

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

Rafael Ferreira Ribeiro

**Os efeitos agudos do exercício de alta intensidade nos genes
relacionados ao metabolismo de carnosina muscular em homens
onívoros e vegetarianos**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr n° 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca FMUSP)

**SÃO PAULO
2025**

Rafael Ferreira Ribeiro

**Os efeitos agudos do exercício de alta intensidade nos genes
relacionados ao metabolismo de carnosina muscular em homens
onívoros e vegetarianos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências do
Sistema Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Bryan Saunders

(Versão corrigida. Resolução CoPGr n° 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está 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

Ribeiro, Rafael Ferreira

Os efeitos agudos do exercício de alta intensidade nos genes relacionados ao metabolismo de carnosina muscular em homens onívoros e vegetarianos / Rafael Ferreira Ribeiro; Bryan Saunders, orientador. -- São Paulo, 2025.

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

1.beta-alanina 2.Treinamento intervalado de alta intensidade
3.Expressão gênica 4.Dieta I.Saunders, Bryan, orient. II.Título

USP/FM/DBD-518/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Agradecimentos

Gostaria de iniciar agradecendo minha família — meus pais, minhas avós e Luna — pelo amor incondicional, pela paciência e pelo apoio em todas as etapas desta trajetória. Foram eles que com muito carinho e compreensão conseguiram me acalmar em momentos tensos e difíceis dessa jornada. Esta Tese é dedicada principalmente a eles, que me entendem como sou e me ensinaram a ser um ser humano bom e empático.

Aos meus amigos, sempre presentes, tanto nos momentos felizes, quanto nas épocas mais desafiadoras, agradeço pela companhia, pelas conversas e pelos encontros que tornaram o caminho mais leve. Em especial, Taca, Tuila, Sasaki, Juca, Pelanka e PH, pela amizade sincera, pela força de sempre e as cervejas de alívio.

Às minhas chefes no Centro Universitário São Camilo, Sandra e Mônica, pela confiança, incentivo e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho. Sempre me apoiando e facilitando o árduo processo de escrita e execução de um doutorado.

Agradeço também aos professores e colegas da São Camilo, em especial aos do curso de Nutrição e à Luciane e Letícia do NECD, pelo companheirismo e pela troca constante que enriqueceu não apenas minha prática docente, mas também minha formação pessoal e científica.

Ao grupo do laboratório, pelo ambiente colaborativo e empático, além das trocas que com certeza ampliaram minha visão científica. De modo especial, agradeço à iniciação científica Guilherme Bracco, pela dedicação, curiosidade e parceria nas etapas experimentais.

Por fim, expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Bryan Saunders, pela orientação precisa, paciência imensurável e estímulo à pesquisa. Sua dedicação à ciência e à formação de pesquisadores foi fundamental para a realização deste trabalho. Com seu senso único de pesquisador e ser humano, consegue deixar o ambiente acadêmico mais leve e precioso, tanto para o estímulo do aprender quando para a realização dos processos e experimentos de uma pós-graduação.

RESUMO

Ribeiro RF. Os efeitos agudos do exercício de alta intensidade nos genes relacionados ao metabolismo de carnosina muscular em homens onívoros e vegetarianos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

A carnosina é um dipeptídeo intramuscular com funções relevantes em contextos de exercício intenso, sobretudo pelo tamponamento de íons H^+ , além de integrar vias de proteção oxidativa, modulação do Ca^{2+} e proteção antiglicação. Embora a suplementação de β -alanina seja reconhecida por aumentar o conteúdo muscular de carnosina, a influência do exercício físico sobre esse parâmetro ainda permanece incerta. Apesar de respostas inconsistentes terem sido relatadas na literatura, dados de nosso grupo demonstraram que 12 semanas de exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) resultaram em aumento do conteúdo muscular de carnosina em indivíduos vegetarianos. Esse aumento ocorreu sem alterações detectáveis na expressão gênica, possivelmente devido ao momento das coletas, realizadas em repouso antes e pelo menos 72 h após o último exercício, e não nas horas subsequentes ao exercício, quando as respostas transcricionais são mais evidentes e transitórias. É plausível, contudo, que o perfil de expressão gênica nas horas subsequentes a uma sessão de HIIT possa contribuir para explicar os aumentos no conteúdo muscular de carnosina observados em estudos anteriores, sugerindo um possível papel das respostas moleculares agudas na mediação das adaptações crônicas associadas ao treinamento. Assim, alterações precoces na expressão gênica poderiam orientar a interpretação de adaptações crônicas de carnosina muscular já observadas. O objetivo deste estudo foi investigar se uma sessão de HIIT altera agudamente a expressão dos genes TauT, PAT1, CARNS e CNDP2 em onívoros e vegetarianos. Biópsias musculares de 21 voluntários (9 onívoros, 7 vegetarianos e 5 controles) foram obtidas em repouso (basal) e 1h, 3h e 24h após uma sessão HIIT (ou após biópsia basal no grupo controle). A expressão foi quantificada por RT-qPCR e analisada por ANCOVA considerando “tempo” como covariável. A ANCOVA com CT apenas sinalizou alguma significância da interação grupo x tempo para o gene CNDP2 ($p=0,064$). Entretanto, ao excluir-se o grupo controle, a ANCOVA revelou interação significativa para CNDP2 ($p = 0,038$), com trajetória ascendente em

onívoros e descendente em vegetarianos, evidenciando possível modulação dependente do padrão alimentar. Esse comportamento é compatível com maior turnover pós-exercício em onívoros e potencial resposta conservadora em vegetarianos, possivelmente alinhada a adaptações crônicas de acúmulo previamente descritas nesse grupo. Em síntese, uma sessão de HIIT não modulou globalmente os genes TauT, PAT1 e CARNS até 24h, mas revelou divergência específica de CNDP2 entre onívoros e vegetarianos, sugerindo que a via de degradação poderia ser um componente importante da maquinaria da carnosina para responder de forma aguda a atividade física e dieta.

Palavras-chave: dieptídeo contendo histidina, beta-alanina, treinamento intervalado de alta intensidade, expressão gênica, dieta.

ABSTRACT

Ribeiro RF. The acute effects of high-intensity exercise on genes related to muscle carnosine metabolism in omnivorous and vegetarian men [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, University of São Paulo; 2025.

Carnosine is an intramuscular dipeptide with relevant functions in the context of intense exercise, particularly through its capacity to buffer H^+ ions, as well as its roles in oxidative protection pathways, Ca^{2+} modulation, and antiglycation defense. Although β -alanine supplementation is well known to increase muscle carnosine content, the influence of physical exercise on this parameter remains uncertain. Despite inconsistent responses reported in the literature, data from our group demonstrated that 12 weeks of high-intensity interval training (HIIT) increased muscle carnosine content in vegetarians. This increase occurred in the absence of changes in gene expression, possibly due to the timing of the biopsies, which were obtained at rest before training and at least 72 h after the last exercise session, rather than in the hours following exercise, when transcriptional responses are more evident and transient. It is plausible that the gene expression profile in the hours following a HIIT session could help explain the increases in muscle carnosine content reported in previous studies, suggesting a role for acute molecular responses in mediating the chronic adaptations associated with training. Thus, early changes in gene expression could help interpret the chronic adaptations in muscle carnosine already described. The aim of this study was to investigate whether a single session of HIIT acutely alters the expression of TauT, PAT1, CARNS, and CNDP2 genes in omnivores and vegetarians. Muscle biopsies from 21 volunteers (9 omnivores, 7 vegetarians, and 5 controls) were obtained at rest (baseline) and 1 h, 3 h, and 24 h after a HIIT session (or after the baseline biopsy in the control group). Gene expression was quantified by RT-qPCR and analyzed ANCOVA, considering “time” as a covariate. ANCOVA including the control group showed weak evidence against the null hypothesis (H_0) for a time x group effect in CNDP2 ($p = 0.064$). However, when the control group was excluded, ANCOVA revealed evidence against H_0 for CNDP2 ($p = 0.038$), showing an upward trajectory in omnivores and a downward trajectory in vegetarians, indicating possible modulation dependent on dietary pattern. This behavior is compatible with greater post-exercise turnover in omnivores and a potential conservative response in

vegetarians, possibly aligned with previously described chronic accumulation adaptations in this group. In summary, a single session of HIIT did not globally modulate TauT, PAT1, or CARNS expression up to 24 h post-exercise but revealed a specific divergence in CNDP2 between omnivores and vegetarians, suggesting that the degradation pathway may be an important component of the carnosine machinery in responding acutely to physical activity and diet.

Keywords: Histidine-containing dipeptide, beta-alanine, high-intensity interval training, gene expression, diet.

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma da divisão dos voluntários e das desistências para a obtenção dos grupos: On, CT e Vg.

Figura 2. Desenho experimental da sessão do HIIT (grupos On e Vg) e do grupo CT (sem HIIT) .

Figura 3. Gráfico para obtenção de D-max. O ponto vermelho, representa as coordenadas para a o D-max.

Figura 4. Tendências lineares de alteração na expressão gênica ao longo da variação do tempo para os genes TauT, PAT1, CARNS e CNDP2 nos grupos onívoros submetidos ao HIIT (On), vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg) e onívoros não submetidos ao HIIT (CT) ($p > 0,05$).

Figura 5. Tendência linear da alteração da expressão do gene CNDP2 ao longo do tempo sem o grupo de onívoros não submetidos ao HIIT (CT), comparando apenas os grupos onívoros submetidos ao HIIT (On) e vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg) ($p = 0,038$).

Figura 6. Inclinação das retas por grupo para a variação da expressão ao longo do tempo para o gene CNDP2 sem de onívoros não submetidos ao HIIT (CT), comparando apenas os grupos onívoros submetidos ao HIIT (On) e vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg) ($p = 0,038$).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características dos participantes do estudo, onívoros (grupos CT e On) e vegetarianos (grupo Vg). Todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 2. Dados da capacidade física e cárdio pulmonar dos voluntários submetidos ao exercício (grupos On e Vg). Todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 3. Ingestão nutricional dos voluntários onívoros (grupos CT e Vg) e vegetarianos (grupo Vg) com recordatórios válidos. Todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Tabela 4. Dados numéricos de p e F (com ou sem CT), nos efeitos de tempo, grupo e interação grupo tempo da ANCOVA. *: p com evidência significativa ($p < 0,05$); #: p com baixo nível de evidência ($0,05 < p < 0,1$).

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 Carnosina e β -alanina	4
3.2 Funções da carnosina no organismo	4
3.3 Distribuição de carnosina nos tecidos.....	7
3.4 Metabolismo da carnosina	7
3.5 Dieta, β -alanina e carnosina muscular.....	9
3.5.1 Dieta.....	9
3.5.2 Suplementação de β -alanina	11
3.6 Exercício físico, HIIT e carnosina muscular	12
4. Materiais e Métodos	16
4.1 Seleção de amostra e voluntários.....	16
4.2 Desenho experimental.....	18
4.3. Métodos e materiais experimentais	20
4.3.1. Teste incremental em ciclo ergômetro	20
4.3.2. Protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT).....	20
4.3.3. Biópsia muscular por agulha de sucção.....	21
4.3.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	22
4.3.5 Avaliação da ingestão de proteínas e de β -alanina na dieta	23
4.4. Análise estatística.....	24
5. Resultados	26
5.1 Caracterização dos voluntários.....	26
5.1.1 Capacidade física e cárdio pulmonar dos voluntários submetidos ao exercício	26
5.1.2 Consumo alimentar	26
5.2 Análise da Expressão Gênica.....	27
5.2.1. Resultados análise ANCOVA	27
6. Discussão	31
6.1 Expressão Gênica	31
6.2 Regulação da carnosina muscular e expressão gênica	32
6.3 Carnosina muscular e fígado	34
6.4 Consumo alimentar	35
6.5 Limitações do estudo.....	36
6.6. Perspectivas futuras	37

7. Conclusão	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO I	54
ANEXO II	58

1. Introdução

A carnosina (β -alanil-L-Histidina) é um dipeptídeo citoplasmático encontrado em altas concentrações no músculo esquelético de vertebrados e invertebrados, atingindo aproximadamente 20 mmol/kg músculo seco em humanos onívoros (Harris et al., 2006; Hill et al., 2007). É sintetizada in situ pela enzima carnosina sintase a partir dos aminoácidos precursores L-histidina e β -alanina. Embora a carnosina possa ser obtida via dieta (principalmente carnes), ela é rapidamente hidrolisada no lúmen intestinal e no plasma pela carnosinase, o que exige a absorção de seus precursores (Asatoor et al., 1970). Diversas funções fisiológicas são atribuídas à carnosina, incluindo ação antioxidante (Boldyrev, 1993), regulação do cálcio (Dutka et al., 2012) e proteção contra glicação (Hipkiss et al., 1995). No entanto, sua função mais crítica é o tamponamento do pH intramuscular devido à sua constante de dissociação pK_a de 6,83, tornando-a um tampão ideal na faixa de variação fisiológica do músculo (Abe, 2000). Este papel é fundamental em atividades de alta intensidade e curta duração, onde o acúmulo de íons H^+ leva à acidose muscular, limitando a ressíntese de fosforilcreatina (Sahlin et al., 1975) e inibindo enzimas glicolíticas (Sutton et al., 1981), o que compromete a produção de energia e a performance (Saunders et al., 2017a).

A concentração de carnosina no músculo é primariamente determinada pelo aporte dietético de peptídeos contendo histidina e, mais notavelmente, pela suplementação de β -alanina. A suplementação tem se mostrado altamente eficaz no aumento da carnosina intramuscular em quase todos os indivíduos (Rezende et al., 2020). Contudo, observamos uma variação individual considerável na resposta a esta suplementação (Saunders et al., 2017b). Essa discrepância sugere que a disponibilidade de β -alanina não é o único fator limitante, sendo o conteúdo final de carnosina determinado pela complexa maquinaria metabólica que regula sua síntese, hidrólise, e o transporte de seus precursores. Diversos genes e proteínas estão envolvidos nesse controle, incluindo a carnosina sintase (CARNS), transportadores de β -alanina (como TauT) e carnosinases (como a CNDP2)(EVERAERT 2012). A atividade dessas proteínas e transportadores é, portanto, um fator chave que modula a resposta individual à suplementação.

Além da suplementação, o treinamento físico também parece modular o metabolismo da carnosina. Indivíduos treinados demonstram maior aumento na

concentração de carnosina muscular após a suplementação de β -alanina (Bex et al., 2014), e esse aumento é mais pronunciado em músculos ativamente treinados (Bex et al., 2014). Esses achados sugerem que o próprio estímulo contrátil ou o aumento do fluxo sanguíneo induzido pelo exercício pode influenciar a expressão e/ou atividade dos transportadores e enzimas envolvidas na captação de β -alanina e síntese de carnosina. Contudo, enquanto estudos de treinamento crônico em vegetarianos mostraram aumento de carnosina (Painelli et al., 2018), estudos similares em indivíduos onívoros falharam em demonstrar tal alteração (Mannion et al., 1994; Baguet et al., 2011). Essa divergência pode estar relacionada aos hábitos alimentares, visto que vegetarianos, com ingestão ausente de β -alanina e portanto com diminuição no conteúdo de carnosina muscular (Painelli et al., 2018), podem ter vias regulatórias menos ativas, sendo mais suscetíveis ao aumento induzido pelo treinamento e/ou dieta (Baguet et al., 2011).

