante 4 semanas) de BA.

4. HIPOTESE

Esperamos observar diferenças na expressão dos genes e do conteúdo de proteínas e transportadores envolvidos no metabolismo da carnosina, em relação a uma dose aguda antes e após um período de suplementação crônica.

5. MÉTODOS

5.1 Participantes

Quinze homens saudáveis, e fisicamente ativos (participavam de exercícios físicos semanalmente, porém, não eram envolvidos em um programa de treinamento estruturado) com idade entre 18 e 45 anos foram recrutados através de redes sociais (Instagram, Facebook, Whatsapp) a comparecer ao laboratório em duas ocasiões separadas. Como critérios de inclusão, os participantes não podiam ter suplementado nos últimos 3 meses, creatina, beta-alanina e cafeína. Não foram incluídos no estudo participantes: 1) tabagistas, 2) portadores de alguma doença crônica, 3) com uso atual ou pregresso de esteroides anabolizantes. Dos quinze indivíduos que entraram no estudo, um realizou a primeira sessão, mas não a segunda sessão devido ao fechamento do laboratório em resposta a pandemia causada pela COVID-19. Quatorze indivíduos completaram todas as sessões experimentais (Tabela 1). Os voluntários foram informados sobre os desconfortos e riscos associados à participação e, a partir daí, deram o consentimento por escrito. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 71621317.7.0000.5391) e todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo – 15. 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido) antes da participação.

Tabela 1. Dados antropométricos dos participantes (N=14)

Dados antropométricos	Média ± DP
Idade (anos)	24 ± 6
Altura (m)	1,77 ± 0,05
Massa corporal (kg)	76,1 ± 6,0
Índice de Massa Corporal (kg/m ²)	23,90 ± 1,69

5.2 Desenho experimental

Os participantes compareceram ao laboratório em duas ocasiões, separadas por 4 semanas. Os indivíduos participaram das sessões sempre no mesmo período do dia, com início pelo menos 4 horas após ingestão da última refeição e após um recordatório alimentar de 48 horas, que foi aplicado pelos pesquisadores treinados no dia das sessões. Os participantes foram instruídos a absterem-se do consumo de álcool, carnes e da prática de exercícios extenuantes ou não usuais por, pelo menos, 72 horas antes de cada avaliação. Foi verificado verbalmente antes de cada sessão se as orientações foram atendidas. Os participantes não podiam ter utilizado creatina, BA ou drogas que visem aumentar o desempenho esportivo por, pelo menos, três meses antes do estudo. Todas as visitas foram realizadas no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição - USP. Ao chegarem ao laboratório os participantes foram submetidos a uma biópsia muscular e uma coleta de sangue pré-suplementação. Os participantes ingeriram dois comprimidos de liberação lenta contendo 800 mg de BA (CarnoSyn®, NAI, EUA) cada (total 1,6 g) e, após a ingestão do suplemento foram coletadas amostras de sangue a cada 15 minutos na primeira hora e a cada 30 minutos após a primeira hora, durante 5 horas. Outras duas biópsias foram realizadas 60 minutos e 240 minutos após a ingestão do suplemento (Figura 1). Após as coletas as amostras de tecido muscular foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente armazenadas em temperatura -80°C. Após a primeira sessão os participantes passaram a ingerir 6400 mg/dia de BA durante quatro semanas. Dois tabletes de 800 mg cada foram ingeridos quatro vezes por dia com um intervalo de 3 a 4 horas entre as doses. Exatamente quatro semanas depois da primeira sessão os participantes retornaram ao laboratório e foram submetidos a segunda sessão, onde era realizado novamente o protocolo da primeira sessão.

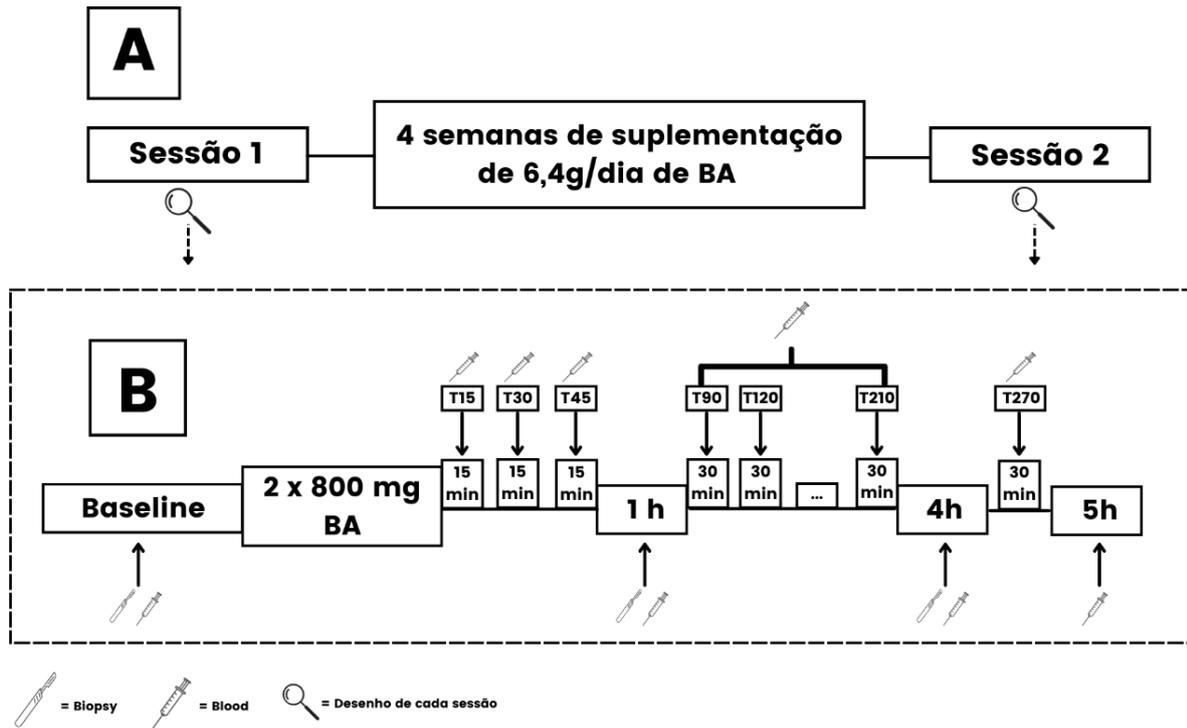


Figure 1. Desenho do estudo (Painel A: Desenho ao longo de 4 semanas. Painel B: Protocolo executado na sessão 1 e 2).

5.3 Biópsia muscular por agulha de sucção

Todas as biópsias foram realizadas por um médico treinado (Dr. Luiz Riani). Foi extraída uma pequena amostra (aproximadamente 100 mg) da porção lateral e mais volumosa do vasto lateral, cuja quantidade é suficiente para todas as análises propostas. O local aproximado da extração foi entre o ponto médio da patela e do trocânter maior. O procedimento de biópsia muscular foi realizado a partir da utilização de uma agulha especialmente desenvolvida para extrair pequenas amostras de músculo (Bergstrom, 1975).

Para a realização do procedimento, o voluntário precisou se manter deitado em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. O médico responsável fez a assepsia do local e, em seguida, administrou 3 mL de xilocaína a 2% para anestesiá-lo. A aplicação do anestésico foi feita com agulhas hipodérmicas descartáveis e estéreis sob o tecido cutâneo. Após assepsia e anestesia, foi feita a incisão para a entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. Para tanto, o médico responsável utilizou uma lâmina de bisturi número 11, esterilizada, individual e descartável para realizar a incisão de aproximadamente 0,5 centímetros de extensão. A incisão cortou a pele e a fáscia muscular. O indivíduo não sentiu qualquer dor durante a realização deste procedimento, uma vez que não existem terminações nervosas e/ou sensíveis a dor na fáscia muscular ou mesmo no próprio músculo. A agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, foi então inserida pelo médico responsável através do pequeno orifício obtido com a incisão. Após uma sucção, aplicada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 120 mL, um pequeno pedaço de músculo foi deslocado para o interior da agulha e cortado pela sua lâmina interna. Usualmente, os voluntários relatam ausência ou uma quantidade mínima de desconforto.

