

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO  
MOVIMENTO HUMANO**

Ações quimiometabólicas ligadas a suplementação com  $\beta$ -alanina: Estudo em ratas.

Patrícia Carla Paulino Belotto  
2018

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

PATRÍCIA CARLA PAULINO BELOTTO

AÇÕES QUIMIOMETABÓLICAS LIGADAS A  
SUPLEMENTAÇÃO COM  $\beta$ -ALANINA: ESTUDO EM RATAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Ciências do Movimento Humano na área de Fisiologia e Treinamento Desportivo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA  
2018

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNIMEP  
Bibliotecária: Marjory Harumi Barbosa Hito - CRB-8/9128.

B452a	<p>Belotto, Patricia Carla Paulino</p> <p>Ações quimiometabólicas ligadas a suplementação com <math>\beta</math>-alanina : estudo em ratas / Patricia Carla Paulino Belotto. – 2018. 64 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva. Dissertação (Mestrado) – Universidade Metodista de Piracicaba, Ciências do Movimento Humano, Piracicaba, 2018.</p> <p>1. Suplementação Alimentar. 2. Metabolismo. 3. Eletrocardiografia. I. Silva, Carlos Alberto da. II. Título.</p> <p>CDU – 796</p>
-------	--

Dedico esse trabalho a minha família dentro e fora do mundo acadêmico, que me deram força para acreditar em minha capacidade e competência.

Dedico a DEUS que iluminou e Abençoou esse caminho de muitos obstáculos e grandes conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade dos conhecimentos adquiridos nesta conquista.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me aconselharam em tudo que faço.

Agradeço a minha família Carlos e Sophia pela compreensão e amor de sempre.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pelos ensinamentos, palavras, conhecimentos e experiências, proporcionando o meu crescimento intelectual, científico e profissional, que levarei para sempre em minha vida. Pela amizade com participação intensa e ativa nesse caminho sendo muito além de um orientador com seus conselhos e direcionamentos. Gratidão eterna, Muito Obrigada.

Ao prof. Dr. Olney Leite Fontes, ex Diretor da Facis, que me apoiou no instante que fui comunicá-lo sobre fazer o mestrado.

Ao ex reitor Marcio de Moraes por ter concedido e liberado meu mestrado com apoio.

A minha supervisora Darci, que também sempre me incentivou a continuar aprendendo.

Agradeço imensamente ao atual reitor Fabio Josgrilberg, por ter concluído esta etapa em minha vida, onde obtive a cota de Bolsa autorizada e concedida através do Convenção Coletiva de Trabalho 2018/2020.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba por toda a colaboração recebida, sentido a minha qualificação, crescimento profissional e pessoal.

Agradeço por todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para que eu alcançasse essa etapa em minha vida. Sinceramente muito obrigada!

O dia mais belo: hoje  
A coisa mais fácil: errar  
O maior obstáculo: o medo  
O maior erro: o abandono  
A raiz de todos os males: Egoísmo  
A distração mais bela: o trabalho  
A pior derrota: o desânimo  
Os melhores professores: as crianças e mestres  
A primeira necessidade: comunicar-se  
O que traz felicidade: ser útil aos demais  
O pior defeito: o mau humor  
A pessoa mais perigosa: a mentirosa  
O pior sentimento: o rancor  
O presente mais belo: o perdão  
O mais imprescindível: o lar  
A rota mais rápida: o caminho certo  
A sensação mais agradável: a paz interior  
O maior remédio: o otimismo  
A maior satisfação: o dever cumprido  
A força mais potente do mundo: a fé  
As pessoas mais necessárias: os pais  
A mais bela de todas as coisas: O AMOR

*Madre Teresa de Calcutá*

**“A verdadeira aprendizagem deve incluir sempre aquele que aprende,  
aquele que ensina e a relação entre essas pessoas”.**

Vygotsky

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

## RESUMO

Na busca de uma melhora da performance, aperfeiçoamento no condicionamento físico e aquisição de boa forma, diversas pessoas passaram a praticar regularmente atividade física. Neste aspecto, o uso de suplementos nutricionais passou a ser uma constante por atletas, ação que tem se difundido entre não atletas. Dentre os suplementos atualmente disponíveis, o aminoácido  $\beta$ -alanina (BA) tem se destacado baseado nas propriedades bioquímicas e suas ações diretas e indiretas, principalmente por ser a base estrutural da formação de carnosina, agente com ação primorosa no controle metabólico das fibras musculares e em consequência aumento na resistência à atividade física. Ao se pensar em melhora das condições energéticas do sistema muscular, não podemos desconsiderar o comprometimento na homeostasia, tal como o induzido pelo desuso gerado pela imobilização, neste sentido, deve-se destacar, que não existem estudos que avaliaram a ação da  $\beta$ -alanina (BA) em condições que promovem o desuso da musculatura esquelética, em especial a imobilização. O objetivo desse trabalho foi avaliar ações ligadas a suplementação com BA tendo como *locus* do estudo a condição de normalidade bem como na imobilização muscular. Foram utilizadas ratas Wistar (200-240g) divididas em grupos experimentais denominados: controle (C); tratadas com BA 7 dias (A7); tratadas com BA 15 dias (A15); imobilizadas (I); imobilizadas tratadas com BA 7 dias (IA7) e imobilizadas tratadas com BA 15 dias (IA15), todos com n=6/grupo. A suplementação com BA consistiu na administração do aminoácido disponível na água *ad libitum* na concentração de 1,8% e a imobilização foi realizada com a órtese de resina acrílica mantendo a posição do tornozelo esquerdo em 90°. A análise foi direcionada a índices de toxicidade; sensibilidade e secreção de insulina; parâmetros cardíacos, como eletrocardiografia, (ECG); frequência cardíaca, (FC); reservas de glicogênio (GLI) dos músculos sóleo (S) e gastrocnêmio branco (GB). Os dados foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido pela análise de variância (ANOVA) one way e pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Foi observado que o tratamento não promoveu toxicidade, houve ajustes na interface do processo secreção/sensibilidade à insulina (*in vivo* e *in vitro*) com maior efetividade no tratamento durante 15 dias; as reservas de GLI do músculo S e GB apresentaram-se maiores após 15 dias de tratamento se comparado ao C, porém, com maior expressão no GB que apresenta domínio de fibras tipo II. O estudo de captação de 2-deoxiglicose indicou predomínio no processo de incorporação a reservas de GLI se comparado a análise do processo oxidativo. Nos parâmetros eletrocardiográficos foi observado que o grupo C apresentou FC em repouso compatível com os valores preconizados para a espécie, no entanto, houve redução na temporização dos segmentos e ondas indicando maior velocidade de condução. A FC do grupo A7 apresentou-se reduzida em 23% se comparado ao C, por sua vez, no grupo A15 foi observado que a FC foi 70% maior se comparado ao grupo A7 e 30% maior se comparado ao C, indicando relação direta entre o tempo e os ajustes funcionais. Um ponto importante é que a ação da BA manifestou-se também no músculo imobilizado, porém, com menor intensidade. Conclui-se que as ações ligadas a suplementação com  $\beta$ -alanina, vão além da participação enquanto sequestrador de hidrogênio, o tratamento promoveu múltiplos efeitos em vias metabólicas, nos ajustes do sistema cardiovascular e na regulação da homeostasia energética das fibras musculares, no entanto, não foi eficiente em minimizar as alterações estruturais bem como a perda de massa classicamente descrita em músculos imobilizados, condição que pode refletir na manutenção do comprometimento funcional.

Palavras-Chave: suplementação,  $\beta$ -alanina, ratas, metabolismo, imobilização muscular, eletrocardiografia.

## ABSTRACT

In search of an improvement in performance, improvement in physical conditioning and acquisition of good form, several people began to practice regular physical activity. In this aspect, the use of nutritional supplements has become a constant for athletes, an action that has spread among non-athletes. Among the currently available supplements, the amino acid  $\beta$ -alanine (BA) has been highlighted based on the biochemical properties and their direct and indirect actions, mainly because it is the structural basis of the formation of carnosine, an agent with exquisite action in the metabolic control of muscle fibers and resulting in increased resistance to physical activity. When thinking about improving the energetic conditions of the muscular system, we cannot disregard the commitment in homeostasis, such as the induced by the disuse generated by the immobilization, in this sense, it should be emphasized that there are no studies that evaluated the action of  $\beta$ -alanine (BA) under conditions that promote skeletal muscle disuse, especially immobilization. The aim of this study was to evaluate actions related to supplementation with BA, taking as a starting point the normality condition as well as muscle immobilization. Wistar rats (200-240g) divided into experimental groups were used: control (C); treated with BA 7 days (A7); treated with BA 15 days (A15); immobilized (I); immobilized treated with BA 7 days (IA7) and immobilized treated with BA 15 days (IA15), all with  $n = 6/\text{group}$ . BA supplementation consisted of administering the available amino acid in water ad libitum at a concentration of 1.8% and immobilization was performed with the acrylic resin orthosis maintaining the position of the left ankle at  $90^\circ$ . The analysis was directed to toxicity indices; sensitivity and secretion of insulin; cardiac parameters such as electrocardiography (ECG); heart rate, (HR); glycogen reserves (GLI) of the soleus (S) and white gastrocnemius (GB) muscles. Data were analyzed by the Shapiro-Wilk normality test, followed by one-way ANOVA and Tukey post-test,  $p < 0.05$ . It was observed that the treatment did not promote toxicity, there were adjustments in the interface of the insulin secretion / sensitivity process (in vivo and in vitro) with greater effectiveness in the treatment during 15 days; GLI reserves of muscle S and GB were higher after 15 days of treatment compared to C, but with greater expression in GB that presented a type II fiber domain. The study of 2-deoxyglucose uptake indicated a predominance in the process of incorporation to GLI reserves when compared to the analysis of the oxidative process. In the electrocardiographic parameters, it was observed that the group C presented resting HR compatible with the values recommended for the species; however, there was a reduction in the timing of the segments and waves indicating a higher speed of conduction. The HR of the A7 group was reduced by 23% when compared to the C group, and in the A15 group it was observed that the HR was 70% higher when compared to the A7 group and 30% higher when compared to the C, indicating a direct relation between the time of ingestion and the functional adjustments. An important point is that the action of BA also manifested in the immobilized muscle, but with less intensity. It is concluded that the actions linked to  $\beta$ -alanine supplementation go beyond participation as a hydrogen sequester, the treatment promoted multiple effects on metabolic pathways, adjustments of the cardiovascular system and regulation of energetic homeostasis of muscle fibers, however, was not efficient in minimizing the structural alterations as well as the mass loss classically described in immobilized muscles, a condition that can reflect in the maintenance of the functional impairment.

Keywords: supplementation,  $\beta$ -alanine, rats, metabolism, muscle immobilization, electrocardiography.



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> -----	<b>8</b>
1.1	Imobilização Muscular-----	10
1.2	Relação $\beta$ –alanina/carnosina-----	13
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> -----	<b>16</b>
2.1	Objetivo geral-----	17
2.2	Objetivo específico-----	17
2.3	Fluxograma-----	18
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> -----	<b>19</b>
3.1	Animais-----	19
3.2	Tratamento $\beta$ –alanina-----	19
3.3	Imobilização-----	20
3.4	Teste de tolerância à Insulina-ITT-----	21
3.5	Teste de tolerância à Glicose-GTT-----	22
3.6	Índice de toxicidade-----	22
3.7	Análise eletrocardiográfica-----	22
3.8	Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	23
3.9	Avaliação do Índice de hidratação do músculo sóleo	24
3.10	Secreção de Insulina <i>in vitro</i> -----	24
3.11	Procedimento Incubação fatias músculo sóleo	26
3.12	Incubação fatias músculos-----	26
3.13	Glicogênio muscular-----	27
3.14	Determinação da relação Proteína Total-DNA	28
3.15	Análise estatística-----	28
3.16	Avaliação da massa e Índice de Ingesta	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> -----	<b>29</b>
4.1	Avaliação da Toxicidade tratamento com $\beta$ –alanina	29

4.2	Hidratação-----	30
4.3	Relações entre a suplementação com $\beta$ -alanina e o sistema insulínico	31
4.4	Relações entre a suplementação com $\beta$ -alanina e o sistema cardiovascular.	33
4.5	Relações entre a suplementação com $\beta$ -alanina e as reservas glicogênicas	38
5	DISCUSSÃO-----	43
6	CONCLUSÃO-----	53
7	REFERÊNCIAS-----	54
8	Anexos -----	61
9	Apêndices -----	62

## 1. INTRODUÇÃO

Para que o músculo esquelético mantenha a homeostasia metabólica e funcional, as fibras dependem da inervação motora, do suprimento sanguíneo e da disponibilidade adequada de substratos metabolizáveis (1, 2).

