

AMANDA ROMUALDO SANTANA

**Papel da (in)atividade muscular no controle da homeostase de
carnosina no músculo esquelético**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original esta disponível na Biblioteca FMUSP).

São Paulo

2025



AMANDA ROMUALDO SANTANA

**Papel da (in)atividade muscular no controle da homeostase de
carnosina no músculo esquelético**

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original esta disponível na Biblioteca FMUSP).

São Paulo

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Amanda Romualdo

Papel da (in)atividade muscular no controle da homeostase de carnosina no músculo esquelético / Amanda Romualdo Santana; Guilherme Giannini Artioli, orientador. -- São Paulo, 2025.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2025.

1.Carnosina 2.Tamponamento 3.Beta-alanina 4.Exercício físico I.Artioli, Guilherme Giannini, orient. II.Título

USP/FM/DBD-178/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

*A Deus, por ser minha fortaleza nos momentos de desafio e por iluminar
meu caminho com fé e propósito.*

*À minha mãe, Arlete, pelo amor incondicional, pela paciência e por me
ensinar, com seu exemplo, o valor da dedicação e da perseverança.*

*Ao meu marido, pelo companheirismo, incentivo e por acreditar em mim
mesmo nos dias mais difíceis.*

*A todos que, de alguma forma, ficaram ao meu lado nesta jornada,
oferecendo apoio, palavras de encorajamento e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a todos os colegas da EEEF e FMUSP que contribuíram de maneira tão significativa para a realização deste trabalho. Em especial, deixo minha gratidão a Andressa, Livia e Gabriela, que, com paciência, apoio e também momentos de descontração, tornaram este projeto possível.

Aos professores Ancelmo, Paulo e Marisa, sou imensamente grata não apenas pela oportunidade de realizar minhas análises em seus laboratórios, mas também pelo privilégio de trabalhar com profissionais incríveis como Bechara, Bianca e Rita. Um agradecimento especial à Rita, que tanto me auxiliou ao compartilhar seu tempo e conhecimento, contribuindo de forma excepcional para o desenvolvimento do meu projeto.

Agradeço também à equipe do Biotério da FMUSP e da EEEF, que me ensinou a lidar e cuidar dos animais com profissionalismo, mas sempre em um ambiente de parceria e respeito. Esse suporte foi essencial para a condução das experiências.

É impossível não destacar o papel do meu orientador, Guilherme. Sou profundamente grata por seus ensinamentos, paciência e compreensão, que foram fundamentais para que eu superasse os altos e baixos e concluísse este projeto.

Agradeço ainda à CAPES pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço à minha mãe, que sempre me incentivou a estudar e a acreditar que tudo é possível e ao meu marido, Fernando, meu melhor amigo e companheiro, deixo meu mais sincero agradecimento por não me deixar desistir e por me apoiar em cada etapa deste caminho. Vocês foram minha maior fonte de inspiração, amor e confiança.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa jornada, o meu muito obrigado.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP*; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Maria Claudia Pestana; Maria Cristina Cavarette Dziabas; Eliana Maria Garcia; Maria Fatima dos Santos, Maria Marta Nascimento; Suely Campos Cardoso. 3a ed. ed. amp. mod. São Paulo: SIBI/USP. 2016. (Caderno de estudos).

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

RESUMO

Santana AR. Papel da (in)atividade muscular no controle da homeostase de carnosina no músculo esquelético [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2025.

É bem estabelecido na literatura que a suplementação de beta-alanina, em médio e longo prazo, aumenta o conteúdo intramuscular de carnosina. Evidências ainda conflitantes sugerem que o exercício físico, tanto de forma aguda como crônica, pode afetar os níveis de carnosina intramuscular. No presente estudo, investigamos o comportamento da carnosina muscular em dois extremos do espectro atividade-inatividade muscular. Quarenta e cinco ratos Wistar Hannover machos com 30 dias de idade foram divididos em 3 grupos: grupo imobilizado (Imob, n=16), grupo imobilizado submetido a treinamento físico (IMOB+TREINO, n=15), e grupo controle (CON, n=14). Os animais do grupo IMOB foram submetidos a uma cirurgia de neurectomia do nervo ciático em uma das patas, ao passo que a pata contralateral foi submetida a uma cirurgia do tipo SHAM. Já o grupo IMOB+TREINO foi submetido aos mesmos procedimentos de neurectomia, adicionados de um protocolo de treinamento físico realizado em água com duração total de 10 semanas e o grupo CON foi submetido apenas à cirurgia do tipo SHAM. A formação desses 3 grupos experimentais em conjunto com o procedimento de denervação em apenas uma das patas permitiu-nos a criação de 4 condições experimentais, a saber: condição SHAM (patas controles, não denervadas, não treinadas), condição SHAM+EXERCÍCIO (patas treinadas), condição DENERVAÇÃO (patas denervadas, não treinadas), condição DENERVAÇÃO+EXERCÍCIO (patas denervadas, treinadas). Resultados: No músculo tibial anterior, as condições em que houve imobilização (DEN e DEN+treino) observaram valores de carnosina ($F(3, 82)=25,6$, $p<0,001$), anserina ($F(3, 81)=10,7$, $p<0,001$) e HCDs totais ($F(3, 81)=21,9$, $p<0,001$) significativamente mais baixos do que ambas as condições sem imobilização (SHAM e SHAM+treino, $p<0,05$ para todas as comparações), não havendo qualquer diferença entre as condições DEN vs. DEN+treino ou SHAM vs. SHAM+treino. No músculo sóleo, as condições em que houve imobilização (DEN e DEN+treino) apresentaram valores de carnosina ($F(3, 77)=20,8$, $p<0,001$), anserina ($F(3, 76)=14,3$, $p<0,001$) e HCDs totais ($F(3, 76)=19,8$, $p<0,001$) significativamente mais baixos do que ambas as condições sem imobilização (SHAM e SHAM+treino, $p<0,05$ para todas as comparações), não havendo qualquer diferença entre as condições DEN vs. DEN+treino ou SHAM vs. SHAM+treino. Conclusão: As evidências demonstradas não indicam de maneira significativa uma relação direta entre a prática de exercícios físicos e o aumento das concentrações de carnosina muscular. Da mesma forma, a avaliação da carnosina em músculos inativos não revelou uma redução substancial em seus níveis como consequência da ausência de atividade.

Palavras-chave: Carnosina. Tamponamento. Beta-alanina. Exercício físico.

ABSTRACT

Santana AR. The role of muscle (in)activity in the control of carnosine homeostasis in skeletal muscle [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2025.

It is well established in the literature that beta-alanine supplementation, in the medium and long term, increases intramuscular carnosine content. Conflicting evidence suggests that physical exercise, both acute and chronic, can affect intramuscular carnosine levels. In the present study, we investigated the behavior of muscle carnosine at two extremes of the muscle activity-inactivity spectrum. Forty-five 30-day-old male Wistar Hannover rats were divided into 3 groups: immobilized group (IMOB, n=16), immobilized group subjected to physical training (IMOB+TRAINING, n=15), and control group (CON, n=14). Animals in the IMOB group underwent sciatic nerve neurectomy surgery in one of the paws, while the contralateral paw was subjected to SHAM surgery. The IMOB+TRAINING group underwent the same neurectomy procedures, plus a physical training protocol performed in water lasting a total of 10 weeks, and the CON group underwent only SHAM surgery. The formation of these 3 experimental groups together with the denervation procedure in only one of the paws allowed us to create 4 experimental conditions, namely: SHAM condition (control paws, non-denervated, untrained), SHAM+EXERCISE condition (trained paws), DENERVATION condition (denervated, untrained paws), DENERVATION+EXERCISE condition (denervated, trained paws). Results: In the tibialis anterior muscle, the conditions in which there was immobilization (DEN and DEN+training) observed significantly lower values of carnosine ($F(3, 82)=25.6$, $p<0.001$), anserine ($F(3, 81)=10.7$, $p<0.001$) and total HCDs ($F(3, 81)=21.9$, $p<0.001$) than both conditions without immobilization (SHAM and SHAM+training, $p<0.05$ for all comparisons), with no difference between the DEN vs. DEN+training or SHAM vs. SHAM+training conditions. In the soleus muscle, the conditions in which there was immobilization (DEN and DEN+training) presented significantly lower values of carnosine ($F(3, 77)=20.8$, $p<0.001$), anserine ($F(3, 76)=14.3$, $p<0.001$) and total HCDs ($F(3, 76)=19.8$, $p<0.001$) than both conditions without immobilization (SHAM and SHAM+training, $p<0.05$ for all comparisons), with no difference between the DEN vs. DEN+training or SHAM vs. SHAM+training conditions. Conclusion: The evidence demonstrated does not significantly indicate a direct relationship between the practice of physical exercises and the increase in muscle carnosine concentrations. Likewise, the evaluation of carnosine in inactive muscles did not reveal a substantial reduction in its levels as a consequence of the absence of activity.

Keywords: Carnosine. Buffering. Beta-alanine. Physical exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da beta-alanina e histidina (parte superior) e dos principais dipeptídeos histidínicos (parte inferior)	20
Figura 2 -	Distribuição de dipeptídeos histidínicos no músculo de diferentes animais.....	22
Figura 3 -	Representação esquemática do metabolismo da carnosina.....	25
Figura 4 -	Estimativa da ingestão diária de beta-alanina a partir de dados fornecidos pela POF 2008-2009 sobre a média do consumo per capita de carnes, aves e peixes no Brasil.....	31
Figura 5 -	Ilustração do conteúdo muscular de carnosina do músculo vasto lateral de humanos treinados em diferentes modalidades esportivas	33
Figura 6 -	Ilustração do desenho experimental do estudo, com formação dos grupos e das condições experimentais	42
Figura 7 -	Equipamento banho de órgãos e software para realização do teste de contratilidade.....	45
Figura 8 -	Dados individuais (linhas sólidas) e média±desvio padrão (barras horizontais e verticais) de peso corporal dos animais nos 3 diferentes grupos experimentais, antes e após os tratamentos.....	52
Figura 9 -	Dados individuais (círculos cinzas) e média±desvio padrão (barras verticais e horizontais) de peso dos músculos sóleo (painel esquerdo) e tibial anterior (painel direito) dos animais nas 4 diferentes condições experimentais	53
Figura 10 -	Frequência das áreas das fibras (gráficos à esquerda) e gráfico de densidade de kernel do tipo violino (gráficos à direita) indicando a distribuição das áreas das fibras entre as 4 condições	54
Figura 11 -	Imagens representativas de secções transversas do músculo tibial anterior mostrando as características morfológicas do tecido nas 4 condições experimentais	55
Figura 12 -	Relação força/frequência dos músculos EDL submetidos a análise de função contrátil <i>ex-vivo</i> nas quatro diferentes condições experimentais	56
Figura 13 -	Fadigabilidade dos músculos EDL submetidos a análise de função contrátil <i>ex-vivo</i> nas quatro diferentes condições experimentais	57
Figura 14 -	Conteúdo de carnosina, anserina e dipeptídeos histidínicos (HCDs) totais nos músculos tibial anterior e sóleo nas 4 condições experimentais	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudos investigando o efeito do treinamento físico sobre o conteúdo muscular de carnosina.....	34
Tabela 2 -	Descrição dos parâmetros do espectrômetro de massas. As análises estão separadas por linhas sendo, a primeira linha é a Transição de Quantificação, a segunda a Transição de Confirmação	48
Tabela 3 -	Estatística descritiva das áreas de secção transversa das fibras musculares (n=900 por condição, 6 animais)	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATB ⁰⁺	Transportador de b-alanina no intestino
ATP	Adenosina Trifosfato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEUAS	Comissões de Ética no Uso de Animais
CN1	Enzima Carnosinase Sérica
CN2	Enzima Carnosinase Tecidual
DCH	Dipeptídeo Contendo Histidina
DP	Desvio Padrão
EDL	Músculo Extensor Digital Longo
EEFE-USP	Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina e Eosina
HClO ₄	Ácido Perclórico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
KCl	Cloreto de Potássio
KHCO ₃	Bicarbonato de Potássio
Mg ²⁺	Íons de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mmol·Kg ⁻¹	Milimol por quilo de peso corporal
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
PAT1	Transportador de b-alanina para o músculo esquelético
PEPT1	Transportador de carnosina para o sangue
PEPT2	Transportador de carnosina para o rim e cérebro
PH	Potencial Hidrogênico
PHT1	Transportador de histidina e carnosina para o músculo esquelético

PHT2	Transportador de histidina para o músculo esquelético
pKa	Constante de Dissociação
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TauT	Transportador de b-alanina para o músculo e cérebro
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1	COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA DA CARNOSINA	20
3.2	DISTRIBUIÇÃO DA CARNOSINA EM DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS	21
3.3	METABOLISMO DA CARNOSINA.....	22
3.1.1	Ingestão, digestão e absorção da carnosina.....	22
3.1.2	Síntese de carnosina.....	25
3.1.3	Excreção de carnosina e beta-alanina.....	26
3.1.4	Metabolismo da carnosina no tecido muscular.....	27
3.4	CARNOSINA COMO TAMPÃO INTRAMUSCULAR.....	27
3.5	FATORES DETERMINANTES DO CONTEÚDO MUSCULAR DE CARNOSINA	29
3.5.1	Tipos de fibra	29
3.5.2	Dieta e suplementação	30
3.6	INFLUÊNCIA DA CARNOSINA NA ATIVIDADE E INATIVIDADE FÍSICA	31
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MODELO ANIMAL	39
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL	40
4.3	CIRURGIA DE SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO	42
4.4	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES CONTRÁTEIS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	43
4.4.1	Protocolo de força x frequência.....	45
4.4.2	Protocolo de fadiga	45
4.5	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MUSCULAR DE CARNOSINA E ANSERINA	46
4.5.1	Preparo das amostras	46
4.5.2	Quantificação simultânea de carnosina e anserina por HPLC/MS-MS	46
4.6	DETERMINAÇÃO DA ÁREA DAS FIBRAS MUSCULARES.....	48

4.7	PROTOCOLO DE TREINAMENTO	50
4.8	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	50
5	RESULTADOS	52
5.1	PESO DOS ANIMAIS	52
5.2	PESO DOS MÚSCULOS.....	52
5.3	FIBRAS MUSCULARES	53
5.4	EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO E DA IMOBILIZAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO CONTRÁTIL MUSCULAR.....	56
5.5	EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A CONCENTRAÇÃO MUSCULAR DE CARNOSINA E ANSERINA.....	57
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A carnosina é um dipeptídeo multifuncional que pertence à classe dos dipeptídeo histidínicos e é abundantemente expresso no músculo esquelético de diversos mamíferos, incluindo os humanos. Tipicamente, o conteúdo de carnosina muscular em humanos varia entre 15-40 mmol·kg⁻¹ de músculo seco (Harris et al., 2006; da Eira Silva et al., 2020). Além da carnosina, outros dipeptídeos histidínicos relevantes são a anserina e a balenina, análogos metilados da carnosina. Enquanto a anserina é expressa em quantidades muito inferiores à carnosina em humanos (de Souza Gonçalves et al., 2023), algumas espécies de aves e mamíferos apresentam mais anserina do que carnosina no músculo esquelético (Dolan et al., 2018; Gonçalves et al., 2021). Já a balenina é encontrada principalmente em baleias e cetáceos (Boldyrev et al., 2013).

A carnosina é sintetizada endogenamente a partir de seus dois aminoácidos constituintes, a saber, beta-alanina e L-histidina, em reação catalisada pela enzima carnosina sintase (Drozak et al., 2010). Várias funções fisiológicas importantes têm sido atribuídas à carnosina, as quais incluem regulação do pH intramuscular (Artioli et al., 2010; Dolan et al., 2018), proteção contra glicação de proteínas (Hipkiss et al., 1994; Hipkiss et al., 1995), detoxificação de produtos da peroxidação lipídica, como aldeídos reativos (Vistoli et al., 2013; 2017; Carvalho et al., 2018), e regulação do manejo e sensibilidade do Ca²⁺ durante a contração muscular (Dutka et al., 2012; Hannah et al., 2015). Além de comprovada relevância para o desempenho físico e esportivo em atividades de alta intensidade (Hobson et al., 2012; Saunders et al., 2017). Valores elevados de carnosina muscular podem, potencialmente, ter aplicações em diversas condições patológicas e fisiológicas. Evidências sugerem que a carnosina pode contribuir para a melhora da função cognitiva, atuar na prevenção de complicações relacionadas ao diabetes, oferecer efeitos protetores em casos de insuficiência renal aguda e apresentar propriedades antineoplásicas (Artioli et al., 2019).

A homeostase da carnosina no músculo esquelético é regulada por diversos fatores. O mais importante deles é a disponibilidade de beta-alanina, aminoácido precursor de sua síntese cujas concentrações intramusculares tipicamente baixas são limitantes para a síntese de carnosina (Harris et al., 2006; Artioli et al., 2010; Matthews et al., 2019). Outros fatores que contribuem para a regulação da carnosina no músculo incluem a atividade das enzimas responsáveis pela síntese e degradação de carnosina no músculo esquelético (Everaert et al., 2013) e a eficiência dos sistemas de transporte de beta-alanina às células musculares (Blancquaert et al., 2016).

É bem estabelecido na literatura que a suplementação de beta-alanina, em médio e longo prazo, aumenta substantivamente o conteúdo muscular de carnosina (Harris et al., 2006; Hill et al., 2007; Saunders et al., 2017; da Eira Silva, 2020), e que a magnitude do aumento de carnosina é dependente da dose total acumulada de beta-alanina (Resende et al., 2020). Contudo, ainda não se sabe com clareza quais outros estímulos podem participar da regulação da carnosina no músculo esquelético.