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

5.4 Avaliação de efeitos colaterais

A avaliação dos efeitos colaterais foi baseada em uma escala de intensidade (Anexo – 15.1 Escala de intensidade dos efeitos colaterais). Os indivíduos eram orientados a relatar a intensidade e o local dos sintomas em uma tabela (Anexo – 15.2 Tabela de efeitos colaterais). A avaliação dos efeitos colaterais se baseou em uma escala de 0 a 4, sendo 0 relacionado a ausência de efeitos colaterais e 5 sintomas insuportáveis, os indivíduos também eram orientados a relatar em qual parte do corpo ocorriam os efeitos colaterais, assim como também era pedido para descrever se os efeitos eram similares a Pinos e agulhas; Formigamento; Cócegas e coceira; Arrepio; Hipersensibilidade tátil e/ou irritação ou Dor.

5.5 Cromatografia líquida de alta potência para determinação de dipeptídeos que contém histidina e de BA no sangue.

O conteúdo total de carnosina muscular e BA sanguínea e muscular serão determinados usando a cromatografia líquida de alta potência (HPLC) (Hitachi, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) como descrito por (Mora et al., 2007). O conteúdo de BA no sangue e no músculo serão mensurados com o mesmo equipamento e de acordo com o método proposto (Harris et al., 2006). Técnicas analíticas para as análises de beta-alanina e carnosina estão sendo padronizadas em colaboração com o Dr. Álvaro Santos-Neto, do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. A quantificação será feita baseando-se nas áreas dos picos obtidos no cromatograma. Tais áreas serão calculadas de acordo com o *software* compatível com o cromatógrafo e individualmente analisadas. Uma equação de regressão linear será obtida baseada na área dos picos da curva padrão e sua interpolação será utilizada para o cálculo da concentração final.

5.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR).

A expressão dos genes *CNDP2*, *CARNS1*, *ABAT*, *PAT1*, *TAUT* e *GAPDH* (Housekeeping) foram quantificados utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os primers foram sintetizadas por terceiros (IDT, Iowa, EUA). As amostras de músculos congelados foram homogeneizadas e o RNA foi isolado como já descrito antes (Saunders et al., 2017b). A concentração de ácidos nucleicos foi determinada de acordo com a densidade ótica a 260 nm em um micro espectrofotômetro (NanoDrop ND2000, Thermo Scientific). A pureza do RNA foi atestada de acordo com as razões

de absorvância 280 e 260 nm. A integridade estrutural do RNA foi verificada utilizando um gel a 1% de agarose com brometo de etídeo. Cada amostra submetida a reação em cadeia da polimerase foi realizada em duplicata e a intensidade de fluorescência, bem como os dados de quantificação e amplificação foram analisados no sistema de detector de sequências (Rotor Gene-Q, Qiagen, Hilden, Germany). Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o método de comparação do Ct e a mudança foi calculada baseada no método 2-ddCT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para realização destes cálculos foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH. As principais comparações na expressão gênica foram as seguintes: Expressão basal entre as semanas 0 e 4; Mudança de expressão da linha de base para 1 h pós-suplementação entre as semanas 0 e 4; Mudança de expressão da linha de base para 4 horas após a suplementação entre a semana 0 e 4.

5.7 Western blot

A extração de proteínas seguida de quantificação foi realizada via Western blotting como descrito anteriormente (CHRISTOPHER L. AXELROD, CIARÁN E. FEALY; KIRWAN, 2017). Em resumo, as células lisadas (10-20 µg) foram determinadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese para membrana de nitrocelulose e incubada durante a noite com anticorpos primários apropriados (CNDP2, ABAT, CARNS1, TAUT e PAT1) seguido de incubação em apropriado anticorpo secundário. As bandas foram reveladas pelo reagente ECL de quimiluminescência aprimorado (SuperSignal™ West Femto Substrate, Thermo Fisher Scientific). Os resultados foram corrigidos pelo corante vermelho Ponceau (0,5%) na membrana para todos os ensaios de Western blot (ROMERO-CALVO et al., 2010). Os blots foram quantificados usando o Image-J software® e os dados foram reportados em pixels (px)

5.8 Avaliação da ingestão dietética

A avaliação da ingestão dietética foi realizada baseada em 4 recordatórios de 24 horas obtidos em dias separados, sendo um realizado no dia do teste e um no dia anterior ao teste em ambas as sessões. A avaliação da ingestão dietética se baseia na listagem de comidas e bebidas consumidas durante 24 horas com auxílio visual de um álbum de fotografias dos alimentos em tamanho real e suas porções. Suplementos alimentares também foram registrados, além disso o valor energético e o teor de macronutrientes

foram analisados pelo software Webdiet (Webdiet, Rio de Janeiro, Brazil). Para avaliar o consumo dietético de beta-alanina, utilizamos uma tabela adaptada com a estimativa de BA a partir da soma de carnosina, anserina e balenina em carnes, aves e peixes (DOLAN et al., 2018; JONES et al., 2011; ABE et al., 2000).

5.9 Análise estatística

A análise dos dados foi conduzida através do software SAS versão 9.3 (SAS® University Edition, SAS Institute Inc., USA) e GraphPad Prism (GraphPad Prism version

9.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA). O nível de significância assumido foi $p < 0.05$. As análises estatísticas descritivas foram analisadas e demonstradas pela média e por desvio padrão. Outliers foram identificados usando o método ROUT antes de executar um teste de Shapiro Wilk para determinar a normalidade dos dados de PCR; os dados foram posteriormente analisados usando um teste t pareado ou teste de Wilcoxon para determinar as diferenças na expressão entre a Sessão 1 (semana 0) e a Sessão 2 (semana 4). Os dados também foram analisados de acordo com as diretrizes de que a regulação positiva do gene pode ser considerada como tendo ocorrido quando a expressão $\geq 2,0$ (Tang et al). Um Teste T de amostras pareadas também foi utilizado para determinar alguma diferença entre os efeitos colaterais nas duas sessões relacionados a “sensações de alfinetes e agulhas e/ou formigamento” e em ingestão dietética relacionada ao consumo de Carboidratos (CHO), Proteínas (PRO), Lipídios (LIP), Ingestão energética (kcal) e ingestão BA em ambas as sessões. Os dados de Western Blot foram analisados através de um modelo misto com indivíduos assumidos como fator aleatório, suplementação (2 níveis: Sessão 1 e Sessão 2) e tempo (Baseline, +1 h, +4 h) como fatores fixos.

6. RESULTADOS

6.1 Efeitos colaterais

A média da soma das pontuações de cada efeito colateral em cada sessão está relatada na Tabela 2. Poucos voluntários relataram efeitos causados na sessão um, enquanto quase nenhum efeito colateral foi reportado na sessão dois. Apenas quatro indivíduos relataram pinos e agulhas na primeira sessão e na segunda sessão após a suplementação. Essa sensação foi isolada principalmente nos braços e pernas. Um indivíduo relatou arrepio na coluna na sessão um, mas não reportou na sessão dois. Um padrão semelhante foi mostrado para Hipersensibilidade tátil e/ou irritação. Três indivíduos experimentaram alguma dor e dor na cabeça durante uma sessão pré suplementação, mas não na visita pós-suplementação. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a ocorrência de efeitos colaterais entre as duas sessões.

Tabela 2. Média da soma das pontuações de cada sessão (N = 14) Todos os dados estão em unidades arbitrárias.

Efeitos colaterais	Sessão 1	Sessão 2	Valor de P
Alfinetes e agulhas e/ou formigamento	0.5 ± 0.9	0.1 ± 0.5	0.21
Cócegas/Coceira	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Arrepio	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.34
Hipersensibilidade tátil	0.2 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.34
Dor	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.10

6.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)

Os genes *ABAT*, *CARNS1*, *PAT1* e *TAUT* foram regulados positivamente (expressão >2) 1 h após a suplementação na Sessão 1 (Semana 0) (Figura 1, Painéis A, B, D, E). Não houve diferenças significativas na expressão gênica em 1-h e 4-h entre as sessões 1 (semana 0) e 2 (semana 4) para *ABAT*, *CARNS1*, *CNDP2*, *TAUT* (todos $p > 0,05$). Houve uma redução na expressão de *PAT1* em 1-h entre as sessões 1 e 2 (semana 0 e 4) ($P=0,04$; Figura 1, Painel D), mas não 4-h. Apenas *CNDP2* foi regulado positivamente (expressão > 2) no Baseline na Sessão 2 (semana 4) em comparação com a Sessão 1 (semana 0) (Figura 2, Painel C). O *TAUT*, *PAT1* e *ABAT* foram regulados negativamente após 4 semanas de suplementação em relação a Sessão 1 (semana 0) no Baseline como determinado por mudanças na expressão (expressão <2), mas sem diferença significativa ($P>0.05$).