O músculo estriado esquelético é composto por diferentes fibras musculares. As fibras vermelhas (tipo I) são chamadas de contração lenta, de metabolismo aeróbio, apresentando grande quantidade de mitocôndrias, de tamanho maior e agregadas logo abaixo do sarcolema e devido a sua alta capacidade oxidativa e baixa velocidade de contração, as principais vias de geração de Adenosina Trifosfato (ATP) são decorrentes dos processos oxidativos mitocondriais. Também possuem grande capacidade de utilizar os ácidos graxos livres devido à elevada capilaridade do tecido e alta reserva de triglicérides (3,4).

Por outro lado, as fibras do tipo IIB, também denominadas fibras brancas ou de contração rápida, apresentam metabolismo anaeróbio, com mitocôndrias escassas, de forma elíptica, que se acumulam ao redor da banda I, a linha Z é mais estreita, apresenta capilaridade reduzida, possuem uma alta capacidade glicolítica e também elevada velocidade de contração, estão envolvidas com atividades de alta intensidade e curta duração e o número de vesículas sinápticas são maiores se comparadas às vermelhas (3,5).

Por fim, existe um tipo de fibra chamada de fibras do tipo IIA também denominada mista apresentando contração rápida e oxidativa. É um tipo de fibra de comportamento intermediário entre as fibras musculares vermelhas e brancas, porém, a presença de mioglobina em sua estrutura lhe confere características superficiais semelhantes às fibras vermelhas (6,7).

Dentro do perfil metabólico, a musculatura esquelética utiliza preferencialmente a glicose como substrato energético, para tal, a captação muscular de glicose é modulada pelo sistema endócrino, uma vez que, a insulina promove a translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) de reservatórios citosólicos para a membrana, elevando a captação de glicose a qual pode ser oxidada ou direcionada para formação deste reservatório energético na forma de glicogênio (8,3). Por outro lado, tem sido demonstrado que os sistemas musculares responsáveis pela captação de glicose também são regulados pela atividade contrátil (9,10,11).

Estudos realizados na década de 90 demonstraram que aproximadamente 70 a 85 % da glicose que é captada em repouso fica reservada na forma de glicogênio, reserva relacionada diretamente com a capacidade aeróbia ou de “endurance” do organismo, de forma que, as alterações no perfil enzimático, das mitocôndrias e das reservas glicogênicas são os responsáveis pela eficiência muscular, assim como, a depleção das reservas de glicogênio é o evento marcador do estado de exaustão muscular (12).

Estudos vinculados a dinâmica do receptor de insulina revelaram que após a ligação da insulina e conseqüente fosforilação da tirosina na subunidade beta, a cascata sinalizadora citosólica é ativada. Esta cascata envolve ativações enzimáticas sequenciais iniciando pela ativação da família das proteínas IRS (substratos do receptor de insulina) bem como de outros substratos como por exemplo o Shc, fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase), Gab-1, Cbl e JAK2 (13, 14).

No que se refere a síntese proteica, sabe-se que a insulina exerce ação potencializadora via ativação da enzima mTOR (enzima alvo da rapamicina ligada ao anabolismo) além de bloquear a proteólise, nesta via também ocorre controle na

translação de proteínas através da fosforilação da enzima p70- ribossomal S6 quinase (p70<sup>s6k</sup>) (15,16).

### **1.1 Imobilização muscular**

A necessidade de imobilização é fato *sine qua non* que acompanha diversos processos de reabilitação, merecendo destaque, sua aplicação nas entorses, lesões nos membros inferiores, fraturas ósseas, rupturas ligamentares ou doenças degenerativas das articulações e como consequência é inevitável a diminuição da amplitude de movimento das articulações e o aparecimento de hipotrofia muscular (17,18).

Dentro de uma análise do perfil fisiológico tem sido descrito que os músculos esqueléticos apresentam significativa plasticidade funcional adaptando-se frente a diferentes estímulos (19). Os primeiros estudos direcionados ao conhecimento dos eventos deflagrados pela imobilização se fundamentavam em técnicas invasivas como a desnervação, tenotomia, fixação da articulação por meio de pinos e bloqueio químico da junção neuromuscular (20,21). No entanto, há uma busca constante pelo aprimoramento de metodologias, sendo publicadas novas propostas não-invasivas, no intuito de contemplar a atividade de pesquisadores (22, 23).

No estudo (24) não foram descritas alterações significativas na força após oito dias de desuso, sugerindo que as alterações mais evidentes da atrofia devem ocorrer nos dias iniciais da imobilização. Por outro lado, durante as seis primeiras horas de imobilização, a síntese proteica é reduzida em 35%, modifica-se o *turnover* proteico e a fração miofibrilar apresenta decréscimo mais evidente dentre as proteínas musculares (25). Neste sentido, tem sido descrito que o decréscimo mais

pronunciado no diâmetro das fibras registra-se durante a primeira semana de imobilização.

A imobilização musculoesquelética, como recurso terapêutico, tem vasta aplicabilidade prática no campo da traumatologia e medicina desportiva, merecendo destaque nas entorses, fraturas ósseas, rupturas ligamentares tendíneas e de outros tecidos moles. O princípio de sua indicação baseia-se sobre a contenção dos efeitos potencialmente álgicos dos movimentos bem como ser um instrumento para possibilitar e facilitar a cicatrização dos tecidos danificados, ou seja, visa permitir que estes tecidos possam atravessar as fases do processo de reparo sem interferências externas (26).

Através destes conhecimentos podemos dizer que a imobilização torna-se de certa forma um “mal necessário”. Por outro lado, a imobilização pode desencadear uma série de alterações adaptativas nos sistemas orgânicos que se traduzem em perda funcional global e local, comprometendo o tempo de retorno do indivíduo às suas atividades normais. No sistema musculoesquelético, a redução da massa muscular e óssea são os efeitos mais marcantes desse processo (27).

As miofibrilas são as estruturas que apresentam as primeiras alterações, principalmente as que se localizam junto ao sarcolema, apresentando focos de rompimento e fragmentação. As partes mais estáveis das fibrilas são as bandas seguidas pelas modificações na morfologia das mitocôndrias, degeneração do retículo sarcoplasmático e aparecimento de vacúolos autofágicos. Quando há desaparecimento das mitocôndrias e de miofibrilas, o sarcolema torna-se ondulado com penetrações proeminentes nas fibras. Neste tipo de fibras a membrana aparece frequentemente fragmentada e o espaço intercelular é preenchido com tecido conjuntivo e fibroblastos. Durante a primeira semana de imobilização ocorre a

infiltração de macrófagos, monócitos e mastócitos, os quais surgem junto às zonas lesadas estando envolvidos no processo inflamatório e na remoção de segmentos de fibras necrosadas (28,29).

A posição de imobilização é um fator determinante no desenvolvimento da atrofia, assim, caso o músculo seja imobilizado em encurtamento, ocorre diminuição significativa do comprimento muscular por diminuição do número de sarcômeros (24). Porém, se o músculo for mantido numa posição de alongamento, se observa elevação do número de unidades sarcoméricas (30).

Sabe-se que o desuso muscular promove fraqueza, depleção das reservas de glicogênio, redução no número de sarcômeros em série, baixa resistência à fadiga e atrofia (31).

Os efeitos produzidos pela imobilização muscular utilizando talas de gesso foram estudados no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos sendo observado redução no peso e atrofia após 6 dias de imobilização (25,32).

Os graus de atrofia musculares estão intimamente relacionados à posição, encurtada ou alongada, em que o músculo é imobilizado. Além disso, a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular (perimísio e endomísio) também depende do posicionamento em que o membro é fixado (33,34). Existe um consenso geral de que os músculos compostos predominantemente por fibras lentas atrofiam mais rapidamente que os formados por fibras rápidas. Porém, para que isso ocorra realmente o comprimento do músculo durante a imobilização deve ser controlado (34).

A homeostasia energética da musculatura esquelética está diretamente relacionada com a plasticidade metabólica da fibra, a qual especializou-se na

utilização de diferentes substratos metabolizáveis como glicose ou ácidos graxos livres para obtenção de energia (35).

Após ser captada, a glicose pode ser oxidada produzindo adenosina trifosfato ou direcionada a reservatórios de glicogênio (8,36). Dentro do aspecto do metabolismo muscular de glicogênio, esta reserva energética é constantemente mobilizada de acordo com a necessidade, de forma que, alterações no perfil enzimático, na atividade mitocondrial ou nas próprias reservas são responsáveis pela eficiência do trabalho muscular bem como pelo desenvolvimento do estado de fadiga ou exaustão (37).

O músculo-esquelético participa de forma eficaz no metabolismo de glicose senso alvo da ação insulínica e auto-regulado pela demanda funcional e fornecimento do substrato. Assim, condições tais como a imobilização pode gerar modificações intrínsecas comprometendo essa dinâmica fisiológica funcional (38) descreveram resultados semelhantes quanto a redução da responsividade à insulina em músculos imobilizados, comprometendo, portanto, o transporte total da glicose.

Ao avaliar a sensibilidade à insulina do músculo sóleo imobilizado, (39) observaram que entre a terceira e oitava hora após a imobilização do membro já havia uma significativa diminuição na população de receptores insulínicos, sugerindo comprometimento na captação da glicose e na síntese de glicogênio.

## **1.2 Relação $\beta$ -alanina/carnosina**

Avaliações bioquímicas têm demonstrado que a carnosina é um dipeptídeo presente no citoplasma de diferentes células, a qual exerce múltiplas funções, atuando especialmente no tecido muscular, o que lhe confere propriedades pluripotente e multifuncionais (40). A síntese de carnosina decorre da ação da enzima



carosina sintase a partir dos aminoácidos L-histidina e  $\beta$ -alanina, dentre os quais a  $\beta$ -alanina exerce ação diferenciada enquanto precursor limitante (41). Importante salientar que o músculo esquelético é incapaz de produzir  $\beta$ -alanina, assim, a síntese de carosina pelas fibras musculares depende unicamente da captação desses aminoácidos (42).

Na literatura científica tem sido descrito benefícios ligados a suplementação de  $\beta$ -alanina no desempenho esportivo, destacando-se que exerce ação indireta principalmente, por ser um intermediário na síntese de carosina no tecido muscular (43). Neste contexto, sabe-se que no músculo esquelético existe um fator limitante na síntese de carosina, que é a atividade da enzima carosina sintetase, que é a responsável pela síntese de carosina (43).

Conseqüentemente, o ponto limitante da síntese de carosina no músculo esquelético é a disponibilidade de  $\beta$ -alanina (44). Logo, estratégias que aumentem a disponibilidade deste aminoácido são capazes de elevar o conteúdo de carosina intramuscular, aumentando a capacidade tamponante intracelular, além de outras funções importantes (45).

No aspecto bioquímico classicamente sabe-se que a  $\beta$ -alanina é um aminoácido não-proteinogênico, o qual é sintetizado no fígado em pequena quantidade sendo o metabolito final da degradação do uracil e da tiamina, quanto a produção endógena, a dieta é a fonte primária de oferecimento de  $\beta$ -alanina, principalmente quando a dieta é rica em carnes (46,47).

A carosina apresenta-se em maior concentração no tecido músculo esquelético, onde representa 0,2 - 0,5% do peso líquido do tecido muscular, se comparado a outros órgãos (41). Estudos tem descrito que a carosina pode exercer múltiplas funções importantes na dinâmica contrátil do músculo esquelético, uma vez

que participa da regulação da concentração de cálcio intracelular, exerce ação antioxidante, atua como imunomodulador e neuroprotetor, condições impar na manutenção da homeostasia metabólica e funcional (45,40,48).

No que tange a utilização da carnosina enquanto suplemento, tem sugerido a importância e as vantagens de suplementar com o precursor  $\beta$ -alanina, uma vez que, a carnosina é degradada no trato digestivo (estômago e intestino) formando histidina e alanina, os quais mesmo sendo precursores da ressíntese da carnosina são propícios a perda no aproveitamento, o que torna mais eficiente a suplementação com  $\beta$ -alanina (46).

Dentro dos efeitos fisiológicos atribuídos a carnosina tem sido destacado sua habilidade enquanto agente que atua regulando o pH das fibras musculares, permitindo maior eficiência na dinâmica estímulo contração, desta forma, sabe-se que concomitante a suplementação com  $\beta$ -alanina há aumento nas concentrações de carnosina nos músculos esqueléticos, e com isso propicia-se melhora na prática de atividade física (42,49).

No âmbito da toxicidade, foi demonstrado em experimentação animal, que o tratamento com carnosina protegeu o organismo da ação tóxica da ciclofosfamida e adriamicina, fármacos citostáticos que são administrados no tratamento de cânceres, sugerindo que a carnosina pode prevenir o aumento nas concentrações séricas das transaminases hepáticas, como também constatado em pesquisas com animais de laboratório. (50).

Com relação a ingestão de  $\beta$ -alanina/formação de carnosina, foi demonstrado forte correlação entre as concentrações citosólicas de carnosina e o tipo de fibra muscular, com destaque no fato das fibras do tipo II conterem maiores concentrações de carnosina (51,52).