Nesse sentido, evidências ainda conflitantes sugerem que o exercício físico, tanto de forma aguda como crônica, pode afetar os níveis de carnosina muscular. Os primeiros estudos que avaliaram essa questão adotaram delineamento transversal, nos quais atletas velocistas foram comparados com atletas fundistas e com controles não atletas (Parkhouse et al., 1985), ou em que fisiculturistas experientes foram comparados com controles não treinados (Tallon et al., 2005). Em ambos os estudos, maiores valores de carnosina muscular foram encontrados nos atletas velocistas e nos fisiculturistas, em comparação com seus controles não treinados, o que sugere que a exposição em longo prazo a exercícios de alta intensidade pode ser um estímulo para maior síntese de carnosina muscular. No entanto, diversos estudos longitudinais não conseguiram confirmar a hipótese de que o treinamento físico seria capaz de aumentar o conteúdo de carnosina no músculo esquelético (Mannion et al., 1994; Kendrick et al., 2008; Kendrick et al., 2009; Baguet et al., 2011; Edge et al., 2013; Gross et al., 2014). Esses estudos, entretanto, apresentam limitações importantes, tais como ausência de controle da ingestão de beta-alanina via dieta, e volume ou intensidade de treino provavelmente abaixo do necessário para induzir aumentos de carnosina muscular, o que os torna incapazes de responder de forma conclusiva se o exercício físico de fato influencia a homeostase de carnosina no músculo esquelético.

Mais recentemente, uma investigação de nosso grupo mostrou que 12 semanas de treinamento intervalado de alta intensidade resultaram em aumento significativo (~25%) na carnosina muscular (de Salles Painelli et al., 2018). Um importante controle utilizado nesse estudo foi o recrutamento exclusivo de indivíduos vegetarianos, controlando, portanto, a principal variável interveniente sobre a carnosina muscular, a saber, o consumo de beta-alanina via dieta. Todavia, Hoetker et al. (2018) mostraram, em contraste com os dados de Painelli et al. (2018), que o treinamento de baixa intensidade, e não de alta intensidade, foi capaz de aumentar carnosina muscular. Os dados de Hoetker et al. (2018) mostraram, ainda, que o treinamento de alta intensidade reduziu a carnosina muscular, o que pode ter sido causado por perdas de carnosina muscular que ocorrem em resposta aguda ao exercício de alta intensidade. Contudo, a hipótese de perda aguda de carnosina induzida pelo exercício não foi

confirmada em outros trabalhos (Carvalho et al., 2018), o que traz ainda mais dúvidas quanto o papel do exercício como regulador da carnosina muscular.

Se assumirmos que o exercício físico é agente modulador da homeostase de carnosina no músculo esquelético, com impactos significativos sobre o conteúdo de dipeptídeos histidínicos, é plausível que esse efeito não seja atribuível ao exercício físico *per se*, mas sim a doses suficientes de contração muscular. Nesse entendimento, a contração muscular seria o agente modulador da homeostase e do conteúdo de carnosina muscular, o que, por dedução, levaria à hipótese de que a ausência de contração muscular deveria reduzir o conteúdo intramuscular de carnosina e seus análogos. Para testar essa hipótese, nosso grupo realizou um estudo com para-atletas que sofreram lesões medulares e portavam paraplegia (Nemezio et al., 2021). Nesse trabalho, comparamos o conteúdo de carnosina em amostras de músculo paralisado (m. vasto lateral) com amostras de músculo bem treinado (m. deltóide). Surpreendentemente, os dados mostraram maior conteúdo de carnosina nos músculos paralisados em comparação com os músculos ativos, o que contradiz diametralmente a hipótese de redução de dipeptídeo histidínicos com a ausência de contração muscular. No entanto, a paralisia muscular sabidamente leva a uma drástica mudança na distribuição de fibras musculares, de tal forma que o vasto lateral, um músculo misto, apresentava mais de 90% de fibras do tipo II nas pessoas com lesão medular (Nemezio et al., 2021). Uma vez que as fibras do tipo II podem apresentar de 70% a 300% mais carnosina do que as fibras do tipo I (Sewell et al., 1992), essa mudança na distribuição das fibras nos músculos paralisados pode ter sido o principal fator que levou ao aumento de carnosina nesses músculos, desta forma impossibilitando a investigação efetiva dos efeitos da ausência de contração muscular sobre a homeostase de dipeptídeos histidínicos.

Para melhor compreender o esclarecimento do papel do exercício físico e, mais especificamente, da atividade muscular sobre a homeostase de carnosina no músculo esquelético, utilizamos no presente estudo um modelo animal de imobilização e de treinamento físico, o que nos permitiu melhor controle de variáveis intervenientes, tais como tipo de lesão, tempo de lesão, tipo de treinamento, dieta, e mudança na distribuição de tipos de fibras musculares.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa teve como objetivo principal investigar os efeitos da atividade e inatividade muscular sobre o conteúdo de dipeptídeos histidínicos no músculo esquelético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre o conteúdo de carnosina no músculo esquelético;
- Avaliar os efeitos da inatividade muscular sobre os níveis de carnosina no músculo esquelético.

3 REVISÃO DA LITERATURA

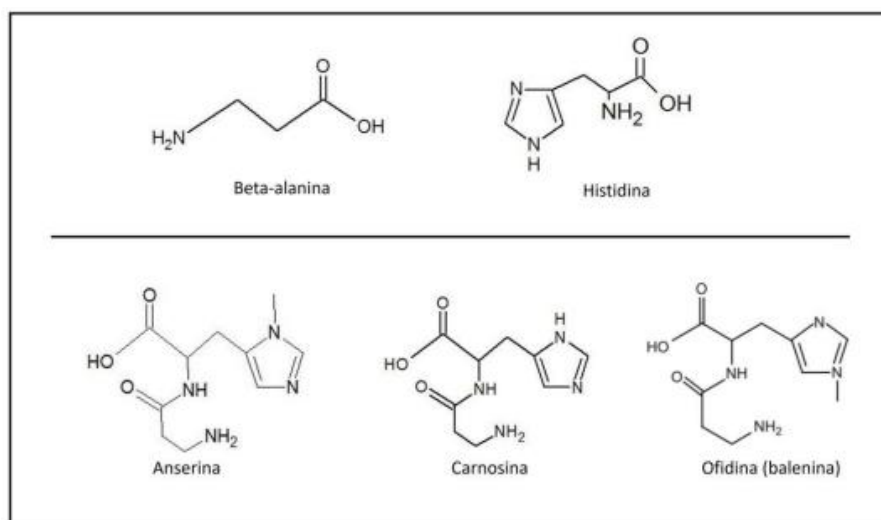
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA DA CARNOSINA

A carnosina é um dipeptídeo não essencial, ou seja, o corpo humano é capaz de sintetizá-la endogenamente a partir dos aminoácidos beta-alanina e L-histidina, por meio da ação da enzima carnosina sintetase (Harris et al., 2006). Essa molécula foi descoberta em 1900 pelos cientistas Vladimir Gulewitsch e Lohnheim, quando observavam extratos de carne fresca que possuíam diversos compostos ainda desconhecidos naquela época. Desde então, a carnosina tem sido objeto de inúmeros estudos para entender sua estrutura, função e impacto fisiológico. É um dos dipeptídeos contendo histidina (DCH) mais conhecido e estudado por seus efeitos fisiológicos (Artioli et al., 2010; Harris et al., 2012; Sale et al., 2013).

A estrutura da carnosina consiste em uma molécula de beta-alanina ligada a uma molécula de L-histidina através de uma ligação peptídica, resultando em uma estrutura cíclica com um anel de imidazol (Figura 1). A ligação peptídica entre beta-alanina e L-histidina forma o esqueleto básico da carnosina, enquanto o anel de imidazol é responsável por sua atividade bioquímica. A estrutura molecular da carnosina permite que ela atue como um tamponante intracelular, ajudando a regular o equilíbrio ácido-base em diferentes tecidos, e este tema receberá mais destaque adiante (Hipkiss, 1998).

Figura 1 - Estrutura química da beta-alanina e histidina (parte superior) e dos principais dipeptídeos histidínicos (parte inferior)



Fonte: Retirado e adaptado de Artioli et al., 2009.

3.2 DISTRIBUIÇÃO DA CARNOSINA EM DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS

Além da carnosina, outros DCHs foram identificados, são balenina e a anserina (Figura 1). A balenina é encontrada no músculo esquelético de cetáceos, enquanto a anserina é encontrada no músculo esquelético de diversos mamíferos, como roedores, suínos, equinos e aves. Por possuírem similaridade estrutural à carnosina, elas são consideradas análogos metilados da carnosina e levantam a questão se eles podem ter efeitos fisiológicos semelhantes (Hipkiss, 2008).

Existem vários fatores que influenciam a concentração de carnosina nos tecidos musculares, incluindo o sexo, a idade, o tipo de tecido muscular e o tipo de dieta. A quantidade de carnosina encontrada nos músculos esqueléticos varia amplamente entre as espécies animais, sendo que os mamíferos marinhos, como a baleia azul, apresentam níveis particularmente elevados de carnosina em seus músculos (Harris et al., 2006).

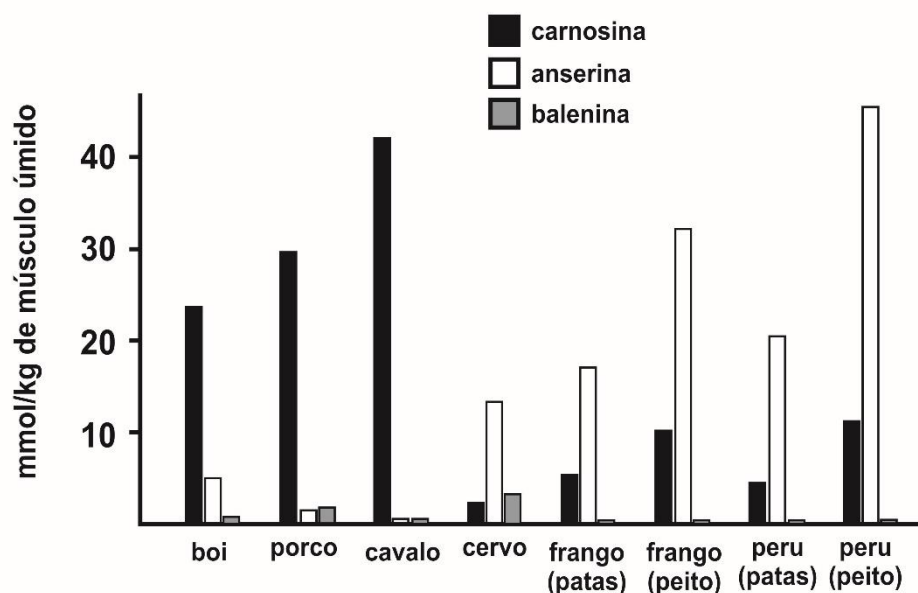
A razão para essa diferença na concentração de carnosina entre espécies animais ainda não é totalmente compreendida. No entanto, alguns estudos sugerem que a evolução pode ter desempenhado um papel importante nessa variação. Por exemplo, a alta concentração de carnosina nos músculos de mamíferos marinhos pode ser uma adaptação para suportar as demandas metabólicas da natação prolongada em água fria (Harris et al., 2006).

Ainda no contexto dos fatores evolutivos, observa-se que animais classificados como presas - ou seja, aqueles que são frequentemente caçados na natureza, como frangos, perus, cavalos e porcos - apresentam maior reserva intramuscular de tamponantes, incluindo um conteúdo mais elevado de carnosina (Artioli et al., 2010). Essa característica é possivelmente explicada pela necessidade de um metabolismo anaeróbico eficiente para escapar de predadores. Nessas situações de fuga, o músculo esquelético desses animais depende de grandes quantidades de defesas tamponantes, como a carnosina, que desempenha um papel crucial na regulação do pH muscular durante esforços intensos. Durante a predominância do metabolismo anaeróbico, ocorre o acúmulo de íons H^+ , resultando em acidose muscular, e a carnosina atua como um tamponante, auxiliando na manutenção da homeostase muscular (Abe 2000; Artioli et al., 2019).

Por outro lado, animais classificados como predadores, como cães e gatos, apresentam um conteúdo intramuscular de carnosina significativamente menor (Parkhouse et al., 1985). Essa diferença pode ser atribuída à predominância do metabolismo aeróbico durante o comportamento de caça (Baguet et al., 2010), o que reduz a necessidade de um sistema tamponante intramuscular tão robusto quanto o observado em animais de fuga.

Em humanos, a carnosina é encontrada em altas concentrações no tecido muscular esquelético, particularmente nas fibras musculares tipo II, que são responsáveis pela contração rápida e intensa, mas também pode ser encontrada em outros tecidos excitáveis. Estudos demonstraram a presença de carnosina na região do bulbo olfatório do cérebro (González-Estrada e Freeman, 1980) e também no músculo cardíaco humano (Creighton et al., 2022). A presença da carnosina nesses tecidos sugere possíveis funções fisiológicas adicionais além do papel desempenhado na regulação do pH no músculo esquelético. Compreender a estrutura e a distribuição da carnosina no reino animal pode fornecer insights importantes sobre suas funções fisiológicas e seu potencial uso terapêutico em humanos (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição de dipeptídeos histidínicos no músculo de diferentes animais



Fonte: Artioli, Painelli e Gualano. Suplementação de β -alanina: fundamentos fisiológicos e aplicações para o exercício, esporte e saúde. 1ª ed. São Paulo: Editora Clannad, 2019.

3.3 METABOLISMO DA CARNOSINA

3.1.1 Ingestão, digestão e absorção da carnosina

Embora o corpo humano seja capaz de sintetizar carnosina endogenamente, ela também pode ser obtida por meio da dieta através da ingestão do seu aminoácido precursor, a beta-alanina. Diversos alimentos são fontes naturais de beta-alanina. Estudos indicam que as carnes, especialmente carnes vermelhas, são ricas em beta-alanina. A carne bovina, por

exemplo, pode conter de 100 a 400 mg de beta-alanina por 100 g de porção comestível (Derave et al., 2010). Além disso, peixes como salmão, atum e cavala também são considerados boas fontes de beta-alanina (Hipkiss, 2018).

Estimar com precisão a quantidade de beta-alanina ingerida através da dieta não é uma tarefa fácil, pois a sua quantidade pode variar significativamente dependendo da espécie animal e do corte da carne (Hoffman et al., 2006; Jones, 2013). Ainda assim, o conteúdo de dipeptídeos histidínicos, como a carnosina, parece ser estável durante o preparo dos alimentos. Estudos apontam que, independentemente do método de cocção, não há perda ou manipulação significativa de dipeptídeos histidínicos nos alimentos (Park et al., 2005). No entanto, a ingestão de carnosina e seu precursor, beta-alanina, através da dieta é extremamente baixa, o que limita sua síntese no organismo (Dunnett e Harris, 1999; Harris et al., 2006).

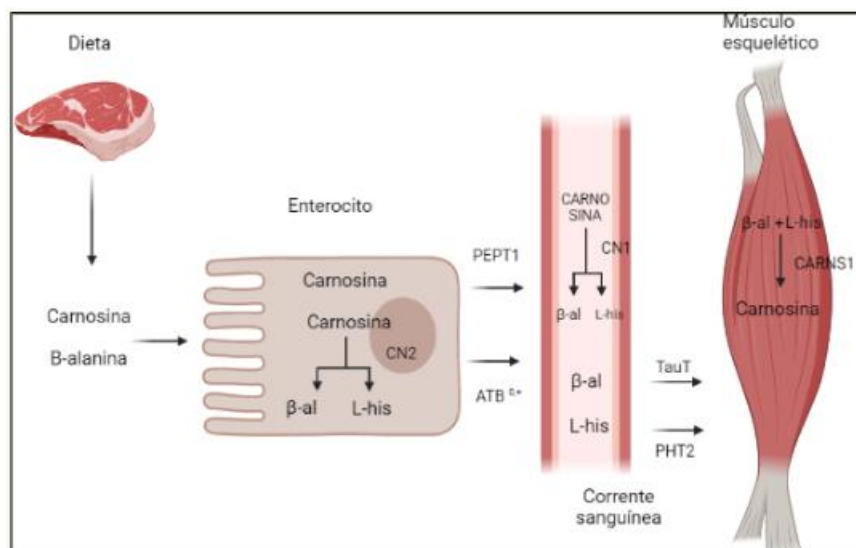
Em um estudo realizado por Derave et al. (2010), foi estimado que o consumo médio de beta-alanina na dieta de um indivíduo que consome carne regularmente é de aproximadamente 2 a 5 g por semana. Dados de nosso laboratório indicam que o consumo médio em pessoas onívoras é de aproximadamente 500 mg/dia. Por isso, é válido destacar que a quantidade de beta-alanina obtida através da dieta pode não ser suficiente para maximizar os níveis de carnosina muscular, o que tornou a suplementação com beta-alanina amplamente utilizada para aumentar a concentração de carnosina no músculo (Hill et al., 2007; Artioli, et al., 2010).

A absorção de carnosina e beta-alanina proveniente da dieta ocorre no trato gastrointestinal, sendo principalmente absorvida no intestino delgado por meio de transportadores específicos (Asatoor et al., 1970; Gardner et al., 1991). Esses transportadores permitem que a carnosina seja eficientemente transportada das células intestinais para a corrente sanguínea, onde pode ser distribuída para os tecidos e órgãos que necessitam dela. Além disso, a digestão da carnosina ocorre predominantemente no lúmen intestinal, onde a enzima digestiva Carnosinase tecidual (CN2) atua na quebra da ligação peptídica entre a alanina e a histidina, liberando a beta-alanina para ser absorvida no jejuno e no íleo e posteriormente transportada para a circulação por meio do transportador $ATB^{0,+}$ (Artioli et al., 2019).

No entanto, a carnosinase CN2 não hidrolisa completamente a carnosina, resultando em parte da carnosina sendo transportada em sua forma intacta pelo transportador PEPT1 para a corrente sanguínea (Fei et al., 1994; Yamashita et al., 1997). Uma vez no plasma sanguíneo, a carnosina está sujeita à ação da enzima carnosinase sérica (CN1) para que possa ser hidrolisada e assim ser captada pelos tecidos (Sale et al., 2013).

A captação de beta-alanina no músculo é mediada por transportadores específicos, como a proteína TauT (principal transportador de beta-alanina para as células musculares) e a proteína PAT1, que são responsáveis pelo transporte de beta-alanina no músculo esquelético. Por outro lado, a L-histidina parece ser transportada pela proteína PHT1, que também é expressa no tecido muscular humano (Everaert et al., 2013). O metabolismo da carnosina pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo da carnosina



Fonte: Adaptado de Sale et al., 2013.

Uma vez que a beta-alanina e a L-histidina são captadas pelo tecido muscular, elas precisam ser condensadas para formar a molécula de carnosina. Esse processo de síntese será discutido no próximo tópico.