Apesar dos dados apresentados por Painelli et al. (2018) demonstrarem um aumento no conteúdo muscular de carnosina após o treinamento com exercício intervalado de alta intensidade (HIIT), as razões para esse incremento ainda não estão completamente esclarecidas. As análises de expressão gênica realizadas nesse estudo não revelaram diferenças entre os momentos pré e pós-treinamento. Entretanto, essa ausência de alteração pode estar relacionada ao momento da coleta das biópsias, que ocorreu em repouso e 72 horas após a última sessão de exercício (Bishop et al., 2022). Sabe-se, contudo, que as modificações na expressão gênica são fenômenos transitórios, ocorrendo predominantemente nas horas subsequentes ao estímulo agudo do exercício (Coffey & Hawley, 2007). Assim, a janela temporal escolhida para a coleta das amostras pode não ter sido sensível o suficiente para detectar as respostas moleculares imediatas que potencialmente precedem e explicam as adaptações crônicas observadas no conteúdo muscular de carnosina. Portanto, é fundamental determinar como e se o exercício intenso agudo altera a maquinaria metabólica de carnosina/ β -alanina, e se esse estímulo difere entre onívoros e vegetarianos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos agudos do exercício de alta intensidade nos principais genes relacionados ao metabolismo de carnosina e ao transporte de β -alanina em voluntários onívoros e vegetarianos. A principal hipótese foi que o exercício de alta intensidade promoveria alterações transitórias na expressão dos genes relacionados à carnosina nas primeiras 24 horas após o HIIT.

2. Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos agudos do exercício de alta intensidade nos principais genes relacionados ao metabolismo de carnosina e ao transporte de β -alanina em onívoros e vegetarianos.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar se o exercício agudo (pós 1, pós 3 e pós 24 horas do-exercício) altera a expressão dos transportadores de β -alanina (TauT e PAT1) e dos genes envolvidos na síntese e degradação da carnosina muscular (CARNS e CNDP2).
- Determinar se a dieta (onívora ou vegetariana) modifica o perfil temporal dessas respostas moleculares após o exercício.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Carnosina e β -alanina

A carnosina (β -alanyl-L-histidina) é um dipeptídeo citoplasmático formado pela conjugação de dois aminoácidos: β -alanina e histidina. Ela exerce múltiplas funções fisiológicas nas células que a contêm, incluindo atuação no tamponamento de íons H^+ , modulação do cálcio e proteção oxidativa, conforme será discutido posteriormente neste trabalho. Sua produção depende de sistemas enzimáticos celulares, em especial da enzima carnosina sintase (CARNS), e da disponibilidade de histidina e β -alanina, sendo esta última o fator limitante na síntese do dipeptídeo (Harris et al., 2006).

Embora a β -alanina ser um aminoácido não essencial, com síntese endógena hepática (Fritzson, 1957; Fritzson, 1965), sua taxa de produção é extremamente baixa, cerca de 10 $\mu\text{mol/h}$. Isso torna sua detecção plasmática um desafio com as técnicas disponíveis (Artioli et al., 2010). Devido à baixa produção endógena, a ingestão de β -alanina é necessária para garantir níveis adequados no organismo, de modo a aumentar sua disponibilidade para a síntese de carnosina (Harris et al., 2006).

Além da produção hepática, existem outras hipóteses de que também possamos sintetizar β -alanina em outros tecidos. No intestino, por meio da enzima aspartato descarboxilase (Stuecker et al., 2012). Nos rins e cérebro, pelo fato desses tecidos expressarem a enzima β -alanina-piruvato transaminase (Hayaishi et al., 1961; Baker et al., 2004). No entanto, a via de síntese hepática de β -alanina é a mais bem estabelecida e amplamente aceita na literatura.

3.2 Funções da carnosina no organismo

Diversas ações fisiológicas têm sido associadas à carnosina, tanto no músculo esquelético, quanto em outros tecidos, como a de antioxidante (Boldyrev, 1993), reguladora da sensibilidade e do transiente de cálcio (Dutka et al., 2012), protetora de proteínas contra a glicação agindo como um peptídeo de sacrifício (Hipkiss et al., 1995), e, sua função mais discutida e documentada, o tamponamento do pH intracelular (Abe, 2000).

A carnosina tem função antioxidante, pois protege a célula contra radicais livres, como foi demonstrado por Boldyrev et al. que ela reduz a peroxidação lipídica da membrana plasmática (Boldyrev et al., 1988). Em concentrações fisiológicas, no músculo esquelético, a carnosina pode sequestrar radicais peróxil e ânions superóxido (Pavlov et al., 1993), além de participar da detoxificação de compostos como 4-hidroxinonenal e malonildialdeído (Hippkiss, 2000; Bispo et al., 2016). A carnosina também atua na quelação de metais (Pavlov et al., 1993). Porém tais funções não são tão fundamentais para célula, já que temos antioxidantes mais importantes que fazem os mesmos papéis que a carnosina faz, porém com uma eficiência melhor (Jones, 2006; Lobo et al., 2010).

Com relação à sua função na regulação do transiente de cálcio para contração muscular, é importante entendermos que estudos indicam que alterações na liberação ou recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático durante a contração muscular influenciam o desenvolvimento da fadiga (Lamb, 2002). A redução das concentrações de Cálcio em músculos fadigados está associada à queda na força muscular (Favero et al., 1993). Com menos cálcio disponível para se ligar à troponina C, há uma diminuição nas pontes cruzadas actina-miosina, resultando em menor produção de força e fadiga muscular (Begum et al., 2005; Allen et al., 2008). A homeostase do cálcio intracelular é crucial para o funcionamento celular. O desequilíbrio de cálcio pode ativar enzimas como fosfolipase A2 e proteases, causando danos à membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, degradação de proteínas e disfunção mitocondrial (Jackson et al., 1984; Duan et al., 1990).

Estudos in vitro mostram que carnosina pode aumentar a liberação de cálcio dos retículos sarcoplasmáticos via ativação dos canais de liberação de cálcio do receptor de rianodina (Batrukova, 1997). No entanto, estudos com ratos e humanos apresentaram resultados divergentes (Dutka, 2004; Dutka et al., 2012), mas há consenso de que a carnosina aumenta a sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio, assim podendo ter uma função na prevenção de lesão causadas pela fadiga muscular gerada pela alteração no transiente de cálcio.

A carnosina tem atraído interesse no campo clínico por sua ação protetora contra a glicação, sendo estudada em experimentos com animais e humanos (Burcham et al., 2002; Yan, 2005). A glicação ocorre quando açúcares se ligam covalentemente a proteínas, alterando suas estruturas nativas e, portanto, suas funções, assim podendo causar danos celulares, contribuindo para o envelhecimento

e doenças (Hipkiss et al., 1995). A glicação inicial pode gerar produtos finais de glicação avançada, através da "reação de Maillard" (1912). Esses produtos, se acumulam em tecidos e vasos sanguíneos, são comuns em condições de hiperglicemia, como no diabetes, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (Sakurai et al., 2003; Brownlee, 2005; Kilhovd et al., 2007). Por diminuir a produção dos produtos de glicação avançada, a carnosina, pode reduzir lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, potencialmente diminuindo o risco de aterosclerose associada ao diabetes (Rashid et al., 2007). No entanto ainda não há evidências de qual mecanismo a carnosina utilizaria para reduzir a produção dos agentes de glicação avançada (Rashid et al., 2007).

Dentre as funções discutidas, a principal e mais estudada função da carnosina é o tamponamento de ácidos no músculo esquelético. Em repouso, o pH muscular varia entre 7,0 e 7,1, e sua manutenção é crucial para a contração e a atividade enzimática (Fabiato, 1978). Durante exercícios de alta intensidade, o pH pode cair para cerca de 6,5, devido à hidrólise do ATP, que libera energia para a contração muscular e libera íons H^+ (Robergs et al., 2004). Devido à sua constante de dissociação de ácidos possuir um valor de 6,83, do ponto de vista físico-químico, isso obrigatoriamente torna a carnosina um tampão ideal para atuar dentro da faixa de variação fisiológica do pH intramuscular, que é levemente mais ácido que o pH plasmático (Abe, 2000). Esse papel é particularmente importante em atletas engajados em atividades e esforços de alta intensidade e curta duração, já que tais esforços conhecidamente levam a um acúmulo de íons H^+ no interior da célula muscular, gerando uma queda do pH muscular.

O acúmulo de H^+ na célula muscular pode levar à inibição da ressíntese de fosforilcreatina (Sahlin et al., 1975), à inibição de enzimas importantes da via glicolítica (Sutton et al., 1981), a inibir o metabolismo anaeróbico e reduzir a produção de energia, contribuindo para o desenvolvimento da fadiga (Harris et al., 1976; Sutton et al., 1981), assim limitando o processo de produção de energia para a contração muscular (Saunders et al., 2017a). Para combater essa acidose, o músculo utiliza tampões intracelulares, sendo a carnosina um dos tampões mais eficazes devido ao seu valor de pKa de 6,83, adequado para a faixa de pH fisiológico do músculo como já citado anteriormente (Harris et al., 2006; Artioli et al., 2010).

3.3 Distribuição de carnosina nos tecidos

A carnosina é encontrada predominantemente em três tecidos: coração, cérebro e, em maior quantidade, no músculo esquelético (Biffo et al., 1990; Harris et al., 2006; O'Dowd et al., 1988). No cérebro, ela se apresenta principalmente nas formas de homo-carnosina (L-histidina ligada a um GABA) e N-acetilcarnosina (produto da descarboxilação da carnosina), que são análogos da carnosina, embora não sejam dipeptídeos contendo histidina (Boldyrev et al., 2004). Essas variantes podem desempenhar funções antioxidantes no tecido nervoso, além de exercerem o papel clássico de tamponamento celular (Boldyrev et al., 2004).

No coração, a carnosina está presente em concentrações de 2 a 10 μM (O'Dowd et al., 1988), mas é no músculo esquelético que ela atinge suas maiores concentrações, cerca de 20 mmol/kg de músculo seco em humanos, sendo o tecido que mais expressa essa molécula e com maior relação com sua função tamponante (Harris et al., 2006). A distribuição da carnosina está diretamente ligada à sua capacidade de produção nos tecidos, sendo o músculo esquelético o principal produtor de carnosina no organismo (Harris et al., 2006).

A concentração de carnosina no músculo esquelético varia de acordo com o tipo de fibra muscular. Fibras do tipo II (rápidas, glicolíticas) apresentam níveis significativamente mais elevados de carnosina em comparação às fibras do tipo I (lentas, oxidativas), refletindo suas distintas demandas metabólicas e de tamponamento durante exercícios de alta intensidade (Dunnet et al., 1997; Kendricks et al., 2008 e 2009). Essa diferença está relacionada à maior produção de íons H^+ nas fibras rápidas durante a glicólise anaeróbica, o que torna a carnosina um importante tampão intramuscular nesses tipos de fibras (Harris et al., 2006). Assim, a distribuição diferencial da carnosina entre os tipos de fibras musculares reflete sua função fisiológica adaptada à intensidade e ao padrão contrátil do músculo.

3.4 Metabolismo da carnosina

O transporte e o metabolismo de aminoácidos são fundamentais para a manutenção de diversos processos biológicos, como síntese proteica, crescimento celular, neurotransmissão e metabolismo do nitrogênio. Entre esses aminoácidos, a

β -alanina desempenha papel particularmente relevante por atuar como precursor essencial na síntese de carnosina.

Os sistemas de transporte de aminoácidos foram inicialmente classificados com base em suas características funcionais — como especificidade do substrato e dependência de íons (Christensen et al., 1990; Palacín et al., 1998). Muitos desses sistemas dependem de gradientes eletroquímicos de íons, e a manutenção desses gradientes é essencial para o transporte eficiente. No intestino, por exemplo, a absorção de nutrientes ocorre por meio de transportadores iônicos localizados na membrana luminal dos enterócitos (Thwaites et al., 2011).

Entre os principais transportadores envolvidos no processo de captação da β -alanina, destaca-se o ATB, um cotransportador que facilita a entrada de diversos aminoácidos, incluindo a β -alanina, na presença de íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) (Munck & Schultz, 1969). Embora seja altamente eficiente, o ATB apresenta maior afinidade por aminoácidos essenciais, como leucina e lisina (Anderson & Ganapathy, 2008), e é predominantemente expresso no intestino — estando ausente no músculo esquelético. Isso indica que seu papel principal está na absorção intestinal de β -alanina, enquanto outros transportadores, como TauT e PAT1, atuam no músculo.

No músculo esquelético, o principal transportador de β -alanina é o TauT (transportador de taurina), expresso também em rins e intestino. Sua afinidade tanto pela β -alanina quanto pela taurina faz com que esses substratos compitam entre si. Estudos indicam que a suplementação de β -alanina pode reduzir a captação de taurina (Jessen, 1994); contudo, dados recentes mostram que doses usuais em humanos não afetam de maneira significativa os níveis musculares de taurina, sugerindo que a regulação do TauT mantém a homeostase da taurina no músculo (Dolan, 2019).

Outro transportador relevante é o PAT1, membro da família de genes *SLC36*, expresso principalmente na superfície luminal do intestino delgado. Ele transporta aminoácidos zwitteriônicos e derivados, incluindo a β -alanina, com afinidade moderada (K_M de 1–10 mM) (Thwaites & Anderson, 2011). Diferentemente do TauT, o PAT1 não depende de íons sódio e cloreto, mas sua contribuição para a captação de β -alanina no músculo é relativamente menor (Fei et al., 1994).

A β -alanina proveniente da dieta ou da hidrólise de dipeptídeos contendo histidina (como a carnosina) é absorvida no intestino por transportadores como PEPT1 e ATB. O PEPT1, um transportador ativo dependente de prótons, atua na absorção de dipeptídeos como carnosina e anserina (Yamashita et al., 1997; Everaert et al., 2013), além de participar da reabsorção renal via sua isoforma PEPT2 (Adibi, 1997). Uma vez na circulação, a β -alanina é captada por tecidos como o músculo esquelético, onde é usada para a síntese de carnosina. Essa reação é catalisada pela CARNS, localizada no citoplasma das fibras musculares. A CARNS apresenta alta afinidade pela histidina ($K_M \approx 16,8 \mu M$), mas baixa afinidade pela β -alanina ($K_M \approx 1-2 \text{ mM}$), o que confirma que a disponibilidade de β -alanina é o principal fator limitante na síntese de carnosina (Horinishi et al., 1978; Harris & Tallon, 2006).

A β -alanina pode ser transaminada pela enzima ABAT, produzindo malonato semialdeído — um intermediário energético observado em dietas ricas em β -alanina (Everaert et al., 2013). Além disso, a atividade de enzimas carnosinases (CNDP1 e CNDP2) regula os níveis de carnosina em diferentes tecidos. A CNDP2 atua principalmente no intestino e no músculo, hidrolisando carnosina e análogos em β -alanina e histidina, enquanto a CNDP1, de maior afinidade, está presente no plasma e pode influenciar as concentrações circulantes (Riedl et al., 2007). Fatores genéticos, idade e sexo podem modular a expressão dessas enzimas (Teufel et al., 2003).

Em conjunto, transportadores (TauT e PAT1), enzimas (CARNS, CNDP2, ABAT) e fatores genéticos compõem um sistema integrado que regula o metabolismo da carnosina muscular. Essa rede metabólica é influenciada por condições fisiológicas, estado nutricional e treinamento físico, evidenciando a complexidade da regulação dessa molécula no músculo esquelético.

3.5 Dieta, β -alanina e carnosina muscular

3.5.1 Dieta

A β -alanina está presente em diferentes alimentos, tanto na forma de dipeptídeos contendo histidina (como a carnosina e a anserina) quanto como β -aminoácido livre. Carnes e peixes são as principais fontes, apresentando elevadas concentrações desses dipeptídeos nas células musculares de mamíferos, aves e peixes. Por exemplo, 100 g de peito de frango contém, em média, 411 mg de β -alanina

(Rezende, 2022). Embora alguns vegetais, como nozes, feijões, ervilhas, grãos de café, amendoim e pinhão, também contenham pequenas quantidades, esses níveis são insuficientes para elevar significativamente as concentrações de carnosina muscular (Parthasarathy et al., 2019).