Tem sido descrito na literatura que há captação de carnosina, porém em pequenas concentrações. Neste contexto, para captar a carnosina, as fibras musculares apresentam na membrana um sistema proteico responsável pelo transporte desta substância os quais pertencem a família de transportadores cujos membros são denominados de PEPT1 e PEPT2 (transportador de oligopeptídeos 1 e 2) e PHT1 e PHT2 (transportador peptídico / histidina 1 e 2), apresentando alta especificidade no transporte de carnosina. Dentro de uma maior especificidade o transportador PEPT1 apresenta alta capacidade e baixa afinidade e desempenha atividade expressiva na absorção intestinal, assim, a carnosina ao ser absorvida no intestino delgado, em parte é disponibilizada aos tecidos. (53,54).

Baseado no fato da literatura descrever múltiplos eventos ligados a carnosina fica notório que a  $\beta$ -alanina é o precursor mais efetivo para que haja aumento na concentração muscular de carnosina, indicando a importância da suplementação para manutenção de concentrações eficientes (55).

A análise da literatura indica benefícios da suplementação com a  $\beta$ -alanina na prática esportiva, desta forma, a hipótese da dissertação é que a  $\beta$ -alanina pode propiciar benefícios interferindo de forma positiva nas alterações fisiológicas desencadeadas pela imobilização muscular.

## 2. OBJETIVO

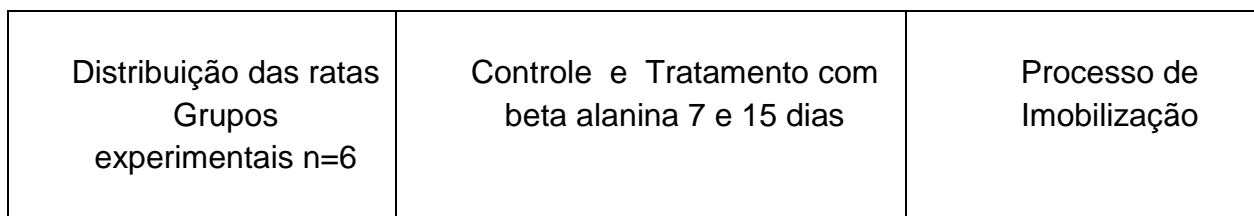
**2.1 Objetivo geral:** Avaliar a condição de desuso muscular associado a suplementação com beta alanina.

### 2.2 Objetivos específicos:

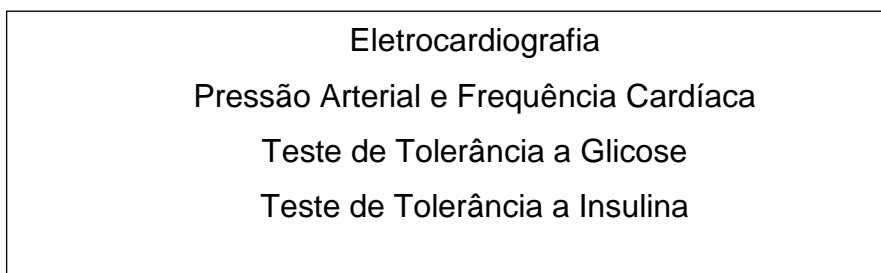
- Analisar índices de toxicidade nos grupos controle e tratados com  $\beta$ -alanina.
- Analisar a sensibilidade secretória à insulina através do Teste de Tolerância a glicose.
- Analisar a sensibilidade tecidual à insulina através do Teste de Tolerância a insulina.
- Avaliar *in vitro* a secreção de insulina em ilhotas isoladas de ratos tratados com  $\beta$ -alanina.
- Avaliar as reservas musculares de glicogênio do músculo sóleo (fibra tipo I) e gastrocnêmio porção branca (fibra tipo II) nas condições controle e submetidos a imobilização.
- Avaliar a captação da 2-deoxiglicose em fatias do músculo sóleo incubados.
- Realizar um estudo eletrocardiográfico nos grupos tratados com  $\beta$ -alanina.
- Realizar um estudo avaliando a pressão arterial nos grupos tratados com  $\beta$ -alanina.

## 2.3 Fluxograma

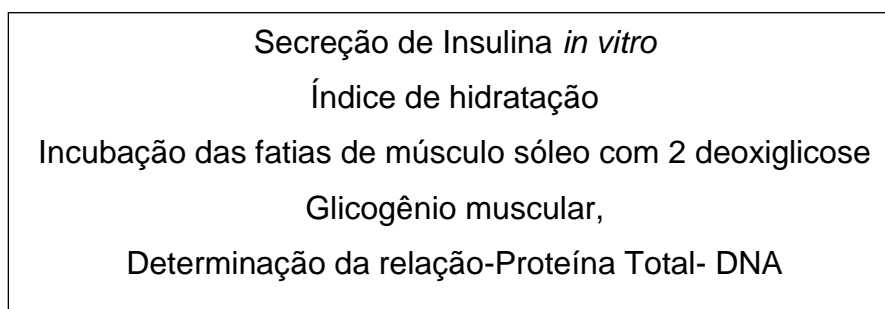
Fluxograma do trabalho realizado de acordo com o período correspondente a cada grupo: Controle, Tratados com beta alanina, Imobilizados e Imobilizados tratados com beta alanina 7 e 15 dias



### Coleta das amostras para análise *in vivo*



### Coleta das amostras para análise, após eutanásia dos animais



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

**3.1 Animais:** Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 3 a 4 meses de idade com peso de 180 a 220 g provenientes do biotério da UNIMEP, aprovado pelo Comitê de Ética<sup>1</sup> Utilização de Animais (CEUA) protocolo- 02/2017 as quais receberam água e alimentação a vontade (*ad libitum*) sendo mantidos em ambiente com temperatura constante de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas, sendo mantidos em gaiolas coletivas contendo no máximo 5 animais e distribuídos segundo a tabela.

Tabela 1- Distribuição das ratas em grupos experimentais, n=6.

GRUPOS	DENOMINAÇÃO
Controle 7 e 15 dias	C
Tratado com $\beta$ -alanina – 7 dias	A7
Tratado com $\beta$ -alanina – 15 dias	A15
Imobilizado 7 dias	I
Imobilizado Tratado com $\beta$ -alanina – 7 dias	IA7
Imobilizado Tratado com $\beta$ -alanina – 15 dias	IA15

### 3.2 Tratamento com $\beta$ -alanina

Os grupos tratados receberam a  $\beta$ -alanina (Beta Cálcio Alanine<sup>®</sup>) disponível na água para beber na concentração de 1,8% (56). Durante o tempo de tratamento de cada grupo 7 e 15 dias, o volume dos bebedouros, foi verificado e completado diariamente.

<sup>1</sup> Documento de aprovação CEUA anexo A

Todos os testes a seguir, ocorreram em seu devido tempo de tratamento 7 e 15 dias e os grupos controle realizados adequados a um cronograma para que todas as análises fossem feitas no mesmo período de tempo.

Nos processos de Incubação das fatias do Músculo Sóleo com 2 –deoxiglicose, Incubação das fatias de Músculo, Glicogênio Muscular, Secreção de Insulina (*in vitro*) e Índice de Toxicidade. As ratas foram anestesiadas com associação dos anestésicos Xilazina (0.09mL/100g/ip) e Ketamina (0.06mL/100g/ip) correspondente ao tempo de tratamento com  $\beta$ -alanina de 7 e 15 dias ou do grupo Controle.

Os animais foram eutanasiados, conforme o período correspondente de tratamento e controle a cada tempo de tratamento 7 e 15 dias.

O Fluxograma mostra como foram realizadas as coletas para as análises *in vivo*, *in vitro* e após a eutanásia, sempre com o número de animais correspondentes à distribuição dos grupos experimentais n=6 por grupo.

### **3.3 Imobilização**

Para imobilização utilizamos órtese de metacrilato de etila, mantendo a posição do tornozelo em 90° (23). Para tal, após a anestesia já descrita anteriormente, a órtese foi posicionada no membro posterior esquerdo, associada a uma cinta de PVC e dois rotadores laterais para permitir movimento, pesando aproximadamente 15 gramas, ficando no animal durante 7 e 15 dias conforme seu grupo. O modelo proposto não interfere na deambulação do animal (figura 1 A), também não permite a descarga de peso na ponta dos pés (figura 1 B), mantendo as articulações do joelho e do quadril livres (figura 1 C) e imobilizadas em 90° (figura 1 D).



Figura 1- A, B, C e D. Sistema de imobilização utilizado nas ratas.

### 3.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para a realização do ITT, no período correspondente ao tempo de 7 e 15 dias de tratamento com beta alanina e controle, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 40 mg/Kg/peso por via intraperitoneal e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado insulina (2 U/Kg/ip - Biohulin) seguido de coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada (57,58).



### **3.5 Teste de tolerância à glicose (GTT)**

Para avaliação do GTT, no período correspondente ao tempo de 7 e 15 dias de tratamento com beta alanina e controle, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 40 mg/Kg/peso por via intraperitoneal e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi administrado glicose (2 g/Kg/ip) seguido de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e a glicemia novamente avaliada (57,58).

### **3.6 Índice de toxicidade**

Após o período experimental de 7 e 15 dias, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg peso. i.p.). O sangue, coletado através da veia renal, sendo centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e o plasma separado e direcionado para análise bioquímica e posteriormente foram eutanasiados.

Para as Análises Eletrocardiográfica, Avaliação da Pressão Arterial, Teste de Tolerância à Insulina (ITT), Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Índice de Hidratação, que são realizados com o animal vivo, as ratas foram anestesiadas com Pentobarbital sódico (40 mg/Kg/ip) por não interferir na atividade cardíaca, correspondente ao tempo de tratamento com  $\beta$ -alanina de 7 e 15 dias ou do grupo Controle e posteriormente submetidos a eutanásia.

### **3.7 Análise eletrocardiográfica**

Para a avaliação das ondas e intervalos eletrocardiográficos, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (40 mg/kg/ip), mantidas em posição supina,

com respiração espontânea para registro do ECG. Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com sensibilidade N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isométrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ( $QTc = QT / \sqrt{RR}$ ) e posteriormente foi calculada a dispersão do intervalo QTc, subtraindo o intervalo QTc mais curto do QTc mais longo ( $QTcd = QTc \text{ Max} - QTc \text{ min}$ ). As análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão (59). A avaliação eletrocardiográfica foi realizada no 7º e 15º dia de tratamento (figura 2).

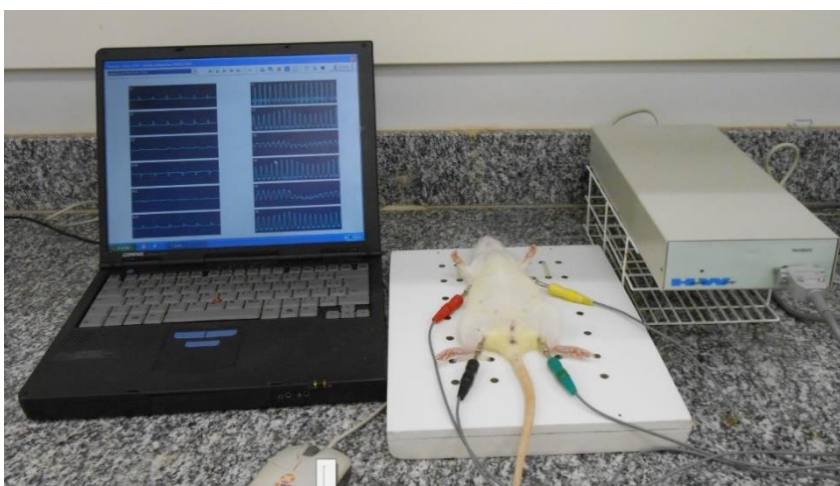


Figura 2. Sistema Heart Ware de captação do sinal eletrocardiográfico.

### 3.8 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Na sequência da análise eletrocardiográfica-ECG, foi avaliado o comportamento da pressão arterial dos animais dos grupos controle e tratados com  $\beta$ -alanina 7 e 15 dias, avaliação realizada no final do tratamento. Para tal, utilizou-se a conexão de um pletismógrafo (BP-2000 Blood Pressure Analysis System TM) à cauda

dos animais, em sala com isolamento acústico e diminuição de quaisquer fontes de ruído que pudessem interferir nesta avaliação. As ratas foram retiradas do biotério e mantidas por 30 minutos no laboratório de experimentação para que pudessem se adaptar ao ambiente. Ratas de grupos alternados, foram colocadas no aparelho, cada uma dentro de um compartimento retangular adequado ao tamanho do animal, onde permaneceram por 5 minutos sobre uma plataforma aquecida a 36 °C e com a cauda já conectada ao “cuff” do aparelho. Após 5 minutos de adaptação do animal ao aparelho, este foi acionado e as medidas de pressão arterial sistólica, diastólica e média foram coletadas. Em cada troca de animal cada compartimento retangular foi higienizado com álcool 70% e secado para evitar que os odores liberados pelas ratas anteriormente analisadas pudessem interferir nas análises das ratas subsequentes. As análises foram realizadas entre 8:00 e 12:00 h, segundo Boschero, Delatre e Santos (57).