3.1.2 Síntese de carnosina

A síntese de carnosina é mediada pela enzima carnosina sintase, a qual combina a beta-alanina e a L-histidina em uma reação de transpeptidação, formando a carnosina (Boldyrev et al., 2013). Estudos têm demonstrado que a carnosina sintase está presente no citoplasma de células do músculo esquelético, cardíaco e cerebral, sugerindo que a carnosina é sintetizada *in situ* (Drozak et al., 2010). O mecanismo de ação da carnosina sintase foi inicialmente descrito por Kalyankar e Meister em 1959, por meio de experimentos com músculo esquelético de frango. Eles observaram que a síntese de carnosina ocorre na presença de íons de magnésio (Mg^{2+}) e adenosina trifosfato (ATP), sendo que durante a reação de

catálise ocorre a formação de adenosina difosfato (ADP) e fosfato (Artioli et al., 2019). Além disso, o estudo revelou que a carnosina sintase é uma enzima com baixa eficiência catalítica e atividade lenta (Drozak et al., 2010).

A atividade da carnosina sintase está relacionada à disponibilidade de beta-alanina no músculo. Estudos têm demonstrado que a suplementação de beta-alanina aumenta as concentrações musculares de carnosina, indicando que a disponibilidade de beta-alanina pode ser um fator limitante para a síntese de carnosina (Hill et al.; Derave et al., 2007). Isso ocorre devido à menor afinidade a beta-alanina em comparação com a L-histidina. Para que a síntese de carnosina ocorra de forma eficaz, são necessárias aproximadamente mil vezes mais beta-alanina do que L-histidina (Hirsch, Grillo & Margolis, 1978).

A síntese de beta-alanina é um processo essencial para aumentar sua disponibilidade no organismo. Conforme mencionado anteriormente, a beta-alanina é considerada um aminoácido não essencial, pois pode ser sintetizada endogenamente pelo fígado através da degradação da uracila (Artioli et al., 2009). No entanto, a taxa de produção de beta-alanina é baixa e suas concentrações plasmáticas geralmente estão abaixo do limite de detecção das técnicas de quantificação (Derave et al., 2010). Portanto, a ingestão de beta-alanina por meio da dieta ou suplementação é fundamental para aumentar sua disponibilidade no organismo.

3.1.3 Excreção de carnosina e beta-alanina

A excreção de carnosina e beta-alanina no organismo envolvem diferentes processos, tanto renais quanto não renais. A beta-alanina pode ser excretada principalmente através dos rins, sendo filtrada pelos glomérulos (Gonçalves et al., 2020). Já a carnosina pode ser excretada de forma semelhante à beta-alanina, sendo filtrada pelos glomérulos renais. No entanto, a carnosina é rapidamente degradada pela enzima carnosinase sérica (CN1) presente no plasma sanguíneo, resultando na formação de beta-alanina e L-histidina (Sale et al., 2013). Esses produtos da degradação da carnosina podem ser posteriormente excretados pelos rins.

Além da excreção renal, a carnosina e a beta-alanina também podem ser metabolizadas por outros tecidos e órgãos do corpo. Estudos sugerem que o tecido hepático desempenha um papel importante na metabolização e excreção desses compostos, convertendo-os em outros metabólitos que são eliminados pela bile e excretados nas fezes (Everaert et al., 2013).

3.1.4 Metabolismo da carnosina no tecido muscular

Uma vez dentro das células musculares, a beta-alanina e a L-histidina podem ser convertidas em carnosina pela ação da enzima carnosina sintase (Drozak et al., 2010). Já sabemos que a beta-alanina é transportada para dentro das miofibrilas pelo transportador TauT, a saber a L-histidina é transportada pela proteína PHT2 (Santos et al., 2021). A síntese de carnosina é totalmente dependente da captação desses aminoácidos pelas células musculares.

A L-histidina é um aminoácido essencial, o que significa que precisa ser obtida através da dieta. Por outro lado, a beta-alanina parece ter sua produção limitada ao fígado. A disponibilidade de beta-alanina é um fator chave para a síntese de carnosina em humanos (Derave et al., 2010).

A atividade de enzimas envolvidas na degradação e metabolismo da carnosina e da beta-alanina também desempenha um papel importante. A carnosina sintase, responsável pela síntese de carnosina, apresenta maior afinidade pela histidina em comparação à beta-alanina (Boldyrev et al., 2013). As concentrações plasmáticas e intramusculares de histidina são cerca de 40 vezes maiores do que a beta-alanina. Portanto, a suplementação de beta-alanina tem sido amplamente utilizada como estratégia para aumentar a síntese de carnosina no músculo (Harris et al., 2006).

O músculo esquelético é o principal reservatório de carnosina no organismo. A carnosina desempenha um papel importante no controle do pH intramuscular, atuando como um tampão ácido-base durante a atividade física intensa. Além disso, a carnosina possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, o que pode contribuir para a proteção das células musculares contra danos oxidativos e processos inflamatórios (Boldyrev et al., 2013).

Além do músculo esquelético, a carnosina tem sido estudada por seu potencial em outras funções fisiológicas. Estudos sugerem que a carnosina pode desempenhar um papel no sistema nervoso central, atuando como um neurotransmissor modulador, além de estar envolvida na regulação do metabolismo da glicose e na função cardiovascular (Boldyrev et al., 2013; Hipkiss, 2009). Todavia, o destaque entre as funções propostas para a carnosina tem sido sua atuação como tamponante intramuscular, e receberá destaque a seguir.

3.4 CARNOSINA COMO TAMPÃO INTRAMUSCULAR

Atualmente a função mais bem descrita da carnosina é a manutenção do equilíbrio ácido-base intramuscular (Artioli et al., 2010). Harris et al. (2006) estimaram que a carnosina contribui significativamente para a capacidade tamponante muscular total. Tal função torna-se especialmente relevante durante atividades de alta intensidade, em que a acidose muscular é um fator limitante para o desempenho físico. Vários estudos têm investigado os efeitos do aumento do conteúdo muscular de carnosina sobre o desempenho físico, relatando melhorias significativas (Baguet et al., 2010; Saunders et al., 2017).

A presença do anel de imidazol na carnosina é fundamental para sua capacidade de tamponamento e regulação do pH muscular (Tallon et al., 2005). Durante o exercício, quando ocorre aumento do ácido láctico, a carnosina atua como um tampão, captando os prótons excessivos e evitando a queda do pH no músculo. Isso é especialmente importante para o desempenho físico e a recuperação muscular já que o aumento da acidose pode prejudicar o desempenho e a recuperação do músculo (Harris et al., 2006; Boldyrev et al., 2013).

O anel de imidazol presente na carnosina confere uma característica ácida, e o valor de pKa do grupo imidazol da histidina presente na carnosina está na faixa de 6,83 a 7,0, que é próximo ao pH fisiológico de 7,0 (Boldyrev et al., 2013). Essa propriedade permite que a carnosina atue efetivamente como um tampão intramuscular em condições de estresse metabólico, como durante o exercício intenso. A capacidade da carnosina em atuar como um tampão intramuscular é fundamental para a homeostase ácido-base no tecido muscular. Ela contribui para a manutenção do pH adequado, evitando a acidificação excessiva que pode comprometer o desempenho muscular e afetar a recuperação pós-exercício (Harris et al., 2006; Boldyrev et al., 2013).

Entre os mamíferos, a carnosina desempenha um papel significativo no tamponamento intracelular, representando aproximadamente 40% desse processo (Abe, 2000). No entanto, em humanos, a contribuição da carnosina para o tamponamento é menor devido à sua menor concentração em relação a outros mamíferos. Em humanos, o conteúdo médio de carnosina é de aproximadamente 20 mmol.kg⁻¹ de músculo seco (Saunders et al., 2016). Comparado ao músculo esquelético de cães, que apresenta 33 mmol.kg⁻¹ de músculo seco, e cavalos de corrida, que apresentam 108 mmol.kg⁻¹ de músculo seco (Dunnett e Harris, 1999). Essa diferença na concentração de carnosina pode estar relacionada a fatores evolutivos e às demandas metabólicas específicas de cada espécie.

Estudos conduzidos em fibras isoladas estimam que a carnosina seja responsável por 4,5% do tamponamento intramuscular em fibras do tipo I e 9,4% em fibras do tipo II (Mannion et al., 1992). Sabe-se que as fibras musculares do tipo II possuem um metabolismo

predominantemente glicolítico, enquanto as do tipo I possuem um metabolismo predominantemente oxidativo. Portanto, é possível concluir que as fibras musculares do tipo II apresentam um maior conteúdo de carnosina (Artioli et al., 2019).

Estudos indicam que as fibras musculares do tipo II possuem cerca de duas vezes mais carnosina do que as fibras do tipo I. Em média, as fibras do tipo II apresentam uma concentração de carnosina de $23,2 \text{ mmol/kg}^{-1}$ de músculo seco, enquanto as fibras do tipo I possuem uma concentração de $10,5 \text{ mmol/kg}^{-1}$ de músculo seco. As fibras musculares do tipo II são responsáveis pela contração lenta e de baixa intensidade. Essa distribuição peculiar é importante, uma vez que as fibras do tipo II possuem uma maior demanda energética durante exercícios de alta intensidade. A presença de carnosina nesses músculos indica seu papel tamponante, o que é essencial para minimizar a fadiga e aumentar a capacidade de realizar exercícios de alta intensidade (Derave et al., 2007; Baguet et al., 2012).

3.5 FATORES DETERMINANTES DO CONTEÚDO MUSCULAR DE CARNOSINA

3.5.1 Tipos de fibra

Como discutido no tópico anterior, o tipo de fibra muscular é indicativo da concentração de carnosina no tecido muscular. Um dos primeiros estudos realizados neste sentido foi conduzido por Dunnet e Harris (1999), que isolaram fibras musculares do glúteo médio de cavalos puro sangue e identificaram que as fibras do tipo II tinham 4 a 5 vezes mais carnosina comparadas às do tipo I. Essa distribuição semelhante também foi observada no músculo esquelético do camelo. Devido às fibras do tipo II serem glicolíticas e de atividade anaeróbia, estão associadas ao aumento da acidose durante o processo de contração muscular, o que justifica um maior conteúdo de carnosina nesse tipo de fibra (Dunnet & Harris, 1999).

Embora a concentração de carnosina em humanos seja relativamente baixa em comparação com outras espécies, a distribuição preferencial nas fibras musculares do tipo II sugere uma adaptação evolutiva para atender às demandas metabólicas dessas fibras durante a contração muscular. O aumento da disponibilidade de carnosina por meio de suplementação ou estratégias alimentares específicas pode ter benefícios potenciais para melhorar o desempenho físico e reduzir a fadiga muscular.

3.5.2 Dieta e suplementação

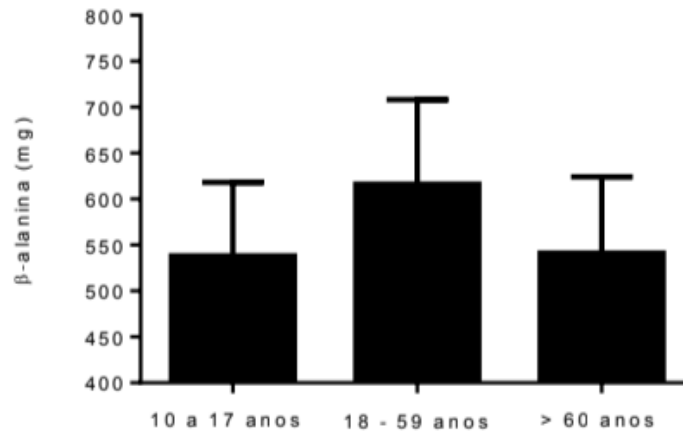
A oferta de beta-alanina é o principal limitante para a síntese de carnosina em humanos, além de um aminoácido não essencial, ela é um aminoácido não proteinogênico, ou seja, não compõe a estrutura de proteína. Portanto pode ser obtida através das carnes, seu principal alimento fonte, ou por meio de suplementação (Boldyrev et al., 2013).

A influência da dieta sobre o conteúdo muscular de carnosina fica clara quando observamos o conteúdo muscular de carnosina em indivíduos que seguem uma dieta vegetariana, que apresentam aproximadamente metade dos valores comumente observados em onívoros (de Salles Painelli et al., 2018; da Eira Silva et al., 2020). Acredita-se que neste caso a síntese de carnosina seja o principal fator limitantes para a produção endógena de carnosina (Harris et al., 2006).

No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada pelo Ministério da Saúde em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), forneceu informações relevantes sobre o consumo alimentar no país. Na edição da pesquisa referente aos anos 2008-2009, foram analisados diversos aspectos relacionados à alimentação, incluindo o consumo médio diário per capita de diferentes itens alimentares, como carnes, aves e peixes. De acordo com a POF 2009, a carne é um alimento amplamente consumido no Brasil, fazendo parte da dieta cotidiana de boa parte da população. O consumo de carnes, aves e peixes foi estimado com base nos dados coletados junto aos indivíduos participantes da pesquisa (Figura 4).

Analisando as informações disponíveis, pode-se observar que há uma variação no consumo diário de beta-alanina entre as diferentes regiões do Brasil. Segundo dados da POF, verifica-se que a região Norte apresenta uma maior ingestão diária de beta-alanina em comparação com outras regiões do país. Essa disparidade pode ser atribuída ao alto consumo de peixes frescos, que é uma prática bastante comum na região Norte. Os peixes são conhecidos por serem fontes naturais de beta-alanina, contribuindo significativamente para a ingestão desse aminoácido nessa região específica.

Figura 4 - Estimativa da ingestão diária de beta-alanina a partir de dados fornecidos pela POF 2008-2009 sobre a média do consumo per capita de carnes, aves e peixes no Brasil



Fonte: Artioli et al., 2019.

*Valores estão apresentados em média+DP.

Como a disponibilidade é um fator limitante para a síntese de carnosina, a suplementação de beta-alanina tem sido amplamente estudada e se mostrado eficaz em promover o aumento de carnosina no músculo. Estudos têm investigado diferentes dosagens de suplementação de beta-alanina para maximizar os efeitos na elevação dos níveis de carnosina. A dosagem recomendada geralmente varia entre 4 a 6 gramas por dia, dividida em doses menores ao longo do dia. Essa estratégia visa elevar gradualmente os níveis de beta-alanina no organismo, uma vez que altas doses podem causar efeitos colaterais como parestesia (Harris et al., 2006; Derave et al., 2007; Saunders et al., 2017).

A parestesia é o efeito colateral mais comum associado à suplementação de beta-alanina. Ela ocorre devido à ativação dos receptores de canais de íons na pele, especialmente quando doses elevadas são consumidas de uma só vez (Stout et al., 2007). No entanto, vale ressaltar que a parestesia é temporária e geralmente desaparece após algumas semanas de uso contínuo da suplementação. Além disso, a parestesia pode ser minimizada ao dividir a dose diária em porções menores e ao optar por formas de beta-alanina de liberação lenta (Harris et al., 2006; Décombaz et al., 2012).

3.6 INFLUÊNCIA DA CARNOSINA NA ATIVIDADE E INATIVIDADE FÍSICA

A carnosina muscular tem sido objeto de estudo em relação ao seu papel no desempenho físico, especialmente em atividades de alta intensidade. É interessante notar que

animais velocistas, que possuem um metabolismo predominantemente anaeróbio, apresentam uma concentração muscular de carnosina maior em comparação a animais com um metabolismo aeróbio mais predominante (Artioli et al., 2010). Estudos de fisiologia comparativa confirmem esses achados (Dolan et al., 2018), e sugerem uma possível relação entre a concentração de carnosina e o metabolismo anaeróbio exigido por atividades de alta intensidade.

Ao aplicarmos essas informações aos seres humanos engajados em atividades físicas, podemos supor que indivíduos envolvidos em treinamentos de alta intensidade e exercícios anaeróbios possam apresentar concentrações mais elevadas de carnosina muscular em comparação a indivíduos sedentários ou envolvidos em atividades predominantemente aeróbias.

Um estudo conduzido por Parkhouse et al. (1985) foi um marco na compreensão do efeito da atividade física nas concentrações de carnosina muscular. O estudo comparou indivíduos sedentários com atletas de diferentes modalidades esportivas, incluindo corredores, remadores e maratonistas.

Os resultados desse estudo revelaram diferenças significativas nas concentrações de carnosina entre os grupos de atletas e os indivíduos sedentários. Os atletas de resistência, como remadores e corredores velocistas, apresentaram concentrações mais elevadas de carnosina muscular em comparação aos maratonistas e aos indivíduos sedentários. Essas descobertas sugerem que a natureza da atividade física desempenha um papel importante nas concentrações de carnosina muscular. Isso pode ser atribuído ao maior estresse metabólico e à maior demanda de tamponamento ácido durante exercícios de alta intensidade e curta duração.

O estudo conduzido por Tallon et al. (2005) trouxe contribuições importantes para a compreensão do efeito da atividade física nas concentrações de carnosina muscular, especificamente em fisiculturistas. O objetivo desse estudo foi investigar as concentrações de carnosina em diferentes grupos de fisiculturistas e compará-las com indivíduos não treinados.

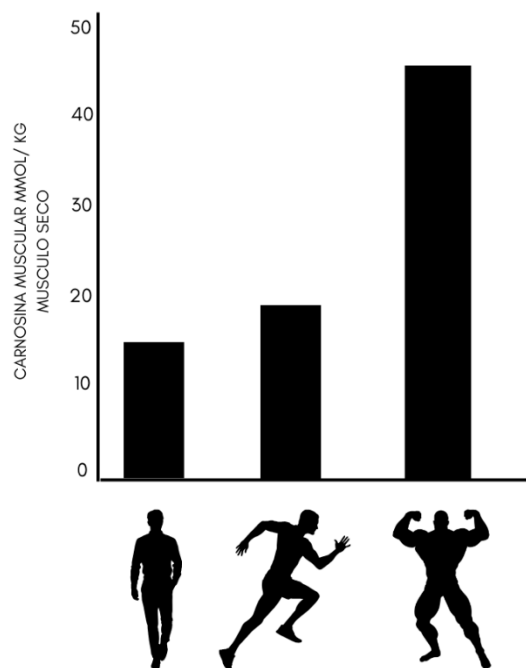
Os resultados desse estudo revelaram que os fisiculturistas apresentaram concentrações significativamente mais altas de carnosina muscular em comparação aos indivíduos não treinados. Essa descoberta sugere que o treinamento de força e o aumento da massa muscular podem estar associados ao aumento das concentrações de carnosina, corroborando com a teoria de que o treinamento de resistência, como o realizado pelos fisiculturistas, pode promover uma maior demanda de tamponamento ácido durante o exercício intenso.