A disponibilidade de β -alanina é um dos principais fatores limitantes da síntese de carnosina muscular (Harris et al., 2006). Em indivíduos onívoros, essa disponibilidade provém tanto da ingestão dietética quanto da produção endógena hepática, enquanto vegetarianos dependem exclusivamente da via endógena (Van Kuilenburg et al., 1992; Trexler et al., 2015). Essa diferença explica as variações observadas entre grupos alimentares: vegetarianos apresentam, em média, concentrações de carnosina cerca de 15 a 20% menores que onívoros, embora valores próximos de 15 mmol/kg de músculo indiquem que a molécula continua fisiologicamente relevante (Harris et al., 2012; Everaert et al., 2011).

O estudo de Blancquaert et al. (2018) mostrou que mulheres onívoras que adotaram uma dieta vegetariana por seis meses mantiveram, de forma geral, os níveis musculares de carnosina, sugerindo relativa estabilidade desse composto mesmo sem aporte dietético de β -alanina. Esses achados indicam que mecanismos endógenos podem compensar, ao menos parcialmente, a ausência da β -alanina alimentar, preservando a homeostase muscular. De modo complementar, Rezende et al. (2022) relataram que pequenas variações na ingestão de carne entre onívoros exercem pouca influência sobre o conteúdo muscular de carnosina. Assim, a dieta tende a afetar significativamente a carnosina muscular apenas em situações extremas, como possivelmente na comparação entre vegetarianos e onívoros, enquanto diferenças dentro de padrões dietéticos semelhantes têm baixo impacto.

Além das diferenças qualitativas na dieta, o consumo total de proteína também parece contribuir para variações individuais na carnosina muscular. Varanoske et al. (2017) observaram que mulheres fisicamente ativas com maior ingestão proteica apresentaram níveis mais altos de carnosina. No entanto, a relação direta entre o tipo de dieta, o consumo proteico total e o conteúdo muscular de carnosina ainda carece de investigação mais detalhada, constituindo uma lacuna importante na literatura.

Em síntese, a dieta influencia o conteúdo de carnosina muscular, mas seu impacto é limitado quando comparado à suplementação. Essa constatação levou ao

crescente interesse na suplementação de β -alanina como estratégia para aumentar os níveis intramusculares desse dipeptídeo.

3.5.2 Suplementação de β -alanina

Embora o organismo produza β -alanina em quantidades reduzidas e ela também seja obtida pela alimentação, a suplementação é a estratégia mais eficaz para elevar os níveis de carnosina intramuscular. Harris et al. (2006) demonstraram que a administração de 6,4 g/dia durante quatro semanas aumentou o conteúdo muscular de carnosina em cerca de 65%. Estudos posteriores confirmaram elevações entre ~60% e 120%, dependendo da dose e da duração (Hill et al., 2007; Baguet et al., 2010; Saunders et al., 2017a). Esses resultados evidenciam que a suplementação exerce efeito muito mais pronunciado que as variações dietéticas. Em média, ela pode elevar o conteúdo de carnosina em até 10 mmol/kg de músculo, praticamente o dobro da diferença observada entre vegetarianos e onívoros (Saunders et al., 2017a; Rezende et al., 2020). Além disso, os aumentos seguem um padrão de saturação, atingindo um platô após períodos prolongados de uso, o que sugere um limite fisiológico para o armazenamento da molécula (Rezende et al., 2020). Entretanto, esse efeito parece ser alcançável apenas com doses elevadas (superiores a 6 g/dia) consumidas por períodos prolongados (superiores a 6 meses) (Saunders et al., 2017b).

Estima-se que cerca de 6% da β -alanina ingerida seja efetivamente convertida em carnosina muscular, enquanto uma fração é excretada na urina (Harris et al., 2006; Stegen et al., 2013). Parte também pode ser oxidada antes de alcançar o músculo, reduzindo a eficiência da síntese (Blancquaert et al., 2016). A captação da β -alanina pelas fibras musculares ocorre por meio de transportadores específicos (TauT e PAT1), cuja atividade pode ser modulada por condições metabólicas e hormonais, em especial pela insulina, conforme evidenciado em modelos celulares (Santos et al., 2021; Gonçalves et al., 2020).

Dessa forma, a suplementação de β -alanina representa uma intervenção eficiente para aumentar o conteúdo muscular de carnosina, superando amplamente as diferenças dietéticas entre onívoros e vegetarianos. A dose e a duração da suplementação são claramente os maiores determinantes do aumento do conteúdo

de carnosina muscular (Perim et al., 2019). Entretanto, outros fatores podem igualmente influenciar essa resposta, em especial o exercício físico. Evidências sugerem que o tipo e principalmente, a intensidade podem modular o conteúdo de carnosina muscular, atuando de maneira complementar ou até independente a suplementação. Foram observados maiores aumentos no conteúdo de carnosina muscular em músculos treinados em comparação aos não treinados após 23 dias de suplementação com $6,4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$, mesmo sem que os atletas fossem submetidos a um protocolo de treinamento específico. Canoístas apresentaram aumentos mais acentuados de carnosina no músculo deltoide em comparação ao sóleo e gastrocnêmio, enquanto o padrão inverso foi observado em ciclistas. Nadadores, cuja modalidade exige treinamento tanto de membros superiores quanto inferiores, mostraram aumentos significativamente maiores de carnosina tanto no deltoide quanto no gastrocnêmio em comparação a não atletas (Bex et al., 2014). Esses resultados sugerem um papel do treinamento no metabolismo da carnosina muscular, embora a ausência de medidas gênicas ou proteicas dificulte a interpretação mecanística dessas descobertas.

Esses achados abrem espaço para uma discussão mais ampla sobre como o exercício físico, principalmente intenso (como o HIIT), pode interagir com as vias de síntese e degradação da carnosina, potencialmente contribuindo para adaptações metabólicas distintas das observadas com a suplementação isolada.

3.6 Exercício físico, HIIT e carnosina muscular

A carnosina desempenha papel essencial no tamponamento intramuscular de íons H^+ durante o exercício intenso, contribuindo para a manutenção do pH e da função contrátil. Por essa razão, a investigação de como o exercício físico influencia o conteúdo muscular de carnosina tem despertado crescente interesse (Bex et al., 2014; Perim et al., 2019; Painelli et al., 2018).

Estudos observacionais indicam que atletas de modalidades de alta intensidade, como velocistas e remadores, apresentam concentrações de carnosina mais elevadas do que maratonistas (Parkhouse et al., 1985), enquanto fisiculturistas exibem níveis excepcionalmente altos, possivelmente influenciados também pelo uso de esteroides anabolizantes (Tallon et al., 2005). Permanece incerto se esse

fenômeno decorre de uma predisposição genética, de uma resposta adaptativa ao estímulo do treinamento ou de diferenças secundárias na composição dos tipos de fibras musculares. Em conjunto, essas evidências reforçam a hipótese de que o estímulo contrátil repetido e o ambiente metabólico ácido gerado por exercícios intensos podem exercer papel importante para o controle da síntese e o acúmulo de carnosina.

Pesquisas experimentais avaliaram mais diretamente essa relação. Mannion et al. (1994) investigaram os efeitos do treinamento isocinético dos extensores do joelho sobre o desempenho em exercícios de alta intensidade e o tamponamento muscular, observando melhora na capacidade de realização de exercícios intensos após o período de treinamento, sem aumento concomitante nas concentrações musculares de carnosina. Estes dados corroboram com Baguet et al. (2011), que, apesar de observarem um pequeno aumento intragrupos no conteúdo de carnosina num grupo que seguiu dieta mista (+11%) e uma redução num grupo submetido à dieta vegetariana (-9%), não relataram aumentos significativos globais de carnosina muscular após 5 semanas de treinamento em atividade física intensa (sprints), independentemente da dieta. Similarmente, os estudos de Kendrick et al. (2008, 2009) não observaram efeitos de 10 ou 4 semanas de treinamento de força no conteúdo de carnosina muscular.

Em contraponto, além da possível relação mostrada por Bex et al. (2014), o estudo de Suzuki et al. (2002) demonstrou uma elevação significativa de carnosina em muscular após protocolo de 8 semanas de um programa de treinamento baseado em sprints. Nesse estudo, as concentrações musculares de carnosina praticamente duplicaram, atingindo valores médios de aproximadamente $47,4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa seca, superiores inclusive aos previamente observados em fisiculturistas ($\approx 43,0 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa seca) (Tallon et al., 2005). Esses resultados, contudo, contrastam com os achados de outros estudos que não observaram aumentos na carnosina muscular após treinamento físico (Mannion et al., 1994; Kendrick et al., 2009). Além disso, o protocolo de treinamento utilizado por Suzuki et al. (2002) consistiu em vinte e oito sprints máximos de 30 segundos realizados ao longo de 8 semanas, totalizando aproximadamente 14 minutos de exercício de alta intensidade. Considerando o volume relativamente reduzido de treinamento, esse protocolo não parece fornecer estímulo suficiente para justificar o aumento substancial observado

na carnosina muscular. Dessa forma, hipóteses alternativas têm sido sugeridas para explicar esses achados, incluindo possíveis mudanças no consumo de alimentos ricos em dipeptídeos de histidina durante o período de treinamento ou até potenciais limitações metodológicas relacionadas à análise das amostras musculares.

Em um dos estudos mais recentes, Painelli et al. (2018) analisaram os efeitos de 12 semanas de HIIT em vegetarianos, identificando aumento significativo no conteúdo muscular de carnosina. Tal resultado sugere que o exercício pode compensar parcialmente a menor ingestão dietética de β -alanina nesses indivíduos, fortalecendo a ideia de que a contração muscular repetida pode regular a síntese e a degradação da carnosina muscular de forma independente da disponibilidade de β -alanina.

Entre os diferentes modelos de exercício utilizados para investigar a regulação metabólica no músculo esquelético, o HIIT tem recebido destaque. Esse tipo de protocolo é caracterizado por repetidas séries de esforço realizadas em intensidades próximas ou superiores ao VO_2max , intercaladas por curtos períodos de recuperação. Durante essas sessões ocorre elevada taxa de glicólise anaeróbia e consequente produção de H^+ , resultando em redução do pH intramuscular e aumento da acidose metabólica transitória (Bishop et al., 2004; Gibala et al., 2012). Essa condição fisiológica impõe grande demanda aos sistemas de tamponamento intramuscular, incluindo fosfatos, proteínas e, de maneira particularmente relevante, a carnosina (Robergs et al., 2004; Edge et al., 2006).

Nesse contexto, o HIIT constitui um modelo experimental particularmente interessante para o estudo da carnosina muscular e de β -alanina. A carnosina apresenta pK_a próximo ao pH fisiológico do músculo, o que a torna um dos principais tampões intramusculares durante exercícios de alta intensidade, contribuindo para retardar a queda do pH e preservar a função contrátil (Harris et al., 2006; Boldyrev et al., 2013). Assim, protocolos que induzem elevado estresse metabólico e acidose transitória, como o HIIT, podem representar um estímulo relevante para a regulação do metabolismo da carnosina, seja por alterações no seu turnover, na atividade de transportadores de β -alanina ou na expressão de genes envolvidos em sua síntese e degradação. Dessa forma, investigar as respostas musculares a sessões de HIIT

oferece um modelo fisiológico adequado para compreender os mecanismos que controlam a homeostase da carnosina no músculo esquelético.

Contudo, a literatura ainda é limitada e apresenta resultados inconsistentes quanto às respostas agudas e moleculares ao exercício (Egan & Sharples, 2023; Miyamoto-Mikami et al., 2018). A maioria dos estudos disponíveis avalia adaptações crônicas, enquanto pouco se sabe sobre as flutuações agudas/imediatas na expressão de genes relacionados à síntese (CARNS1), transporte (TauT, PAT1) e degradação (CNDP2) da carnosina. O estudo de Painelli et al. (2018) coletou as biópsias musculares em repouso e 72 h após o último protocolo de HIIT, o que pode ter perdido alterações transitórias de expressão gênica, geralmente observadas nas primeiras horas pós-exercício (Coffey & Hawley, 2007). Assim, a ausência de diferenças nos genes relacionados à transporte e metabolismo de carnosina muscular, entre pré e pós-treinamento, pode refletir o momento de coleta, e não necessariamente a ausência de regulação molecular. Diante disso, investigações que explorem as respostas agudas de expressão gênica pós-exercício em diferentes dietas (onívora versus. vegetariana) tornam-se essenciais para compreender os mecanismos de regulação da homeostase da carnosina muscular.

Assim, compreender como o HIIT modula de forma aguda os genes associados ao metabolismo da carnosina oferece novas perspectivas sobre as adaptações metabólicas induzidas pelo exercício e ajuda a explicar as diferenças observadas entre onívoros e vegetarianos.

4. Materiais e Métodos

4.1 Seleção de amostra e voluntários

A amostra foi composta por homens adultos jovens, clinicamente saudáveis, com idades variando entre 18 e 35 anos. Nenhum dos participantes fazia uso de creatina, β -alanina ou de qualquer outro recurso ergogênico, farmacológico ou nutricional voltado ao aumento do desempenho físico por, pelo menos, três meses antes do início do protocolo experimental. O grupo vegetariano incluía apenas indivíduos que mantinham esse padrão alimentar de forma contínua havia no mínimo um ano (Painelli et al., 2018).

Foram excluídos os sujeitos que apresentavam hábitos tabagistas, diagnóstico de doenças crônicas ou histórico de uso atual ou anterior de esteroides anabolizantes. Dessa forma, os critérios de inclusão contemplaram indivíduos do sexo masculino, saudáveis e aptos a realizar o teste incremental, o protocolo de exercício de alta intensidade (HIIT) e as etapas experimentais que incluíam biópsias musculares. Todos os voluntários elegíveis receberam esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Os critérios de exclusão englobaram tabagismo, presença de enfermidades crônicas (como hipertensão, diabetes mellitus ou asma brônquica), uso atual ou anterior de esteroides anabolizantes, limitação física que impedisse a realização adequada do teste incremental ou do HIIT (menos de seis tiros completados), além de impedimentos logísticos ou de agenda que inviabilizassem a participação completa nos testes e nas coletas. Foram também excluídos os indivíduos que, após o agendamento, deixaram de comparecer ou optaram por não assinar o TCLE.

Considerando um estudo nosso anterior (Saunders et al., 2017b) que analisou a resposta genética depois de 4-24 semanas de suplementação com β -alanina, trabalhamos com uma amostra de conveniência (Lakens, 2022). A quantidade inicial proposta de voluntários foi de 25 separados em 3 grupos: onívoros submetidos ao HIIT (On), com N=10; vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg), com N=10; e onívoros não submetidos ao HIIT (CT) com N=5. Foram recrutados um total de 32 voluntários (19 onívoros e 13 vegetarianos). Dos 13 vegetarianos recrutados, 7 participaram do estudo (grupo Vg); 1 não foi capaz de realizar o teste incremental proposto, desistindo

na primeira carga; 2 voluntários deixaram de responder aos contatos após agendamento da primeira visita, não comparecendo; outros 3 voluntários, apesar do interesse, não puderam comparecer por conta de agenda: 2 moravam fora da cidade de São Paulo e por isso só poderiam realizar os testes e as biópsias aos fim de semana, o que seria inviável, já outro tinha a agenda aberta apenas no período noturno, o que impossibilitava os tempos das biópsias e a agenda da Escola de Educação Física da USP. Dos 19 onívoros recrutados, 14 participaram do estudo, sendo 9 no grupo On e 5 no grupo CT; 5 voluntários não puderam participar por conta de agenda, apesar de 2 terem realizado o teste incremental, só poderiam fazer o HIIT e as biópsias apenas aos fins de semana, o que seria inviável. Portanto, totalizamos um total de 21 voluntários: 9 no grupo On, 7 no grupo Vg e 5 grupo CT (Figura 1). Antes da participação no estudo, todos os voluntários preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram questionados para determinar que não têm qualquer problema de saúde que pode prejudicar a realização dos testes físicos. Este estudo foi submetido e aceito pelo comitê de ética da USP - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo / EEFÉ-USP (CAAE: 79401917.5.0000.5391).