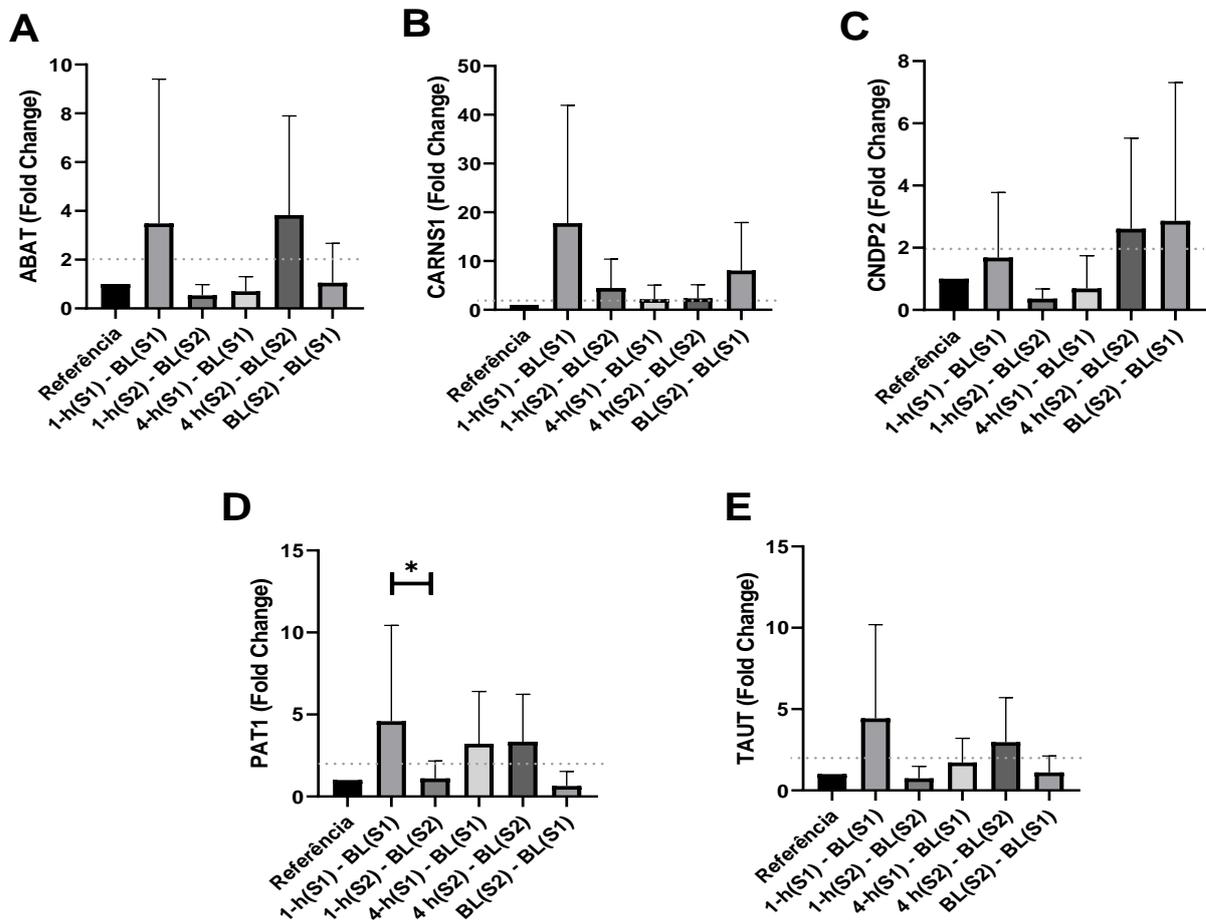


Figura 2. Fold Change da expressão gênica ao longo da Sessão 1 e Sessão 2 para *ABAT*, *CARNS1*, *CNDP2*, *PAT1*, *TAUT* ($N=14$). 1-h= 1 hora após a suplementação, 4-h= 4 horas após a suplementação, (S1) = Sessão, (S2)= Sessão 2, Referência = 1, Linha pontilhada = 2 * $P=0.04$

6.3 Western Blot

Não houve mudanças significativas no conteúdo proteico de CNDP2 e ABAT (Figura 3, Painel A-B) em ambas as sessões e tempos ($P > 0,05$). Não houve efeito de sessão ($P = 0,68$) nem de tempo ($P = 0,10$) para CARNS1, no entanto houve um efeito de interação de sessão x tempo ($P = 0,04$). Na sessão 1 (semana 0) houve um aumento agudo do conteúdo proteico de CARNS1 (Figura 3, Painel C) do baseline ($1,41 \pm 1,17$ pixels [px]) para 4 hr pós ($3,32 \pm 3,04$ px; $P = 0,02$), mas não para sessão 2 (semana 4; $P > 0,05$). Houve efeito de tempo ($P = 0,01$) com diferença estatisticamente significativa no conteúdo de TAUT ($P = 0,01$). Na sessão 1 (semana 0) do baseline ($0,21 \pm 0,19$ px) para 4 hr pós ($0,62 \pm 0,47$ px) e na sessão 2 (semana 4) do baseline ($0,35 \pm 0,30$ px) para 4 hr pós ($0,49 \pm 0,24$ px) ($P = 0,01$).

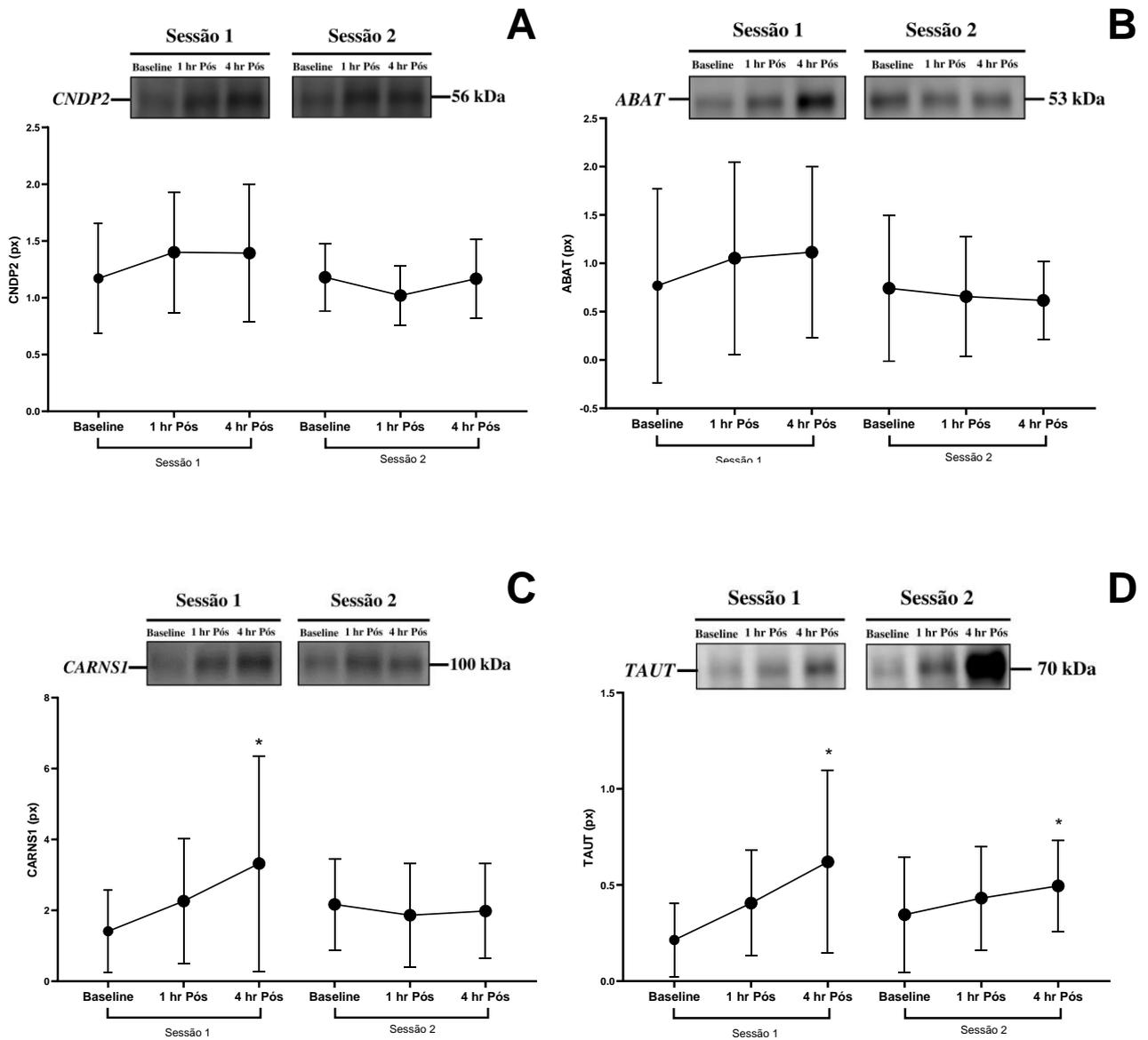


Figura 3. Média das mudanças do conteúdo de proteínas intra-sessões em pixels (px) ao longo da Sessão 1 e Sessão 2 para ABAT, CARNIS1, CNDP2, TAUT (N=8). * $P < 0.02$ em relação ao baseline.