O estudo de Tallon et al. (2005) também oferece insights valiosos ao considerar a relação entre as concentrações de carnosina muscular e a predominância de fibras musculares do tipo II em fisiculturistas. Sabe-se que as fibras musculares do tipo II possuem um metabolismo predominantemente glicolítico, o que significa que elas dependem principalmente da via anaeróbica para a produção de energia durante o exercício de alta intensidade.

Estudos anteriores indicaram que as fibras musculares do tipo II apresentam concentrações mais elevadas de carnosina em comparação com as fibras do tipo I (Dunnett, 1995). Essa diferença na concentração de carnosina pode estar relacionada à maior demanda metabólica e produção de íons de hidrogênio durante o exercício de alta intensidade, que é característico das fibras do tipo II.

Além disso, o estudo de Tallon et al. (2005) demonstrou que fisiculturistas possuem concentrações mais altas de carnosina muscular. Essa descoberta é consistente com a hipótese de que o treinamento de força, típico dos fisiculturistas, promove adaptações musculares, incluindo o aumento da proporção de fibras musculares do tipo II. Essas fibras, por sua vez, podem apresentar maiores concentrações de carnosina, que desempenha um papel importante no tamponamento intramuscular e na neutralização de íons de hidrogênio (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração do conteúdo muscular de carnosina do músculo vasto lateral de humanos treinados em diferentes modalidades esportivas



Fonte: Adaptado de Parkhouse et al., 1985; Tallon et al., 2005; Kim et al., 2007.

Embora esses estudos forneçam suporte à hipótese de que o treinamento físico possa estar associado ao aumento do conteúdo muscular de carnosina, é importante reconhecer que esses delineamentos experimentais não permitem estabelecer uma relação direta de causa e efeito. Portanto, são necessárias mais pesquisas para investigar de forma mais aprofundada essa relação e fornecer evidências mais robustas.

Alguns estudos longitudinais avaliaram especificamente o efeito treinamento de alta intensidade sobre o conteúdo muscular de carnosina e tem demonstrados dados conflitantes.

Os primeiros estudos sobre o efeito do treinamento físico no conteúdo de carnosina muscular foram conduzidos por Mannion, Jakeman e Willan (1994). Nesse estudo, os pesquisadores investigaram se a atividade física seria capaz de aumentar as concentrações de carnosina no músculo esquelético. Para isso, eles empregaram um protocolo de treinamento de extensões do joelho em um dinamômetro isocinético, com uma frequência de três vezes por semana ao longo de 16 semanas. Surpreendentemente, os resultados desse estudo não revelaram alterações significativas no conteúdo de carnosina muscular nem na capacidade tamponante do músculo.

Estudos posteriores também buscaram investigar o efeito do treinamento físico no conteúdo de carnosina muscular, e os resultados obtidos foram consistentes com o estudo de Mannion et al. (1994); Kendrick et al. (2008); Kendrick et al. (2009); Baguet et al. (2011); Edge et al. (2013) e Gross et al. (2014) foram alguns dos pesquisadores que não conseguiram confirmar a hipótese de que o treinamento físico seria capaz de aumentar as concentrações de carnosina no músculo esquelético. Esses estudos adicionais demonstraram resultados similares, não evidenciando alterações significativas no conteúdo de carnosina muscular em resposta ao treinamento físico.

Tabela 1 - Estudos investigando o efeito do treinamento físico sobre o conteúdo muscular de carnosina

Referência	Amostra	Natureza do Treino	Duração do Treino	Resultado
Mannion et al., 1994	33 jovens fisicamente ativos	Isocinético	16 semanas	Sem alteração
Suzuki et al., 2004	6 homens jovens sedentários	Intermitente	8 semanas	100% de aumento
Kendrick et al., 2008/	6 homens jovens fisicamente ativos	Força	10 semanas	Sem alterações
Kendrick et al., 2009	14 homens jovens fisicamente ativos	Isocinético	4 semanas	Sem alterações

Baguet et al., 2011	20 homens jovens fisicamente ativos	Intermitente	5 semanas	Sem alterações
---------------------	-------------------------------------	--------------	-----------	----------------

Fonte: Adaptado de Artioli et al., 2019.

Em contrapartida, um estudo conduzido por Suzuki et al. (2004) trouxe resultados promissores ao observar um aumento de 100% no conteúdo muscular de carnosina após um período de 8 semanas de treinamento em cicloergômetro. É importante ressaltar que, até o momento, este foi o único estudo a evidenciar um efeito modulador do treinamento físico sobre a carnosina muscular, sem envolver a suplementação com beta-alanina.

Além do estudo mencionado anteriormente, os achados de Hoetker et al. (2018) acrescentam informações ainda mais contraditórias em relação ao efeito da atividade física nas concentrações de carnosina muscular. Seu estudo sugere que a atividade física de alta intensidade pode não aumentar as concentrações de carnosina e até mesmo reduzi-las (Hoetker et al., 2018). Essas descobertas contraditórias reforçam a complexidade do papel da atividade física na regulação da carnosina muscular.

Os resultados de Hoetker et al. destacam a importância de considerar múltiplos fatores, como a intensidade e a duração do exercício, o tipo de tecido muscular avaliado e a metodologia de medição utilizada, ao investigar os efeitos da atividade física na carnosina muscular.

Os estudos conduzidos até o momento sobre o efeito do treinamento físico no conteúdo muscular de carnosina apresentam algumas limitações e falhas importantes que devem ser consideradas. Uma das principais falhas é a heterogeneidade nos desenhos experimentais e nas metodologias utilizadas para medir a concentração de carnosina muscular. Métodos diferentes de medição, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), podem fornecer resultados discrepantes e dificultar a comparação entre os estudos.

O treinamento físico empregado por alguns autores também pode influenciar nos resultados. Alguns estudos utilizaram protocolos de treinamento com duração e intensidade que podem não ser capazes de induzir a acidose intramuscular necessária para estimular alterações significativas nos níveis de carnosina muscular. Essa falta de padronização nos protocolos de treinamento dificulta a comparação direta dos resultados entre os estudos, limitando nossa compreensão dos reais efeitos do treinamento sobre os níveis de carnosina muscular.

Outra falha frequente nos estudos é a falta de controle rigoroso da ingestão de beta-alanina, precursora da carnosina, via dieta, o que também pode afetar os resultados, uma vez

que a suplementação de beta-alanina pode influenciar diretamente os níveis de carnosina muscular.

Pensando nesta última limitação, um estudo foi conduzido em nosso laboratório, com participantes vegetarianos que passaram por 12 semanas de treinamento intermitente de alta intensidade. O estudo conduzido por Salles Painelli et al. (2018) revelou que o treinamento intervalado de alta intensidade é capaz de aumentar o conteúdo intramuscular de carnosina, independentemente da ingestão de alimentos fonte de beta-alanina.

Os vegetarianos, devido à exclusão de fontes animais de proteínas, apresentam uma ingestão reduzida de carnosina em comparação com indivíduos não vegetarianos. Isso pode resultar em concentrações mais baixas de carnosina muscular em vegetarianos, visto que a carnosina é derivada de fontes dietéticas de origem animal. Os achados do estudo revelaram que a suplementação de beta-alanina foi eficaz em aumentar significativamente as concentrações de carnosina muscular em vegetarianos fisicamente ativos. A suplementação de beta-alanina foi capaz de compensar a falta de ingestão de carnosina por meio da dieta e elevar os níveis intramusculares dessa substância tamponante (de Salles Painelli et al., 2018). O treinamento utilizado no estudo também é comprovadamente capaz de induzir acidose muscular, e ao controlar o principal fator limitante, a dieta, os dados revelam que o treinamento de alta intensidade pode aumentar o conteúdo muscular de carnosina. Também devemos considerar que a inatividade física ou a paralisia podem ter efeitos opostos e sobre o conteúdo de carnosina muscular. A hipótese é que a falta de estímulo muscular resultante da inatividade física ou da paralisia pode levar a uma diminuição nas concentrações de carnosina no músculo esquelético, e além disso, a falta de atividade física pode reduzir a expressão de enzimas envolvidas na biossíntese da carnosina muscular.

Um estudo relevante nesse contexto foi conduzido por Nemezio et al. (2021), investigou os efeitos da suplementação de beta-alanina na concentração de carnosina em remadores com paralisia. Este estudo é particularmente relevante, uma vez que a paralisia afeta a função muscular e pode ter implicações no metabolismo de carnosina. Foi comparado o músculo vasto lateral (inativo) com o deltoide (ativo) destes indivíduos. Os resultados deste estudo revelaram que ao considerar os níveis basais de carnosina o vasto lateral possuía 56% mais carnosina quando comparado ao deltoide, esse achado foi atribuído ao fato de que a paralisia pode resultar em atrofia muscular, redução do diâmetro das fibras musculares, diminuição do número de miofibrilas, desorganização da arquitetura muscular e perda de massa muscular (Grimby et al., 1976). Além disso, podem ocorrer alterações na composição

de fibras musculares, ocorrendo um aumento progressivo das fibras tipo II em relação às fibras do tipo I (Grimby et al., 1976; Burnham et al., 1997).

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O papel da carnosina como tamponante intramuscular e a importância da disponibilidade de beta-alanina como um fator limitante para a síntese desse composto têm sido amplamente discutidos na literatura (Harris et al., 2006; Boldyrev et al., 2013). No entanto, apesar desses aspectos estarem bem estabelecidos, outras funções e respostas relacionadas à atividade física ainda precisam ser elucidadas. Existem questões em aberto em relação à magnitude da resposta da carnosina em diferentes contextos de atividade física.

É importante ressaltar que muitos dos estudos realizados até o momento apresentam fatores limitantes que podem interferir nos resultados e na interpretação dos dados. Alguns desses fatores incluem:

- 1) Duração do estudo: Alguns estudos podem ter sido conduzidos por um período relativamente curto, o que pode não capturar completamente os efeitos em longo prazo da atividade física e da suplementação de beta-alanina sobre os níveis de carnosina;
- 2) Variabilidade dos métodos de mensuração: Diferentes estudos podem ter utilizado métodos diferentes para medir os níveis de carnosina, o que pode levar a variações nos resultados e dificultar a comparação direta entre os estudos;
- 3) Variabilidade individual: Os níveis de carnosina podem variar significativamente entre indivíduos, devido a fatores genéticos, idade, sexo, composição corporal e estado de saúde. Essa variabilidade individual pode dificultar a comparação direta entre os participantes e a interpretação dos resultados;
- 4) Controle do treinamento: É importante controlar e monitorar o programa de treinamento dos participantes para garantir que os efeitos observados sejam realmente atribuíveis à atividade física. Variações no tipo, intensidade e duração do treinamento podem influenciar os resultados e dificultar a comparação entre os grupos;

- 5) Padronização da dieta: Para minimizar a influência da dieta nos resultados, é importante padronizar a alimentação dos participantes durante o estudo. Isso envolve controlar a ingestão de alimentos ricos em carnosina, como carnes vermelhas, aves e peixes, que podem afetar os níveis de carnosina muscular. Além disso, é necessário monitorar e registrar a ingestão de macronutrientes (proteínas, carboidratos, gorduras) que podem afetar o metabolismo da carnosina.

Essas limitações podem dificultar a comparação dos resultados entre os estudos e a obtenção de conclusões definitivas. Portanto, a disponibilidade de dados conflitantes e a presença de fatores limitantes ressaltam a necessidade de realizar pesquisas adicionais para aprofundar nosso entendimento sobre os mecanismos subjacentes pelos quais a atividade física influencia os níveis de carnosina em diferentes contextos. Embora diversos estudos tenham investigado a relação entre atividade física e carnosina, os resultados nem sempre são consistentes e muitas questões permanecem sem resposta. A compreensão dos mecanismos pelos quais a atividade física modula os níveis de carnosina é crucial não apenas para a ciência básica, mas também para o desenvolvimento de intervenções práticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELO ANIMAL

O uso de modelos animais pode configurar uma estratégia de investigação valiosa ao permitir melhor controle de variáveis que, em estudos com humanos, não poderiam ser controladas. No âmbito deste projeto, a escolha pelo modelo animal tem a vantagem de nos permitir controlar a dieta, fator interveniente majoritário sobre o conteúdo intramuscular de carnosina, além da distribuição dos tipos de fibra, do estímulo associado ao treinamento físico, e do tipo e tempo de imobilização muscular. Nesse sentido, nosso modelo animal teve o objetivo de melhor controlar as variáveis de interesse e as variáveis de confusão, permitindo-nos, especificamente, obter:

- 1) Controle dietético: Nos estudos com animais, é possível fornecer uma dieta controlada e padronizada, eliminando a variabilidade observada nos estudos com humanos. Isso permite avaliar especificamente o efeito da dieta na concentração de carnosina sem a interferência de outras fontes dietéticas de beta-alanina;
- 2) Manipulação experimental: Com modelos animais, é possível realizar manipulações experimentais precisas, como a indução da paralisia e de atividade física. Essas manipulações permitem investigar diretamente os efeitos dessas intervenções nas concentrações de carnosina, eliminando a influência de fatores confundidores;
- 3) Padronização: Os estudos com animais permitem uma maior padronização em relação a fatores como idade, sexo, histórico médico e genética dos participantes, o que reduz a variabilidade e aumenta a validade interna dos resultados;
- 4) Coleta de tecido: Com modelos animais, é possível coletar tecidos específicos, como músculos, de maneira mais direta e controlada, permitindo uma análise detalhada das concentrações de carnosina em diferentes tipos de fibras musculares e regiões específicas.

Neste estudo, 48 ratos Wistar Hannover machos com 30 dias de idade foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) pela rede de biotérios da Universidade de São Paulo (USP) e utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação da Escola de

Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) em grupos de 3-4 animais por gaiola, em caixas de polipropileno forradas com maravalha esterilizada, trocadas 3 vezes por semana. Os ratos receberam ração padrão e água *ad libitum*, e permaneceram em ambiente controlado, com sistema de ventilação com trocas frequentes de ar, filtragem de ar, temperatura controlada $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar em $55 \pm 10\%$, ciclo de iluminação automático invertido claro/escuro de 12/12 horas, período escuro iniciando às 06h00. O projeto foi submetido às Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS) da (EEFE-USP) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e, somente após aprovação, os animais foram adquiridos e os experimentos tiveram início. Os experimentos foram conduzidos em blocos de 16 animais, de modo que repetimos cada experimento 3 vezes para chegar ao número amostral final, assegurando maior reprodutibilidade de nossos dados. Dentro de cada bloco, os tratamentos foram igualmente representados, garantindo balanceamento das condições dentro de cada bloco. Por fim, os animais foram designados aos diferentes grupos de forma aleatória, utilizando-se um gerador de sequências aleatórias (www.random.org).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 3 grupos, a saber: grupo imobilizado (IMOB, n=16), grupo imobilizado submetido a treinamento físico (IMOB+TREINO, n=15), e grupo controle (CON, n=14). O desbalanceamento entre os grupos animais ocorreu devido à morte de três animais durante o estudo. Inicialmente adquirimos 16 animais para o grupo IMOB e 17 animais para o grupo IMOB+TREINO, devido ao próprio risco da cirurgia e treinamento, e 15 animais para o grupo Sham, de menor risco.

Os animais do grupo IMOB foram submetidos a uma cirurgia de neurectomia do nervo ciático, que consistiu na remoção de um segmento de ~1 cm do nervo na porção proximal da pata. Uma das patas foi submetida à neurectomia, ao passo que a pata contralateral foi submetida a uma cirurgia do tipo SHAM (controle experimental em que os procedimentos cirúrgicos são repetidos, porém com preservação do nervo).

Em cada animal, a escolha da pata submetida à neurectomia foi feita de forma aleatória, balanceando-se o número de patas direitas e esquerdas neurectomizadas. A aleatorização e balanceamento das patas foram feitos por meio de sequências de números aleatórios (random.com). Já o grupo IMOB+TREINO foi submetido aos mesmos procedimentos de neurectomia, adicionados de um protocolo de treinamento físico realizado

em água com duração total de 10 semanas. Por fim, os animais do grupo CON passaram por cirurgia do tipo Sham em ambas as patas. A formação desses 3 grupos experimentais em conjunto com o procedimento de denervação em apenas uma das patas permitiu-nos a criação de 4 condições experimentais, a saber:

- Condição SHAM (patas controles, não denervadas, não treinadas)
- Condição SHAM+EXERCÍCIO (patas treinadas)
- Condição DENERVAÇÃO (patas denervadas, não treinadas)
- Condição DENERVAÇÃO+EXERCÍCIO (patas denervadas, treinadas).

Mesmo cientes de que quase certamente as patas denervadas não contrairiam durante as sessões de treinamento físico, ou durante qualquer outro momento da vida dos animais após a cirurgia, optamos por manter essa quarta condição de forma separada em nossas análises em razão da possibilidade dos efeitos do exercício físico não serem apenas mediados de forma autócrina ou parácrina, mas também de forma endócrina, em resposta à ação de miocinas e exercinas potencialmente liberadas durante o treinamento pelos músculos ativos ou por outros órgãos. Logo, essa abordagem nos permitiu também examinar se eventuais respostas ao treinamento físico seriam mediadas por fatores autócrinos e parácrinos, ou por fatores endócrinos.