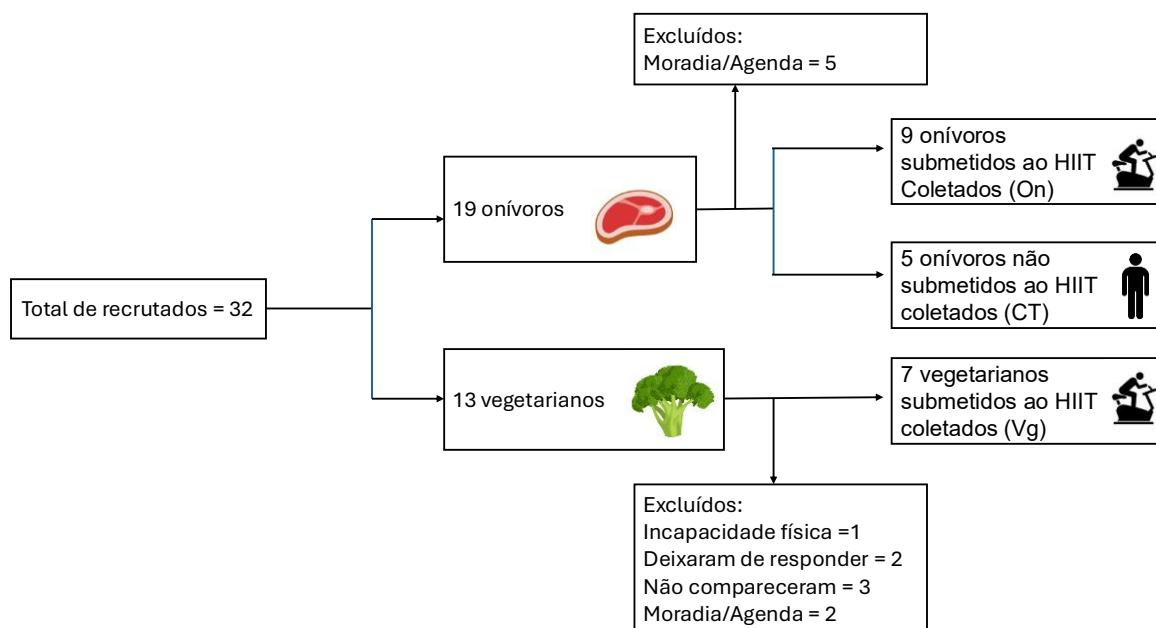


Figura 1. Fluxograma da divisão dos voluntários e das desistências para a obtenção dos grupos: On, CT e Vg.

Na tabela 1 temos os dados de idade, massa corporal e índice de massa corporal (representados como média $\pm$ desvio padrão) para os onívoros (grupos CT e On) e vegetarianos (grupo Vg).

Tabela 1. Características dos participantes do estudo, onívoros (grupos CT e On) e vegetarianos (grupo Vg). Todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Característica	Onívoros (N = 14)	Vegetarianos (N = 7)
Idade (anos)	24 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4
Massa (kg)	80,9 $\pm$ 8,3	78,0 $\pm$ 19,0
Altura (m)	1,81 $\pm$ 0,08	1,76 $\pm$ 0,09
IMC (kg/m²)	25,6 $\pm$ 3,4	24,9 $\pm$ 3,9

4.2 Desenho experimental

As etapas experimentais foram conduzidas no Laboratório de Adaptação ao Treinamento de Força da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP). Todas as sessões ocorreram sob a supervisão direta de um fisiologista experiente (Dr. Bryan Saunders ou Me. Rafael Ribeiro), com a presença de um médico (Dr. Luiz Riani) de prontidão nas dependências da unidade para eventuais intercorrências clínicas.

Os voluntários compareceram ao laboratório após, no mínimo, duas horas da última refeição, abstendo-se do consumo de álcool, alimentos de origem animal ou que contivessem β -alanina, bem como da prática de atividades físicas intensas ou não habituais nas 24 horas precedentes. Além disso, o uso de cafeína foi restrito no dia da realização do teste incremental e também no dia destinado ao protocolo de HIIT.

Durante a primeira visita, realizou-se um teste incremental destinado à determinação do consumo máximo de oxigênio (VO_{2pico} ; K5 b², Cosmed, Itália), da potência máxima ($W_{máx}$) e da potência correspondente ao limiar de lactato, além da familiarização com o protocolo de exercício que seria aplicado na sessão de HIIT subsequente. Nessa mesma ocasião, cada participante forneceu dois recordatórios alimentares de 24 horas referentes a dias não consecutivos — um em dia útil e outro em final de semana. As duas visitas finais ao laboratório corresponderam às sessões

experimentais principais, que incluíram a execução do protocolo de HIIT e a coleta das biópsias musculares (Figura 2).

Na segunda visita, uma biópsia muscular de repouso (biópsia basal) foi realizada, para se obter um parâmetro de base de comparação. Logo a seguir os participantes foram submetidos a um protocolo de exercício de 6 a 10 séries de tiros de dois minutos em ciclo ergômetro com dois minutos de intervalo a 140% do limiar de lactato previamente determinado (Edge et al., 2006). Além da biópsia basal, foram realizadas biópsias musculares 60 e 180 min após o exercício. Vinte e quatro horas após o protocolo de exercício, os voluntários retornaram ao laboratório (terceira visita) para uma biópsia muscular e coleta de amostra de sangue. Até o retorno ao laboratório para última biópsia, os voluntários foram instruídos a não comer alimentos que contenha beta-alanina ou seja, carne ou vísceras de boi, frango, porco ou peixe. As biópsias musculares foram armazenadas em -80°C até serem submetidas às técnicas para os estudos da expressão gênica. Os voluntários do grupo CT realizaram as mesmas biópsias, com os mesmos intervalos de tempo, porém sem a sessão de exercício.

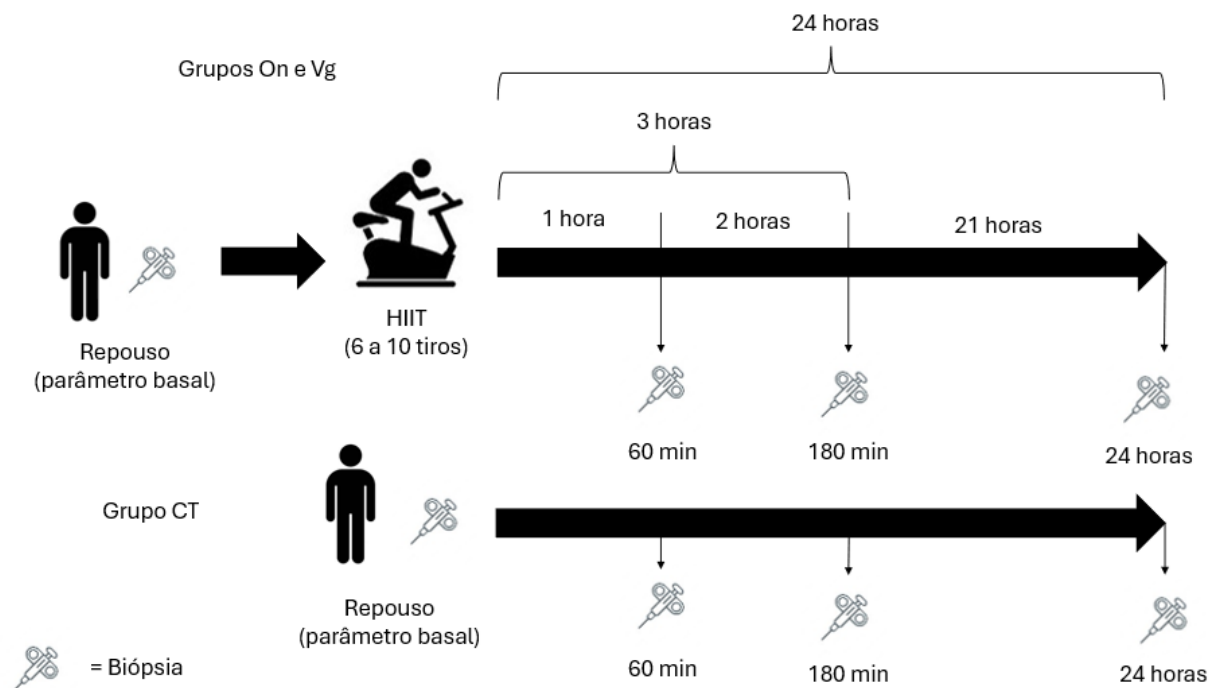


Figura 2. Desenho experimental da sessão do HIIT (grupos On e Vg) e do grupo CT (sem HIIT) .

4.3. Métodos e materiais experimentais

4.3.1. Teste incremental em ciclo ergômetro

O teste incremental foi realizado em um ciclo ergômetro (Lode Excalibur, Lode, Holanda). Utilizou-se o protocolo usado por Painelli et al. (2018), onde a carga inicial é de 20 W com aumentos de 30 W a cada estágio de 4 min com 1 minuto de repouso, até a exaustão. A frequência cardíaca (Polar H7, Polar, Kempele, Finlândia) e o VO_2 (K5, Cosmed, Itália) foram monitorados continuamente durante o teste. Amostras de sangue capilar foram coletadas das pontas dos dedos nos intervalos de 1 minuto de repouso para a determinação da concentração de lactato (Lactate Plus, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Todos os participantes receberam forte encorajamento verbal durante todo o teste até atingirem a exaustão. O $\text{VO}_{2\text{pico}}$ foi considerado como o maior VO_2 atingido durante o teste em medidas com intervalos de 30 segundos.

4.3.2. Protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT)

As sessões de treinamento foram realizadas em um ciclo ergômetro estacionário (Monark 828E, Monark, Suécia). Após 10 minutos de aquecimento padronizado (50 W a 70 rpm) o exercício foi realizado a 140% do limiar de lactato previamente calculado para cada indivíduo através das coletas de sangue capilar realizadas no Teste Incremental Máximo por meio do método D-max (Cheng et al., 1992). Este método consiste em encontrar o ponto da curva de concentração de lactato x potência mais distante em relação à reta conectando a menor e a maior concentração e potência encontrados (Figura 3). Os participantes realizaram no mínimo seis e no máximo dez tiros com duração de dois minutos cada e intervalo de um minuto de descanso. Não foi dito ao voluntário em qual tiro ele estava durante o teste, apenas sendo possível a desistência em qualquer momento. Todos os participantes receberam forte encorajamento verbal durante o teste, até atingirem o máximo de tiros que conseguissem, mínimo de 6 e máximo de 10. Este é o mesmo protocolo utilizado por Painelli et al (2018), onde foi estudado o efeito do treinamento crônico com HIIT (12 semanas/3 x por semana) na carnosina muscular, mostrando um aumento na concentração em vegetarianos.

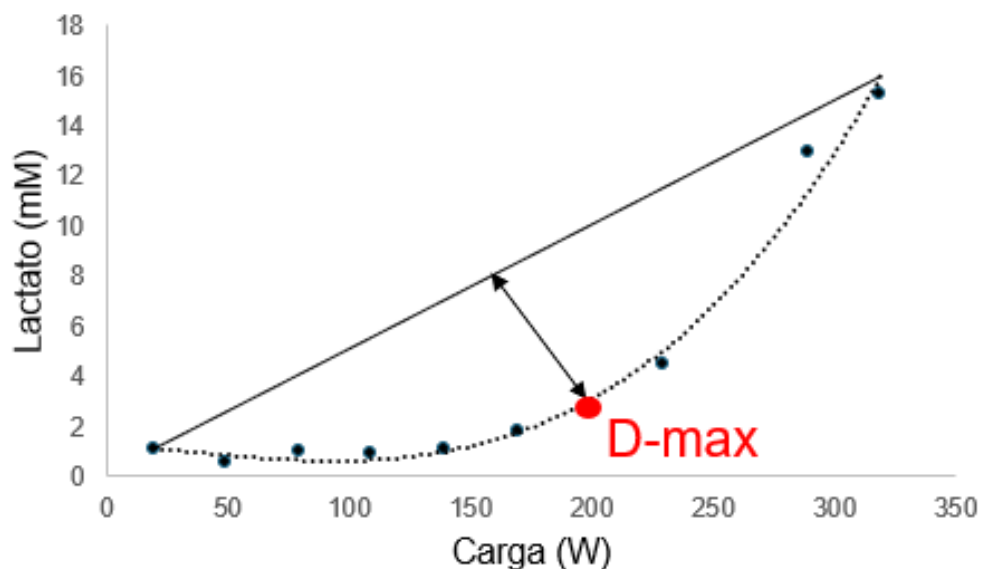


Figura 3. Gráfico para obtenção de D-max. O ponto vermelho, representa as coordenadas para a o D-max.

4.3.3. Biópsia muscular por agulha de sucção

As biópsias musculares foram conduzidas por um médico experiente (Dr. Luiz Riani) utilizando a técnica clássica descrita por Bergström (1975), adaptada para o uso de sucção. A amostra coletada (~100 mg) foi obtida da região lateral mais espessa do músculo vasto lateral, aproximadamente entre o ponto médio da patela e o trocânter maior do fêmur, quantidade considerada suficiente para as análises de expressão gênica previstas.

Durante o procedimento, os participantes permaneceram deitados em decúbito dorsal, com os joelhos estendidos e os músculos relaxados. Após a assepsia do local, foi administrada anestesia local (3 mL de xilocaína a 2%) com agulha hipodérmica estéril. Em seguida, realizou-se uma pequena incisão (~0,5 cm) atravessando pele e fáscia muscular, feita com lâmina de bisturi nº 11, esterilizada e de uso único.

A agulha de biópsia, também esterilizada e individual, foi inserida através dessa incisão. Por meio de sucção aplicada na extremidade externa da agulha com uma seringa de 120 mL, uma pequena porção de tecido muscular foi aspirada para o interior do dispositivo e seccionada pela lâmina interna. O desconforto relatado pelos

voluntários foi mínimo ou inexistente, uma vez que o tecido muscular apresenta escassa inervação sensitiva.

Após a coleta, exerceu-se leve compressão no ponto de incisão para evitar sangramento, seguida de oclusão com bandagem estéril e atadura adesiva para manter o curativo fixo. Uma faixa compressiva foi posicionada sobre a coxa para reduzir o risco de edema local. Os participantes foram orientados a manter o curativo por 24 horas e a conservar a região limpa e seca por, no mínimo, 72 horas após o procedimento.

Imediatamente após a obtenção, as amostras musculares foram mergulhadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas a -80 °C até o momento das análises de expressão gênica. O período de realização das biópsias sempre foi o mesmo entre os indivíduos, apesar de que as concentrações de carnosina muscular são estáveis ao longo do dia e o objetivo principal do estudo foi avaliar as variações temporais em relação ao exercício (HIIT) e às subseqüentes coletas.

4.3.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A quantificação da expressão dos genes CARNS, TauT (SLC6A4), CNBP2, PAT1 (SLC36A1) e do gene de referência GAPDH foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). As sondas e primers específicos foram adquiridos comercialmente (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

Os fragmentos de músculo congelado foram homogeneizados, e o RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme protocolo do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 nm (NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific), enquanto a pureza foi avaliada pela razão de absorbância 260/280 nm.

A etapa de transcrição reversa foi conduzida com 1 µg de RNA total, completando um volume final de 10 µL com água ultrapura. Em seguida, adicionaram-se 10 µL do reagente do kit comercial de transcrição reversa (2× RT Kit, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). O processo ocorreu em termociclador seguindo as etapas: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min, conforme instruções do fabricante.

As reações de qPCR foram executadas em duplicata em um volume final de 20 μ L, contendo aproximadamente 5–20 ng de cDNA (2 μ L), 10 μ L de TaqMan Fast Advanced Master Mix (2 $\times$), 1 μ L de cada primer e 7 μ L de água ultrapura tratada com DEPC (Thermo Fisher Scientific). As análises foram realizadas em um QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). O protocolo de amplificação incluiu uma etapa inicial de 95 °C por 20 s, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 60 °C por 30 s. Ao término, foi obtida a curva de dissociação, variando de 65 °C a 95 °C com incremento de 1 °C por ciclo, para verificação da especificidade do produto amplificado.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et al., 2001). O valor de ΔC_t foi calculado pela diferença entre o C_t do gene alvo e o C_t do gene de referência (GAPDH). As variações temporais ($\Delta\Delta C_t$) foram determinadas subtraindo-se o valor de ΔC_t do momento basal (repouso) daqueles obtidos nos tempos de 1 h, 3 h e 24 h após o HIIT. O gene GAPDH foi empregado como controle endógeno em todas as análises.