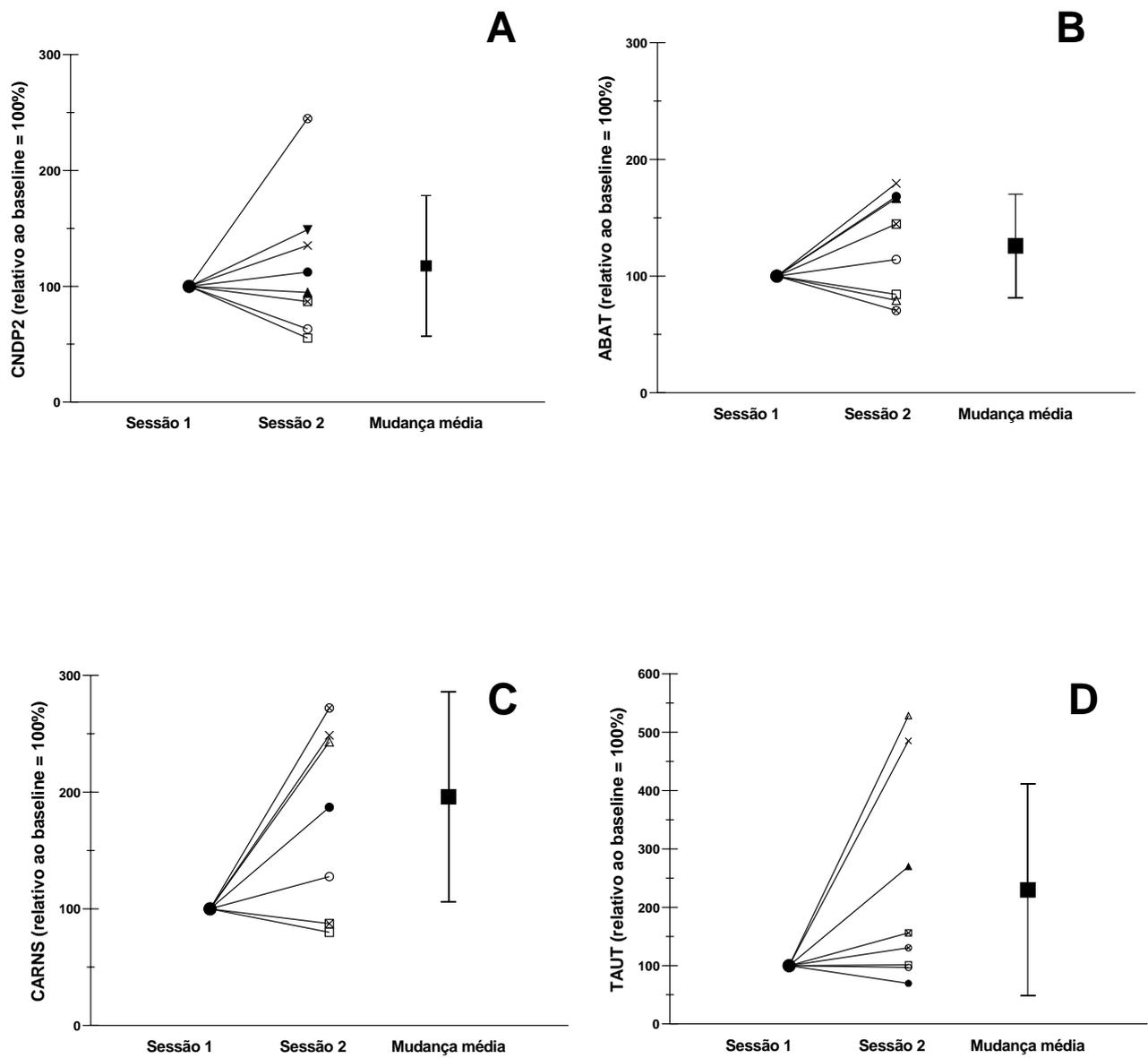


Figura 4. Fold change do conteúdo proteico dos dados individuais: Sessão 1 (semana 0) para Sessão 2 (semana 4) de ABAT, CARN1, CNDP2, TAUT da esquerda para direita (N=8). Média e desvio padrão: À direita. Sem diferenças significativas (todos $P > 0.05$).

6.4 Avaliação da ingestão dietética

A média da ingestão de macronutrientes, do consumo energético total e da ingestão de beta-alanina pela dieta nas 24 horas anteriores ao teste, assim como no dia do teste foram calculados e reportados na Tabela 3. Não houve diferenças significativas na ingestão energética, de macronutrientes e de beta-alanina entre as sessões.

Tabela 3. Ingestão dietética no dia anterior e no dia sessões (N=14)

Voluntário	24 horas anteriores e dia do teste									
	Sessão A					Sessão B				
	PRO (g/kg)	CHO (g/kg)	LIP (g/kg)	Energia (kcal)	BA (g)	PRO (g/kg)	CHO (g/kg)	LIP (g/kg)	Energia (kcal)	BA (g)
1	1,7	3,8	1,5	2519	0,2	1,8	4,5	1,5	971	0,1
2	2,4	9	1,4	5108	2,0	1,8	6,2	1,5	4070	0,8
3	4	7,6	2	4558	0,0	3,9	7,7	2	4567	0,0
4	2,5	6,3	2,6	4810	0,6	2,6	6,3	2,7	4928	1,5
5	1,9	3,7	1,5	2869	0,0	2,5	4,4	1,5	3182	0,0
6	2,9	3,5	1,3	1944	0,8	2,2	3,1	0,9	2189	0,0
7										
8	1,7	4,5	1,7	3072	0,0	1,2	8,4	2	4420	0,0
9	2,3	8,4	1,8	4288	0,0	2,4	5,5	1,5	3256	0,0
10	1,5	4,7	3,6	4060	0,0	1	3,5	1,7	2378	0,0
11	7,2	4,7	1,6	4644	0,0	3	8,9	1,6	4644	0,0
12	2,1	4,3	1,7	3179	0,3	2	4,3	1,5	2977	0,0
13	1	5	0,3	1751	0,0	1,5	8,7	0,7	3059	0,0
14	1,9	4,5	2,4	3869	0,0	2,3	3,6	2	3342	0,0
MÉDIA	2,5	5,4	1,8	3590,1	0,3	2,2	5,8	1,6	3383,3	0,2
DP	1,6	1,8	0,8	1111,4	0,6	0,8	2,1	0,5	1136,8	0,5
TESTE T	0,14	0,28	0,14	0,22	0,20					

7. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar as respostas agudas e crônicas à suplementação de BA em doses tipicamente utilizadas na literatura, na expressão de genes e no conteúdo de proteínas e transportadores relacionados ao metabolismo de carnosina. Foi observado um efeito significativo no fold change do gene *PAT1* após 1 hora de suplementação aguda da sessão 1 (semana 0) para a sessão 2 (semana 4) (Figura 2, Painel D). O conteúdo de CARNS1 aumentou após a suplementação aguda na Sessão 1 (semana 0), mas não na sessão 2 (semana 4) (Figura 3, Painel C). Houve um efeito de tempo para TAUT, 4 horas após a suplementação aguda BA na sessão 1 (semana 0) e na sessão 2 (semana 4) (Figura 3, Painel D).