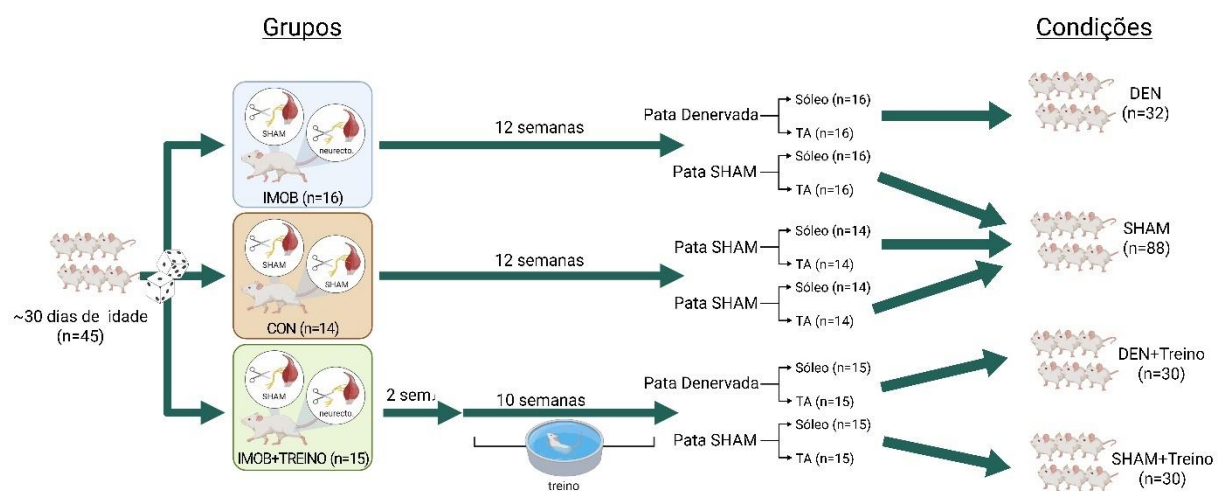
Aproximadamente aos 30 dias de idade, os animais foram submetidos às cirurgias de neurectomia e/ou SHAM, conforme descrição detalhada adiante. Duas semanas após a cirurgia, o programa de treinamento físico foi iniciado para o grupo IMOB+TREINO. Os demais grupos foram mantidos pelo mesmo período de tempo sem realizar nenhum tipo de treinamento. Assim, o tempo total de intervenção foi de 12 semanas, sendo as duas primeiras destinadas à recuperação da cirurgia e as 10 seguintes ao período de treinamento. Ao final desse período, os animais foram submetidos à avaliação da função contrátil muscular e, em seguida, eutanasiados para coleta dos músculos tibial anterior e sóleo de ambas as patas. A escolha dos músculos tibial anterior e sóleo se deu para que pudéssemos avaliar os efeitos da imobilização e do treinamento físico em grupos musculares compostos quase que exclusivamente por fibras do tipo I (sóleo) e do tipo II (tibial anterior).

Após a dissecação dos músculos, fizemos sua limpeza imediata, removendo os tecidos conjuntivo e adiposo aparentes, e então registramos o peso úmido dos músculos. Em seguida, as amostras foram aliquotadas, congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C até

o momento das análises. Uma das alíquotas foi criopreservada em OCT Tissue-Tek® em isopentano resfriado em nitrogênio líquido, para posterior preparo dos cortes para análise histológica.

Os tecidos emblocados foram utilizados para determinação área das fibras musculares. As variáveis analisadas nos tecidos musculares foram: conteúdo de carnosina e conteúdo de anserina. O desenho experimental está ilustrado na Figura 6.

Figura 6 - Ilustração do desenho experimental do estudo, com formação dos grupos e das condições experimentais



Fonte: Produção da autora (2025).

Legenda: Imob=imobilização; CON=controle; DEN=Denervação.

4.3 CIRURGIA DE SECÇÃO DO NERVO CIÁTICO

Aos ~30 dias de idade, os animais foram submetidos à neurectomia para remoção cirúrgica de um segmento de ~1 cm do nervo ciático de uma das patas. O objetivo do procedimento foi induzir paralisia do trem posterior em apenas um dos lados, preservando a função da pata contralateral, para que possamos avaliar o impacto da ausência de contração muscular sobre a homeostase de carnosina. Trata-se de um procedimento invasivo de grau de severidade baixo-moderado.

O procedimento foi feito com o animal em anestesia profunda, estágio III, plano 2, segundo a classificação de Guedel. A indução de anestesia foi feita com administração de cetamina 100 mg/kg de peso corporal associada a xilazina 10 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal. Os reflexos interdigital e palpebral foram constantemente verificados. A manutenção da anestesia, para os animais que apresentaram reflexos, foi feita por

administração de 10% da dose de cetamina por via intraperitoneal. A cirurgia foi realizada com os instrumentos autoclavados em campo cirúrgico estéril de uso único.

A cirurgia consistiu em uma incisão de cerca de 1,5 cm na pele, após tricotomia, na região proximal da pata que divide os grupos musculares extensores e flexores do joelho. Logo abaixo da incisão, por entre os grupos musculares, passa o nervo ciático. A fáscia externa foi cortada com o uso de um bisturi, para que pudéssemos ter acesso ao nervo, o qual pinçado com o auxílio de um explorador de ponta romba e, em seguida, dois cortes distantes entre si em ~1 cm foram realizados, seccionando-se o nervo, assim evitando contato entre as pontas e possível reconexão nervosa. Imediatamente antes e após 8 horas passada a cirurgia, os animais receberam injeção intraperitoneal do analgésico Tramadol 2%. Os pesquisadores envolvidos verificaram diariamente as condições dos animais no período pós-cirúrgico e a dor por meio da escala de Grimace. A necessidade de uso de outras drogas anti-inflamatórias ou analgésicas foi discutida com o médico veterinário responsável técnico pelo biotério da EEFE-USP, caso os animais apresentassem sinais de dor ou alterações de comportamento. No entanto, todos os animais se recuperaram bem após o procedimento, não tendo sido necessária nenhuma intervenção adicional.

4.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES CONTRÁTEIS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

A avaliação das propriedades contráteis foi realizada em uma subamostra de 15 animais (30 patas, distribuídas da seguinte maneira: SHAM: n=16; DEN: n=6; SHAM+treino: n=4; DEN+treino: n=4). Após o período de 12 semanas seguintes à cirurgia, os animais anestesiados com tribromoetanol (20mg/100g peso corporal) via intraperitoneal e o músculo extensor digital longo (EDL) de ambas as patas foi dissecado, preservando-se os tendões, e submetidos então a avaliação das propriedades contráteis *ex-vivo* em banho de órgãos. Após a retirada das patas, os animais, ainda sob anestesia profunda, foram eutanasiados utilizando-se sobredose de isoflurano (10%) por via inalatória. Os tendões dos músculos dissecados foram amarrados com linha cirúrgica e as peças musculotendíneas montadas em um banho de órgãos para análise da função contrátil. O músculo EDL é preferencialmente utilizado em protocolos dessa natureza por ser fusiforme, não apresentar ângulo de penação, além de ser de fácil isolamento e preparo.

Após remoção do músculo EDL, os músculos tibial anterior e sóleo das patas direita e esquerda foram removidos e preservados para as demais análises citadas, conforme descrito em detalhes adiante.

Imediatamente após o isolamento, o músculo EDL teve sua extremidade distal presa a um gancho fixo dentro de uma cuba de vidro (volume total de 25 ml) e submerso em uma solução tampão de Krebs-Ringer consistindo em (mL): 137 NaCl, 24 NaHCO₃, 5,0 KCl, 1,0 KH₂PO₄, 1,0 MgSO₄, 2,0 CaCl₂ e 11,0 glicose, pH 7,4. Todos os tampões foram mantidos com perfusão de uma mistura de gás carbógena (95% O₂ e 5% CO₂). A extremidade proximal foi fixada em um braço de alavanca com um transdutor de força isométrica (TIM-200; 0-200 g), conectado a um sistema computadorizado de aquisição e registro da força tênsil em função do tempo (AVS projetos, São Paulo Brasil), permitindo, junto com a integração dos parâmetros de estimulação elétrica, a determinação das propriedades contráteis do músculo.

No início do experimento, após 15 minutos de incubação para equilíbrio do músculo adaptação ao meio, os músculos foram ajustados para o comprimento ótimo (L₀, definido como o comprimento que resulta em maior força de contração durante uma contração do tipo *single twitch*). Isso otimiza o recrutamento de unidades motoras e garante que todos os músculos sejam avaliados a partir da mesma condição inicial. Para tal, os músculos foram estimulados eletricamente com pulsos únicos (1hz) a cada 2min, durante 20 min. Entre cada estímulo, os músculos foram progressivamente estirados através do micromanipulador acoplado ao transdutor de força (incrementos de 1 mm), até o comprimento em que o máximo valor de força de contração em resposta a cada estímulo fosse produzido.

As contrações musculares foram evocadas por estimulação de campo com voltagem constante aplicada através de eletrodos paralelos em cada lado do músculo inseridos dentro da cuba, utilizando-se um estimulador elétrico (AVS-100) e um amplificador (AECAD04F) (Figura 7). A duração de cada pulso foi de 0,2 ms. Após a suspensão em L₀, o tampão foi trocado e os músculos foram deixados em repouso por mais 5 minutos, e então foram aplicados os protocolos de força e fadiga conforme descrito abaixo, com intervalo de 5 minutos de descanso entre os testes para estabilização do tampão.

Figura 7 - Equipamento banho de órgãos e software para realização do teste de contratilidade



Fonte: Produção da autora (2025).

4.4.1 Protocolo de força x frequência

Neste protocolo, o músculo foi avaliado em sua capacidade de gerar força em razão de estimulação elétrica com frequências crescentes, permitindo assim a construção de uma curva força x frequência. Para tanto, estímulos elétricos com 3 trens de pulsos elétricos de 2s de duração cada foram emitidos, separados entre si por intervalos de 3min, às frequências de 1hz, 30hz e 100hz, respectivamente. Os valores de Força de Contração Pico foram calculados por meio da diferença entre o valor de tensão basal antes do estímulo e o pico de força gerado em resposta ao estímulo elétrico.

4.4.2 Protocolo de fadiga

Neste protocolo, os músculos foram submetidos à avaliação de resistência à fadiga, sendo estimulados eletricamente com trens de pulsos elétricos de 300ms de duração cada, separados entre si por intervalos de 900ms (totalizando ciclos de 1200ms, e uma relação tempo de estimulação: tempo de repouso de 1:3 ou 0.33), a uma frequência de 30hz, durante 5min. A queda na capacidade de gerar força foi considerada como parâmetro de fadiga de cada tecido.

4.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MUSCULAR DE CARNOSINA E ANSERINA

4.5.1 Preparo das amostras

Antes de proceder à análise para a determinação do conteúdo de carnosina e anserina, as amostras congeladas foram submetidas a um processo de liofilização por 16 horas em um liofilizador de bancada. Em seguida, o tecido passou por um processo de limpeza, em que os vestígios visíveis de tecido conjuntivo e sangue foram removidos. Posteriormente, alíquotas de aproximadamente 3 mg do tecido liofilizado transformadas em um pó fino por meio do uso de duas pinças e acondicionadas em microtubos de 1,5 ml.

As amostras foram homogeneizadas em uma solução Ácido Perclórico (HClO_4) 0,5 M e EDTA 0,5 M, sendo adicionados 50 μl da solução para cada 1 mg de tecido. Após a adição do reagente, a mistura foi submetida à agitação em vórtex por um total de 15 minutos de forma intermitente (30 segundos no vórtex seguidos por 30 segundos no gelo). Posteriormente, a centrifugação foi realizada a 5000 g em uma centrífuga refrigerada a 4°C, por um período de 3 minutos. O sobrenadante foi separado e pesado para determinar o volume do extrato. Uma vez estabelecido o volume do extrato, uma solução de neutralização de KHCO_3 2,1 M foi adicionada, correspondendo a um quarto do volume do extrato.

Finalmente, a solução foi novamente submetida à centrifugação a 5000 g, a uma temperatura de 4 graus Celsius, pelo período de 3 minutos. O sobrenadante resultante foi separado e passou por um processo de filtração utilizando filtros de centrifugação de 10 μm . Posteriormente, as amostras foram congeladas a -80° C para posterior realização da análise de cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa (HPLC/MS-MS).

4.5.2 Quantificação simultânea de carnosina e anserina por HPLC/MS-MS

As concentrações de carnosina e anserina foram determinadas nos extratos de músculo conforme descrito em Gonçalves et al., (2021). Os padrões e as amostras foram quantificados em duplicata e analisados por HPLC-ESI+-MS/MS on-line, utilizando Carnosina-d4 (CAR-d4) como padrão interno (Carvalho et al., 2018).

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo API 6500 (Sciex, Washington DC, WA), acoplado a utilizando um sistema de HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado com *autosampler*, forno de coluna a 45°C, válvula de comutação de fluxo automatizada de alta pressão posicionada entre colunas, uma bomba binária e uma bomba isocrática, além de duas colunas, a saber: coluna Kinetex C18 (100×4.6mm; diâmetro de partícula de 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, CA) e Coluna Kinetex C18 (100 x 2,1 mm; diâmetro de partícula 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, CA). As fases móveis foram solução acetato de amônio 5 mM pH 5,5 (fase A) e acetonitrila (fase B). Antes do uso, ambas as soluções foram filtradas em membrana PVDF 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA). As condições de separação foram as seguintes: de 0 a 6 min: 10% de acetonitrila a 150 µl/min; de 6 a 10 min: 10-90% de acetonitrila a 150-300 µl/min; de 10 a 15 min: 90% de acetonitrila a 300 µl/min; de 15 a 20 min: 90-10% de acetonitrila a 300-150 µl/min, permitindo que a primeira coluna fosse reequilibrada até 30 min. A válvula de comutação de fluxo de 2 posições e 6 portas foi posicionada entre as colunas, e descartou o eluente da primeira coluna até o 3º minuto de corrida, enquanto mantinha a segunda coluna recebendo solução de água: acetonitrila (9:1, v:v) a um fluxo constante, mantido pela bomba isocrática, de 100 µl/min. Em seguida, a válvula trocada de posição, levando o eluato da primeira coluna para a segunda coluna, e então ao detector triplo-quadrupolo do espectrômetro de massa. Após o 14º minuto de corrida, a válvula retornava à posição inicial, permitindo reequilíbrio de ambas as colunas. A detecção dos íons foi feita por eletrospray (ESI) no modo positivo, com monitoramento de reação selecionada (SEM). A voltagem turbo Ionspray foi mantida em 5500 V, com cortina de gás a 15 psi e o nebulizador e gás auxiliar a 50 psi. A temperatura foi ajustada para 500°C e a pressão de nitrogênio na célula de colisão foi ajustada para alta. A relação sinal/ruído (S/R) de ≥ 7 foi utilizada como critério de quantificação. As transições S/R para carnosina, anserina e controles internos foram monitoradas usando um tempo de permanência de 150 ms.

Na Tabela 2 estão apresentados os principais parâmetros utilizados para configurar e operar o espectrômetro de massas. Esses parâmetros desempenham papéis específicos na análise de compostos por espectrometria de massas e influenciam diretamente na seleção, fragmentação e análise dos íons. A seguir, são explicados os significados de cada parâmetro:

- Q1 (Da): Analisador de Massa de Entrada. Define a faixa de massa dos íons que entrarão no sistema de análise. Expresso em unidades de massa atômica (Da);

- Q3 (Da): Analisador de Massa de Saída. Seleciona um íon específico a ser monitorado após a fragmentação no segundo quadrupolo. Usado em análises MS/MS. Expresso em unidades de massa atômica (Da);
- DT (msec): Tempo de Decalagem. Controla o intervalo entre os pulsos dos quadrupolos para otimizar a transferência dos íons entre os analisadores;
- DP (V): Potencial de Declive. Ajusta a voltagem entre os eletrodos do quadrupolo, influenciando a trajetória dos íons durante a análise;
- CE (V): Energia de Colisão. Define a energia cinética dos íons em colisão com um gás (por exemplo, argônio) no segundo quadrupolo. Afeta a fragmentação em análises MS/MS;
- CXP (V): Potencial de Compensação de Colisão. Diferença de energia para guiar íons fragmentados ao terceiro analisador de massa ou detector.

Tabela 2 - Descrição dos parâmetros do espectrômetro de massas. As análises estão separadas por linhas sendo, a primeira linha é a Transição de Quantificação, a segunda a Transição de Confirmação

Analito	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DT (msec)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Car	227	110	100	51	33	22
	227	156	100	51	23	8
Ans	241	109	250	71	37	8
	241	170	250	71	31	16
Card ₄	231	110	100	51	33	22
	231	156	100	51	23	8

Nota: As análises estão separadas por linhas sendo, a primeira linha é a Transição de Quantificação, a segunda a Transição de Confirmação

4.6 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DAS FIBRAS MUSCULARES

As áreas das fibras foram avaliadas em uma subamostra de 6 animais por condição, sendo avaliadas 100-150 fibras por condição, totalizando assim, 900 fibras por condição. Imediatamente após a remoção dos músculos tibial anterior e sóleo, uma alíquota foi criopreservada para posterior preparo para cortes histológicos. Os músculos foram fixados em uma massa de OCT Tissue-Tek® e em seguida congelados por 60 segundos por imersão em isopentano em temperatura de nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80°C e posteriormente levadas ao criostato (Leica CM1850 UV, Wetzlar, Alemanha),

mantido a uma temperatura de -21°C e cortadas transversalmente em secções de 10 µm. Os cortes histológicos foram preparados em lâminas (26 x 76 mm) e armazenados a – 80 °C para o estudo morfológico.

Posteriormente o tecido foi corado com hematoxilina e eosina (H&E) e as lâminas seladas com lamínula para análise morfológica do tecido. As fotomicrografias das fibras musculares foram capturadas utilizando microscópio óptico Axio 25 Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha), o qual estava conectado a um computador para aquisição das imagens. A análise da área seccional transversal (AST) das fibras musculares foi realizada por meio do *software* ImageJ2 (v. 1.45s, *National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EUA). A fim de obter dados representativos, foram examinados um total de 6 animais por grupo, com a análise sendo aplicada em 150-200 fibras por animal, abrangendo os músculos Sóleo e Tibial de ambas as patas direita e esquerda.