### **3.9 Avaliação do índice de hidratação do músculo sóleo**

A avaliação do conteúdo de água no tecido muscular, foi utilizado o método de desidratação em estufa a 50°, onde o músculo sóleo foi pesado e colocado em um cadinho de porcelana previamente desidratado e o peso do músculo avaliado com balança analítica a cada hora até atingir o peso constante. Na sequência logo após as análises cardíacas.

### **3.10 Secreção de Insulina (*in vitro*)**

Para avaliação da resposta secretória da insulina à glicose, as ilhotas foram isoladas segundo a técnica originalmente descrita por (57).

Em cada experimento, foram sacrificados de um a três animais por concussão

cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 ml de solução de Hanks contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando um fluxo retrógrado, a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12x2cm) e incubado por aproximadamente 18 min a 37°C.

Em seguida, ainda em 37°C, o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em um Becker sendo misturado com solução de Hanks. O sobrenadante foi aspirado com seringa (50 ml) após 3 minutos de decantação. Após repetir essa operação por 3 vezes, o produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, e sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas de ratas, pertencentes aos quatro grupos experimentais, foram coletadas alternadamente em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 ml de solução tampão Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina, a qual foi adicionado glicose 5,6 mM e incubada por 45 minutos (pré-incubação), a 37°C em atmosfera de carbogênio, pH 7,4, a solução de Krebs foi substituída por 1,0 ml do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L.

Procedeu-se uma nova incubação durante 80 minutos, nas condições acima referidas. Após este período, as placas foram colocadas no freezer (-20) por 10 minutos e, o sobrenadante de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservado a -20° C, até o momento da dosagem da insulina secretada. A insulina secretada durante o período de incubação foi avaliada de acordo com o método

descrito por (60).

### **3.11 Procedimento de Incubação das fatias do músculo sóleo com 2-deoxiglicose**

A preparação dos músculos, assim como a pré-incubação e incubação foram realizadas segundo procedimento básico descrito por Kokubun (61).

Após eutanásia das ratas, foram retirados amostras do músculo sóleo. Os tendões distal e proximal do músculo sóleo foram liberados e com um bisturi foi efetuado um corte longitudinal na linha mediana do músculo. Os tendões de cada fatia de músculo foram ligados *in situ* com uma linha de algodão, a grampos em “U” recobertos por cânulas de polipropileno, respeitando-se o comprimento de repouso do músculo. A seguir, essa preparação foi pesada e as fatias com peso entre 25 e 35 mg foram submetidas ao procedimento de incubação, o período de tempo entre o sacrifício do animal e o início da incubação foi de, no máximo, 5 minutos. Os resultados são apresentados em [ $\mu\text{mol/g}(\text{de tecido úmido})$ ] n=6 fatias.

### **3.12 Incubação das fatias de músculo sóleo**

As fatias de músculos presas aos grampos foram colocadas em Erlenmeyers de 25 ml siliconizadas, contendo 3,5 ml de tampão Krebs- Ringer bicarbonato. Os frascos foram selados com tampas de borracha e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Duninoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95%/5%). Após esse período de pré-incubação, os músculos foram transferidos a outro frasco contendo 3,5 ml de meio de incubação, durante 60 minutos, com gaseamento durante primeiros 15 minutos. Frascos controle contendo meio de incubação e grampo sem músculo foram incubados em cada experimento.

Após o período de incubação, 1 ml de amostra do meio foi desproteïnizada em 1 ml de solução de  $\text{HClO}_4$  0,6N e a fatia de músculo imediatamente digerida em 0,5 ml de KOH para dosagem do glicogênio muscular. A temperatura na pré-incubação e incubação foi de  $37^\circ \text{C}$  e o meio de pré-incubação e incubação preparado para concentração final de: NaCl 0,6 % HEPES 6.64 mM, KCl 0,032 %,  $\text{CaCl}_2$  1.14 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.015 %,  $\text{NaHCO}_3$  0.19%,  $\text{Mg.SO}_4$  0.03%.

Os procedimentos de incubação estão resumidos no esquema abaixo expressos em  $[\mu\text{mol/g}(\text{de tecido úmido})]$  (figura 3):

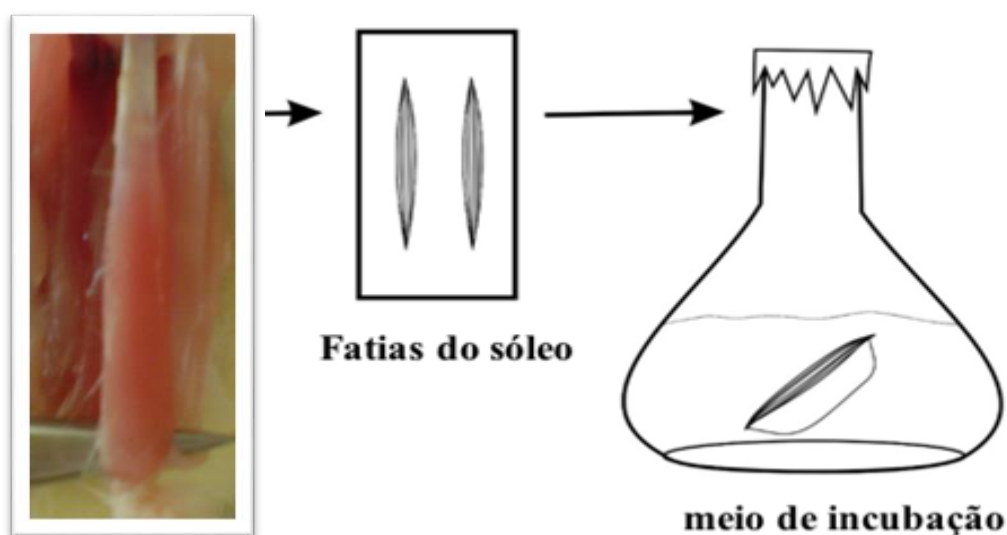


Figura 3. Esquema da incubação de fatias do músculo sóleo na análise do metabolismo da 2-deoxiglicose.

### 3.13 Glicogênio muscular

Após anestesia, com associação dos anestésicos Xilazina (0.09mL/100g/ip) e Ketamina (0.06mL/100g/ip) correspondente ao tempo de tratamento com  $\beta$ -alanina de 7 e 15 dias ou do grupo Controle amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio branco foram retiradas e digeridas em KOH 30 % a quente, o glicogênio foi precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da

precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de (62). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

### **3.14 Determinação da relação Proteína Total-DNA**

Na determinação da relação Proteína Total-DNA foi utilizado o Kit PROTAL da Laborlab®, foram dosadas amostras de músculo sóleo com os valores sendo expressos em mg/100mg.

### **3.15 Análise estatística**

Na análise estatística os dados foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido pela análise de variância (ANOVA) one way e pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

Para o teste ITT a variável analisada foi a porcentagem de decaimento(KITT), sendo calculada a porcentagem de cada animal, logo após calculada a média dessa variável a qual foi comparada com a média do outro grupo pelo test  $t$  ( $p > 0,05$ ).

### **3.16 Avaliação da massa e Índice de Ingesta**

Durante todo o experimento, duas vezes por semana, foi aferido o peso (g) dos animais e quantificada a ingestão de líquido (ml) por animal e ingestão de ração dos animais de todo os grupos Controle, beta alanina 7 e 15 dias.

## 4 RESULTADOS

No intuito de descrever os diferentes aspectos ligados a suplementação com  $\beta$ -alanina, optou-se pela divisão dos resultados em capítulos, permitindo com isso uma análise dentro de padrões sistêmicos.

Na avaliação da massa dos animais não foi observado diferença entre controle (C) e tratado 7 dias com  $\beta$ -alanina (A7) (C  $216\pm 9,0g$  vs T7,  $218\pm 12g$ ) ou se comparado ao tratado durante 15 dias (A15) (C  $216\pm 9,0g$  vs T15,  $222\pm 10g$ ). A seguir foi avaliado o índice de ingesta e não foi verificada diferença entre os grupos experimentais mantendo a média de ingesta sólida de 48 g/dia e na ingesta líquida em média 49 mL/dia durante as fases experimentais de cada grupo.

### 4.1 Avaliação da toxicidade do tratamento com $\beta$ -alanina

Diversos cientistas reiteram na literatura que estudos experimentais envolvendo a suplementação devem desenvolver avaliações da toxicidade. Seguindo este perfil, este trabalho iniciou avaliando parâmetros importantes ligados a alterações hepáticas e renal frente ao tratamento com  $\beta$ -alanina. Na avaliação da concentração plasmática de colesterol total e LDL não foi observada diferença se comparado ao controle, mesmo após 15 dias de tratamento como demonstrado na tabela 2. No mesmo aspecto de análise, foram avaliadas as concentrações plasmáticas da lipoproteína HDL onde no grupo A7 foi verificada redução de 28% igual ao Controle, enquanto no grupo A15 a redução foi de 40% \* $p < 0,05$ , se comparado ao grupo controle (tabela 2).

Outro fator importante se refere a concentração plasmática das transaminases tanto na aspartato aminotransferase (AST ou TGO) quanto a alanina



aminotransferase (ALT ou TGP). Os grupos A7 e A15 não diferiram se comparado ao controle, indicando que nesta dose não houve toxicidade. No que se refere a concentração plasmática de creatinina também não foi observado diferença entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2. Concentrações plasmática de componentes bioquímicos marcadores de toxicidade nos grupos controle (C), tratados com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratado com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=6.

	C	A 7	A 15
Colesterol total (mg/dL)	67 $\pm$ 11	65 $\pm$ 9	69 $\pm$ 9
HDL (mg/dL)	25 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2*
LDL (mg/dL)	15 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4	15 $\pm$ 6
TGO / AST (U/L)	41 $\pm$ 06	45 $\pm$ 5	51 $\pm$ 6
TGP / ALT (U/L)	32 $\pm$ 2	43 $\pm$ 6	44 $\pm$ 7
Creatinina (mg/dL)	0,58 $\pm$ 0,4	0,56 $\pm$ 0,2	0,62 $\pm$ 0,1

\*p<0,05 comparado ao controle.

## 4.2 Hidratação

Tem sido sugerido que o tratamento com  $\beta$ -alanina possa promover aumento na hidratação das fibras musculares e com isso influenciar nas vias enzimáticas citosólicas. Para dirimir esta dúvida foi avaliado o grau de hidratação do músculo sóleo através do método do peso constante, sendo constatado que nos músculos controle, 70% do peso correspondia a água, enquanto nos músculos de animais tratados com  $\beta$ -alanina 7 e 15 dias apresentaram 71,9%, não sendo estatisticamente diferentes.

### 4.3 Relações entre a suplementação com $\beta$ -alanina e o sistema insulínico.

Dentre os diferentes métodos de avaliação da funcionalidade das células  $\beta$  pancreáticas destaca-se o teste de tolerância a glicose (GTT) que indica a responsividade pancreática a glicose sendo observado que a área sob a curva foi reduzida em 10% no grupo tratado com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e 25% no grupo tratado com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15) se comparado ao controle. (figura 4).

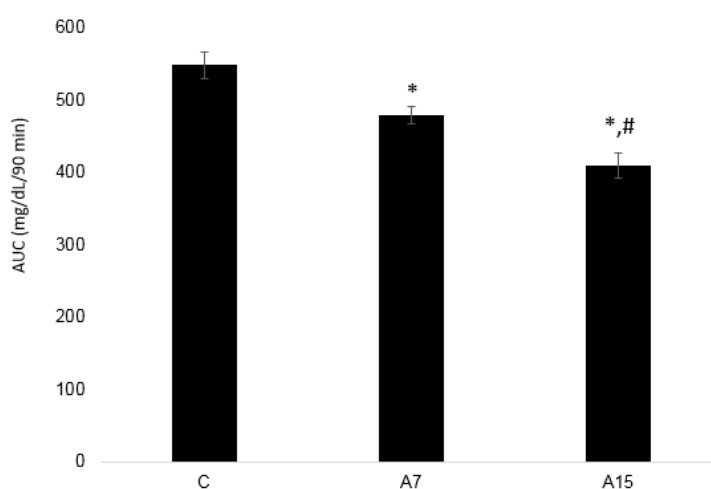


Figura 4. Áreas sob a curva (AUC, mg/dL/90min) dos grupos controle (C) e tratados com  $\beta$ -alanina 7 dias (A7) e tratados com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores expressos como média  $\pm$  dp, n=4. \*p<0,05 comparado ao controle e #p<0,05 comparado ao A7.

A seguir optou-se por realizar o teste de tolerância à insulina (ITT) no intuito de avaliar a sensibilidade tecidual à insulina, sendo observado que a sensibilidade tecidual foi reduzida em 17% no grupo A7 dias, no entanto, na avaliação do tratamento durante 15 dias (A15), não foi observado diferença do controle (figura 5).