Neste estudo foi possível observar que a ingestão aguda de 1,6 g de BA na sessão 1 (semana 0) levou a uma regulação positiva (expressão > 2) de todos os genes avaliados 1 hora após a suplementação em relação ao baseline, de acordo com diretrizes a regulação positiva do gene pode ser considerada como tendo ocorrido quando a expressão $\geq 2,0$ (TANG et al., 2018). O que já era esperado tendo em vista o aumento da BA circulante em resposta a suplementação de BA. Entretanto, antes e após um período de suplementação de 4 semanas com 6,4 g/dia de BA e 1 hora após uma dose aguda de 1,6g de BA foi demonstrado uma redução significativa da expressão do gene *PAT1* entre as sessões 1 e 2 (semana 0 e semana 4) (Figura 2, Painel D). O *PAT1* é um transportador que apresenta alta especificidade para a captação de BA. Não houve alteração da expressão do gene *TAUT* através da suplementação de BA para sessão 1 (semana 0) e sessão 2 (semana 4), isso contrasta com um estudo anterior do nosso grupo que mostrou uma redução da expressão de *TAUT* após 4 semanas de suplementação de BA (SAUNDERS et al., 2017). Isso pode ser devido ao método utilizado, tendo em vista que o fold change nesse estudo foi calculado através dos dados individuais, enquanto em Saunders et al (2017) o fold change foi calculado a partir da média. No músculo esquelético o *TAUT* destaca-se por sua alta especificidade, além de transportar o aminoácido Taurina, também é o principal transportador BA para o músculo esquelético (MIYAMOTO, 1990). Outros genes como *ABAT*, *CARNS*, *CNDP2*, não apresentaram diferenças significativas em sua expressão após a ingestão aguda de BA antes e após 4 semanas de suplementação.

Não houve mudanças significativas no conteúdo proteico de CNDP2 e ABAT em ambas as sessões e tempos. No entanto, houve um aumento significativo do conteúdo de TAUT do baseline para 4 horas após a suplementação de BA na sessão 1 (semana 0) e sessão 2 (semana 4). O que pode refletir em maiores aumentos de carnosina no músculo esquelético decorrente de um maior transporte de BA do sangue para o músculo 4 horas após a suplementação. Além

disso, na sessão 1 (semana 0) houve um aumento agudo significativo do conteúdo proteico de CARNS1 do baseline para 4 horas pós-suplementação. O que sugere que 4 horas após a suplementação aguda de BA o processo de aumento do conteúdo de carnosina no músculo esquelético esteja iniciando. Entretanto, enquanto ainda é observado um aumento de TAUT na sessão 2 (semana 4) do baseline para 4 horas pós-suplementação, não ocorre o mesmo com a CARNS1. O que poderia representar uma menor síntese de carnosina muscular decorrente de aumentos progressivos gerados pela suplementação crônica de 6,4 g/dia durante 4 semanas. Isso faz sentido ao considerar que a magnitude do aumento de carnosina muscular é maior nas primeiras 4 semanas em relação as semanas subsequentes (SAUNDERS et al., 2017). Agudamente o aumento do conteúdo de CARNS e TAUT pode representar uma resposta natural do músculo ao aumento de disponibilidade de BA. No entanto, agudamente pode ser que haja um mecanismo de homeostase onde não é observado um aumento da CARNS1 embora o conteúdo de TAUT aumente.

Algo peculiar em relação as mudanças do conteúdo de TAUT 4 horas após a suplementação é que um trabalho anterior mediu a expressão gênica de *TAUT* e mostrou uma redução da expressão desse gene já na 4ª semana de suplementação e nas 24 semanas subsequentes (SAUNDERS et al., 2017). Isso poderia sugerir um menor conteúdo desse transportador após um período de suplementação crônica. Mas mostramos que após uma suplementação aguda, antes e após 4 semanas de suplementação de BA, o conteúdo de TAUT aumenta após 4 horas de suplementação, no entanto não foi observado diferenças significativas antes e após o período de suplementação crônica. Além disso também mostramos que houve uma redução da expressão gênica de *PAT1* antes e após um período de suplementação crônica, isso poderia sugerir uma redução do conteúdo desse transportador no músculo esquelético após um período de suplementação crônica de BA, no entanto ainda carecem dados sobre o conteúdo proteico de PAT1 antes e após um período de suplementação crônica. Estudos anteriores mediram a expressão desses mesmos genes em indivíduos vegetarianos antes e após um período de 12 semanas de HIIT (DE SALLES PAINELLI et al., 2018). O tipo de população escolhida e o fato de os indivíduos não terem suplementado BA pode ter colaborado para a falta de mudanças na expressão de genes envolvidos no metabolismo da carnosina.

Ao longo das sessões poucos voluntários relataram efeitos colaterais na sessão um, enquanto quase nenhum efeito colateral foi reportado na sessão dois. Isso ocorreu provavelmente devido a ingestão de comprimidos de liberação lenta que evitaram rápidos aumento de BA na corrente sanguínea, o que poderia gerar o desconforto da parestesia. Os

sintomas de parestesia demonstraram ser dependentes da dose, em estudos anteriores a ingestão de uma dose de 40 mg/kg de massa corporal de BA em pó resultou em sintomas substancialmente desconfortáveis de parestesia (HARRIS et al., 2006), enquanto uma dose menor de 20mg/kg (o que equivaleria a uma dose única equivalente usada atualmente estudo em um indivíduo de 80 kg) resultou em sintomas menos intensos. Outro estudo demonstrou anteriormente que a administração de 1,6 g de BA em comprimidos de liberação lenta resultou em efeitos colaterais sensoriais significativamente menores do que a mesma dose de BA administrada como solução (DÉCOMBAZ et al., 2012). Os dados aqui sugerem que as cápsulas de liberação lenta levam a poucos efeitos colaterais, e quaisquer efeitos colaterais são quase totalmente eliminados após 4 semanas de suplementação, sugerindo uma tolerância à dose fornecida.

Os indivíduos que participaram do estudo foram orientados a manter o mesmo padrão dietético ao longo das duas sessões. Não houve diferenças significativas na ingestão energética, de macronutrientes e de beta-alanina entre as sessões. Além disso, os voluntários foram orientados a abster-se do consumo de carnes 24 horas antes e nos dias dos testes de cada sessão evitando, dessa forma, ingerir BA dietética. Afinal, existem altas concentrações de carnosina, anserina e balenina em mamíferos, aves e peixes. (ABE, 2000; JONES; SMITH; HARRIS, 2011). Mesmo que tenha havido um consumo de BA através da dieta de aproximadamente $0,3 \pm 0,6$ na primeira sessão e $0,2 \pm 0,5$ na segunda sessão, um estudo anterior mostrou que $0,8$ g/dia de BA suplementada por 3 meses, mas não $0,4$ g/dia, foi suficiente para aumentar BA em um grupo de onívoros que foram experimentalmente expostos a uma dieta vegetariana (BLANCQUAERT et al., 2018). Os autores estimaram a ingestão alimentar típica de BA em aproximadamente $0,3$ g/dia e concluíram que os $0,5$ gramas adicionais eram suficientes para estimular o acúmulo de carnosina muscular. No entanto, entre algumas das limitações desse estudo estão a falta de dados do quanto realmente essa ingestão alimentar mínima de BA pela dieta poderia afetar a expressão dos genes, além disso não houve controle da ingestão dietética dos participantes ao longo das 4 semanas do estudo, embora os mesmos tenham mantido o mesmo padrão dietético 24 horas antes e nos dias de teste.

Em conclusão, até o dado momento foi visto que a ingestão aguda de 1,6g de BA aumentou a expressão dos genes relacionados à síntese de carnosina muscular, mas que 4 semanas de suplementação de 6,4g de BA reduziram a expressão do gene *PAT1* de maneira significativa. Além disso, ocorre um aumento do conteúdo de CARNS e TAUT de maneira aguda após uma dose aguda de BA, no entanto após um período de suplementação crônica

somente TAUT tem aumento em seu conteúdo após uma dose aguda. Atualmente, ainda não está claro o que isso significa para a síntese de carnosina muscular. No entanto, trabalhos futuros que avaliem as respostas agudas de uma dose típica de BA antes e após um período de suplementação de quatro semanas, no que diz respeito a conteúdo sérico e muscular de BA, assim como conteúdo de carnosina muscular nos trarão um maior entendimento sobre a grande variabilidade existente nos aumentos do conteúdo de carnosina muscular.

8. DISCIPLINAS CURSADAS

Tabela 4. Disciplinas cursadas

Disciplinas	Situaç ão	Crédi tos	No ta
Aplicações e Implicações de Conceitos de Estatística nos Estudos da Educação Física e Esporte	Concluído	6	A
Tópicos Avançados em Nutrição e Suplementação em Atividade Física	Concluído	6	A
Fisiologia da Fadiga Muscular Durante o Exercício Físico	Concluído	6	A

9. PUBLICAÇÕES

9.1 Artigos

- Ribeiro, R., **Duarte, B.**, Guedes, A., Ramos, G., Piçanço, A., Penna, E., Coswig, V., Barbalho, M., Gentil, P., Gualano, B., Saunders, B. Short-duration beta-alanine supplementation did not prevent the detrimental effects of an intense preparatory period on exercise capacity in top-level female footballers. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, 2020.