4.3.5 Avaliação da ingestão de proteínas e de β -alanina na dieta

A avaliação da ingestão dietética de proteínas, carboidratos e lipídios foi realizada por meio de dois recordatórios de 24 h da alimentação dos voluntários em dois dias distintos, sendo um dia durante a semana e outro em um fim de semana. O valor energético e teor de macronutrientes dos recordatórios foram analisados utilizando a tabela TACO (NEPA, 2011), tabela de composição de alimentos do IBGE (IBGE, 2011), TBCA (FoRC, 2023) e USDA. Para isso, foi utilizado o software Dietbox (Dietbox, Porto Alegre, Brasil). O consumo habitual de β -alanina dos voluntários foi aferido por meio de dados compilados em um estudo de nosso grupo (Rezende et al, 2023), que compilou dados da quantia de β -alanina de diversos alimentos utilizando como base estudos da literatura.

Para os recordatórios, os voluntários foram orientados a registrar todos os alimentos que consumiram durante o dia, especificando a quantidade – em peso ou medidas caseiras –, métodos de cocção, e horário das refeições. No caso de recordatórios com discrepâncias ou medidas ausentes, quando possível, os voluntários foram contactados novamente para retificar tais informações. Os participantes que falharam em fornecer recordatórios com essas informações, ou que

não responderam os contatos para sua correção, foram excluídos das análises dietéticas deste estudo.

4.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias e respectivos desvios-padrão. A comparação entre os grupos onívoros e vegetarianos, considerando as variáveis de caracterização, consumo alimentar e desempenho físico, foi conduzida por meio de teste t para amostras independentes, utilizando o software *Jamovi* (JAMOV PROJECT). Além disso, para a variável referente à ingestão proteica, realizou-se uma análise adicional com os valores normalizados pelo peso corporal.

As análises de expressão gênica foram conduzidas utilizando o software RStudio (R Core Team). Os dados de expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), foram avaliados quanto às diferenças entre grupos experimentais. Para avaliação de valores discrepantes (*outliers*), foi considerado o z-score, valores $|z| > 3$ foram considerados potenciais *outliers*.

Foi aplicada uma análise de covariância (ANCOVA) para investigar a expressão relativa dos genes *Taut*, *PAT1*, *CARNS* e *CNDP2* entre os grupos CT (n=5), On, (n=9) e Vg, (n=7) ao longo dos três tempos experimentais: 1 hora após o HIIT ou biópsia basal (1h), 3 horas após o HIIT ou biópsia basal (3h) e 24 horas após o HIIT ou biópsia basal (24h). Utilizou-se o fator “Tempo” (pós 1 hora, pós 3 horas e pós 24 horas do exercício) como covariável no modelo, a fim de ajustar as comparações entre grupos para potenciais variações associadas ao tempo experimental. As amostras das biópsias basais foram consideradas como a baseline (tempo 0) e comparadas com as biópsias pós 1 hora, pós 3 horas e pós 24 horas. Essa análise foi realizada em dois cenários: ANCOVA considerando os três grupos (incluindo o CT); ANCOVA considerando apenas os grupos experimentais, com exclusão do CT.

A ANCOVA foi aplicada considerando o tempo como covariável numérica, permitindo avaliar tendências lineares (slopes/inclinações) da expressão gênica ao longo dos três pontos temporais a partir do HIIT (On e Vg) e biópsia basal (CT). Essa análise verifica se os grupos apresentam diferenças na inclinação da variação temporal de cada gene, testando os efeitos principais e a interação Grupo $\times$ Tempo.

Os resultados foram expressos como valores da estatística F e respectivos valores de p. A interpretação dos resultados foi realizada com base nas probabilidades estatísticas de rejeição da hipótese nula (H_0), adotando-se as seguintes categorias: $p > 0,1$: ausência de evidência contra H_0 ; $0,05 < p \leq 0,1$: evidência fraca contra H_0 ; $0,01 < p \leq 0,05$: evidência contra H_0 ; $0,001 < p \leq 0,01$: forte evidência contra H_0 ; $p \leq 0,001$: evidência muito forte contra H_0 (Amrhein et al., 2017).

5. Resultados

5.1 Caracterização dos voluntários

5.1.1 Capacidade física e cárdio pulmonar dos voluntários submetidos ao exercício

Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os participantes dos grupos On e Vg com relação à VO_{2pico} ($p = 0,44$), potência máxima atingida ($p = 0,54$), potência no limiar de lactato ($p = 0,50$) e estágios completos no HIIT ($p = 0,62$) (Tabela 2).

Tabela 2. Dados da capacidade física e cárdio pulmonar dos voluntários submetidos ao exercício (grupos On e Vg). Todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetro	On (N =9)	Vg (N = 7)
VO_{2pico} (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	44,6 $\pm$ 15,7	37,8 $\pm$ 6,6
Potência Máxima (W)	237 $\pm$ 49	242 $\pm$ 27
Potência no limiar de lactato (W)	155 $\pm$ 34	150 $\pm$ 1
Estágios completados do HIIT	8 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1

5.1.2 Consumo alimentar

A avaliação da dieta dos participantes com recordatórios válidos, indicou diferença já esperada na ingestão de β -alanina, apenas os onívoros ingeriram esse β -aminoácido (0,8 $\pm$ 0,3 vs. 0.0 $\pm$ 0.0 g/dia). Já em relação a outros nutrientes evidenciou-se diferença significativa tanto na ingestão total de proteínas ($p = 0,037$; Tabela 3) quanto na contribuição relativa das proteínas para o valor energético total (%VET) ($p = 0,008$; Tabela 3), quando comparados onívoros e vegetarianos. Entretanto, ao ajustar o consumo proteico em função do peso corporal, não se observaram diferenças estatisticamente relevantes entre os grupos ($p = 0,059$; Tabela 3). A fração percentual de calorias derivadas dos carboidratos foi mais elevada nos vegetarianos em comparação aos onívoros ($p = 0,004$; Tabela 3). Por outro lado, não foram detectadas diferenças significativas no consumo absoluto de carboidratos, na ingestão de lipídeos ou no valor energético total (VET) entre os dois grupos (todos $p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Ingestão nutricional dos voluntários onívoros (grupos CT e Vg) e vegetarianos (grupo Vg) com recordatórios válidos. Todos os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Nutrientes	Onívoros (N = 9)	Vegetarianos (N=5)	p
VET	2308 $\pm$ 487	2441 $\pm$ 562	0,416
Proteína (g/dia)	171,2 $\pm$ 21,7	132 $\pm$ 38,4	0,037*
Proteína(g/kg)	2,1 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,5	0,059
Proteína (%VET)	30,4 $\pm$ 5,6	18,2 $\pm$ 1,3	0,008*
Carboidrato (g/dia)	264,9 $\pm$ 95,4	398,3 $\pm$ 102,7	0,102
Carboidrato (%VET)	44,9 $\pm$ 6,5	60,0 $\pm$ 3,7	0,004*
Lipídeos (g/dia)	62,7 $\pm$ 16,7	65,8 $\pm$ 9,5	0,791
Lipídeos (%VET)	24,7 $\pm$ 5,7	21,7 $\pm$ 2,4	0,599

5.2 Análise da Expressão Gênica

Não foram detectados *outliers* com a avaliação por *z-score* em nenhum dos grupos, genes ou tempos testados.

5.2.1. Resultados análise ANCOVA

Nas análises incluindo o grupo CT (CT, n=5; On, n=9; Vg, n=7), nenhum dos quatro genes apresentou evidência consistente na interação Grupo $\times$ Tempo (TauT p=0,118; PAT1 p=0,147; CARN5 p=0,659; CNDP2 p=0,064) (Figura 5). No entanto, para o gene CNDP2 observou-se evidência fraca de diferença entre os grupos ao longo do tempo (p = 0,064).

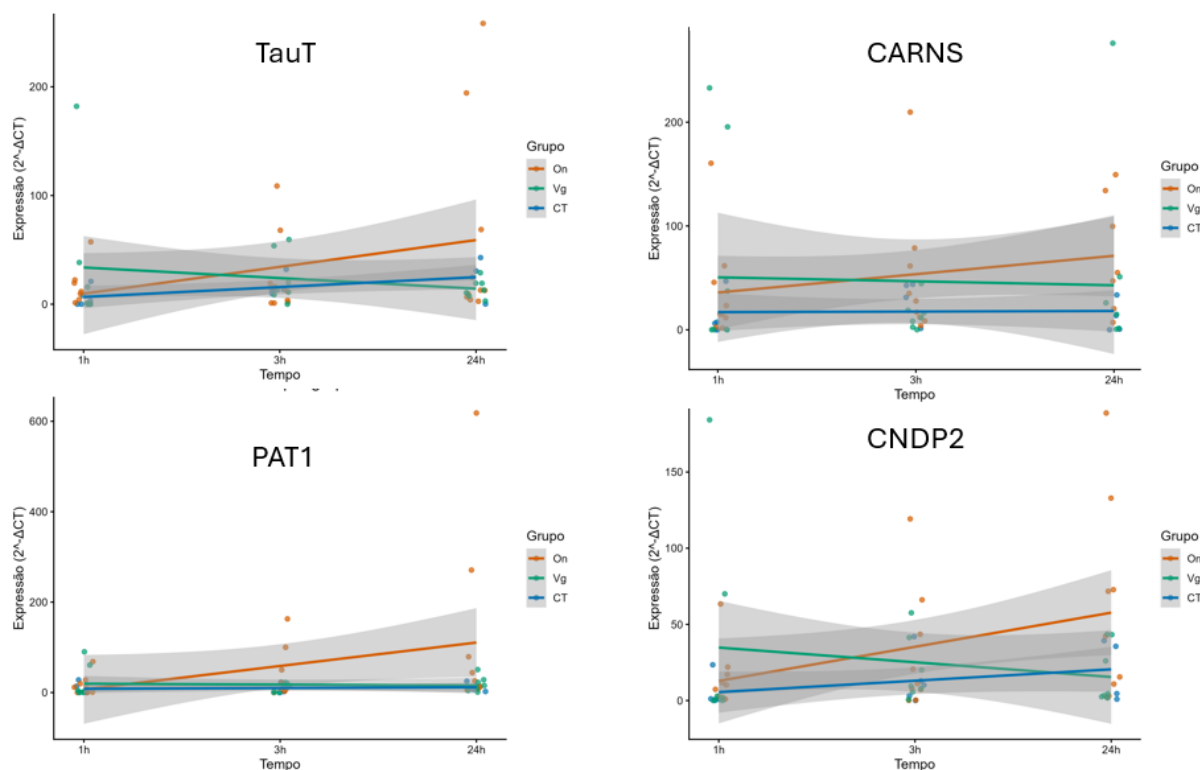


Figura 4. Tendências lineares de alteração na expressão gênica ao longo da variação do tempo para os genes TauT, PAT1, CARNS e CNDP2 nos grupos onívoros submetidos ao HIIT (On), vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg) e onívoros não submetidos ao HIIT (CT) ($p > 0,05$).

Quando o grupo CT foi excluído da análise, restringindo a comparação entre On ($n=9$) e Vg ($n=7$), os genes TauT, PAT1 e CARNS permaneceram sem diferenças significativas em relação as inclinações da expressão gênica ao longo do tempo (TauT $p=0,068$; PAT1 $p=0,113$; CARNS $p=0,455$). Para o gene TauT observou-se evidência fraca de diferença entre os grupos ($p = 0,068$). Contudo, o gene CNDP2 apresentou evidência de interação Grupo $\times$ Tempo na inclinação da expressão gênica estatisticamente significativa ($p=0,038$) (Figura 6 e 7). Esse resultado revela que os grupos On e Vg exibiram inclinações distintas: enquanto o grupo Vg apresentou tendência de redução da expressão relativa de CNDP2 ao longo do tempo, o grupo On apresentou tendência ao aumento da expressão.

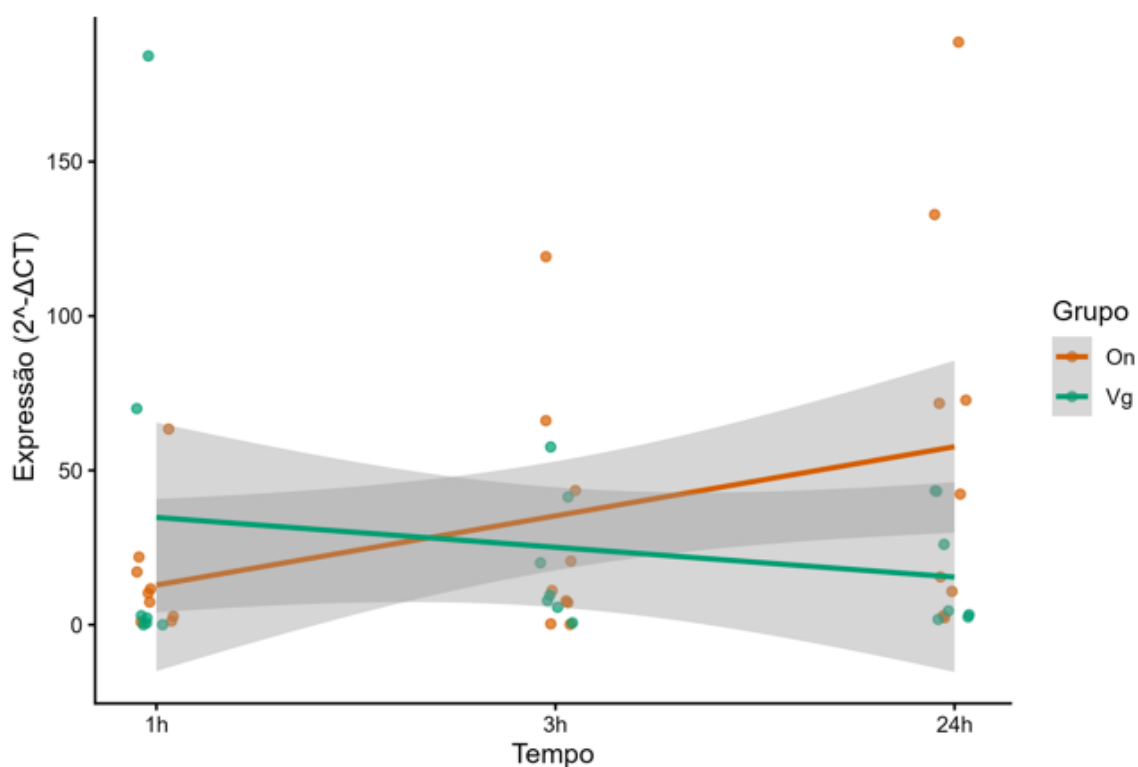


Figura 5. Tendência linear da alteração da expressão do gene CNDP2 ao longo do tempo sem o grupo de onívoros não submetidos ao HIIT (CT), comparando apenas os grupos onívoros submetidos ao HIIT (On) e vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg) ($p=0,038$).