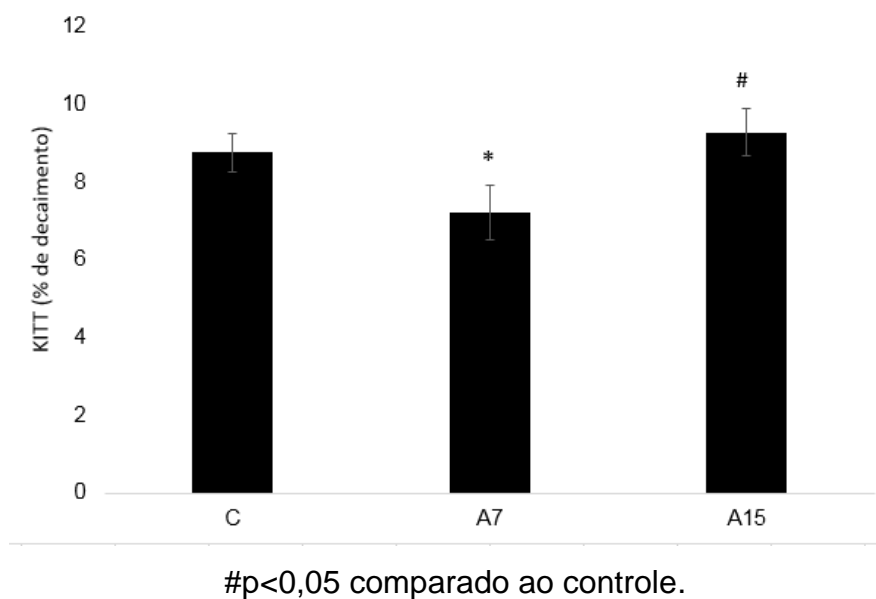


Figura 5. Porcentagem de decaimento da glicemia (KITT) dos grupos controle (C), tratados com  $\beta$ -alanina 7 dias (A7) e tratados com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores expressos como média  $\pm$  dp, n=4. \*p<0,05 de A7 comparado ao controle e Controle igual a A15.

Conhecidamente, o processo secretório da insulina é influenciado por vários fatores, dentre os quais alguns agentes bioquímicos que alteram o metabolismo das células beta pancreáticas e ativam o processo secretório. Os resultados mostram que não houve mudança na secreção de insulina em ilhotas isoladas e coletada de ratos tratados durante 7 dias com  $\beta$ -alanina (A7) e incubadas em concentração crescente de glicose, se comparado a condição controle. Foi observado aumento na secreção de insulina no grupo controle e grupo A7 na presença de concentrações crescentes de glicose, atingindo valores 166% maiores na transição da concentração 2,8mM para 5,6mM; 255% na transição de 5,6mm para 8,3mM e 20% na transição de 8,3mM para 11,1mM ou 16,7mM, comportamento observado na condição controle e tratado 7 e 15 dias. Nota-se que A15 é diferente de A7 e Controle e que Controle e A7 estabilizaram a partir de 11.1 mm. (figura 6).

No grupo (A15) foi observado que as células  $\beta$  estavam sensibilizadas tendo

em vista, a maior concentração de insulina secretada, atingindo valores 254% maiores na condição de incubação na presença de 5,6mM de glicose; 40% na condição de incubação na presença de 8,3mM; 38% na condição de incubação na presença de 11,1mM e 55% na presença de 16,7mM, se comparado ao comportamento controle ou A7 que difere estatisticamente  $p < 0,05$  (figura 6).

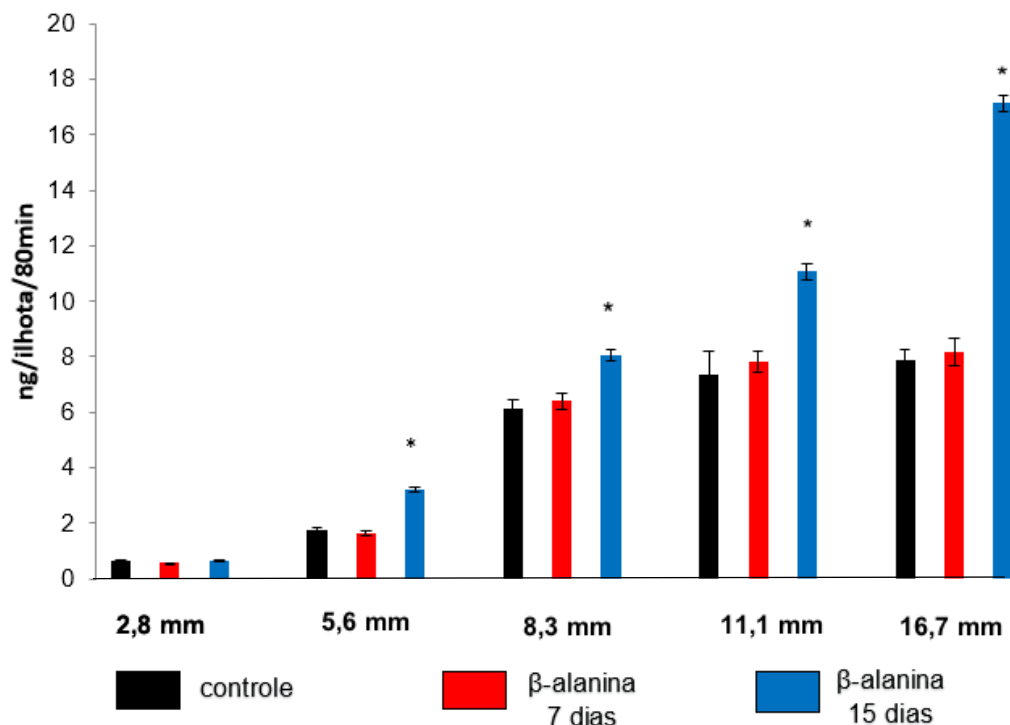


Figura 6. Secreção de insulina (ng/ilhota/80min) por ilhotas pancreáticas isoladas de ratas dos grupos controle (C), tratadas com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratadas com  $\beta$ -alanina 15 dias (A15). As ilhotas foram incubadas na presença de concentrações crescentes de glicose (2,8; 5,6; 8,3, 11,1 e 16,7 mM). Os valores expressos como média  $\pm$  dp, n=4. \* $p < 0,05$  comparado a condição C e A7.

#### 4.4 Relações entre a suplementação com $\beta$ -alanina e as reservas glicogênicas.

Na avaliação das reservas musculares de glicogênio (GLI) foi observado que o músculo sóleo tratado com  $\beta$ -alanina durante 7 dias não apresentou diferença nas reservas de GLI se comparado ao controle, por outro lado, o grupo tratado com  $\beta$ -alanina durante 15 dias apresentou reservas de GLI 25% maiores, \* $p > 0,05$  quando

comparado ao controle. Ainda dentro da análise metabólica muscular foram avaliadas as reservas de GLI musculares quando submetidas a imobilização, sendo verificado que o desuso promoveu redução de 43% nas reservas de GLI do sóleo (S). Nesta condição de desuso, porém, suplementados com  $\beta$ -alanina, foi verificado que após 7 dias as reservas de GLI do S não diferiram se comparado ao grupo imobilizado não tratado, por sua vez, após 15 dias de tratamento foi observado que as reservas de GLI apresentaram-se 22% maiores mas não atingiu os valores de Controle, comparados ao grupo Imobilizados (I) e Imobilizados alanina 7 dias (IA7) (figura 7).

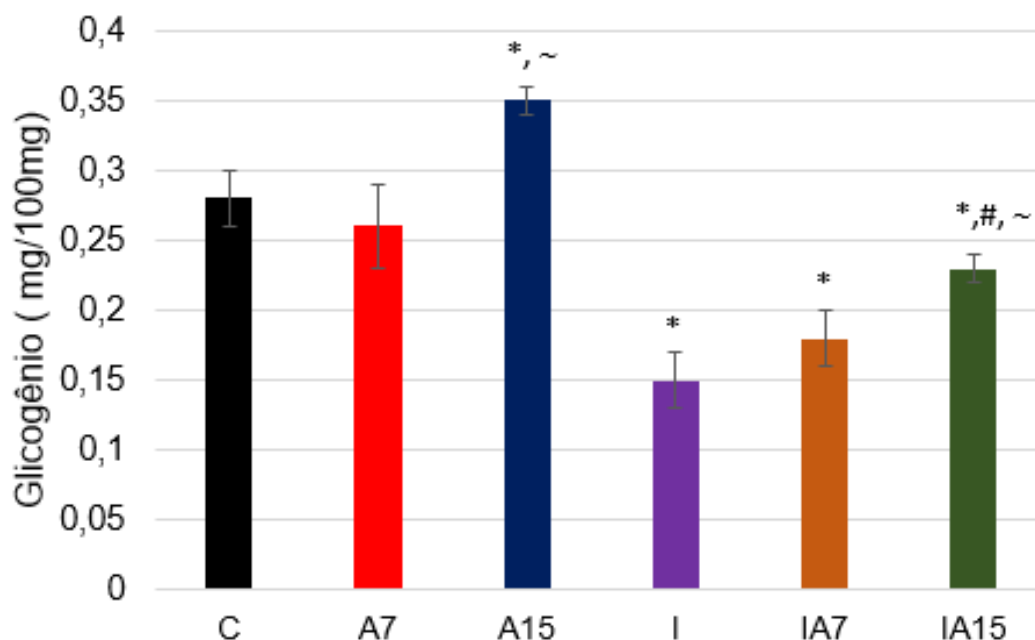


Figura 7. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo de ratas dos grupos controle (C) e imobilizada (I), tratadas com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratadas com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao grupo I, ~  $p < 0,05$  comparado ao A7 em cada condição.

A mesma análise realizada no músculo gastrocnêmio porção branca (GB) mostrou que após 7 dias de tratamento com  $\beta$ -alanina, as reservas de GLI foram 12% maiores e após 15 dias de tratamento as reservas de GLI apresentaram-se 51%

maiores, se comparado ao controle. Ao analisarmos o comportamento das reservas glicogênicas do GB após 7 dias de imobilização observou-se que as reservas apresentaram-se 42% menores se comparado ao controle, por sua vez, nos grupos imobilizados e tratados com  $\beta$ -alanina, nos primeiros 7 dias não foi observado diferença se comparado ao grupo imobilizado não tratado, no entanto, no grupo imobilizado e tratado durante 15 dias as reservas apresentaram-se 20% maiores se comparado aos grupos imobilizados (I). (figura 8).

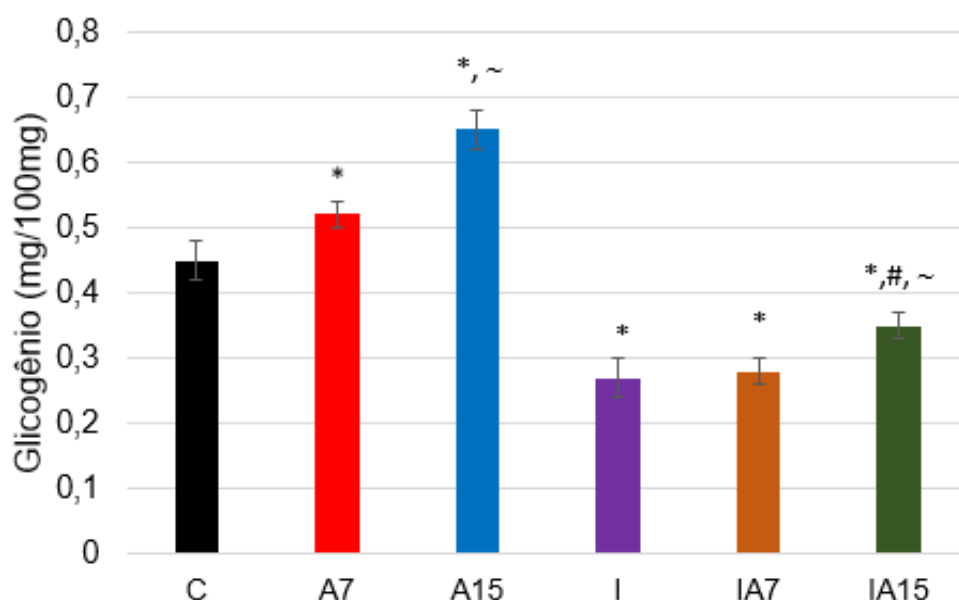


Figura 8. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio porção banca de ratos dos grupos controle (C) e imobilizada (I), tratadas com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratadas com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=6. \* $p < 0,05$  comparado ao controle, # $p < 0,05$  comparado ao grupo I, ~  $p < 0,05$  comparado ao A7 em cada condição

Na busca de entender as dinâmicas metabólicas do músculo tratado com  $\beta$ -alanina, optou-se por avaliar a captação da 2-deoxiglicose em fatias de músculo sóleo incubadas sendo observado que no grupo A7 a captação apresentava-se 20% maior se comparado ao controle enquanto no grupo A15 os valores foram 82% maiores que C e 52% maior se comparado ao grupo A7 (figura 9).