- Perim P, Gobbi N, **Duarte B**, Farias de Oliveira L, Costa LAR, Sale C, Gualano B, Dolan E, Saunders B. Beta-alanine did not improve high-intensity performance throughout simulated road cycling. **European Journal of Sport Science**. 2021 Jun 22:1-10.

- Ribeiro, F.; Longobardi, I.; Perim, P. **Duarte, B.**; Ferreira, P.; Gualano, B.; Roschel, H.; Saunders, B. Timing of Creatine Supplementation around Exercise: A Real Concern? **Nutrients**. 2021, 13, 2844.

- Da Silva, K., **Duarte, B.**, Gomes, A., Saunders B., Mota, J. Factors that Moderate the Effect of Nitrate Ingestion On Exercise Performance in Adults: A Systematic Review With Meta-Analyses and Meta-Regressions. **Advances in Nutrition**, n. 7, p. 1–16, 2022.

9.2 Livros

- SILVA, A. D.; Icó, P.C.D ; PINTO, R. S. ; **COSTA, B. D.** ; SOUSA, T. M. ; VINTECINCO, V. ; LEITE, B. . Preparatório para provas em Fundamentos da Nutrição. 3. ed. Salvador: SANAR, 2019. v. 3. 231p

10. COLABORAÇÃO EM PROJETOS

- “Os efeitos agudos do exercício de alta intensidade no conteúdo de carnosina muscular e genes relacionados em homens omnívoros e vegetarianos”. (EM ANDAMENTO)
- “Respostas sanguíneas e musculares à suplementação de bicarbonato de sódio e subsequente desempenho do exercício”.
- “Efeitos da suplementação de beta-alanina e bicarbonato de sódio no desempenho do CrossFit®”.
- “Influência do polimorfismo em MCT1 e MCT4 na performance e respostas sanguíneas frente a um teste de ciclismo de 1-km contrarrelógio em atletas recreacionais.”
- “Efeitos da suplementação aguda de L-teanina e cafeína no desempenho cognitivo e na performance de praticantes de CrossFit®.”

11. PARTICIPAÇÃO COMO OUVINTE

- Sports Science Symposium – USP - 2019
- Congresso da Associação Brasileira de Nutrição Esportiva - ABNE – 2019
- Arnold Conference Experience – Modulo de Nutrição - Online – 2020

- Arnold Conference Experience – Modulo de Treinamento - Online – 2020
- American College Virtual Experience – Online - 2020
- WE Nutrition Conference – Online – 2020
- A força por trás do placebo (Informedics) – Online – 2021
- Curso – “III Meeting de Nutrição Esportiva” – Reumatologia da FMUSP, Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP - Online – 06/2022

12. APRESENTAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM MESA REDONDA

- Áreas de Atuação do Nutricionista: Nutrição Esportiva. Participação como convidado em aula para os alunos de 1ª semestre no Centro Universitário São Camilo 2019 - 1ª
- Áreas de Atuação do Nutricionista: Nutrição Esportiva. Participação como convidado em aula para os alunos de 1º semestre no Centro Universitário São Camilo 2019 – 2ª
- Áreas de Atuação do Nutricionista: Nutrição Esportiva. Participação como convidado em aula para os alunos de 1º semestre no Centro Universitário São Camilo 2019 – 3ª
- Áreas de Atuação do Nutricionista: Nutrição Esportiva. Participação como convidado em aula para os alunos de 1º semestre no Centro Universitário São Camilo 2019 – 4ª
- Áreas de Atuação do Nutricionista: Pesquisa Científica. Participação como convidado em aula para alunos de 1º semestre no Centro Universitário São Camilo - 2019
- Presidente de Mesa do primeiro módulo da II Conferência em Nutrição Esportiva realizada pela Liga Acadêmica de Nutrição Esportiva do Centro Universitário São Camilo. (LANES – SC) 2019.
- Palestra - Suplementação de tamponantes: O que a literatura aponta? II Simpósio de gestão e Nutrição Esportiva realizado pela Liga Acadêmica de Nutrição Esportiva do Centro Universitário São Camilo. (LANES - SC) 2019.
- Palestra - Suplementação de tamponantes: O que a literatura aponta? Primeiro Simpósio de Nutrição organizado pelo Centro Acadêmico Dith Mesquita Universidade Anhembí Morumbi (CA Dith Mesquita – UAM) 2019.

- Palestra - Suplementação de tamponantes: O que a literatura aponta? I Simpósio de Nutrição Esportiva organizado pela Liga de Nutrição Clínica e Esportiva da Faculdade de Medicina do ABC (LANCE – FMABC) 2020.
- Palestra – Suplementos Ergogênicos: O que sabemos? Imersão em Nutrição Esportiva, evento realizado por mestrandos da Universidade de São Paulo. 2020
- “Aulão” de 3 horas online – Suplementos Ergogênicos: O que sabemos? Aula online para Liga de Nutrição Clínica e Esportiva da Faculdade de medicina do ABC (LANCE - FMABC) 2020.
- Aula online – Suplementação de tamponantes: O que a literatura aponta? Aula online em evento beneficente “Nutrindo a Solidariedade” organizado pela Prof. Dra. Aline David
- Aula online - Suplementação de tamponantes: O que a literatura aponta?. Aula online exclusiva para membros da Liga Acadêmica de Nutrição e Exercício Físico da Universidade de São Paulo (LANAF-USP) 2020.
- Aula online – Beta-Alanina: O que a literatura nos mostra? 1º Meeting Internacional de Nutrição Esportiva e Exercício Físico organizado pelo Grupo de Estudos em Nutrição e Exercício (GENEX) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em parceria com o Applied Physiology & Nutrition Research Group da Universidade de São Paulo (USP) 2020.
- Aula online – Síntese proteica e hipertrofia muscular: Qual a diferença e como alcançar? Mega Evento Nutrição 2020 Online, disponível de 20/agosto a 20/out/2020 na plataforma EAD Profissional Nutrição em Pauta.
- Aula online – Trajetória na Nutrição Esportiva. Participação como convidado em aula para os alunos de 3º e 8º semestre da faculdade LS Educacional – 2020
- Participação em mesa – Evento: “A força por trás do placebo” (Infomedics) – 2021
- Aula online – Suplementação visando o desempenho esportivo: Uma abordagem prática e teórica. Aula ministrada para alunos da Liga Acadêmica de Nutrição da Universidade São Judas Tadeu – 2021
- Palestra online - Suplementação visando o desempenho esportivo. 1º Simpósio Multidisciplinar de Nutrição e Saúde do Centro Universitário Una, Campus: Bom Despacho. Minas Gerais - 02/2022

- Aula presencial – Professor convidado – Plant Based Diet. Aula Ministrada na Pós-graduação em Nutrição Esportiva do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo – 06/2022 (Duração: 08h – 18h)

13. REFERÊNCIAS

ABE, H. Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 7, p. 757–765, 2000.

ADIBI, S. A. Renal assimilation of oligopeptides: Physiological mechanisms and metabolic importance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 272, n. 5 35-5, 1997.

ANDERSON, C. M. H.; GANAPATHY, V.; THWAITES, D. T. Human solute carrier SLC6A14 is the β -alanine carrier. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 17, p. 4061–4067, 2008.

ASATOOR, A. M. et al. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. **Gut**, v. 11, n. 3, p. 250–254, 1970.

B. G. MUNCK AND S. G SCHULTZ. Rba 75278 interactions between leucine and lysine transport in rabbit ileum. v. 3, 1969.

BAGUET, A. et al. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 3, p. 837–842, 2009.

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

BIFFO, S.; GRILLO, M.; MARGOLIS, F. L. Cellular localization of carnosine-like and anserine-like immunoreactivities in rodent and avian central nervous system. **Neuroscience**, v. 35, n. 3, p. 637–651, 1990.

BOLDYREV, A. et al. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 137, n. 1, p. 81–88, 2004.

BOLDYREV, A. A. MINIREVIEW DOES CARNOSINE POSSESS DIRECT ACTIVITY? v. 25, n. 8, p. 1101–1107, 1993.

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

BOLDYREV, A. A.; KURELLA, E. G.; STVOLINSKY, S. L. Biological role of carnosine metabolism in excitable tissues: speculations and facts (a commentary). **Pathophysiology**, v. 1, n. 3, p. 215–219, 1994.

BOTKA, C. W. et al. Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: Identification of putative human genes using bioinformatics. **AAPS PharmSci**, v. 2, n. 2, p. 76–97, 2000.