4.7 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Os animais do grupo IMOB+TREINO foram submetidos a 10 semanas de treinamento físico em água. Os treinos ocorreram quatro vezes por semana, sendo divididos em dois grupos para que o período de recuperação dos animais fosse exatamente igual. O primeiro grupo treinou às 2as, 3as, 5as e 6as feiras e o segundo grupo 3as, 4as, 6as feiras e sábados, em uma piscina especialmente desenvolvida para treinamento de natação em ratos. A água da piscina foi filtrada e aquecida a $30\pm 1^{\circ}$ C durante toda a sessão. O treinamento foi progressivo em tempo de duração e em intensidade, controlada pela aplicação de pesos de chumbo na cauda do animal, até que os animais realizassem sessões de 30 minutos de duração com carga de 2% do peso corporal. A progressão do treinamento foi da seguinte maneira: na semana 1, a carga de 0% e as 4 sessões com duração de 15, 20, 25 e 30 minutos, respectivamente; na semana 2, as sessões tiveram duração de 30 minutos e as cargas aplicadas ao longo das 4 sessões foram 1%; na 3ª semana, as cargas aplicadas foram 1%, 1%, 2% e 2%, respectivamente. A partir da 4ª semana, todas as sessões de treino foram feitas com 2% do peso corporal, por 30 minutos. Todos os animais submetidos ao protocolo de treinamento foram pesados antes de cada sessão com o intuito de calcular a carga a ser aplicada durante o treinamento. É relevante destacar que três animais vieram a óbito no decorrer do protocolo.

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os valores de carnosina e anserina, bem como os dados de peso dos músculos, foram comparados entre as 4 condições por meio de ANOVA de um fator (condição, 4 níveis) com teste *post-hoc* de Tukey quando foi observado efeito principal significativo na ANOVA (JASP

v.0.18.3.0). Para as variáveis que apresentam fator tempo (peso corporal e dados de contratilidade muscular), os dados foram analisados com modelos mistos (proc mixed, SAS OnDemand) com dois fatores fixos (condição e tempo, medidas repetidas no fator tempo). Quatro matrizes de covariância foram testadas para determinar a que melhor se ajustava a cada conjunto de dados (autorregressiva, não estruturada, composta simétrica e toeplitz) e o critério de informação Schwarz's Bayesian (menor valor BIC) foi utilizado para escolha da matriz com melhor ajuste. Em havendo efeitos principais ou de interação significantes, testes de comparação múltipla foram realizados para localizar as diferenças, com ajuste de Tukey-Kraemer. Para as áreas das fibras, os valores individuais de cada fibra (900 observações em cada condição) foram utilizados para construir curvas de frequência. As distribuições foram então comparadas em pares por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras (www.statskingdom.com/kolmogorov-smirnov-two-calculator.html), com ajuste dos valores de p pelo método de Bonferroni. Para reduzir a probabilidade de falso positivo devido à pseudoreplicação e inflação do n , intervalos de confiança de 95% foram calculados para cada condição e comparados entre si, sendo considerados significantes quando não se cruzam. Para todos os testes estatísticos, foi adotado nível α de 5%. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

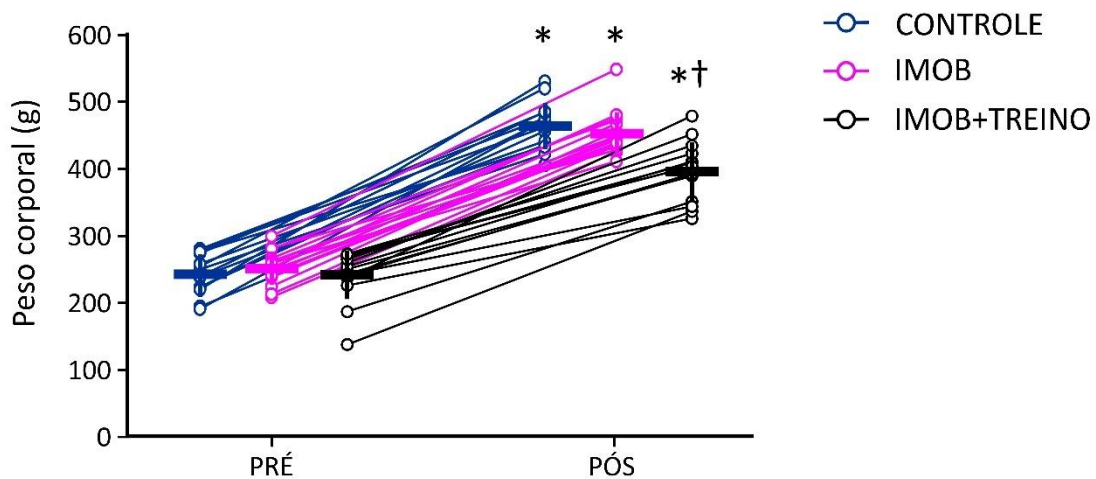
5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PESO DOS ANIMAIS

O peso dos animais aumentou ao longo do tempo de tratamento $F(1,42)=1238$, $p<0.0001$, efeito principal de tempo), porém o aumento foi menor nos animais que treinaram em comparação com os demais grupos ($F(2,42)=7,4$, $p=0,0017$, interação grupo*tempo). Enquanto os grupos CON e IMOB apresentaram ganho de peso de 91% e 88%, respectivamente, o grupo IMOB+TREINO apresentou ganho de 73%. A comparação múltipla revelou que, no período pós-tratamento, os grupos CON e IMOB não foram diferentes quanto ao peso corporal ($t=0,58$, $p=0,99$), mas que ambos os grupos tiveram peso significativamente maior do que o grupo IMOB+TREINO (vs. CON: $t=4,39$, $p=0,001$; vs. IMOB: $t=3,94$, $p=0,0038$; Figura 8).

Figura 8 - Dados individuais (linhas sólidas) e média±desvio padrão (barras horizontais e verticais) de peso corporal dos animais nos 3 diferentes grupos experimentais, antes e após os tratamentos



* $p<0,05$ vs. o mesmo grupo no período PRÉ;

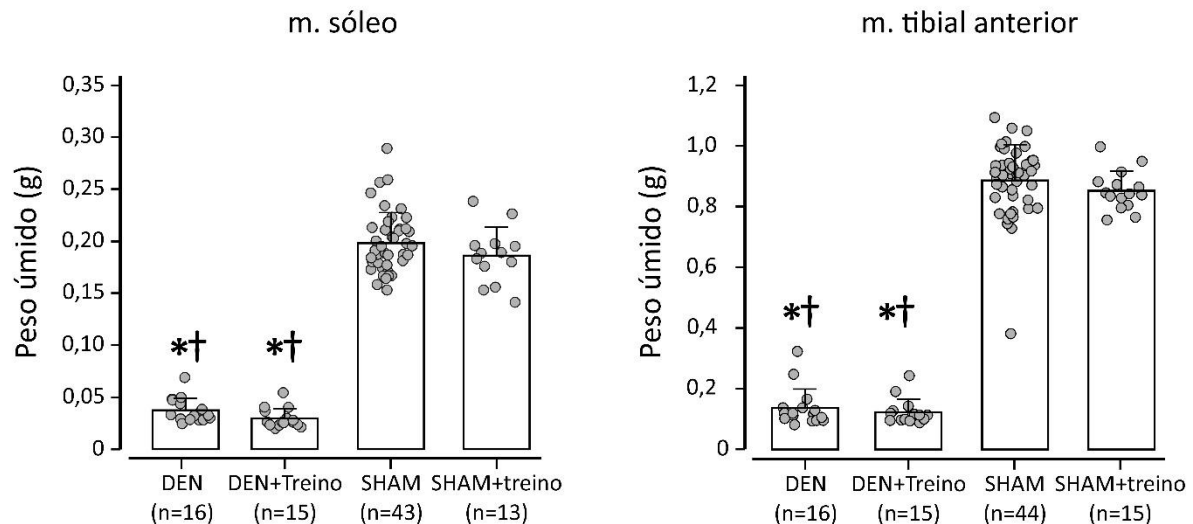
† $p<0,05$ vs. demais grupos no período PÓS.

5.2 PESO DOS MÚSCULOS

A imobilização por secção do nervo ciático levou a uma redução drástica do peso dos músculos dos animais, tanto no sóleo ($F(3, 83)=301,3$, $p<0,0001$, efeito principal) como no tibial anterior ($F(3, 86)=437,1$, $p<0,0001$, efeito principal). A análise de comparação múltipla

com ajuste de Tukey revelou que ambos as condições denervadas apresentaram valores significativamente menores do que as condições não denervadas ($p < 0,0001$ em todos os casos) (Figura 9).

Figura 9 - Dados individuais (círculos cinzas) e média $\pm$ desvio padrão (barras verticais e horizontais) de peso dos músculos sóleo (painel esquerdo) e tibial anterior (painel direito) dos animais nas 4 diferentes condições experimentais



Fonte: Produção da autora (2025).

* $p < 0,05$ vs. SHAM;

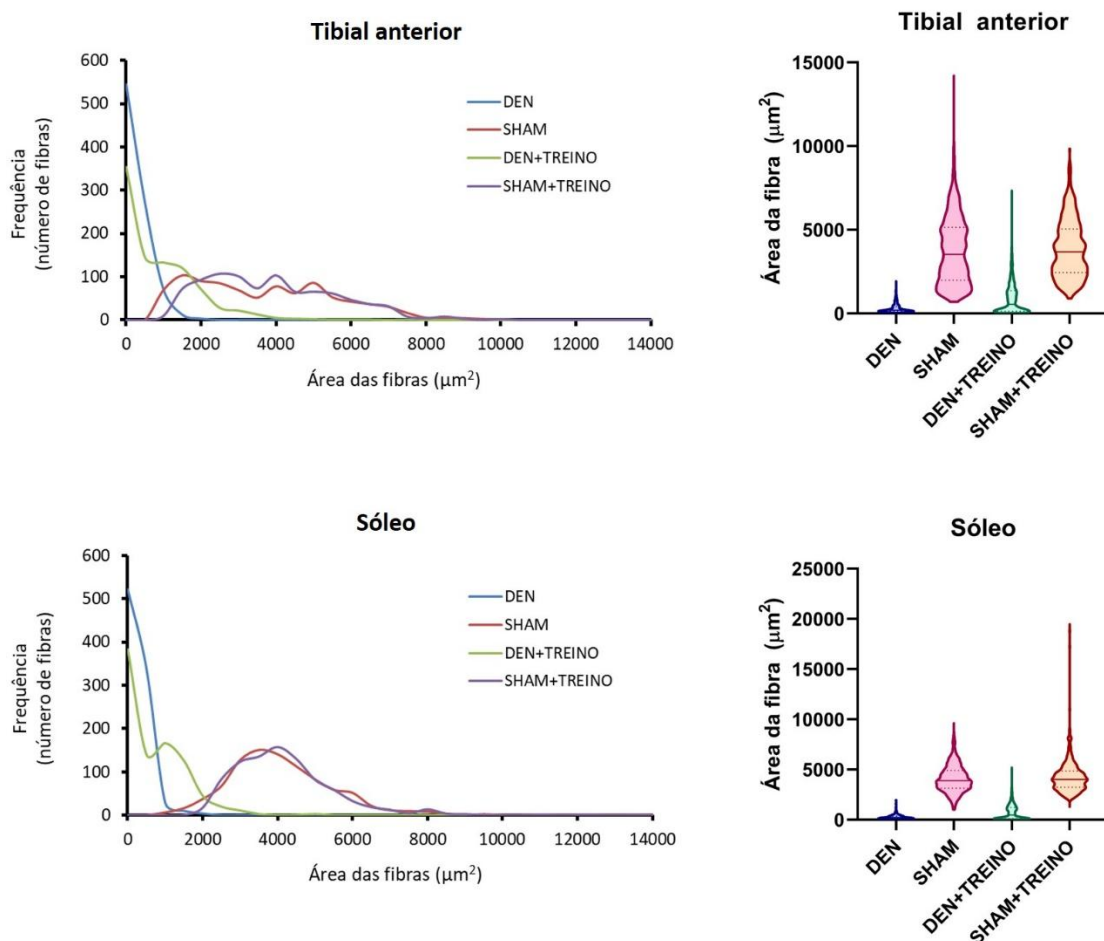
† $p < 0,05$ vs. SHAM+TREINO.

5.3 FIBRAS MUSCULARES

No músculo tibial anterior, a condição de denervação reduziu drasticamente a área das fibras musculares, as quais foram menores em comparação com todas as demais condições ($p < 0,0001$ em todas as comparações – teste de Kolmogorov-Smirnov) (Figura 10). A condição DEN+treino também resultou em fibras musculares com áreas substantivamente menores do que as condições não denervadas ($p < 0,0001$ em todas as comparações), porém ligeiramente maiores do que na condição DEN sem treinamento ($p < 0,0001$; Figura 10). Essas diferenças foram confirmadas pela análise dos intervalos de confiança de 95% (Tabela 3). O treinamento (condição SHAM+treino) também resultou em área de fibras ligeiramente superior à condição SHAM, diferença essa que foi significativa segundo a análise de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,0001$). No entanto, a análise dos intervalos de confiança revelou que eles se cruzam, o que indicando que essa diferença pode ter sido causada pelo número amostral inflado (Tabela 3).

No músculo sóleo, a denervação também reduziu drasticamente as áreas das fibras ($p < 0,0001$ para todas as comparações vs. condição DEN - teste de Kolmogorov-Smirnov) (figura 10). As áreas das fibras também foram significativamente menores na condição DEN+treino vs. ambas as condições sem denervação (SHAM e SHAM+treino, $p < 0,0001$ em ambas as comparações) (Figura 10). A comparação entre as condições DEN e DEN+treino também revelou discreto efeito protetor do treinamento, com áreas ligeiramente maiores na condição DEN+treino ($p < 0,0001$), o que foi confirmado pela avaliação dos intervalos de confiança (Tabela 3). Na condição SHAM, no entanto, o treinamento não foi capaz de aumentar a área das fibras segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (SHAM vs. SHAM+treino, $p = 0,375$), porém os intervalos de confiança marginalmente não se encontram (Tabela 3).

Figura 10 - Frequência das áreas das fibras (gráficos à esquerda) e gráfico de densidade de kernel do tipo violino (gráficos à direita) indicando a distribuição das áreas das fibras entre as 4 condições



Fonte: Produção da autora (2025).

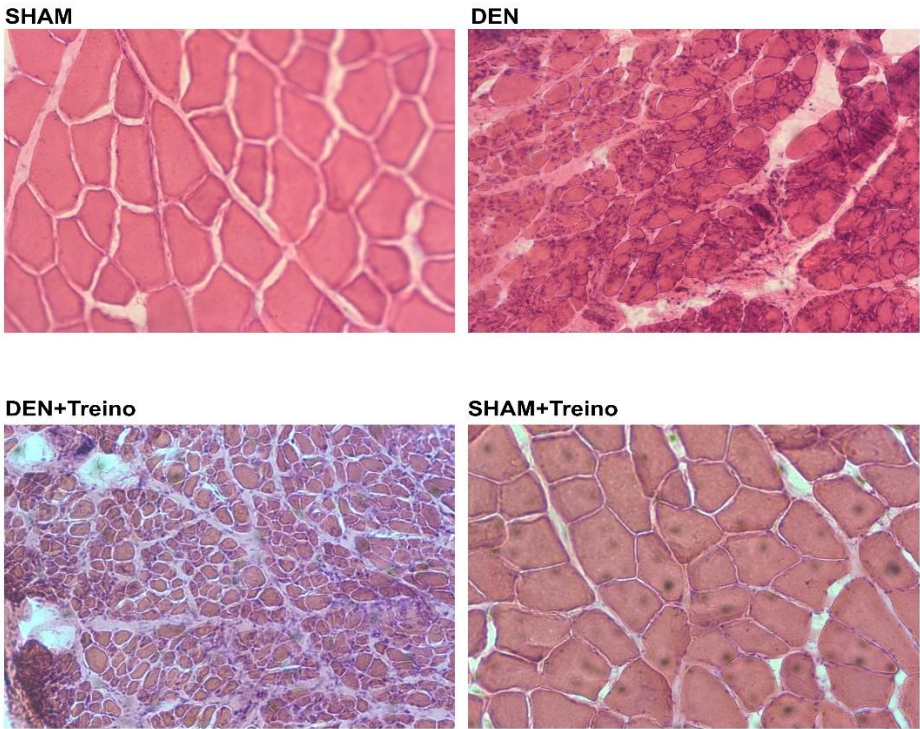
Tabela 3 - Estatística descritiva das áreas de secção transversa das fibras musculares (n=900 por condição, 6 animais)

	DEN	SHAM	DEN+treino	SHAM+treino
Tibial Anterior				
Média	313	3745	894	3864
DP	288	1992	978	1716
Mediana	197	3529	538	3679
IC95%	294-332	3615-3875	830-958	3751-3976
Sóleo				
Média	289	4078	744	4370
DP	254	1353	764	2006
Mediana	213	3886	461	4016
IC95%	273-306	3990-4167	694-794	4239-4501

Nota: Todos os valores estão expressos em unidade de área (μm^2);
DP=Desvio Padrão;
IC95%=Intervalo de confiança de 95%.

As imagens dos cortes histológicos (Figura 11) revelam não apenas uma atrofia extrema das fibras musculares, mas também um aumento de tecido conjuntivo fibrosos entre as fibras musculares, e a presença intensa de infiltrados inflamatórios.

Figura 11 - Imagens representativas de secções transversas do músculo tibial anterior mostrando as características morfológicas do tecido nas 4 condições experimentais

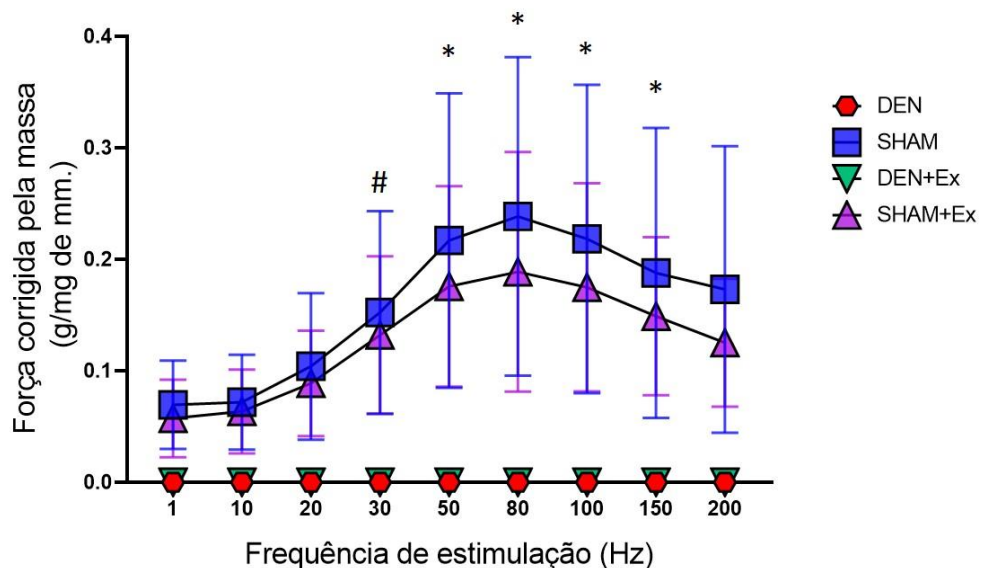


Fonte: Produção da autora (2025).