Para dirimir a dúvida quanto ao direcionamento da 2-deoxiglicose após a captação, foi avaliado a oxidação da glicose não sendo observado diferença entre C e A7, no entanto no grupo A15 a oxidação encontrava-se 30% maior que o controle (figura 10).

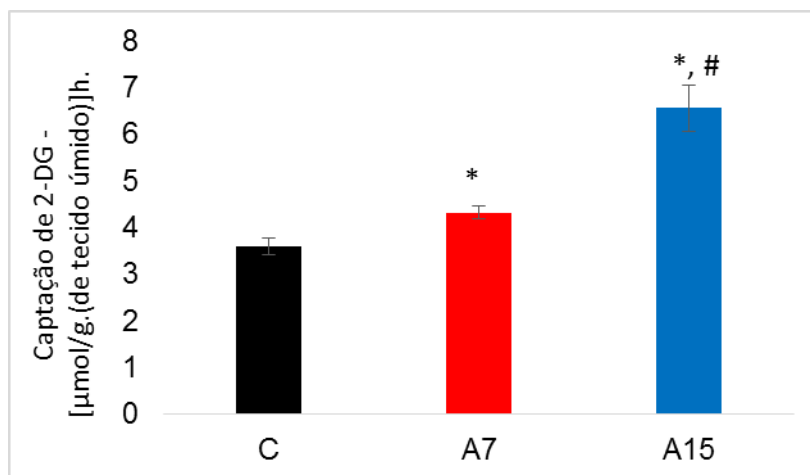


Figura 9. Captação de 2-deoxiglicose (DG) em fatias do músculo sóleo de ratos controle (C), tratados com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratados com beta-alanina durante 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n= 6 fatias. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao grupo A7.

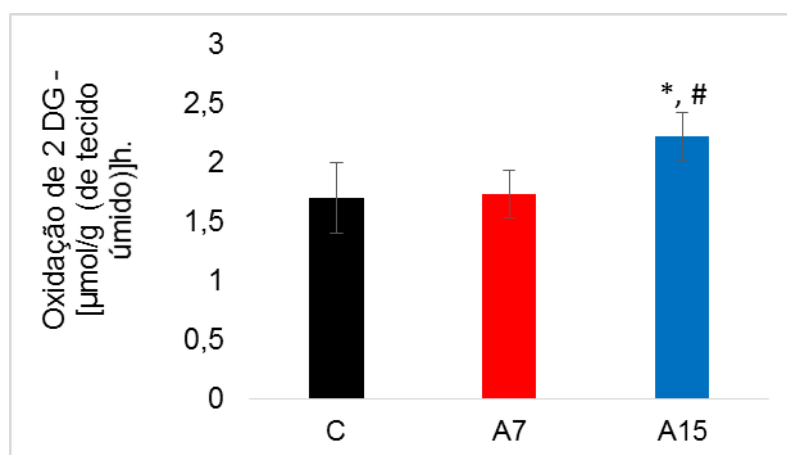


Figura 10. Oxidação de 2-deoxiglicose (DG) em fatias do músculo sóleo de ratos controle (C), tratados com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratados com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  Dp, n= 6 fatias, \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao A7.

Por fim, foi avaliado a incorporação da glicose nas reservas de glicogênio e foi observado que o grupo A7 apresentou valores 27% maiores se comparado ao

C enquanto o grupo A15 apresentou 50% maiores se comparado ao A7 e 90% maiores se comparado ao C (figura 11).

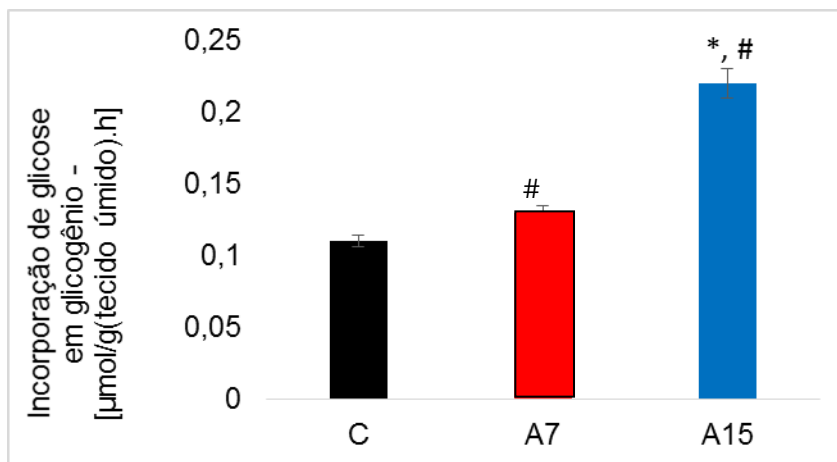


Figura 11. Incorporação de glicose em glicogênio em fatias do músculo sóleo de ratos controle (C), tratados com  $\beta$ -alanina durante 7 dias (A7) e tratados com  $\beta$ -alanina durante 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=6 fatias. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao A7.

Um ponto a se considerar se refere a relação proteína total-DNA que indica o número de mionúcleos. Optou-se pela avaliação no período caracterizado como crítico na condição de desuso, ou seja, 7 dias e no músculo sóleo, figura 12, mostra que a imobilização promoveu significativa redução na relação proteína total-DNA, por sua vez, o tratamento não modificou nem as condições controle e nem na condição imobilizado.

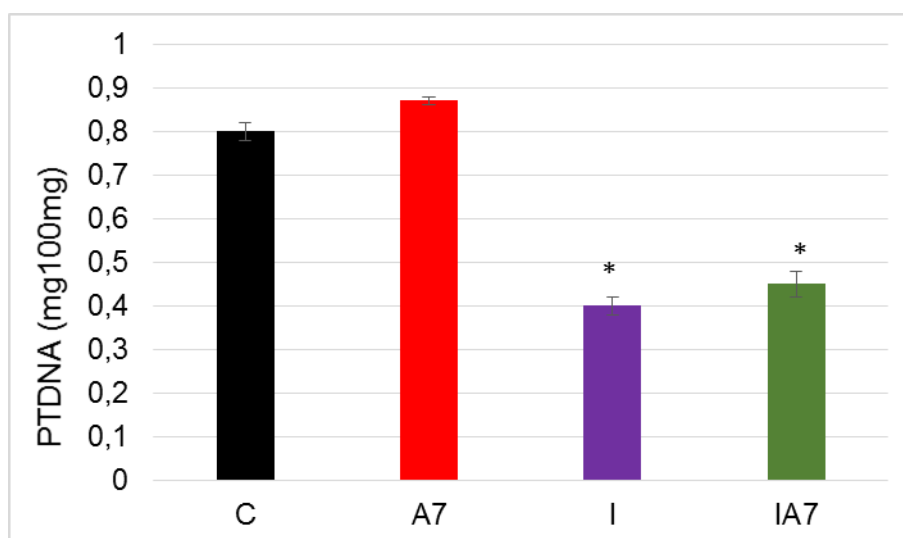




Figura 12. Relação proteína total/DNA (mg/100mg) do músculo sóleo nos grupos: controle (C), Imobilizado (I), Tratado (T) e Imobilizado tratado (IT). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=6. \*p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao grupo imobilizado.

Este mesmo perfil foi observado ao avaliar a massa muscular do sóleo, condição em que foi observado a mesma dinâmica da relação PTDNA, ou seja, redução média de 40% frente a imobilização e inexistência de efeito do tratamento. (vide figura 13).

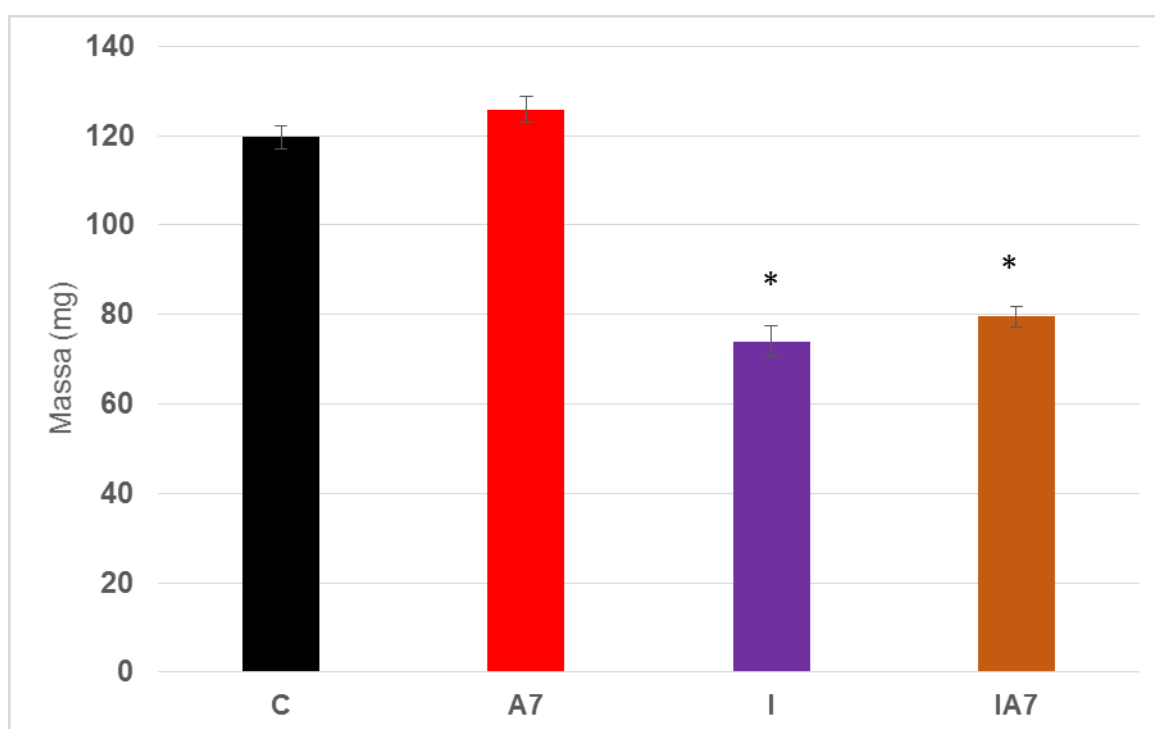


Figura 13. Massa do músculo sóleo (mg) nas condições controle (C), tratado com  $\beta$ -alanina 7 dias (A7), Imobilizados (I) e imobilizados tratados com  $\beta$ -alanina (IA7). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=6. \* p<0,05 comparado ao controle.

#### 4.5 Relações entre a suplementação com $\beta$ -alanina e o sistema cardiovascular

Por se tratar de suplementação torna-se fundamental analisar se existe modificação em parâmetros ligados a homeostasia do sistema cardiovascular.

Foi observado que o grupo controle (C) apresentou frequência cardíaca (FC) em repouso compatível com os valores preconizados para a espécie. Inicialmente, os registros eletrocardiográficos mostram que a FC do grupo A7 apresentou-se reduzida em 23% se comparado a FC do C, por sua vez, no grupo A15 foi observado que a FC foi 70% maior se comparado ao grupo A7 e 30% maior se comparado ao C (figura 14).

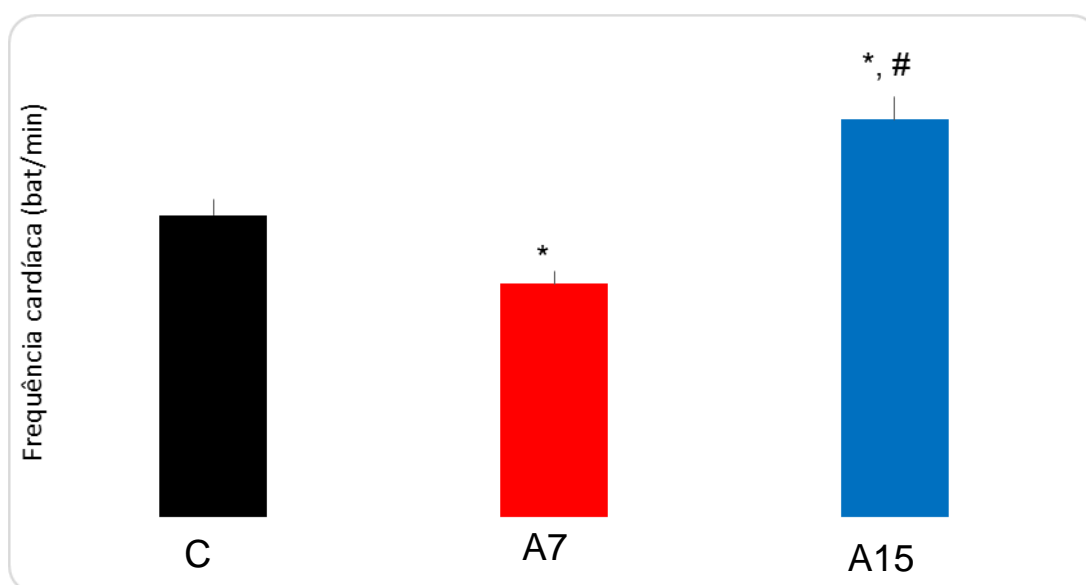


Figura 14. Frequência cardíaca (bat/min) dos grupos controle (C), tratado com  $\beta$ -alanina 7 dias (A7) e tratado com  $\beta$ -alanina 15 dias (A15). Os valores representam a média  $\pm$  dp, n=5. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao tratado 7 dias.