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

DE SALLES PAINELLI, V. et al. **High-Intensity Interval Training Augments Muscle Carnosine in the Absence of Dietary Beta-alanine Intake**. [s.l: s.n.]. v. 50

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

DUCKER, K. J.; DAWSON, B.; WALLMAN, K. E. Effect of Beta-Alanine Supplementation on 2,000-m Rowing-Ergometer Performance. n. 2012, p. 336–343, 2013.

DUTKA, T. L. et al. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca²⁺ sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in human skeletal muscle fibers Effects of carnosine on contractile apparatus Ca²⁺ sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in human . n. December 2011, p. 728–736, 2015.

EVERAERT, I. et al. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1221–1229, 2011.

EVERAERT, I. et al. Low plasma carnosinase activity promotes carnosinemia after carnosine ingestion in humans. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 302, n. 12, p. F1537–F1544, 2012.

EVERAERT, I. et al. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 5, p. 1169–1179, 2013.

FEI, Y. et al. 'M :: K = II • I. v. 1500, n. January, p. 1497–1500, 1994.

FRITZSON, P. The catabolism of C14-labeled uracil, dihydrouracil, and beta-ureidopropionic acid in rat liver slices. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 223–228, 1957.

HAMA, T. et al. Intestinal absorption of β-alanine, anserine and carnosine in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 22, n. 2, p. 147–157, 1976.

HARRIS, R. C. et al. The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. **Amino Acids**, v. 30, n. 3 SPEC. ISS., p. 279–289, 2006.

HARRIS, R. C.; DUNNETT, M.; GREENHAFF, P. L. Journal of Sports Sciences Carnosine and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle Carnosine and taurine contents in individual W bres of human vastus lateralis muscle. **Journal of Sports Sciences**, n. August 2011, p. 37–41, 2010.

HIPKISS, A. R.; MICHAELIS, J.; SYRRIS, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine , a potential anti-protein-cross-linking agent. v. 371, 1995.

HORINISHI, H.; GRILLO, M.; MARGOLIS, F. L. Purification and Characterization of Carnosine Synthetase From Mouse Olfactory Bulbs. **Journal of Neurochemistry**, v. 31, n. 4, p. 909–919, 1978.

HOWE, S. T. et al. The Effect of Beta-Alanine Supplementation on Isokinetic Force and Cycling Performance in Highly Trained Cyclists. p. 562–570, 2013.

J. R. SUTTON, N. L. J. A. C. J. T. Effect of pH on muscle glycolysis during exercise. p. 331–338, 1981.

JONES, G.; SMITH, M.; HARRIS, R. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, n. OCE6, p. 2021, 2011.

KAMAL, M. A. et al. Influence of genetic knockout of Pept2 on the in vivo disposition of endogenous and exogenous carnosine in wild-type and Pept2 null mice. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 4, p. 986–992, 2009.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. **Equipe de tradução**. 6^a ed. [s.l.] Ed. Artmed, 2014.

SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8. doi: 10.1038/nprot.2008.73. PMID: 18546601.

LU, H.; KLAASSEN, C. Tissue distribution and thyroid hormone regulation of Pept1 and Pept2 mRNA in rodents. *Peptides*, v. 27, n. 4, p. 850–857, 2006.

MIYAMOTO, Y. Uphill transport of P-alanine in intestinal brush-border membrane vesicles. 1990.

NG, R. H.; MARSHALL, F. D. Regional and Subcellular Distribution of Homocarnosine–Carnosine Synthetase in the Central Nervous System of Rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 30, n. 1, p. 187–190, 1978.

O'DOWD, J. J.; ROBINS, D. J.; MILLER, D. J. Detection, characterisation, and quantification of carnosine and other histidyl derivatives in cardiac and skeletal muscle. **BBA - General Subjects**, v. 967, n. 2, p. 241–249, 1988.

OH, C. H. et al. Rapid gas chromatographic screening of edible seeds, nuts and beans for non-protein and protein amino acids. **Journal of Chromatography A**, v. 708, n. 1, p. 131–141, 1995.

PARTHASARATHY, A.; SAVKA, M. A.; HUDSON, A. O. The synthesis and role of β -alanine in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. July, 2019.

PERIM, P. et al. Can the Skeletal Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation Be Optimized? **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. August, p. 1–10, 2019.

PERRY, T. L.; HANSEN, S.; LOVE, D. L. relatively high. p. 1229–1230, 1968.

REZENDE, N. S. et al. The Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation: A Systematic Review With Bayesian Individual and Aggregate Data E-Max Model and Meta-Analysis. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

RIEDL, E. et al. A CTG polymorphism in the CNDP1 gene determines the secretion of serum carnosinase in Cos-7-transfected cells. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2410–2413, 2007.

SAHLIN, B. K.; HARRIS, R. C.; HULTMAN, E. I. v. 152, p. 173–180, 1975.

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

SAUNDERS, B. et al. β -Alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: A systematic review and meta-Analysis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 51, n. 8, p. 658–669, 2017b.

STAUTEMAS, J. et al. **Pharmacokinetics of β -Alanine Using Different Dosing Strategies** **Frontiers in Nutrition**, 2018.

STAUTEMAS, J. et al. Fragmented Dosing of β -alanine Induces A Body Weight-Independent Pharmacokinetic Response. 2019.

STAUTEMAS, J. et al. The role of alanine glyoxylate transaminase - 2 (agxt2) in β -alanine and carnosine metabolism of healthy mice and humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 2, n. 0123456789, 2020.

STELLINGWERFF, T. et al. Effect of two β -alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. p. 2461–2472, 2012.

TANG, F. et al. Identification of differentially expressed genes and biological pathways in bladder cancer. *Molecular medicine reports* 17, 6425-6434, doi:10.3892/mmr.2018.8711 (2018).

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

VARANOSKE, A. N. et al. β -Alanine supplementation elevates intramuscular carnosine content and attenuates fatigue in men and women similarly but does not change muscle L-histidine content. **Nutrition Research**, v. 48, p. 16–25, 2017.

VARANOSKE, A. N. et al. Comparison of sustained-release and rapid-release β -alanine formulations on changes in skeletal muscle carnosine and histidine content and isometric performance following a muscle-damaging protocol. **Amino Acids**, v. 51, n. 1, p. 49–60, 2019.

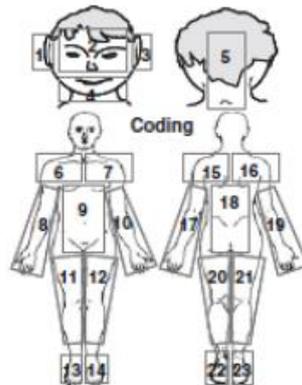
VINGREN, J. L. et al. Testosterone Physiology in Resistance Exercise and Training. **Sports Medicine**, v. 40, n. 12, p. 1037–1053, 2010.

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

14. ANEXOS

14.1 Escala de intensidade dos efeitos colaterais

Quais partes do corpo você sentiu sintomas?



Qual a intensidade dos sintomas?

Ausente			Insuportável	
0	1	2	3	4

14.2 Tabela de efeitos colaterais

Favor quantificar a natureza, intensidade e local dos sintomas.

Natureza	Pinos e agulhas/ formigamento		Cócegas/Coceira		Arrepio		Hipersensibilidade tátil e/ou irritação		Dor	
	Intensidade		Intensidade		Intensidade		Intensidade		Intensidade	
BASELINE										
15 min										
30 min										
45 min										
60 min										
90 min										
120 min										
150 min										
180 min										
210 min										
240 min										
270 min										
300 min										

Nome:

Data:

14.3 Termo de consentimento livre esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. DADOS DO INDIVÍDUO

Nome completo _____

RG _____

CPF _____

Data de nascimento _____

Endereço completo _____

CEP _____

Fone _____

E-mail _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do Projeto de Pesquisa

Respostas agudas à ingestão de β -alanina para prever respostas crônicas de suplementação de β -alanina

2. Pesquisador Responsável

Bruno Gualano/Bryan Saunders

3. Cargo/Função

Professor da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

4. Avaliação do risco da pesquisa:

RISCO MÍNIMO RISCO BAIXO RISCO MÉDIO RISCO MAIOR

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

5. Duração da Pesquisa

5 semanas

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO INDIVÍDUO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, DE FORMA CLARA E SIMPLES, CONSIGNANDO:

- Esta pesquisa pretende investigar os efeitos agudos de suplementação de β -alanina na concentração de β -alanina circulante, conteúdo e expressão de genes relacionados à carnosina em humanos. Suplementação crônica de β -alanina, um aminoácido encontrado em carnes (frango, carne bovina, peixe), aumenta a concentração de carnosina muscular, um composto envolvido no desempenho de exercício. Após suplementação aguda de β -alanina, isso aumentará a β -alanina no sangue (β -alanina circulante) antes de entrar no músculo.
- Todos os testes serão realizados no Laboratório de Fisiologia Aplicada e Nutrição na Escola de Educação Física e Esporte da USP sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan

Saunders), enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permanecerá de prontidão nas instalações da unidade, em caso de alguma emergência médica.