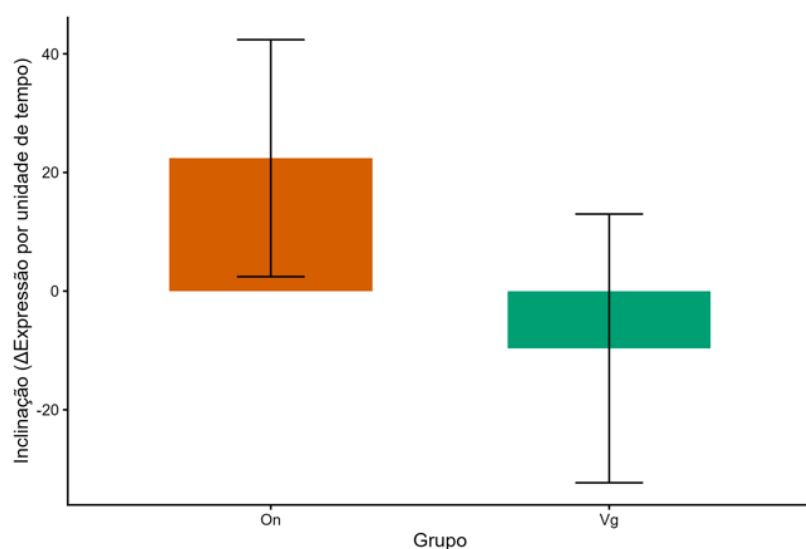


Figura 6. Inclinação das retas por grupo para a variação da expressão ao longo do tempo para o gene CNDP2 sem de onívoros não submetidos ao HIIT (CT), comparando apenas os grupos onívoros submetidos ao HIIT (On) e vegetarianos submetidos ao HIIT (Vg) ($p=0,038$).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão dos genes CARNS e PAT1 não apresentou alterações significativas ao longo do tempo ou entre os grupos experimentais. O gene TauT apresentou algum nível de significância na interação Grupo x Tempo, após a análise sem o grupo controle. Já o gene CNDP2 apresentou evidências na trajetória temporal da expressão entre os grupos On e Vg, evidenciando uma alta diferença significativa na relação Grupo x Tempo. (Tabela X)

Tabela 4. Dados numéricos de p e F (com ou sem CT), nos efeitos de tempo, grupo e interação grupo tempo da ANCOVA. *: p com evidência significativa ($p < 0,05$); #: p com baixo nível de evidência ($0,05 < p < 0,1$).

Gene	Efeito	F (com CT)	p (com CT)	F (sem CT)	p (sem CT)
CARNS	Tempo	0.29	0.749	0.36	0.550
	Grupo	0.32	0.576	0.42	0.521
	Grupo × Tempo	0.42	0.659	0.57	0.455
CNDP2	Tempo	1.83	0.171	2.72	0.107
	Grupo	1.23	0.274	0.74	0.395
	Grupo × Tempo	2.94	0.065 [#]	4.70	0.038 [*]
PAT1	Tempo	0.59	0.559	0.85	0.361
	Grupo	1.60	0.211	2.26	0.140
	Grupo × Tempo	1.99	0.147	2.62	0.113
TauT	Tempo	1.43	0.248	2.18	0.148
	Grupo	1.17	0.287	0.68	0.417
	Grupo × Tempo	2.26	0.118	3.60	0.068 [#]

6. Discussão

Os resultados do presente estudo indicaram que a expressão dos genes relacionados à carnosina não foi modificada nas avaliações realizadas 1, 3 ou 24 horas após uma única sessão de HIIT com o grupo CT. Entretanto, análises estatísticas sem o grupo CT, mostraram que o perfil de expressão do gene CNDP2 pós-exercício diferiu entre vegetarianos e onívoros, com aumento nos indivíduos onívoros e redução nos vegetarianos. Essa divergência pode indicar que a dieta exerce um papel modulador na regulação pós-exercício do metabolismo da carnosina, possivelmente promovendo maior turnover dessa molécula em onívoros, enquanto vegetarianos apresentariam uma resposta de conservação metabólica. Tal mecanismo regulatório pode contribuir para explicar achados prévios do grupo, nos quais o treinamento intervalado de alta intensidade crônico resultou em aumento do conteúdo muscular de carnosina em vegetarianos. A redução da expressão de CNDP2 observada após o exercício no grupo VG poderia, portanto, limitar a degradação da carnosina e favorecer seu acúmulo ao longo do tempo, representando uma adaptação molecular específica associada ao padrão dietético.

6.1 Expressão Gênica

A análise da expressão de três dos quatro genes avaliados (TauT, PAT1 e CARNS) não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais, tanto nos modelos de ANCOVA com CT ou sem CT. No entanto, o gene CNDP2 apresentou um achado relevante: embora, na ANCOVA incluindo o grupo CT, tenha sido observada apenas alguma de interação Grupo $\times$ Tempo, essa interação tornou-se estatisticamente significativa quando o grupo CT foi excluído da análise. Esse resultado indica que os grupos On e Vg exibiram inclinações distintas ao longo do tempo: enquanto o grupo Vg apresentou tendência de redução na expressão relativa de CNDP2, o grupo On mostrou uma tendência de aumento.

Nossos achados podem representar um ponto de partida para compreender o aumento no conteúdo muscular de carnosina induzido pelo exercício físico na ausência de ingestão de β -alanina, conforme descrito por Painelli et al. (2018). Embora esses autores tenham observado aumento da carnosina muscular sem alteração na expressão gênica, é importante destacar que as biópsias foram obtidas

em estado de repouso, pelo menos 72 horas após o exercício antes e depois de um período de 12 semanas de HIIT. Tal delineamento constitui uma limitação relevante, pois impede a identificação de possíveis alterações agudas na expressão gênica induzidas pelo HIIT, as quais poderiam estar associadas às adaptações crônicas observadas posteriormente.

De fato, considerando-se outros genes relacionados às adaptações fisiológicas decorrentes do treinamento, é comum observar respostas agudas logo após o exercício (Cameron-Smith, 2002; Hargreaves, 2015). Assim, torna-se essencial investigar essas modificações iniciais na expressão dos genes ligados ao metabolismo da carnosina, a fim de elucidar se tais respostas poderiam explicar o aumento no conteúdo muscular de carnosina descrito por Painelli et al.

6.2 Regulação da carnosina muscular e expressão gênica

Para o gene CNDP2, os grupos diferiram quanto à inclinação da expressão ao longo do tempo, mesmo na ausência de diferenças nos níveis médios. Observou-se que o grupo Vg apresentou uma tendência de redução na expressão, enquanto o grupo On mostrou tendência de aumento. Essa discrepância sugere que CNDP2 pode estar particularmente envolvido em mecanismos modulados tanto pela dieta quanto pelo HIIT, o que pode representar uma possível via de atuação desse gene no processo descrito por Painelli et al. (2018).

A CNDP2 é a principal enzima responsável pela degradação da carnosina muscular, participando do controle de sua produção e do seu turnover (Evaraert et al, 2011). Nossos resultados indicam que o aumento da carnosina muscular observado em vegetarianos submetidos ao HIIT (Painelli et al., 2018) pode estar associado a uma regulação voltada à conservação metabólica da carnosina após as primeiras 24 horas do exercício. Tal fenômeno ocorreria por meio da redução da expressão de CNDP2, o que diminuiria a degradação da carnosina muscular e, conseqüentemente, promoveria, de forma crônica e a longo prazo, o acúmulo dessa molécula no músculo de indivíduos vegetarianos. Obviamente necessitamos de mais estudos para certificar esse fato, estamos apenas na base de hipóteses, já que vegetarianos ainda possuem uma concentração razoável de carnosina muscular (Painelli et al., 2018), o que pode indicar também uma síntese elevada.

Nos onívoros, por outro lado, apesar de não termos muitos estudos na área, há evidências de uma relação entre aumento do conteúdo muscular de carnosina e os grupos musculares trabalhados com o exercício, onde os músculos mais utilizados parecem apresentar um conteúdo maior de carnosina (Bex et al., 2014). Além disso temos o estudo de Suzuki et al. (2002) que, apesar de um espaço amostral baixo, mostra um aumento de carnosina muscular causado pelo treinamento com sprints, exercício similar ao HIIT realizado nesse trabalho. Estes aumentos poderiam estar mais relacionados à ingestão de β -alanina (Harris et al., 2006), já que no estudo de Bex et al. (2014) houve suplementação, mas também à ativação de mecanismos de síntese, não se relacionando à inibição de sua degradação. De fato, nossos resultados indicam uma tendência a aumento na expressão de CNBP2 ao longo das primeiras 24 horas após o HIIT, sugerindo uma propensão à intensificação da degradação da carnosina muscular em onívoros. Entretanto, como a literatura aponta que o exercício físico e a ingestão de β -alanina tendem a elevar, e não reduzir, o conteúdo de carnosina em onívoros (Suzuki et al. 2002; Bex et al., 2014; Harris et al., 2006; Hill et al., 20017), esse aumento na degradação pode refletir apenas um turnover mais dinâmico e eficiente, sem implicar redução do conteúdo total.

Naturalmente, não é possível afirmar que a CNBP2 seja a única responsável pelo aumento de carnosina muscular observado em vegetarianos submetidos ao HIIT. O presente estudo avaliou apenas três momentos pós-exercício (1 h, 3 h e 24 h), sendo plausível que alterações adicionais na expressão gênica ocorram após ou entre esses períodos de tempo. Além disso, outros genes não analisados podem também participar da regulação da síntese e degradação da carnosina muscular em vegetarianos e onívoros. Sabe-se que a homeostase da carnosina é regulada por três principais mecanismos: a captação de β -alanina, a síntese de carnosina e a sua degradação (Harris et al., 2006; Artioli, 2010; Blancquaert, 2015).

No que se refere à captação de β -alanina e histidina pelo músculo, os transportadores TauT e PAT1 desempenham papel central. Conforme amplamente descrito na literatura, a β -alanina é o fator limitante para a síntese de carnosina muscular (Harris et al., 2006). Assim, seria plausível supor que um aumento na expressão desses transportadores pudesse contribuir para o incremento de carnosina muscular observado em vegetarianos no estudo de Painelli et al. (2018). No entanto, em nosso estudo, não foram detectadas alterações significativas na expressão gênica de TauT ou PAT1, o que sugere que o aumento da carnosina muscular descrito por

Painelli et al. (2018) não esteja associado a mecanismos de transporte desses aminoácidos. Dessa forma, é provável que esses genes não exerçam influência direta na regulação da carnosina muscular em vegetarianos. Isso estaria de acordo com achados de Saunders et al. (2017), que observaram uma diminuição em TauT após suplementação crônica de β -alanina, possivelmente mostrando um importante papel no aumento da carnosina muscular causada pela suplementação e não pela atividade física em si.

No caso do gene CARNS, principal envolvido na síntese de carnosina muscular, também não foram observadas diferenças significativas na expressão ao longo do tempo. Tal achado sugere que a síntese de carnosina possa não ter sido um dos fatores determinantes para o aumento observado em vegetarianos (Painelli et al., 2018), ou que os intervalos temporais avaliados em nosso protocolo não tenham sido suficientes para captar sua possível regulação. Apesar de esse resultado reforça a hipótese de que, em vegetarianos, o HIIT não promove aumento expressivo na síntese ou no turnover da carnosina ao longo do tempo, mas sim uma modulação voltada à diminuição de sua degradação.

É importante destacar, ainda, a existência de variabilidade gênica entre os indivíduos para os genes analisados, o que pode justificar a ampla dispersão dos valores de expressão observados entre os voluntários. Polimorfismos genéticos já foram descritos para alguns desses genes tanto em humanos quanto em modelos murinos (Gregor et al., 1994; Thomas et al., 2014; Guilherme et al., 2017). No entanto, até o momento, não há evidências na literatura que indiquem se essas variações genotípicas interferem de forma significativa no metabolismo da carnosina ou nas respostas adaptativas induzidas pelo exercício.

6.3 Carnosina muscular e fígado

Para que o aumento da carnosina muscular observado em voluntários vegetarianos por Painelli et al. (2018) ocorresse, é provável que tenha havido algum tipo de regulação ou modulação no metabolismo da carnosina ou da β -alanina, seja no próprio músculo ou em outros tecidos metabolicamente relevantes, como o fígado — principal órgão responsável pela produção endógena de β -alanina (Trexler et al., 2015; Saunders et al., 2017a). Um aumento na síntese hepática de β -alanina e carnosina poderia elevar a disponibilidade plasmática desse aminoácido, favorecendo

sua captação pelo músculo e, conseqüentemente, estimulando a síntese de carnosina muscular. Nesse contexto, o fígado poderia desempenhar papel análogo ao da suplementação de β -alanina, aumentando sua concentração circulante e potencializando o acúmulo muscular subsequente.

Considerando que a suplementação de β -alanina é amplamente reconhecida por elevar os níveis de carnosina muscular (Saunders et al., 2017b; Blancquaert et al., 2018), é plausível supor que um aumento plasmático decorrente de maior produção hepática também pudesse gerar efeito semelhante. No entanto, essa hipótese permanece especulativa, uma vez que não há, até o momento, evidências diretas que relacionem a produção hepática de β -alanina à prática de exercício físico ou às concentrações de carnosina muscular em humanos.

6.4 Consumo alimentar

Os resultados mostraram que a ingestão absoluta de proteínas foi maior entre os onívoros em comparação aos vegetarianos. No entanto, ao ajustar o consumo de proteínas pelo peso corporal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Observou-se ainda que a dieta dos onívoros apresentou maior proporção energética proveniente de proteínas, enquanto a dos vegetarianos teve maior contribuição de carboidratos, em concordância com achados prévios da literatura (Davey et al., 2003; Clarys et al., 2013; Papier et al. 2019). No caso de β -alanina, como já esperado, só tivemos ingestão em onívoros.

Os achados relacionados à ingestão de β -alanina reforçam dados prévios da literatura, com valores médios entre onívoros semelhantes aos reportados anteriormente (Saunders et al., 2017b). Como esperado, vegetarianos não mostraram consumo desse aminoácido, uma vez que sua presença está restrita às carnes (Trexler et al, 2015; Saunders et al, 2017; Painelli et al., 2018). Tal fato ajuda a compreender por que estudos anteriores demonstraram diferenças no conteúdo de carnosina muscular entre esses grupos (Harris et al., 2012; Painelli et al., 2018). Embora, possa haver indícios de que a ingestão proteica possa influenciar os níveis de carnosina (Varanoske, 2017), não é possível concluir se esse efeito se deve ao maior aporte de carne — e, portanto, de β -alanina — ou ao total de proteínas consumidas. Pelos dados mais sensíveis, atuais e citados na literatura (Saunders meta-analise), temos que o aumento da carnosina está intimamente relacionado ao

consumo de β -alanina, e portanto os onívoros tendem a terem valores maiores de carnosinas que vegetarianos.

Em relação à ingestão de proteínas, os resultados sugerem diferenças absolutas entre onívoros e vegetarianos, mas essas deixam de ser significativas quando ajustadas pelo peso corporal. Ainda assim, o maior percentual de proteínas no VET dos onívoros pode ser explicado pela predominância de carnes na dieta, enquanto a maior contribuição de carboidratos nos vegetarianos reflete o perfil nutricional das fontes vegetais de proteína. Estudos anteriores apontam que uma ingestão proteica elevada pode auxiliar na manutenção de L-histidina e, consequentemente, no suporte ao conteúdo muscular de carnosina, sobretudo em situações de suplementação de β -alanina (Blancquaert et al., 2017; Varanoske et al., 2017). A real influência do consumo habitual de proteínas sobre a carnosina muscular ainda permanece em aberto, reforçando a necessidade de investigações.

6.5 Limitações do estudo

É importante destacar que o tamanho amostral do presente estudo foi inferior ao planejado. Essa limitação implica que algumas das diferenças observadas possam não ter alcançado significância estatística devido ao número reduzido de voluntários (N aquém do ideal), e não necessariamente por ausência de efeito biológico ou limitações metodológicas. Embora o tamanho total da amostra tenha sido semelhante ao de outros estudos da literatura, como o de Painelli et al. (2018), a distribuição desigual entre os grupos experimentais resultou em um número menor de participantes vegetarianos, o que pode ter reduzido o poder estatístico para detectar diferenças específicas entre os grupos.