A análise do registro eletrocardiográfico dos grupos tratados com  $\beta$ -alanina mostra o comportamento elétrico nas diferentes vias de condução com marcantes modificações na dispersão do sinal elétrico no músculo cardíaco. Na análise do intervalo PR (IPR) e segmento PR (SPR) foi observado que no A7 houve redução de 47% no IPR enquanto no SPR a redução foi de 25%, se comparado ao C, indicando redução na dinâmica de propagação do sinal no período que compreende o início da

onda P até o início do complexo QRS representado pelo IPR, bem como no intervalo de tempo que o estímulo leva para alcançar os ventrículos após a despolarização atrial (SPR). Cabe ressaltar que, no grupo A15 houve expressão da onda P sobrepondo a onda T decorrente da alta frequência cardíaca (vide tabela 3 e figura 15).

Outro fato a se considerar, é que o intervalo QT foi 10% mais lento no grupo A7 e 21% mais rápido no grupo A15 se comparado ao grupo C. No que se refere ao complexo QRS e amplitude da onda R não foi observado diferença nos padrões elétricos (tabela 3).

Tabela 3. Tempo de condução (ms) e amplitude de sinal (mV) em diferentes complexos e segmentos dos grupos controle (C), tratados com alanina 7 dias (A7) e tratados com alanina 15 dias (A15). Os valores correspondem a média  $\pm$  dp, n=5. \*p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao grupo tratado 7 dias.

	C	A 7	A 15
Intervalo PR (ms)	35 $\pm$ 1,9	47 $\pm$ 2,5*	28 $\pm$ 2,7*,#
Segmento PR (ms)	12 $\pm$ 3,2	17 $\pm$ 0,9*	9 $\pm$ 0,8*,#
QT (ms)	103 $\pm$ 2,0	112 $\pm$ 4,1*	88 $\pm$ 1,8*
QRS (ms)	50 $\pm$ 2,3	48 $\pm$ 0,0	46,5 $\pm$ 1,9
Amplitude R (mV)	0,46 $\pm$ 0,08	0,35 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,05

No que se refere a variações no complexo de sinais do ECG, pode-se observar detalhes das alterações elétricas na figura 13, onde destaca-se os segmentos e intervalos descritos na tabela.

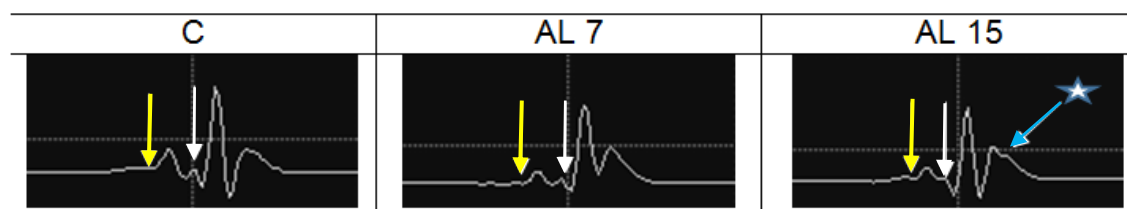


Figura 15. Representação gráfica do intervalo e espaço PR dos grupos controle (C), tratado com  $\beta$ -alanina 7 dias (A7) e tratado com  $\beta$ -alanina 15 dias (A15). Início da onda P  $\downarrow$  onda R  $\downarrow$  sobreposição da Onda P.  $\leftarrow$   $\star$

De acordo com a espécie, ratos normais apresentam o eixo do vetor QRS para plano frontal de aproximado de  $+59.6 \pm 22.6^\circ$  (86). Neste estudo, foi observado que o ângulo do QRS foi de  $+67 \pm 14^\circ$  no grupo controle,  $+67,5 \pm 12^\circ$  no grupo A7 e  $61,5 \pm 1.7^\circ$  no grupo A15, valores que acompanham a literatura e indicam que não houve modificação na posição anatômica no coração em decorrência do tratamento.

Uma vez observado alterações no complexo de sinais elétricos cardíaco, a figura 16 reitera o comportamento da frequência cardíaca expressa nos diferentes grupos, onde pode-se observar a propagação do sinal transcrito na derivação DII. No que se refere ao comportamento do registro do ECG, observa-se que todos os registros acompanham a linha de base, não apresentando modificação nos padrões das ondas seguindo o padrão Aschmann ( $1\text{mm} = 1\text{mV}$ ;  $1\text{mm} = 0,04\text{s}$ ).

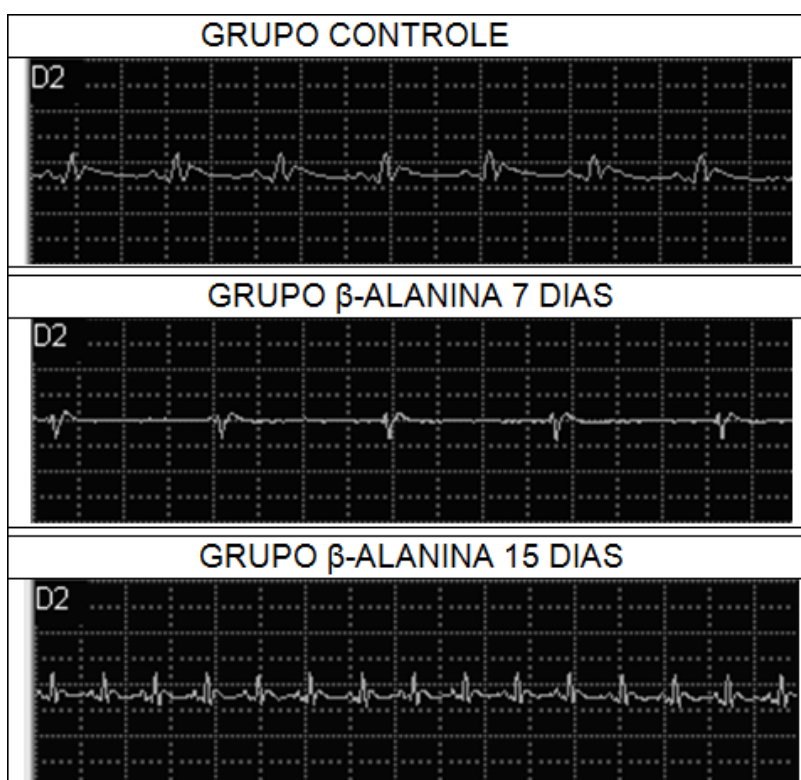


Figura 16. Registro eletrocardiográfico na derivação DII dos grupos controle (C), tratado com  $\beta$ -alanina 7 dias (A7) e tratado com  $\beta$ -alanina 15 dias (A15).

A seguir foi avaliado o comportamento da pressão arterial dos animais dos grupos controle e tratados com  $\beta$ -alanina 7 e 15 dias, avaliação realizada no final do tratamento. Os resultados mostraram que frente ao tratamento com  $\beta$ -alanina durante 7 dias houve redução de 17% na pressão sistólica, 8% na pressão diastólica e 14% na pressão média, condição que se diferenciou quando a análise foi realizada no grupo tratado com  $\beta$ -alanina durante 15 dias quando foi observado que as pressões estavam maiores que o controle atingindo 8% na pressão sistólica, 15% na pressão diastólica e 7% na pressão média como mostra a figura 17.

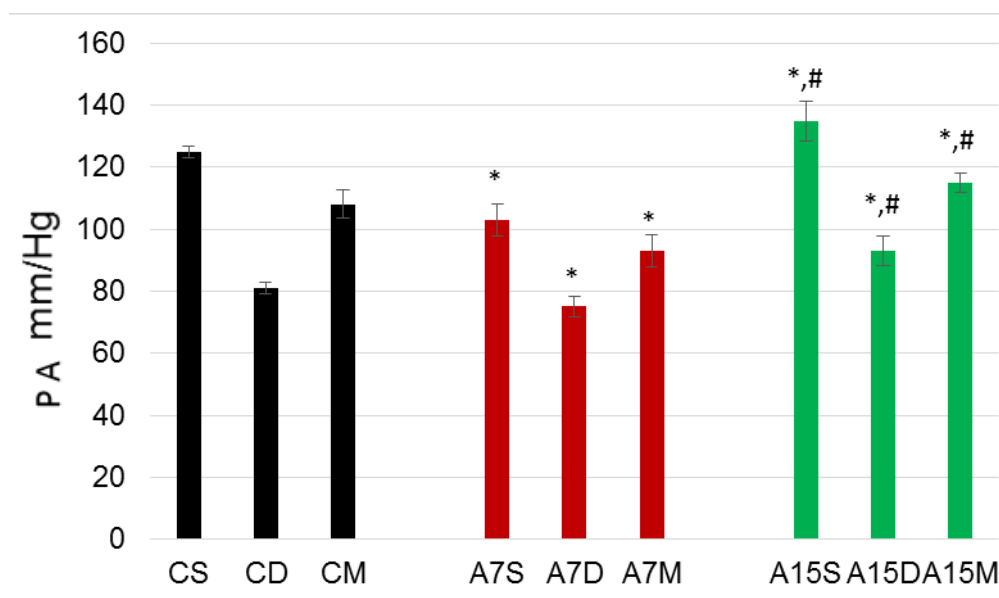


Figura 17. Pressão arterial (mm/Hg) sistólica (S), diastólica (D) e média (M) de ratos controle (C), tratados com alanina 7 dias (A7) e 15 dias (A15). Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=8. \* p< 0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao A7.

## 5 DISCUSSÃO

Inicialmente a hipótese da dissertação é que a  $\beta$ -alanina poderia propiciar benefícios interferindo de forma positiva nas alterações fisiológicas desencadeadas pela imobilização muscular o que não foi confirmada.

Avaliações experimentais utilizando suplementos merecem especial atenção, principalmente tendo em vista a possibilidade da substância promover toxicidade modificando o equilíbrio homeostático de diferentes órgãos (40). Na literatura, tem sido descrito que a suplementação de  $\beta$ -alanina é a forma mais eficiente de aumentar a concentração de carnosina nos músculos, o que faz deste dipeptídeo um agente efetivo no controle de múltiplas funções, destacando a habilidade em tamponar íons hidrogênio, regular a dinâmica do sistema contrátil muscular ao influenciar nas dinâmicas do cálcio, exercer ação antioxidante além de promover inibição da formação de produtos avançados da glicoxidação e lipoxidação (40,48).

Desta forma, a amplitude de efeitos existente na relação  $\beta$ -alanina/carnosina confere um grande potencial de utilização/aplicação tanto no meio esportivo quanto nas atividades ligadas à clínica, visto que, o fator limitante da síntese de carnosina é a disponibilidade de  $\beta$ -alanina, ou seja, existem fortes indícios da existência de efeito dose-resposta (64).

No tratamento com  $\beta$ -alanina foi utilizado este aminoácido não essencial na dose de 1,8% disponível na água para beber, conforme recente proposta que indicou ser efetiva tanto na formação de carnosina e indiretamente potencializar as respostas insulínicas (56). Nos resultados inerentes a toxicidade foi observado que dentre os importantes parâmetros avaliados, a administração do suplemento promoveu significativa redução somente na concentração plasmática da lipoproteína HDL. Pode-se inferir, que este efeito possivelmente se relacione com a ação da carnosina, visto

que, a  $\beta$ -alanina é o precursor deste dipeptídeo, assim, os dados apresentados sugerem que a carnosina associa-se negativamente com a lipoproteína HDL-colesterol, não afetando outros parâmetros plasmáticos, tal qual a bateria lipídica representada por triglicerídeos, LDL, entre outros. Um recente trabalho atribui esta ação seletiva sobre o HDL a características da espécie e dieta administrada, não descartando que possa haver modificações no perfil lipídico, caso um estudo seja desenvolvido em condições nutricionais que promovem a manutenção de condição hiperlipidêmica (51)

Com relação as transaminases hepáticas, não foi observado alterações se compararmos os grupos tratados com o controle, dado que acompanha a literatura, um vez que, já foi descrito que carnosina pode prevenir o aumento das concentrações plasmáticas das transaminases como demonstrado em estudos com ratos (65). Um ponto a salientar é que, o efeito supracitado pode estar relacionado ao período de suplementação, uma vez que, a alteração foi significativa somente após 15 dias da suplementação.

Um ponto de destaque é que, mesmo sendo relatado que a carnosina possa estar envolvida na regulação de funções do sistema nervoso e indiretamente modificar a neurotransmissão, não foi observado modificação na ingesta em decorrência da suplementação, o que nos leva a supor que as áreas hipotalâmicas relacionadas a ingesta não foram alteradas, baseado na presença de grandes populações de transportadores de aminoácidos na barreira hematoencefálica, e assim, dentro das condições impostas dose, tempo de tratamento neste estudo, não acompanhamos a proposta que a carnosina atua como regulador de apetite (66, 67, 68, 66).