5.4 EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO E DA IMOBILIZAÇÃO SOBRE A FUNÇÃO CONTRÁTIL MUSCULAR

Nas condições em que houve denervação do nervo isquiático, nenhum dos músculos analisados apresentou qualquer atividade contrátil mensurável e, portanto, todos os valores foram computados como zero. A análise de modelos mistos revelou efeito principal de condição ($F(3, 26)=28,95$; $p<0,0001$), de tempo ($F(8, 62)=7,92$; $p<0,0001$) e de interação condição*tempo ($F(24, 70)=3,05$; $p=0,0001$) sobre a relação força relativa/frequência de estimulação. Todas as condições denervadas produziram significativamente menos força do que as condições SHAM ($p<0,05$ para todos os efeitos simples), não havendo diferenças significantes entre as condições SHAM e SHAM+treino ($t=-0,83$, $p=0,838$). A análise dos efeitos simples indicou que a força relativa aumentou significativamente a partir de 50 Hz em comparação com 1 Hz ($t=-5,6$; $p<0,0001$), mantendo-se maior do que 1 Hz para todas as frequências seguintes (80 Hz: $t=-4,91$, $p=0,0002$; 100 Hz: $t=-4,58$, $p=0,0007$; 150 Hz: $t=-3,27$, $p=0,0428$), exceto para 200 Hz ($t=-2,63$; $p=0,194$) (Figura 12).

Figura 12 - Relação força/frequência dos músculos EDL submetidos a análise de função contrátil *ex-vivo* nas quatro diferentes condições experimentais



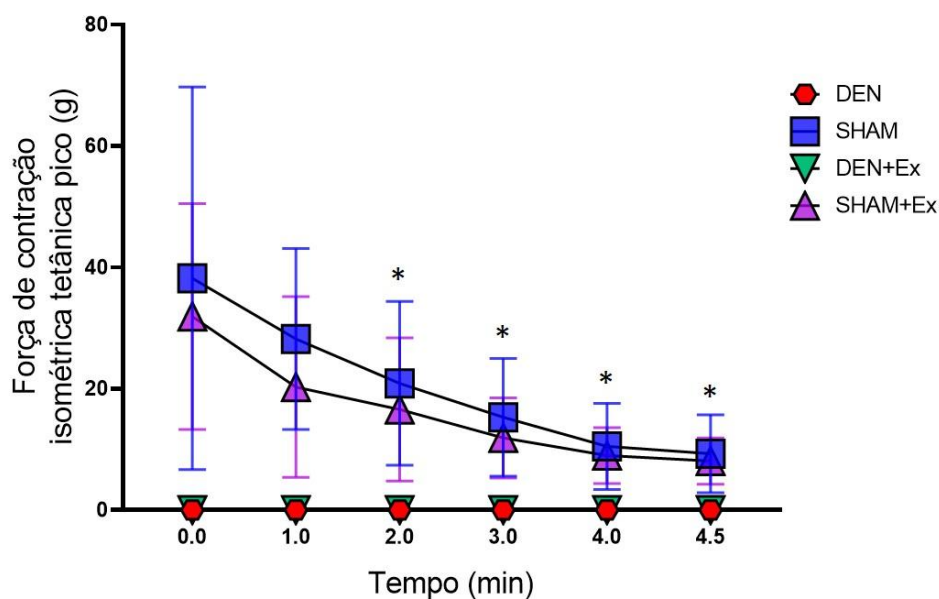
Fonte: Produção da autora (2025).

$p=0,082$ vs. 1 Hz (efeito simples de tempo)

* $p<0,05$ vs. 1 Hz (efeito simples de tempo)

No teste de fadigabilidade, a análise de modelos mistos revelou efeito principal de condição ($F(3, 18)=10,73$, $p=0,0003$), de tempo ($F(5, 31)=6,92$, $p=0,0002$), e de interação condição*tempo ($F(15, 51)=1,98$, $p=0,036$). A análise dos efeitos simples mostrou que a condição SHAM+treino foi significativamente diferente da condição DEN+treino ($t= 3,18$, $p=0,024$), e marginalmente diferente da condição DEN ($t=2,57$, $p=0,082$). A condição SHAM foi significativamente diferente das condições DEN+treino ($t=-3,6$, $p=0,0098$) e DEN ($t=4,58$, $p=0,0012$). Não houve diferença entre as condições SHAM e SHAM+Treino ($t=0,55$, $p=0,927$). A análise dos efeitos simples também revelou uma queda na força ao longo do protocolo de fadiga, com reduções significantes a partir do 2º minuto de teste ($p<0,01$ para todas as comparações – efeito simples de tempo) (Figura 13).

Figura 13 - Fadigabilidade dos músculos EDL submetidos a análise de função contrátil *ex-vivo* nas quatro diferentes condições experimentais



Fonte: Produção da autora (2025).

* $p<0,05$ vs. tempo 0 (efeito simples de tempo).

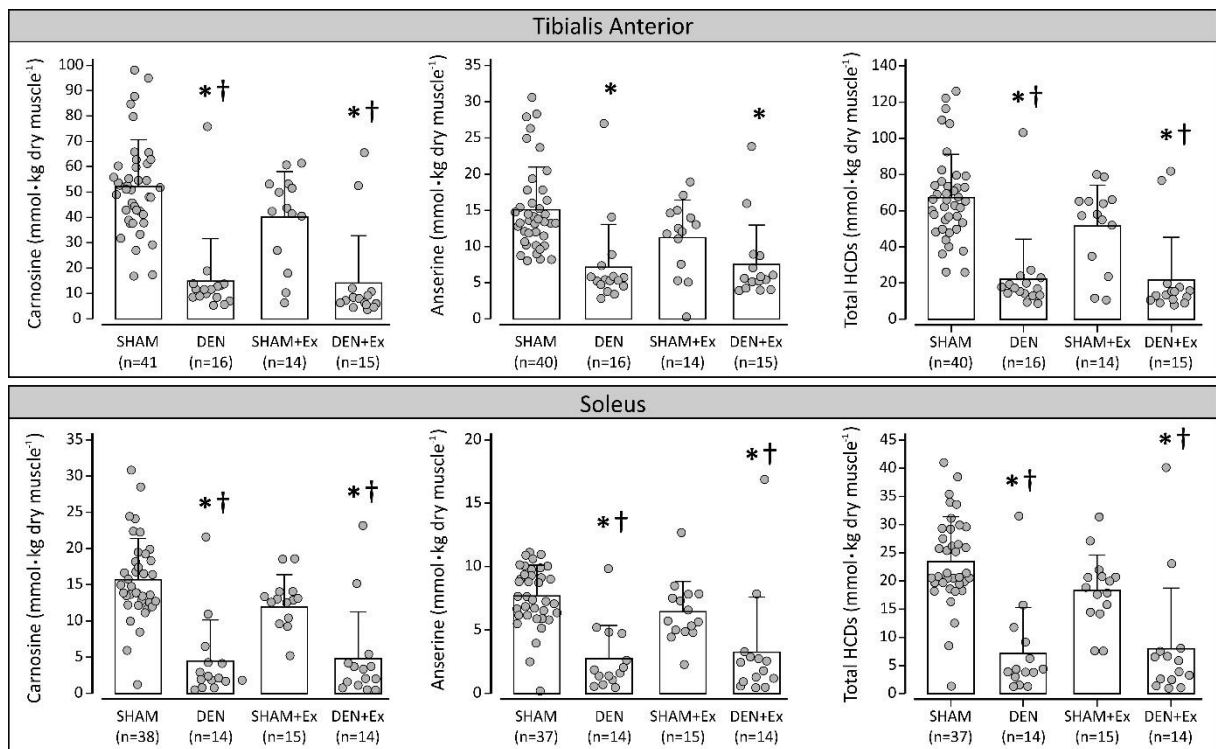
5.5 EFEITOS DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A CONCENTRAÇÃO MUSCULAR DE CARNOSINA E ANSERINA

No músculo tibial anterior, as condições em que houve imobilização (DEN e DEN+treino) apresentaram valores de carnosina ($F(3, 82)=25,6$, $p<0,001$), anserina ($F(3, 81)=10,7$, $p<0,001$) e HCDs totais ($F(3, 81)=21,9$, $p<0,001$) significativamente mais baixos

do que ambas as condições sem imobilização (SHAM e SHAM+treino, $p<0,05$ para todas as comparações), não havendo qualquer diferença entre as condições DEN vs. DEN+treino ou SHAM vs. SHAM+treino (Figura 14).

No músculo sóleo, as condições em que houve imobilização (DEN e DEN+treino) apresentaram valores de carnosina ($F(3, 77)=20,8$, $p<0,001$), anserina ($F(3, 76)=14,3$, $p<0,001$) e HCDs totais ($F(3, 76)=19,8$, $p<0,001$) significativamente mais baixos do que ambas as condições sem imobilização (SHAM e SHAM+treino, $p<0,05$ para todas as comparações), não havendo qualquer diferença entre as condições DEN vs. DEN+treino ou SHAM vs. SHAM+treino (Figura 14).

Figura 14 - Conteúdo de carnosina, anserina e dipeptídeos histidínicos (HCDs) totais nos músculos tibial anterior e sóleo nas 4 condições experimentais



Fonte: Produção da autora (2025).

* $p<0,05$ vs. SHAM

† $p<0,05$ vs. SHAM+treino

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os primeiros resultados do estudo demonstram o efeito do treinamento físico sobre o peso dos animais considerando os diferentes grupos experimentais. Inicialmente, não foram observadas diferenças significativas nos pesos iniciais dos ratos nos grupos estudados, indicando que a alocação dos animais para os grupos foi bem equilibrada e não houve viés na distribuição inicial (Smith et al., 2020). No entanto, ao final do período de estudo, foi notado que o peso final dos ratos difere entre os grupos IMOB e IMOB+TREINO, sendo que os animais que passaram por treinamento apresentaram peso final menor, quando comparados aos animais imobilizados sedentários. Este achado pode ter relação com o fato de que treinamento físico pode influenciar o metabolismo e a composição corporal, levando a uma maior utilização de gordura como fonte de energia e, conseqüentemente, a uma redução do acúmulo de gordura corporal (Thompson et al., 2018).

Este achado é reforçado quando analisamos o peso dos músculos tibial e sóleo após a coleta, pois não houve diferenças significativas entre o peso dos músculos atrofiados e não atrofiados dos animais imobilizados treinados e não treinados e também não foram apresentadas diferenças estatísticas significativas no peso final dos animais quando comparamos os grupos IMOB e CON. Portanto a imobilização por si só não parece afetar significativamente o peso corporal dos ratos.

A atrofia muscular engloba alterações complexas que afetam o músculo esquelético, manifestando-se por mudanças fisiológicas, anatômicas e histológicas. Goldspink (1977) pioneiramente investigou essa temática, explorando transformações morfológicas e fisiológicas em músculos atrofiados e paralisados. Um dos indicadores proeminentes da atrofia é a redução do tamanho muscular, resultando em perda de massa e ligando-se à diminuição de sarcômeros, as unidades contráteis do músculo. Além disso, a diminuição de componentes contráteis, como as miofibrilas, também contribui para a diminuição da massa muscular (Goldspink, 1977).

A atrofia muscular também está associada a uma redução no número de mitocôndrias, prejudicando o metabolismo energético das células musculares, a vascularização do músculo também é afetada, podendo haver uma diminuição no suprimento de oxigênio e nutrientes (Frontera et al., 1986; Andersen et al., 2005).

A análise histológica desempenha um papel vital na compreensão desses efeitos sobre as fibras musculares, revelando diferenças significantes entre grupos e destacando as transformações morfológicas em resposta ao treinamento e imobilização (Kosek et al., 1999).

Ao compararmos grupos de ratos submetidos à imobilização com aqueles que também foram treinados fisicamente, observamos um efeito positivo do treinamento na preservação do tamanho das fibras musculares. As fibras musculares do grupo que passou por imobilização seguida de treinamento (IMOB+TREINO) mostraram diâmetros maiores em comparação com o grupo de imobilização (Imob), tanto para o músculo tibial quanto o sóleo. Isso sugere que o treinamento pode amenizar os impactos negativos da imobilização nas fibras musculares. Além disso, a análise das fibras musculares das patas saudáveis entre os grupos indicou que a atividade física regular, mesmo em condições normais, pode preservar o tamanho dessas fibras (Smith et al., 2020).

No que tange ao teor intramuscular de carnosina e anserina, a análise comparativa entre os grupos não elucidou diferenças estatisticamente significativas em relação a esses níveis. Isso se aplica tanto à comparação entre músculos ativos (IMOB+TREINO) e inativos (Imob), quanto entre os músculos saudáveis dos grupos IMOB e CON. Surpreendentemente, as concentrações de carnosina e anserina não apresentaram variações discerníveis entre os grupos de músculos ativos e inativos, contrariando algumas expectativas iniciais. A ausência de diferenças significativas sugere que, pelo menos no período de análise e nas condições experimentais estabelecidas, o treinamento físico não resultou em alterações mensuráveis nos níveis de carnosina e anserina nos músculos. Essa constatação é congruente com estudos anteriores que enfatizam a complexidade das respostas metabólicas ao exercício (Kendrick et al., 2009; Baguet et al., 2011).

No entanto, uma diferença notável foi observada quando os músculos saudáveis dos grupos IMOB e CON foram comparados com os músculos atrofiados dos mesmos grupos. Nesse caso, os músculos saudáveis exibiram concentrações significativamente maiores de carnosina e anserina em relação aos músculos atrofiados. Isso sugere que a atrofia muscular induzida pela imobilização pode estar associada a uma redução nas concentrações desses compostos tamponantes (Smith et al., 2009).

É importante ressaltar que a ausência de diferenças significativas nos níveis de carnosina e anserina entre os grupos ativos e inativos podem ser influenciadas por uma série de fatores, como a duração do período de treinamento, a intensidade do exercício e a resposta individual dos animais. A influência do treinamento também pode ser observada quanto aos níveis de força e fadiga analisados no teste de contratilidade. Uma possível explicação para a ausência de diferenças pode estar relacionada à especificidade do protocolo de treinamento empregado. O tipo, duração e intensidade do treinamento podem não ter sido suficientes para

desencadear modificações substanciais na contratilidade muscular e na capacidade de fadiga nos grupos treinados (Artioli et al., 2010; Hobson et al., 2012).

Outra consideração importante é a adaptabilidade dos músculos diante do estímulo do treinamento. É possível que os músculos tenham desenvolvido mecanismos de compensação ou regulação para manter a contratilidade e a resistência à fadiga estáveis, independentemente do treinamento. Isso poderia explicar a ausência de diferenças marcantes nos resultados entre os grupos. Além disso, a sensibilidade dos métodos utilizados para avaliar a contratilidade muscular e a fadiga também pode afetar a detecção de alterações sutis nos grupos (Enoka et al., 2008, Dutka et al., 2012).

A realização do treinamento em água por 10 semanas apresenta uma consideração interessante. O ambiente aquático proporciona uma resistência hidrodinâmica única que pode influenciar a sobrecarga imposta aos músculos durante o exercício. A resistência da água pode variar dependendo da intensidade e da técnica do movimento, o que pode ter implicações na ativação muscular, na distribuição de cargas e no recrutamento de fibras musculares. Portanto, o treinamento em água pode ter contribuído para modulações específicas nas propriedades musculares, que por sua vez podem ter influenciado os resultados relacionados à atrofia e ao treinamento (Barbosa et al.; Colado et al., 2009).

Além disso, o período de análise também pode ter influenciado os resultados obtidos. A avaliação realizada dois dias após o término do treinamento em água pode não ter capturado completamente os efeitos em curto prazo desencadeados pelo treinamento. A enzima carnosina sintase, sendo uma enzima de atividade mais lenta, pode demandar um período de tempo maior para que suas adaptações se tornem plenamente evidentes. Considerando que as enzimas frequentemente se ajustam para otimizar a função metabólica em resposta ao estímulo do treinamento, um tempo de treinamento prolongado poderia ser justificável para permitir que a carnosina sintase atinja níveis mais significativos de expressão e atividade. Isso pode ser particularmente importante para entender completamente o papel do treinamento na modulação da carnosina intramuscular.

A enzima carnosina sintase apresenta um desafio metodológico significativo devido à sua dificuldade de detecção e limitação técnica em sua quantificação. No contexto do presente estudo, a ausência de uma análise direta da atividade enzimática pode ter limitado a compreensão dos mecanismos que regulam os níveis de carnosina muscular em resposta ao protocolo experimental aplicado.

No entanto, ao lidar com a atrofia muscular e seus efeitos sobre enzimas, transportadores e mecanismos relacionados à carnosina, um tempo prolongado de atrofia pode de fato apresentar desafios. Embora um período mais longo de atrofia possa oferecer insights mais profundos sobre as respostas moleculares e adaptativas dos músculos durante a perda de massa muscular, pode também apresentar desvantagens, como a potencial degradação mais extensa de proteínas e a possibilidade de adaptações compensatórias não diretamente relacionadas à carnosina (Goldspink, 1977; Sandri, 2008).

Assim, um tempo mais curto de atrofia poderia ter permitido uma melhor avaliação dos efeitos do treinamento e de possíveis intervenções. Em contra partida, estes dados vão contra ao período necessário para a ação da enzima carnosina sintase, que precisaria de um tempo maior de experimento para sua ação.