Os tempos selecionados para análise (1 h, 3 h e 24 h pós-HIIT) são usualmente utilizados para mostrar alterações na expressão gênica causada por exercício (Willoughby & Rosene, 2003; Little et al., 2011; Bonafiglia et al., 2017), e por isso foram escolhidos em nosso estudo. Porém, eles podem não ter captado todas as alterações na expressão gênica, especialmente aquelas que ocorrem de forma mais tardia. É plausível que modificações relevantes se manifestem entre 24 e 72 horas após o exercício — intervalo utilizado por Painelli et al. (2018) — ou mesmo ao longo das 12 semanas de treinamento crônico. Assim, futuras investigações que incluam períodos de coleta adicionais poderiam elucidar melhor a dinâmica temporal dessas

respostas moleculares. Apesar disso, esse é um primeiro estudo que mostra como a expressão se comporta após o HIIT, nesses períodos específicos.

Uma limitação relevante do presente trabalho foi a impossibilidade de quantificar as concentrações musculares e plasmáticas de beta-alanina e carnosina. Essa análise não pôde ser realizada devido a falhas técnicas no espectrômetro de massas do Laboratório de Química Analítica da USP de São Carlos, equipamento que seria utilizado em parceria para tais determinações. As amostras correspondentes permanecem devidamente armazenadas, e ainda há a intenção de realizar essas análises futuramente. A quantificação da carnosina muscular, em particular, seria essencial para verificar se a modulação da expressão de CNBP2 observada em vegetarianos poderia estar associada a alterações efetivas nos níveis de carnosina após 24 horas do HIIT. Além disso, permitiria avaliar se o exercício promoveria modificações agudas (1 h, 3 h e 24 h) nas concentrações musculares e plasmáticas dessas moléculas, principalmente agora com os indícios que o gene CNBP2 nos trouxeram. Essa ausência de dados sobre as concentrações musculares e plasmáticas de carnosina constitui uma limitação significativa, impossibilitando a correlação direta entre a expressão gênica e as alterações metabólicas efetivas.

Também foi realizada a tentativa de análise da expressão do gene ABAT; entretanto, não foi possível obter resultados confiáveis por PCR. Essa limitação pode ter ocorrido devido à degradação do primer, mas também pela possível baixa ou ausência de expressão desse gene no músculo esquelético humano. A literatura sobre o tema é escassa — até o momento, apenas três estudos reportaram tentativas de avaliar a expressão de ABAT nesse tecido (Everaert et al., 2011; Saunders et al., 2017; Painelli et al., 2018). No trabalho de Everaert et al. (2011), inclusive, a análise não pôde ser realizada em músculo humano, sendo restrita a amostras de musculatura murina. Tal evidência reforça a hipótese de que ABAT apresenta baixa ou inexistente expressão em músculo esquelético humano, o que explicaria a ausência de resultados em nosso estudo e a dificuldade recorrente em investigar esse gene.

6.6. Perspectivas futuras

Nosso trabalho apresenta os primeiros dados acerca de como o HIIT pode afetar, de forma aguda, a expressão gênica relacionada ao metabolismo da carnosina

em indivíduos onívoros e vegetarianos. Os resultados obtidos oferecem indícios relevantes de que esses grupos podem apresentar uma regulação distinta dos mecanismos de síntese e degradação da carnosina, o que representa um achado de grande relevância para a compreensão do metabolismo dessa molécula no tecido muscular.

Atualmente, já existem evidências robustas de que a suplementação com β -alanina aumenta as concentrações de carnosina muscular (Saunders et al., 2017). Contudo, ainda há escassez de estudos que investiguem alterações na carnosina muscular decorrentes exclusivamente da atividade física. Nosso estudo contribui para preencher essa lacuna ao explorar a possível relação entre exercício intermitente de alta intensidade e o metabolismo da carnosina em onívoros e vegetarianos, oferecendo subsídios para avanços em relação aos achados prévios de Painelli et al. (2018).

Além disso, nossos resultados podem auxiliar na compreensão de como indivíduos vegetarianos poderiam potencialmente aumentar o conteúdo de carnosina muscular a curto prazo sem recorrer à suplementação de β -alanina — um suplemento de origem exclusivamente animal. Tal possibilidade seria altamente relevante para o desenvolvimento de estratégias de treinamento e desempenho físico direcionadas a atletas vegetarianos.

Como perspectivas futuras, destaca-se a necessidade da quantificação das concentrações de carnosina muscular e plasmática por espectrometria de massa, a fim de verificar se ocorrem aumentos agudos pós-HIIT em vegetarianos ou onívoros. Adicionalmente, investigações futuras devem considerar a avaliação de outros tempos pós-exercício, bem como o aumento do tamanho amostral, para ampliar a robustez estatística das análises.

7. Conclusão

Este estudo aprofunda a linha de investigação sobre a interação entre dieta e o exercício na regulação molecular aguda do metabolismo da carnosina, evidenciando um potencial papel da CNDP2 nesse processo para vegetarianos. Apesar das limitações apresentadas, os resultados obtidos oferecem valiosos caminhos futuros para a formulação de hipóteses e destacam a importância de compreender a resposta molecular individualizada ao exercício físico em diferentes contextos dietéticos.

REFERÊNCIAS

ABE H. (2000) Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. **Biochemistry-Moscow** 65(7): 757-765.

ADIBI SA. Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance. **Am J Physiol.** 1997;272(5 Pt 1):E723-36.

ALLEN DG, LAMB GD, WESTERBLAD H. Skeletal muscle fatigue: Cellular mechanisms. **Physiol Rev.** 2008;88(1):287-332.

AMRHEIN, Valentin; GREENLAND, Sander; McSHANE, Blake. The earth is flat ($p > 0.05$): significance thresholds and the crisis of unreplicable research. **PeerJ**, San Diego, v. 5, e3544, 2017.

ANDERSON CM, GANAPATHY V, THWAITES DT. Human solute carrier SLC6A14 is the betaalanine carrier. **J Physiol.** 2008;586(17):4061-7.

ARTIOLI GG, GUALANO B, SAUNDERS B, DOLAN E. The muscle carnosine response to beta-alanine supplementation: a systematic review with bayesian individual and aggregate data E-Max model and meta-analysis. **Front Physiol.** 2020;11:913.

ARTIOLI GG, GUALANO B, SMITH A, STOUT J, LANCHAH JR. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Med Sci Sports Exerc.** 2010;42(6):1162-73.

ASATOOR AM, BANDO JK, LANT AF, et al. (1970) Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. **Gut** 11(3): 250-254.

BAGUET A, EVERAERT I, DE NAEYER H, et al. (2011) Effects of sprint training combined with vegetarian or mixed diet on muscle carnosine content and buffering capacity. **European Journal of Applied Physiology** 111(10): 2571-2580.

BAKER PR, CRAMER SD, KENNEDY M, ASSIMOS DG, HOLMES RP. Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells. ***Am J Physiol Cell Physiol.*** 2004;287(5):C1359-65.

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

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

BERGSTROM J. (1975) Percutaneous Needle-Biopsy of Skeletal-Muscle in Physiological and Clinical Research. ***Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*** 35(7): 606-616.

BEX T, CHUNG W, BAGUET A, et al. (2014) Muscle carnosine loading by beta-alanine supplementation is more pronounced in trained vs. untrained muscles. ***Journal of Applied Physiology*** 116(2): 204-209.

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

BISPO VS, DE ARRUDA CAMPOS IP, DI MASCIO P, MEDEIROS MH. Structural elucidation of a carnosine-acrolein adduct and its quantification in human urine samples. ***Sci Rep.*** 2016;6:19348.

BLANQUAERT, L.; EVERAERT, I.; DERAUVÉ, W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. ***Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care***, v. 18, n. 1, p. 63-70, jan. 2015.

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, DERAUVÉ W, EVERAERT I.

Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by β -alanine transamination. **J Physiol.** 2016;594(17):4849-63.

BOLDYREV AA. (1993) Does carnosine possess direct antioxidant activity? **Int J Biochem** 25(8): 1101-1107.

BOLDYREV A, FEDOROVA T, STEPANOVA M, DOBROTVORSKAYA I, KOZLOVA E, BOLDANOVA N, BAGYEVA G, IVANOVA-SMOLENSKAYA I, ILLARIOSHKIN S. Carnosine [corrected] increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. **Rejuvenation Res.** 2008;11(4):821-7.

BOLDYREV AA, ALDINI G AND DERAWE W. (2013) Physiology and Pathophysiology of Carnosine. **Physiological Reviews** 93(4): 1803-1845.

BONAFIGLIA, J. T. et al. Acute upregulation of PGC-1 α mRNA associates with improvements in skeletal muscle oxidative capacity following training. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 12, p.

BRISOLA GMP, ZAGATTO AM. Ergogenic effects of β -alanine supplementation on different sports modalities: Strong evidence or only incipient findings? **J Strength Cond Res.** 2019;33(1):253-282.

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes.** 2005;54(6):1615-25.

BURCHAM PC, KAMINSKAS LM, FONTAINE FR, PETERSEN DR, PYKE SM. Aldehydesequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. **Toxicology.** 2002;181-182:229-36.

CAMERON-SMITH, D. Exercise and skeletal muscle gene expression. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 3, p. 209-213, mar. 2002.

CARVALHO VH, OLIVEIRA AHS, DE OLIVEIRA LF, et al. (2018) Exercise and beta-alanine supplementation on carnosine-acrolein adduct in skeletal muscle. **Redox Biol** 18: 222-228.

CHENG B, KUIPERS H, SNYDER AC, et al. (1992) A new approach for the determination of ventilator and lactate thresholds. **Int J Sports Med** 13: 518-522.

CHRISTENSEN HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. **Physiol Rev.** 1990;70(1):43-77.

CLARYS, P. et al. Comparison of nutritional quality of the vegan, vegetarian, semi-vegetarian, pesco-vegetarian and omnivorous diet. **Appetite**, v. 64, p. 123-130, 2013.

COFFEY, VG.; HAWLEY, JA. *The molecular bases of training adaptation*. **Sports Medicine**, v. 37, n. 9, p. 737-763, 2007.

DAVEY, G. K. et al. EPIC-Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33 883 meat-eaters and 31 546 non meat-eaters in the UK. **Public Health Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 259-268, 2003.

DOLAN E, SWINTON PA, PAINELLI VS, STEPHENS HEMINGWAY B, MAZZOLANI B, INFANTE SMAIRA F, SAUNDERS B, ARTIOLI GG, GUALANO B. A Systematic Risk Assessment and Meta-Analysis on the Use of Oral β -Alanine Supplementation. **Adv Nutr.** 2019;10(3):452-463.

DUNNETT M, HARRIS RC, DUNNETT CE, et al. (2002) Plasma carnosine concentration: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage. **Equine Vet J Suppl** (34): 283-287.

DUNNETT M, HARRIS RC, SOLIMAN MZ, SUWAR AA. Carnosine, anserine and taurine contents in individual fibres from the middle gluteal muscle of the camel. **Res Vet Sci.** 1997;62(3):213–6.

DUAN C, DELP MD, HAYES DA, DELP PD, ARMSTRONG RB. Rat skeletal muscle

mitochondrial $[Ca^{2+}]$ and injury from downhill walking. ***J Appl Physiol*** (1985). 1990;68(3):1241-51.

DUTKA TL, LAMB GD. Effect of carnosine on excitation-contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. ***J Muscle Res Cell Motil.*** 2004;25(3):203-13.

DUTKA TL, LAMBOLEY CR, MCKENNA MJ, et al. (2012) Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers. ***J Appl Physiol*** (1985) 112(5): 728-736.

EDGE, Johann et al. Effects of high-intensity interval training on muscle buffer capacity and exercise performance. ***European Journal of Applied Physiology***, v. 96, n. 1, p. 97-105, 2006.

EDGE J, BISHOP D, GOODMAN C. Effects of chronic $NaHCO_3$ ingestion during interval training on changes to muscle buffer capacity, metabolism, and short-term endurance performance. ***J Appl Physiol.*** 2006;101(3):918–25

EGAN, B; SHARPLES, AP. *Molecular responses to acute exercise and their relevance for adaptations in skeletal muscle to exercise training.* ***Physiological Reviews***, v. 103, n. 3, p. 2057-2170, jul. 2023.

EVERAERT I, DE NAEYER H, TAES Y, DERAIVE W. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. ***Eur J Appl Physiol.*** 2013;113(5):1169-79. 58

EVERAERT I, MOOYAART A, BAGUET A, ZUTINIC A, BAELE H, ACHTEN E, TAES Y, DE HEER E, DERAIVE W. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. ***Amino Acids.*** 2011;40(4):1221-9.

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

FAVERO TG, PESSAH IN, KLUG GA. Prolonged exercise reduces Ca²⁺ release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Pflugers Arch.** 1993;422(5):472-5.

FEI YJ, KANAI Y, NUSSBERGER S, GANAPATHY V, LEIBACH FH, ROMERO MF, SINGH SK, BORON WF, HEDIGER MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. **Nature.** 1994;368(6471):563-6.

FRITZSON P, EFSKIND J. The effect of dietary 2-acetylaminofluorene on the uracildegrading enzymes in rat liver. **Cancer Res.** 1965;25:703-7.

FRITZSON P. The catabolism of C¹⁴-labeled uracil, dihydrouracil, and betaureidopropionic acid in rat liver slices. **J Biol Chem.** 1957;226(1):223-8.

GIBALA, Martin J. et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 5, p. 1077-1084, 2012.

GONÇALVES, LS. et al. Insulin does not stimulate β -alanine transport into human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 4, p. C777-C786, abr. 2020. DOI: 10.1152/ajpcell.00550.2019. PMID: 32101455.

GREGOR, P.; HOFF, M.; HOLIK, J.; HADLEY, D.; FANG, N.; COON, H.; BYERLEY, W. Dinucleotide repeat polymorphism in the human taurine transporter gene (TAUT). **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 12, p. 2263-2266, dez. 1994. PMID: 7881434.

GUILHERME, J. P. L. F.; LANCHÁ JÚNIOR, A. H. Single nucleotide polymorphisms in carnosinase genes (CNDP1 and CNDP2) are associated with power athletic status. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 533–542, dez. 2017.

HARGREAVES, M. Exercise and gene expression. ***Progress in Molecular Biology and Translational Science***, v. 135, p. 457-469, 2015.

HARRIS RC, DUNNETT M AND SNOW DH. (1991) Muscle carnosine content is unchanged during maximal intermittent exercise. ***Equine Exercise Physiology*** 3: 257-261.

HARRIS RC, TALLON MJ, DUNNETT M, et al. (2006) The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. ***Amino Acids*** 30(3): 279-289.

HARRIS RC, WISE JA, PRICE KA, et al. (2012) Determinants of muscle carnosine content. ***Amino Acids*** 43(1): 5-12.

HAYAISHI O, NISHIZUKA Y, TATIBANA M, TAKESHITA M, KUNO S. Enzymatic studies on the metabolism of β -alanine. ***J Biol Chem***. 1961;236:781-90.

HILL CA, HARRIS RC, KIM HJ, et al. (2007) Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. ***Amino Acids*** 32(2): 225-233.

HIPKISS AR. (2000) Carnosine and protein carbonyl groups: a possible relationship. ***Biochemistry (Mosc)*** 65(7): 771-778.

HIPKISS AR, MICHAELIS J AND SYRRIS P. (1995) Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. ***FEBS Lett*** 371(1): 81-85.

HOBSON RM, SAUNDERS B, BALL G, HARRIS RC, SALE C. Effects of β -alanine supplementation on exercise performance: A meta-analysis. ***Amino Acids***. 2012;43(1):25-37.

HORINISHI H, GRILLO M, MARGOLIS FL. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. ***J Neurochem***. 1978;31(4):909-19.

JACKSON MJ, JONES DA, EDWARDS RH. Experimental skeletal muscle damage: The nature of the calcium-activated degenerative processes. ***Eur J Clin Invest.*** 1984;14(5):369-74.

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

JONES, DP. Redefining oxidative stress. ***Antioxidants & Redox Signaling***, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

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

KAVIANI M, SHAW K, PHILIP DC. (2020) Benefits of creatine supplementation for vegetarians compared to omnivorous athletes: a systematic review. ***Int J Environ*** 17(9): 3041.