3. Sua participação no estudo terá a duração de cinco semanas com três visitas ao laboratório. Na primeira visita você fará um teste de ciclismo em que a carga (dificuldade) do teste será crescente, até que você entre em fadiga e não consiga mais manter o exercício.
4. Nas duas últimas visitas você fará a ingestão de 1,6 g de beta-alanina. Nas visitas serão coletadas pequenas amostras de sangue de sua veia para medirmos beta-alanina e outros dados que nos dizem como está seu metabolismo. Além disso, colheremos também uma pequena (do tamanho de um grão de arroz cru) amostra de seu músculo em três ocasiões, retirada da parte de frente de sua coxa (músculo vasto lateral). Essa amostra será importante para que possamos confirmar o efeito da suplementação de beta-alanina. Esse procedimento será conduzido por um médico experiente e treinado (Dr. Luiz Riani). Antes e durante as 4 semanas de suplementação, você preencherá recordatórios alimentares para que possamos avaliar seu consumo alimentar.
5. Durante as 4 semanas de participação, você suplementará com beta-alanina (um aminoácido que pode melhorar o desempenho). A dose será de 6.4 gramas por dia de beta-alanina, que serão subdivididas em 4 doses diárias de 1.6 gramas. Você deverá manter sua rotina normal enquanto participa do estudo.
6. A biópsia muscular causará um pequeno desconforto de picada no momento da anestesia. Embora sua perna esteja anestesiada (portanto, você não deverá sentir dor), a introdução da agulha de biópsia pode causar incômodo. Esse incômodo é rápido e não deve durar mais do que 2 ou 3 segundos. A biópsia é feita forma limpa e asséptica. Apesar da biópsia ser um procedimento invasivo, nossa equipe é bem experiente e treinada neste procedimento, e não existem relatos de problemas graves associados à biópsia em nosso laboratório. Mesmo assim, havendo necessidade, você poderá ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas).
7. As sessões de teste físico podem levá-lo a grande cansaço físico, já que serão de alta intensidade. Por fim, é possível que você sinta algum incômodo após ingerir a beta-alanina, pois ela pode causar uma sensação de "formigamento" da pele (parestesia). Caso isso ocorra, a sensação desaparece sozinha em cerca de 30 a 60 minutos e não oferece nenhum risco a saúde. Porém, para evitar que isso ocorra, o suplemento é especialmente formulado em tabletes especiais que diminuem as chances de isso ocorrer.
8. Ao participar como voluntário desta pesquisa, você terá acesso às avaliações padrão-ouro do seu estado de saúde e condicionamento físico. Além disso, você terá direito a consultas nutricionais, onde você receberá aconselhamento profissional sobre como pode melhorar seus hábitos alimentares. Você poderá tirar todas as dúvidas que tiver sobre alimentação e atividade física com profissional altamente capacitados.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. DADOS DO INDIVÍDUO

Nome completo _____

RG _____

CPF _____

Data de nascimento _____

Endereço completo _____

CEP _____

Fone _____

E-mail _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do Projeto de Pesquisa

Respostas agudas à ingestão de β -alanina para prever respostas crônicas de suplementação de β -alanina

2. Pesquisador Responsável

Bruno Gualano/Bryan Saunders

3. Cargo/Função

Professor da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

4. Avaliação do risco da pesquisa:

RISCO MÍNIMO RISCO BAIXO RISCO MÉDIO RISCO MAIOR |
(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

5. Duração da Pesquisa

5 semanas

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO INDIVÍDUO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, DE FORMA CLARA E SIMPLES, CONSIGNANDO:

- Esta pesquisa pretende investigar os efeitos agudos de suplementação de β -alanina na concentração de β -alanina circulante, conteúdo e expressão de genes relacionados à carnosina em humanos. **Suplementação crônica de β -alanina, um aminoácido encontrado em carnes (frango, carne bovina, peixe), aumenta a concentração de carnosina muscular, um composto envolvido no desempenho de exercício. Após suplementação aguda de β -alanina, isso aumentará a β -alanina no sangue (β -alanina circulante) antes de entrar no músculo.**
- Todos os testes serão realizados no Laboratório de Fisiologia Aplicada e Nutrição **na Escola de Educação Física e Esporte da USP** sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para responder eventuais dúvidas;
2. você terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência;
3. todos os seus dados serão mantidos sob confidencialidade, sigilo e privacidade. Eles poderão ser utilizados para publicações científicas, mas sua identidade nunca será revelada;
4. estará a sua disponibilidade assistência no HU ou no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Bryan Saunders – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 2648-1337

Bruno Gualano – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 2648-1337

Comitê de Ética em Pesquisa da EEFPE-USP – Av. Prof. Mello Moraes, 65. Butantã. Tel: (11) 3091-3097

Hospital Universitário da USP – Av. Prof. Lineu Prestes, 2565. Butantã Tel:(11) 3091-9200

VI. - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

São Paulo, ____/____/____

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

14.4 Parecer consubstanciado do comitê de etica e pesquisa (CEP)

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Respostas agudas à ingestão da β -alanina para predizer respostas crônicas de suplementação de β -alanina

Pesquisador: Bruno Gualano

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71621317.7.0000.5391

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.441.418

Apresentação do Projeto:

A suplementação de B-alanina tem sido utilizada para aumentar as concentrações de L-carnosina na musculatura esquelética que, apresenta várias funções biológicas, dentre elas a função de antioxidante e agente tamponante. Entretanto, ainda há uma lacuna na literatura em relação à suplementação de beta-alanina e a quantidade de carnosina no músculo esquelético assim como de genes e proteínas relacionadas ao seu metabolismo. A análise desses parâmetros auxiliará no entendimento do metabolismo de carnosina e na determinação de diretrizes de suplementação mais individualizadas e eficientes.

No presente projeto, vinte homens saudáveis serão submetidos à suplementação aguda de 1600 mg de beta-alanina e crônica de 6400 mg-dia-1 em 4 semanas. Amostras musculares serão coletadas antes e depois do período de suplementação para se avaliar expressão, atividade e a quantidade de proteínas e genes relacionados à carnosina. A hipótese do estudo é a magnitude da resposta aguda à suplementação de beta-alanina em relação a genes e proteínas que controlam o metabolismo de carnosina muscular poderão predizer a resposta muscular a suplementação crônica.

O projeto será desenvolvido Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição – EEFEUSP.

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3097

Fax: (11)3812-4141

E-mail: cep39@usp.br

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.441.418

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é avaliar as respostas agudas à suplementação de -alanina na concentração plasmática de -alanina, na expressão de genes relacionados ao metabolismo de carnosina e no seu respectivo conteúdo, pré e pós-suplementação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco envolvido no protocolo é médio.

Dentre os procedimentos da pesquisa, está previsto a realização da biópsia muscular, procedimento invasivo que será realizado por médico treinado na técnica (Luiz Riani).

Como benefícios, os indivíduos terão acesso a avaliações padrão-ouro do seu estado de saúde e condicionamento físico, além de aconselhamento profissional sobre seus hábitos alimentares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os comentários e sugestões do relator foram atendidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está claro. Sugestões foram atendidas.

Recomendações:

N/A

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as sugestões foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_956080.pdf	03/10/2017 18:56:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BAAcuteResponses_PlataformaBrasil_FINAL_Amended.pdf	03/10/2017 18:56:05	Bryan Saunders	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_AcuteBA_Amended.pdf	03/10/2017 18:55:54	Bryan Saunders	Aceito

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3097

Fax: (11)3812-4141

E-mail: cep39@usp.br

USP - ESCOLA DE EDUCAÇÃO
FÍSICA E ESPORTE DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.441.418

Ausência	TCLE_AcuteBA_Amended.pdf	03/10/2017 18:55:54	Bryan Saunders	Aceito
Outros	BAAgudoProjetoAssinado.pdf	17/07/2017 14:45:31	Bryan Saunders	Aceito
Folha de Rosto	FolhodeRostoBAAassinado.pdf	17/07/2017 14:43:49	Bryan Saunders	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Edilamar Menezes de Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Mello Moraes, 65
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-030
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3097 Fax: (11)3812-4141 E-mail: cep39@usp.br