Uma abordagem cuidadosa para definir os períodos de treinamento e atrofia, combinada com avaliações regulares e detalhadas das respostas moleculares, pode oferecer insights valiosos sobre a regulação da carnosina e seus efeitos em diferentes contextos fisiológicos. Além disso, a consideração de estudos complementares que explorem uma variedade de durações de treinamento, atrofia e coleta pode fornecer uma compreensão mais completa das complexas interações envolvendo a carnosina em músculos esqueléticos (Johnson et al., 2021).

A compreensão dos resultados obtidos em nosso estudo sobre a atrofia muscular e os efeitos do treinamento em água requer uma análise cuidadosa da duração dos protocolos empregados. A indução da atrofia muscular por um período relativamente longo de 12 semanas pode ter desempenhado um papel crucial nos achados observados. Durante esse período, o músculo pode ter passado por adaptações complexas para lidar com a inatividade, o que pode ter impactado os resultados do treinamento subsequente (Brown et al., 2018).

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Com base nas extensivas investigações conduzidas no âmbito deste estudo, uma abordagem abrangente foi realizada para compreender o impacto da atividade e inatividade muscular nas concentrações e metabolismo da carnosina muscular. Este estudo demonstrou que a paralisia muscular pós-desnervação de longo prazo reduziu drasticamente o conteúdo muscular de carnosina e anserina. Essa redução não depende de diferenças na dieta, idade, sexo e tipo de fibra, e demonstra que a inatividade muscular pode ser um forte modulador do conteúdo de HCDs musculares, pelo menos em condições extremas. O treinamento físico, por outro lado, não afetou os HCDs musculares.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry (Mosc)*. 2000 Jul;65(7):757-65. PMID: 10951092.
- Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha AH Jr. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2010 Jun;42(6):1162-73. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181c74e38. PMID: 20479615.
- Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. *Eur J Sport Sci*. 2019 Feb;19(1):30-9. doi: 10.1080/17461391.2018.1444096. Epub 2018 Mar 4. PMID: 29502490.
- Asatoor AM, Bando JK, Lant AF, Milne MD, Navab F. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. *Gut*. 1970 Mar;11(3):250-4. doi: 10.1136/gut.11.3.250. PMID: 5423906; PMCID: PMC1411426.
- Baguet A, Everaert I, De Naeyer H, Reyngoudt H, Stegen S, Beeckman S, Achten E, Vanhee L, Volckaert A, Petrovic M, Taes Y, Derave W. Effects of sprint training combined with vegetarian or mixed diet on muscle carnosine content and buffering capacity. *Eur J Appl Physiol*. 2011 Oct;111(10):2571-80. doi: 10.1007/s00421-011-1877-4. Epub 2011 Mar 4. PMID: 21373871.
- Baguet A, Koppo K, Pottier A, Derave W. Beta-alanine supplementation reduces acidosis but not oxygen uptake response during high-intensity cycling exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Feb;108(3):495-503. doi: 10.1007/s00421-009-1225-0. Epub 2009 Oct 16. PMID: 19841932.
- Blancquaert L, Baba SP, Kwiatkowski S, Stautemas J, Stegen S, Barbaresi S, Chung W, Boakye AA, Hoetker JD, Bhatnagar A, Delanghe J, Vanheel B, Veiga-da-Cunha M, Derave W, Everaert I. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. *J Physiol*. 2016 Sep 1;594(17):4849-63. doi: 10.1113/JP272050. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27062388; PMCID: PMC5009790.
- Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013 Oct;93(4):1803-45. doi: 10.1152/physrev.00039.2012. PMID: 24137022.
- Burnham R, Martin T, Stein R, Bell G, MacLean I, Steadward R. Skeletal muscle fibre type transformation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1997 Feb;35(2):86-91. doi: 10.1038/sj.sc.3100364. PMID: 9044514.
- Carvalho VH, Oliveira AHS, de Oliveira LF, da Silva RP, Di Mascio P, Gualano B, Artioli GG, Medeiros MHG. Exercise and β -alanine supplementation on carnosine-acrolein adduct in skeletal muscle. *Redox Biol*. 2018 Sep;18:222-8. doi: 10.1016/j.redox.2018.07.009. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30053728; PMCID: PMC6077140.
- Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, Doig CL, Sale C. Physiological roles of carnosine in myocardial function and health. *Adv Nutr*. 2022 Oct 2;13(5):1914-29. doi: 10.1093/advances/nmac059. PMID: 35689661; PMCID: PMC9526863.

da Eira Silva V, Painelli VS, Shinjo SK, Ribeiro Pereira W, Cilli EM, Sale C, Gualano B, Otaduy MC, Artioli GG. Magnetic resonance spectroscopy as a non-invasive method to quantify muscle carnosine in humans: a comprehensive validity assessment. *Sci Rep*. 2020 Mar 17;10(1):4908. doi: 10.1038/s41598-020-61587-x. PMID: 32184463; PMCID: PMC7078313.

de Salles Painelli V, Nemezio KM, Pinto AJ, Franchi M, Andrade I, Riani LA, Saunders B, Sale C, Harris RC, Gualano B, Artioli GG. High-intensity interval training augments muscle carnosine in the absence of dietary beta-alanine intake. *Med Sci Sports Exerc*. 2018 Nov;50(11):2242-2252. doi: 10.1249/MSS.0000000000001697. PMID: 30334920.

de Souza Gonçalves L, Pereira WR, da Silva RP, Yamaguchi GC, Carvalho VH, Vargas BS, Jensen L, de Medeiros MHG, Roschel H, Artioli GG. Anserine is expressed in human cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rep*. 2023 Oct;11(19):e15833. doi: 10.14814/phy2.15833. PMID: 37771070; PMCID: PMC10539627.

Décombaz J, Beaumont M, Vuichoud J, Bouisset F, Stellingwerff T. Effect of slow-release β -alanine tablets on absorption kinetics and paresthesia. *Amino Acids*. 2012 Jul;43(1):67-76. doi: 10.1007/s00726-011-1169-7. Epub 2011 Dec 3. Erratum in: *Amino Acids*. 2013 Oct;45(4):1015. PMID: 22139410.

Derave W, Everaert I, Beeckman S, Baguet A. Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Med*. 2010 Mar 1;40(3):247-63. doi: 10.2165/11530310-000000000-00000. PMID: 20199122.

Derave W, Ozdemir MS, Harris RC, Pottier A, Reyngoudt H, Koppo K, Wise JA, Achten E. beta-alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Nov;103(5):1736-43. doi: 10.1152/jappphysiol.00397.2007. Epub 2007 Aug 9. PMID: 17690198.

Dolan E, Saunders B, Dantas WS, Murai IH, Roschel H, Artioli GG, Harris R, Bicudo JEPW, Sale C, Gualano B. A Comparative study of hummingbirds and chickens provides mechanistic insight on the histidine containing dipeptide role in skeletal muscle metabolism. *Sci Rep*. 2018 Oct 3;8(1):14788. doi: 10.1038/s41598-018-32636-3. PMID: 30283073; PMCID: PMC6170442.

Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Van Schaftingen E. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem*. 2010 Mar 26;285(13):9346-56. doi: 10.1074/jbc.M109.095505. Epub 2010 Jan 22. PMID: 20097752; PMCID: PMC2843183.

Dunnett M, Harris RC. Influence of oral beta-alanine and L-histidine supplementation on the carnosine content of the gluteus medius. *Equine Vet J Suppl*. 1999 Jul;(30):499-504. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb05273.x. PMID: 10659307.

Dunnett, MHRC. Carnosine and Taurine contents of type I, IIA and IIB fibres in the middle gluteal muscle of the thoroughbred horse. *Equine Veterinary J*. 1995; 27(S18):214-7. doi: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb04922.x.

Dutka TL, Lambolley CR, McKenna MJ, Murphy RM, Lamb GD. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Mar;112(5):728-36. doi: 10.1152/jappphysiol.01331.2011. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22174397.

Edge J, Eynon N, McKenna MJ, Goodman CA, Harris RC, Bishop DJ. Altering the rest interval during high-intensity interval training does not affect muscle or performance adaptations. *Exp Physiol*. 2013 Feb;98(2):481-90. doi: 10.1113/expphysiol.2012.067603. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22923232.

Everaert I, De Naeyer H, Taes Y, Derave W. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2013 May;113(5):1169-79. doi: 10.1007/s00421-012-2540-4. Epub 2012 Nov 4. PMID: 23124893.

Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*. 1994 Apr 7;368(6471):563-6. doi: 10.1038/368563a0. PMID: 8139693.

Gardner ML, Illingworth KM, Kelleher J, Wood D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol*. 1991 Aug;439:411-22. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018673. PMID: 1910085; PMCID: PMC1180115.

Gonçalves LS, Kratz C, Santos L, Carvalho VH, Sales LP, Nemezio K, Longobardi I, Riani LA, Lima MMO, Saito T, Fernandes AL, Rodrigues J, James RM, Sale C, Gualano B, Geloneze B, de Medeiros MHG, Artioli GG. Insulin does not stimulate β -alanine transport into human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020 Apr 1;318(4):C777-C786. doi: 10.1152/ajpcell.00550.2019. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32101455.

Gonçalves LS, Sales LP, Saito TR, Campos JC, Fernandes AL, Natali J, Jensen L, Arnold A, Ramalho L, Bechara LRG, Esteca MV, Correa I, Sant'Anna D, Ceroni A, Michelini LC, Gualano B, Teodoro W, Carvalho VH, Vargas BS, Medeiros MHG, Baptista IL, Irigoyen MC, Sale C, Ferreira JCB, Artioli GG. Histidine dipeptides are key regulators of excitation-contraction coupling in cardiac muscle: evidence from a novel CARNS1 knockout rat model. *Redox Biol*. 2021 Aug;44:102016. doi: 10.1016/j.redox.2021.102016. Epub 2021 May 20. PMID: 34038814; PMCID: PMC8144739.

González-Estrada MT, Freeman WJ. Effects of carnosine on olfactory bulb EEG, evoked potentials and DC potentials. *Brain Res*. 1980 Dec 8;202(2):373-86. doi: 10.1016/0006-8993(80)90149-3. PMID: 6254611.

Gross M, Boesch C, Bolliger CS, Norman B, Gustafsson T, Hoppeler H, Vogt M. Effects of beta-alanine supplementation and interval training on physiological determinants of severe exercise performance. *Eur J Appl Physiol*. 2014 Feb;114(2):221-34. doi: 10.1007/s00421-013-2767-8. Epub 2013 Nov 9. PMID: 24213883.

Grimby G, Broberg C, Krotkiewska I, Krotkiewski M. Muscle fiber composition in patients with traumatic cord lesion. *Scand J Rehabil Med*. 1976;8(1):37-42. PMID: 132700.

Hannah R, Stannard RL, Minshull C, Artioli GG, Harris RC, Sale C. β -Alanine supplementation enhances human skeletal muscle relaxation speed but not force production capacity. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Mar 1;118(5):604-12. doi: 10.1152/jappphysiol.00991.2014. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25539942.

Harris RC, Tallon MJ, Dunnett M, Boobis L, Coakley J, Kim HJ, Fallowfield JL, Hill CA, Sale C, Wise JA. The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*. 2006 May;30(3):279-89. doi: 10.1007/s00726-006-0299-9. Epub 2006 Mar 24. PMID: 16554972.

Hill CA, Harris RC, Kim HJ, Harris BD, Sale C, Boobis LH, Kim CK, Wise JA. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*. 2007 Feb;32(2):225-33. doi: 10.1007/s00726-006-0364-4. Epub 2006 Jul 28. PMID: 16868650.

Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett*. 1995 Aug 28;371(1):81-5. doi: 10.1016/0014-5793(95)00849-5. PMID: 7664889.

Hipkiss AR. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Aug;30(8):863-8. doi: 10.1016/s1357-2725(98)00060-0. PMID: 9744078.

Hipkiss AR. Glycotoxins: Dietary and metabolic origins; possible amelioration of neurotoxicity by carnosine, with special reference to Parkinson's Disease. *Neurotox Res*. 2018 Jul;34(1):164-72. doi: 10.1007/s12640-018-9867-5. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29417441.

Hirsch JD, Grillo M, Margolis FL. Ligand binding studies in the mouse olfactory bulb: identification and characterization of a L-[3H] carnosine binding site. *Brain Res*. 1978 Dec 15;158(2):407-22. doi: 10.1016/0006-8993(78)90684-4. PMID: 213175.

Hobson RM, Saunders B, Ball G, Harris RC, Sale C. Effects of β -alanine supplementation on exercise performance: a meta-analysis. *Amino Acids*. 2012 Jul;43(1):25-37. doi: 10.1007/s00726-011-1200-z. Epub 2012 Jan 24. PMID: 22270875; PMCID: PMC3374095.

Hoetker D, Chung W, Zhang D, Zhao J, Schmidtke VK, Riggs DW, Derave W, Bhatnagar A, Bishop D, Baba SP. Exercise alters and β -alanine combined with exercise augments histidyl dipeptide levels and scavenges lipid peroxidation products in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2018 Dec 1;125(6):1767-78. doi: 10.1152/jappphysiol.00007.2018. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30335580; PMCID: PMC10392632.

Kalyankar GD, Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. *J Biol Chem*. 1959 Dec;234:3210-8. PMID: 14404206.

Kendrick IP, Harris RC, Kim HJ, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, Bui TT, Smith M, Wise JA. The effects of 10 weeks of resistance training combined with beta-alanine supplementation on whole body strength, force production, muscular endurance and body composition. *Amino Acids*. 2008 May;34(4):547-54. doi: 10.1007/s00726-007-0008-3. Epub 2008 Jan 4. PMID: 18175046.

Kendrick IP, Kim HJ, Harris RC, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, Bui TT, Wise JA. The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. *Eur J Appl Physiol*. 2009 May;106(1):131-8. doi: 10.1007/s00421-009-0998-5. Epub 2009 Feb 12. PMID: 19214556.

Mannion AF, Jakeman PM, Willan PL. Effects of isokinetic training of the knee extensors on high-intensity exercise performance and skeletal muscle buffering. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1994;68(4):356-61. doi: 10.1007/BF00571457. PMID: 8055896.

Matthews JJ, Artioli GG, Turner MD, Sale C. The Physiological Roles of Carnosine and β -Alanine in exercising human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2019 Oct;51(10):2098-108. doi: 10.1249/MSS.0000000000002033. PMID: 31083045.

Nemezio K, Yamaguchi GC, Ramkrapes APB, Schulz ML, Baptista IL, Riani LA, Gonçalves LS, Sale C, Medeiros MHG, Gualano B, Artioli GG. The role of chronic muscle (in)activity on carnosine homeostasis: a study with spinal cord-injured athletes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2021 Jun 1;320(6):R824-R832. doi: 10.1152/ajpregu.00360.2020. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33789445.

Parkhouse WS, McKenzie DC, Hochachka PW, Ovalle WK. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *J Appl Physiol* (1985). 1985 Jan;58(1):14-7. doi: 10.1152/jappl.1985.58.1.14. PMID: 3968004.

Rezende NS, Swinton P, de Oliveira LF, da Silva RP, da Eira Silva V, Nemezio K, Yamaguchi G, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Dolan E. The muscle carnosine response to beta-alanine supplementation: a systematic review with Bayesian individual and aggregate data e-max model and meta-analysis. *Front Physiol*. 2020 Aug 14;11:913. doi: 10.3389/fphys.2020.00913. PMID: 32922303; PMCID: PMC7456894.

Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM, Harris RC. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids*. 2013 Jun;44(6):1477-91. doi: 10.1007/s00726-013-1476-2. Epub 2013 Mar 12. PMID: 23479117.

Santos L, Gonçalves LS, Bagheri-Hanei S, Möller GB, Sale C, James RM, Artioli GG. Insulin stimulates β -alanine uptake in skeletal muscle cells in vitro. *Amino Acids*. 2021 Nov;53(11):1763-6. doi: 10.1007/s00726-021-03090-9. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34676442; PMCID: PMC8592947.

Saunders B, DE Salles Painelli V, DE Oliveira LF, DA Eira Silva V, DA Silva RP, Riani L, Franchi M, Gonçalves LS, Harris RC, Roschel H, Artioli GG, Sale C, Gualano B. Twenty-four weeks of β -alanine supplementation on carnosine content, related genes, and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2017 May;49(5):896-906. doi: 10.1249/MSS.0000000000001173. PMID: 28157726.

Saunders B, Elliott-Sale K, Artioli GG, Swinton PA, Dolan E, Roschel H, Sale C, Gualano B. β -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2017 Apr;51(8):658-69. doi: 10.1136/bjsports-2016-096396. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27797728.

Sewell DA, Harris RC, Marlin DJ, Dunnett M. Estimation of the carnosine content of different fibre types in the middle gluteal muscle of the thoroughbred horse. *J Physiol.* 1992 Sep;455:447-53. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019310. PMID: 1484359; PMCID: PMC1175653.

Stout JR, Cramer JT, Zoeller RF, Torok D, Costa P, Hoffman JR, Harris RC, O'Kroy J. Effects of beta-alanine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue and ventilatory threshold in women. *Amino Acids.* 2007;32(3):381-6. doi: 10.1007/s00726-006-0474-z. Epub 2006 Nov 30. PMID: 17136505.

Suzuki Y, Ito O, Takahashi H, Takamatsu K. The effects of sprint training on skeletal muscle carnosine in humans. *Int J Sport Health Sci.* 2004;2:105-10. doi: 10.5432/ijshs.2.105.

Tallon MJ, Harris RC, Boobis LH, Fallowfield JL, Wise JA. The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. *J Strength Cond Res.* 2005 Nov;19(4):725-9. doi: 10.1519/041018.1. PMID: 16287364.

Vistoli G, Colzani M, Mazzolari A, Gilardoni E, Rivaletto C, Carini M, Aldini G. Quenching activity of carnosine derivatives towards reactive carbonyl species: focus on α -(methylglyoxal) and β -(malondialdehyde) dicarbonyls. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Oct 21;492(3):487-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.069. Epub 2017 Aug 20. PMID: 28834691.

Yamashita T, Shimada S, Guo W, Sato K, Kohmura E, Hayakawa T, Takagi T, Tohyama M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem.* 1997 Apr 11;272(15):10205-11. doi: 10.1074/jbc.272.15.10205. PMID: 9092568.