KENDRICK IP, HARRIS RC, KIM HJ, et al. (2008) 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*** 34(4): 547-554.

KENDRICK IP, KIM HJ, HARRIS RC, et al. (2009) The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. ***European Journal of Applied Physiology*** 106(1): 131-138.

KILHOVD BK, JUUTILAINEN A, LEHTO S, RÖNNEMAA T, TORJESEN PA, HANSEN KF, LAAKSO M. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: A population based 18 year follow-up study. ***Diabetologia*** 2007;50(7):1409-17.

KUANG J, MCGINLEY C, LEE MJC, et al. (2022) Interpretation of exercise-induced changes in human skeletal muscle mRNA expression depends on the timing of post-exercise biopsies. **Peer J** 10:e12856

LAKENS, Daniël. *Sample Size Justification*. **Collabra: Psychology**, v. 8, n. 1, artigo 33267, mar. 2022.

LAMB GD. Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. **J Muscle Res Cell Motil**. 2002;23(1):81-91.

LITTLE, J. P. et al. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 6, p. R1304-R1310, 2011.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

MANNION AF, JAKEMAN PM AND WILLAN PL. (1994) Effects of isokinetic training of the knee extensors on high-intensity exercise performance and skeletal muscle buffering. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol** 68(4): 356-361.

MILIONI F, DE POLI RAB, SAUNDERS B, et al. (2019) Effect of β -alanine supplementation during high-intensity interval training on repeated sprint ability performance and neuromuscular fatigue. **J Appl Physiol** 127: 1599 - 1610.

MIYAMOTO-MIKAMI, E; TSUJI, K; HORII, N, et al. *Gene expression profile of muscle adaptation to high-intensity intermittent exercise training in young men*. Scientific Reports, v. 8, art. 16811, nov. 2018.

MORA L, SENTANDREU MA AND TOLDRA F. (2007) Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*** 55(12): 4664-4669.

MUNCK BG, SCHULTZ SG. Interactions between leucine and lysine transport in rabbit ileum. ***Biochim Biophys Acta***. 1969;183(1):182-93.

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

PAINELLI VS, NEMEZIO KM, JESSICA A, et al. (2018) HIIT Augments Muscle Carnosine in the Absence of Dietary Beta-Alanine Intake. ***Med Sci Sports Exerc***.

PALACÍN M, ESTÉVEZ R, BERTRAN J, ZORZANO A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. ***Physiol Rev***. 1998;78(4):969-1054.

PARKHOUSE, W. S.; MCKENZIE, D. C.; HOCHACHKA, P. W.; OVALLE, W. K. Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. ***Journal of Applied Physiology***, v. 58, n. 1, p. 14-17, jan. 1985. DOI: 10.1152/jappl.1985.58.1.14. PMID: 3968004.

PAPIER, K. et al. Meat consumption and sources of protein in the UK Biobank: differences between meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans. ***Nutrients***, v. 11, n. 4, p. 824, 2019.

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

PAVLOV AR, REVINA AA, DUPIN AM, BOLDYREV AA, YAROLOV AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. ***Biochim Biophys Acta***. 1993;1157(3):304-12.

PERIM, P.; MARTICORENA, F. M.; RIBEIRO, F.; BARRETO, G.; GOBBI, N.; KERKSICK, C.; DOLAN, E.; SAUNDERS, B. Can the skeletal muscle carnosine response to beta-alanine supplementation be optimized? *Frontiers in Nutrition*, v. 6, Art. 135, 27 ago. 2019.

PERRY TL, HANSEN S, LOVE DL. Serum-carnosinase deficiency in carnosinaemia. *Lancet*. 1968;1(7554):1229-30.

RASHID I, VAN REYK DM, DAVIES MJ. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation in vitro. *FEBS Lett*. 2007;581(5):1067-70.

REZENDE, N. S.; RODRIGUES, M.; TRUEMAN, C.; PIGG, S.; BAEK, L.; HARRIS, R. C. The muscle carnosine response to beta-alanine supplementation. *Sports Medicine*, v. 50, n. 8, p. 1631-1642, ago. 2020.

REZENDE, N. S.; BESTETTI, G. C.; OLIVEIRA, L. F.; MAZZOLANI, B. C.; SMAIRA, F. I.; DUMAS, A.; SWINTON, P.; SAUNDERS, B.; DOLAN, E. Dietary β -Alanine Intake Assessed by Food Records Does Not Associate With Muscle Carnosine Content in Healthy, Active, Omnivorous Men and Women. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, v. 33, n. 3, p. 133-140, mar. 2023.

RIEDL E, KOEPEL H, BRINKKOETTER P, STERNIK P, STEINBEISSER H, SAUERHOEFER S, JANSSEN B, VAN DER WOUDE FJ, YARD BA. A CTG polymorphism in the CNDP1 gene determines the secretion of serum carnosinase in Cos-7 transfected cells. *Diabetes*. 2007;56(9):2410-3.

ROBERGS RA, GHIASVAND F, PARKER D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(3):R502-16.

SAHLIN K, HARRIS RC AND HULTMAN E. (1975) Creatine kinase equilibrium and lactate content compared with muscle pH in tissue samples obtained after isometric exercise. *Biochem J* 152(2): 173-180.

SAKURAI S, YONEKURA H, YAMAMOTO Y, WATANABE T, TANAKA N, LI H, RAHMAN AK, MYINT KM, KIM CH, YAMAMOTO H. The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol.** 2003;14(8 Suppl 3):S259-63.

SANTOS L; GONÇALVES, LS.; BAGHERI-HANEI, S; MÖLLER, G; SALE C; JAMES RM.; ARTIOLI, GG. Insulin stimulates β -alanine uptake in skeletal muscle cells in vitro. *Amino Acids*, v. 53, n. 11, p. 1763-1766, nov. 2021.

SAUNDERS B, ELLIOTT-SALE K, ARTIOLI GG, et al. (2017a) Beta-alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. **Br J Sports Med** 51(8): 658-669.

SAUNDERS B, PAINELLI VS, LF DEO, et al. (2017b) Twenty-four Weeks of beta-Alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. **Med Sci Sports Exerc** 49(5): 896-906.

STEGEN S, BLANCQUAERT L, EVERAERT I, BEX T, TAES Y, CALDERS P, ACHTEN E, DERAIVE W. Meal and beta-alanine coingestion enhances muscle carnosine loading. **Med Sci Sports Exerc.** 2013;45(8):1478-85.

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

SUTTON JR, JONES NL AND TOEWS CJ. (1981) Effect of PH on muscle glycolysis during exercise. **Clin Sci (Lond)** 61(3): 331-338.

SUZUKI, Y.; ITO, O.; MUKAI, N.; TAKAHASHI, H.; Takamatsu, K. High level of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. **Japanese Journal of Physiology**, v. 52, n. 2, p. 199-205, abr. 2002.

TALLON, M. J.; HARRIS, R. C.; BOOBIS, L. H.; FALLOWFIELD, J. L.; WISE, J. A. The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. ***Journal of Strength and Conditioning Research***, v. 19, n. 4, p. 725-729, nov. 2005. DOI: 10.1519/041018.1. PMID: 16287364.

TEUFEL M, SAUDEK V, LEDIG JP, BERNHARDT A, BOULARAND S, CARREAU A, CAIRNS NJ, CARTER C, COWLEY DJ, DUVERGER D, GANZHORN AJ, GUENET C, HEINTZELMANN B, LAUCHER V, SAUVAGE C, SMIRNOVA T. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. ***J Biol Chem***. 2003;278(8):6521-31.

THOMAS, K. C.; STAGGIO-KLEIN, A.; OVERMYER, K. A.; FOX, E. C.; MEININGER, K.; WALDER, K.; SIMPSON, L. A.; COOK, J. L.; ZHANG, J.; et al. Evidence-based selection of commonly used RT-qPCR reference genes for skeletal muscle research. ***PLOS ONE***, v. 9, n. 8, e103395, 26 ago. 2014.

THWAITES DT, ANDERSON CM. The SLC36 family of proton-coupled amino acid transporters and their potential role in drug transport. ***Br J Pharmacol***. 2011;164(7):1802-16.

TREXLER, Eric T. et al. International society of sports nutrition position stand: Beta-alanine. ***Journal of the International Society of Sports Nutrition***, v. 12, n. 30, p. 1-14, 2015. DOI: 10.1186/s12970-015-0090-y.

VARANOSKE AN, HOFFMAN JR, CHURCH DD, WANG R, BAKER KM, DODD SJ, COKER NA, OLIVEIRA LP, DAWSON VL, FUKUDA DH, STOUT JR. Influence of Skeletal Muscle Carnosine Content on Fatigue during Repeated Resistance Exercise in Recreationally Active Women. ***Nutrients***. 2017 Sep 7;9(9):988. doi: 10.3390/nu9090988. PMID: 28880219; PMCID: PMC5622748

WILLOUGHBY, D. S.; ROSENE, J. M. Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. ***Medicine & Science in Sports & Exercise***, v. 35, n. 6, p. 923-929, 2003.

YAMASHITA T, SHIMADA S, GUO W, SATO K, KOHMURA E, HAYAKAWA T, TAKAGI T, TOHYAMA M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. **J Biol Chem.** 1997;272(15):10205-11.

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

YAZIGI SOLIS M, ARTIOLI GG, MONTAG E, et al. (2014) The liposuction-induced effects on adiponectin and selected cytokines are not affected by exercise training in women. **Int J Endocrinol** 2014: 315382.

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. DADOS DO INDIVÍDUO**

Nome completo _____

RG _____

CPF _____

Data de
nascimento _____Endereço
completo _____

CEP _____

Fone _____

E-mail _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA**1. Título do Projeto de Pesquisa**

Os efeitos agudos do exercício de alta intensidade no conteúdo de carnosina muscular e genes relacionados.

2. Pesquisador Responsável

Bruno Gualano/Bryan Saunders

3. Cargo/Função

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

4. Avaliação do risco da pesquisa:

☐ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO BAIXO ☒ RISCO MÉDIO ☐ RISCO MAIOR

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

5. Duração da Pesquisa

2 semanas

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

1. Esta pesquisa pretende investigar os efeitos agudos do exercício de alta intensidade no conteúdo de carnosina muscular, um composto envolvido no desempenho de exercício, e genes relacionados em humanos.
2. Os testes serão realizados no Laboratório de Fisiologia Aplicada e Nutrição na Escola de Educação Física e Esporte da USP sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan Saunders), enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permanecerá de prontidão nas instalações da unidade, em caso de alguma emergência médica.
3. Sua participação no estudo terá a duração de no máximo duas semanas com três visitas ao laboratório. Na primeira visita você fará um teste de ciclismo em que a carga (dificuldade) do teste será crescente, até que você entre em fadiga e não consiga mais manter o exercício.
4. Na segunda visita uma cânula será inserida na veia antecubital após a chegada e uma amostra de sangue será colhida. Esse procedimento será conduzido por um profissional treinado neste procedimento (Dr Luiz Riani ou Dr Bryan Sanders). Além disso, uma biópsia muscular será realizada; colheremos uma pequena (do tamanho de um grão de arroz cru) amostra de seu músculo, retirada da parte de frente de sua coxa (músculo vasto lateral). Essa amostra será importante para que possamos examinar o efeito do exercício na carnosina muscular e seus genes. Esse procedimento será conduzido por um médico experiente e treinado (Dr. Luiz Riani). Depois você será submetido a um protocolo de exercício de 6 a 10 séries de tiros de dois minutos em cicloergômetro, com dois minutos de intervalo, a 140% do limiar de lactato, previamente determinado durante a primeira visita. Imediatamente e três horas após o exercício, coletaremos mais duas biópsias musculares e amostras de sangue. Antes, durante e após o exercício serão coletados pequenas amostras de sangue da ponta de seu dedo para medirmos lactato e outros dados que nos dizem como está seu metabolismo (gasometria sanguínea).
5. Vinte e quatro horas após o protocolo de exercício, você retornará ao laboratório para uma biópsia muscular e amostra de sangue. Durante estas 24 h, você não pode comer carne ou qualquer alimento que possa conter beta-alanina. Os alimentos proibidos serão discutidos pessoalmente com o voluntário. Além disso, você preencherá diários alimentares para que possamos avaliar seu consumo alimentar.
6. A biópsia muscular causará um pequeno desconforto de picada no momento da anestesia. Embora sua perna esteja anestesiada (portanto, você não deverá sentir dor), a introdução da agulha de biópsia pode causar incômodo. Esse incômodo é rápido e não deve durar mais do que 2 ou 3 segundos. A biópsia é feita forma limpa e asséptica. Apesar da biópsia ser um procedimento invasivo, nossa equipe é bem experiente e treinada neste procedimento, e não existem relatos de problemas graves associados à biópsia em nosso

laboratório. Mesmo assim, havendo necessidade, você poderá ser encaminhado para o HU-USP (Hospital Universitário da USP) ou HC-FMUSP (Hospital das Clínicas).

7. A punção do dedo pode trazer um desconforto moderado devido à picada da agulha. A punção da veia pode trazer um desconforto no braço devido ao aperto pelo garrote e à picada da agulha. Além disso, em alguns casos poderá ocorrer um hematoma (mancha roxa) em seu braço. No entanto, apenas uma punção por sessão ocorrerá para inserir uma cânula na veia; posteriormente, todas as coletas de sangue serão retiradas desta cânula. Esta punção na veia será realizada nas últimas duas sessões; na segunda sessão serão coletadas até 3 seringas de 5 ml, que equivale a aproximadamente 15 ml. Na última visita, será coletada uma seringa de 5 ml. Todas as visitas terão lugar no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada e Nutrição na Escola de Educação Física e Esporte - USP. Todos os testes serão realizados sob a supervisão de um fisiologista treinado (Dr. Bryan Saunders), enquanto um médico (Dr. Luiz Riani) permanecerá de prontidão nas instalações da Unidade, em caso de alguma emergência médica.
8. As sessões de teste físico podem levá-lo a grande cansaço físico, já que serão de alta intensidade. Por fim, é possível que você sinta algum incômodo após ingerir a beta-alanina, pois ela pode causar uma sensação de “formigamento” da pele (parestesia). Caso isso ocorra, a sensação desaparece sozinha em cerca de 30 a 60 minutos e não oferece nenhum risco à saúde. Porém, para evitar que isso ocorra, o suplemento é especialmente formulado em tabletes especiais que diminuem as chances de isso ocorrer.
9. Ao participar como voluntário desta pesquisa, você terá acesso às avaliações padrão-ouro do seu estado de saúde e condicionamento físico. Além disso, você terá direito a consultas nutricionais, onde você receberá aconselhamento profissional sobre como pode melhorar seus hábitos alimentares. Você poderá tirar todas as dúvidas que tiver sobre alimentação e atividade física com profissionais altamente capacitados.

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

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para responder eventuais dúvidas;
2. Você terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, e ainda assim terá acesso aos resultados de todas as avaliações realizadas;
3. Todos os seus dados serão mantidos sob confidencialidade, sigilo e privacidade. Eles poderão ser utilizados para publicações científicas, mas sua identidade nunca será revelada;
4. Estará à sua disposição assistência no HU ou no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

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

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

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

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

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

VI. - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

--

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, ____/____/____

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

ANEXO II

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Bruno Gualano

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71621317.7.0000.5391

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.441.418

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

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



Continuação do Parecer: 2.441.418

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco envolvido no protocolo é médio.

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os comentários e sugestões do relator foram atendidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

N/A

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as sugestões foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_956080.pdf	03/10/2017 18:56:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BAAcuteResponses_PlataformaBrasil_FINAL_Amended.pdf	03/10/2017 18:56:05	Bryan Saunders	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_AcuteBA_Amended.pdf	03/10/2017 18:55:54	Bryan Saunders	Aceito

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

Página 02 de 03

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



Continuação do Parecer: 2.441.418

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Edilamar Menezes de Oliveira
(Coordenador)

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

Página 03 de 03