Dentro de uma análise endocrinológica, mais especificamente no que se refere ao processo secretório da insulina, recentes trabalhos constataram que modificações na responsividade das células  $\beta$ -pancreáticas a glicose, ocorrem somente quando as ilhotas pancreáticas são expostas a forma L-alanina, não sendo expressiva a ação da  $\beta$ -alanina (69,70).

Avaliando a responsividade das células  $\beta$  pancreáticas à glicose através do teste de tolerância a glicose, foi observado redução na área sob a curva após 7 dias de suplementação, responsividade que foi ainda mais expressiva no grupo suplementado durante 15 dias, onde a área sob a curva foi ainda menor, indicando maior secreção de insulina. Uma vez que a secreção de insulina não se relaciona diretamente com a  $\beta$ -alanina, o efeito pode ter relação com a concentração citosólica de carnosina, a qual é sintetizada a partir da disponibilidade da  $\beta$ -alanina. Neste sentido, uma recente avaliação direcionada a relação entre a carnosina e a dinâmica secretória da insulina constatou que esta exerceu expressiva ação potencializadora da secreção de insulina frente a glicose, mesmo em baixas concentrações (71).

A seguir, e de forma complementar, foi avaliado a responsividade tecidual à insulina através do teste de tolerância a insulina, sendo observado expressiva redução na constante de decaimento da glicemia (KITT/%min) no grupo suplementado por 7 dias, no entanto, no tratamento durante 15 dias não foi observado diferença. Estes dados indicam ajustes nas dinâmicas do controle glicêmico representado pela progressiva elevação na secreção de insulina e concomitante aumento na sensibilidade tecidual (*up-regulation*) na fase inicial da suplementação seguido da redução compensatória concomitante a progressão da suplementação (*down-regulation*), mecanismos importantes na preservação da relação entre insulina



secretada/população de receptores nos tecidos periféricos buscando a manutenção da normoglicemia e o equilíbrio homeostático (72).

A avaliação *in vitro* da dinâmica secretória de insulina em ilhotas isoladas de ratos mostrou que após 7 dias de suplementação com  $\beta$ -alanina não houve modificação na responsividade das ilhotas quando submetidas a incubação em concentrações crescentes de glicose. Por outro lado, nas ilhotas isoladas de ratos tratados com  $\beta$ -alanina durante 15 dias foi observado maiores respostas secretórias e hierarquicamente crescentes, quando incubadas dentro do mesmo perfil, indicando que as células  $\beta$ -pancreáticas estavam sensibilizadas. Estes dados evidenciam um efeito sensibilizador nas células secretoras de insulina e pode ter relação com o aumento na concentração citosólica de carnosina, lembrando que recentemente, em um estudo *in vitro* realizado em cultura de células INS-1 secretoras de insulina, foi demonstrado que concomitante ao aumento na concentração citosólica de carnosina, ocorria sensibilização destas células e maior secreção de insulina (51,71).

Frente a influência que a carnosina exerce na dinâmica insulínica, passou-se a avaliar o comportamento das reservas musculares glicogênicas (GLI) sendo observado maiores reservas no músculo gastrocnêmio (TIPO II). Neste sentido, tem sido descrito a presença de transportadores de aminoácidos tipo TauT e Pat 1 nas fibras musculares em proporção 3 vezes maior nas fibras glicolíticas (Tipo II) se comparado as fibras oxidativas (tipo I) (73,74,75).

A comunidade científica tem descrito múltiplas vias metabólicas ligadas a sinalização insulínica sendo identificado cascatas enzimáticas ligadas tanto a captação de substratos metabolizáveis quanto a formação de reservatórios (16). No que se refere as fibras musculares, a insulina controla múltiplas funções, principalmente no que se refere a captação de glicose, metabolização ou formação de

GLI (76). Desta forma, a fibra muscular ajusta a captação de glicose de acordo com a demanda, existindo no citosol uma cascata de eventos sequencialmente deflagrados pela ligação da insulina ao receptor e fosforilação deste, seguido de ativação de sistemas proteicos pertencentes a família dos substratos do receptor da insulina (IRSs), ativação da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase B (AKT) culminando com a translocação de transportadores de glicose tipo GLUT 4 e consequente aumento na captação da hexose (77,78).

Um ponto a se ressaltar é que mesmo havendo maior relação entre o conteúdo de carnosina e a formação das GLI expresso em músculo de fibra branca, no músculo sóleo (fibras tipo I, vermelhas) também houve aumento no GLI, porém, somente no período de tratamento de 15 dias, fato que não exclui uma ação da carnosina nesta tipagem de fibra.

Dentro do mesmo perfil de análise foram avaliadas as GLI em músculos submetidos a imobilização, condição onde a literatura tem descrito diminuição na atividade contrátil, aumento na concentração de tecido conjuntivo, diminuição no número de capilares, redução na sinalização insulínica, bem como diminuição na eficiência das vias metabólicas, seguido de atrofia, condição que pode ser reiterada frente aos resultados descritos nos experimentos de relação proteína total / DNA e na avaliação da massa do músculo sóleo (79,80).

Nesta análise foi verificado que os músculos imobilizados apresentaram expressiva redução nas reservas glicogênicas GLI em decorrência do desuso, seguido de um pequeno aumento nas reservas após 7 dias do desuso somente no músculo gastrocnêmio, sendo sugestivo um efeito temporal da suplementação com  $\beta$ -alanina para que haja quantidade de carnosina nas fibras musculares, baseado no fato que as GLI tornaram-se expressivamente maiores após 15 dias de

suplementação, se comparado ao grupo imobilizado não tratado ou tratado durante 7 dias. É importante salientar que as reservas de GLI não atingiram os valores observados no grupo controle.

Este estudo vai ao encontro de uma recente publicação onde os autores descrevem que a carnosina além de promover aumento na secreção de insulina também promove aumento na população de transportadores de glicose no músculo esquelético, ação impar para que haja aumento na captação de glicose e formação das GLI (71). Este estudo, de forma pioneira, mostra que os efeitos da suplementação com  $\beta$ -alanina também se manifestam em músculos imobilizados, porém, em menor intensidade.

Uma vez que, o tratamento modifica as dinâmicas da síntese de reservas energéticas realizou-se um estudo envolvendo captação de 2-deoxi-glicose sendo escolhido o músculo sóleo, que é o modelo tradicionalmente escolhido para estudo de captação, mesmo sabendo do efeito preferencial da carnosina nos músculos Tipo II, desta forma, esta opção torna passível a comparação com dados da literatura (81).

Uma vez que o ITT indicou elevação na captação da hexose, optou-se por avaliar a captação da 2-deoxiglicose com marcador da captação de glicose e a incorporação da [U-C<sup>14</sup>] glicose na formação das reservas de glicogênio, avaliado pela quantificação da radioatividade do H<sup>3</sup> e do C<sup>14</sup>, respectivamente. Nesta avaliação foi constatado um significativo aumento na captação, em relação de A7 para A15 e menor intensidade de oxidação de controle Para A7 e de A7 comparado a A15 e uma expressiva formação de reservas de glicogênio.

A base que sustenta os resultados é a capacidade que a carnosina apresenta em aumentar a atividade secretória das células  $\beta$ -pancreáticas, devido a suplementação com  $\beta$ -alanina, fato que pode ter diretamente favorecido o aumento na

captação de glicose pelos tecidos periféricos além de promover aumento na população de transportadores na membrana e ativação das vias citosólicas formadoras de reservas glicogênicas (71).

Por fim, foi realizado um estudo eletrocardiográfico, no intuito de avaliar se a suplementação com  $\beta$ -alanina pode influenciar na condução elétrica no músculo cardíaco. Na análise da frequência cardíaca foi observado que após tratamento durante 7 dias (A7) o padrão do ECG diferenciou do controle, uma vez que, foi verificado bradicardia sinusal, efeito que pode estar relacionado com a ação da carnosina, na modulação de canais iônicos de cálcio e na atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase alterando com isso, o cronotropismo do músculo cardíaco e o status da contratilidade cardíaca, sendo atribuído a esta substância a hipótese de ser regulador endógeno da contratilidade cardíaca (82,83,84).

Um cuidado especial aplicado aos registros eletrocardiográficos se refere a idade, peso e sexo propiciando especificidades no sinal elétrico cardíaco. Sabe-se que, ratos Wistar apresentam eletrocardiograma com peculiaridades, porém, com similaridades anatômicas entre o coração do rato e o de humanos, de forma que, o eixo elétrico se encontra entre  $+60^\circ$  e  $+90^\circ$  (85).

As ondas do eletrocardiograma representam a condução elétricas nas diferentes partes do músculo cardíaco. Este estudo mostra diferenças no perfil eletrocardiográfico em decorrência do tratamento com  $\beta$ -alanina, assim, o grupo A7 apresentou redução nos parâmetros do ECG principalmente no segmento e intervalo PR indicativo de redução nas constantes de propagação do sinal nas câmaras atriais, condição também constatada no intervalo QT que representa a duração da sístole elétrica (contração cardíaca) e mede a quantidade de tempo requerida para a despolarização e repolarização ventricular, desde o início do complexo QRS até o

final da onda T, acompanhando as baixas frequências constatadas. Cabe ressaltar que o aumento no intervalo QT mostra um diferencial se comparado a normalidade descrita por (87).

Dentro do perfil do ECG de ratos Wistar relatamos que a base do ventrículo esquerdo é a última área cardíaca a ser despolarizada sendo representada por uma onda S que apresentou-se supra desnivelada no grupo A7, condição que pode refletir alterações inotrópicas clássicas em animais que apresentam baixa frequência cardíaca de repouso. No que se refere ao complexo QRS e amplitude da onda R, no grupo A7, não foi observado diferença nos padrões elétricos.

Sequencialmente foi avaliado o comportamento das ondas do ECG no grupo A15 sendo observado expressivas diferenças se comparado tanto ao grupo controle quanto ao grupo A7. Acompanhando o descrito na frequência cardíaca, foi observado intervalo e segmento PR mais curto, condição também descrita no intervalo QT, indicando taquicardia. No registro, foi observado a expressão da onda P encima da onda T, condição clássica quando a frequência cardíaca atinge valores extremamente altos.

Lembrando que a homeostase na concentração de carnosina, no músculo cardíaco, é regulada pela concentração circulante de  $\beta$ -alanina, uma possível explicação para esta significativa mudança no perfil eletrocardiográfico pode ter relação com a capacidade da  $\beta$ -alanina em promover elevação na concentração de cálcio nos cardiomiócitos, fato que pode modificar o tempo de condutância dos canais de rianodina, os quais passariam a ficar mais tempo ativados chegando a atingir tempo seis vezes maior do que o controle, modificando com isso o comportamento das proteínas contráteis (84).

De forma complementar, um recente estudo verificou que após duas semanas de administração da  $\beta$ -alanina, utilizando a via oral, a concentração circulante foi elevada em três vezes e por atuar ativando bombas iônicas que propiciam a troca  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  gera-se mudança no influxo de cálcio nos cardiomiócitos modificando a capacidade contrátil, sendo sugestivo que este estímulo induza modificações no sistema de condução (89,90)

Uma vez que houve diferença no comportamento elétrico da musculatura cardíaca é sugestivo que haja hierarquia nos eventos geradores das mudanças no ECG sendo indicativo neste estudo a bradicardia precoce (A7) e taquicardia a longo prazo (A15). Outros estudos que busquem esclarecer uma possível interferência indireta da suplementação com  $\beta$ -alanina no controle autonômico, podem auxiliar no entendimento das diferentes nuances ligadas a tríade alanina/carnosina/ajustes no controle elétrico das funções cardíacas.

Acompanhando a análise eletrocardiográfica foi avaliado o comportamento da pressão arterial sendo observado redução significativa na pressão arterial sistólica, diastólica e conseqüentemente na pressão média no grupo A7 seguido de elevação significativa destes parâmetros no grupo A15, neste sentido, recentes publicações ligadas a suplementação com  $\beta$ -alanina descreveram um significativo efeito no sistema vascular, onde a substância atua enquanto vasodilatador, promovendo com isso a redução nos índices pressóricos (51,67).

Por outro lado, temos que considerar que sugestões na literatura indicam que a carnosina também atua como modulador na neurotransmissão e no sistema nervoso autônomo sendo possível também haver um ajuste temporal na modulação neural do sistema cardiovascular (89,90).

Um ponto importante é que a ação da BA manifestou-se também no músculo imobilizado, porém, com menor intensidade.

O presente trabalho com pesquisa de animais experimentais tratados com beta alanina e imobilizados, trouxe muitas informações novas sobre este suplemento, uma vez que não existem até o presente momento estudos nesta linhagem, porém importante salientar que novos estudos são necessários.

As limitações do estudo se resumem á disponibilidade do suplemento no mercado, estudos escassos com animais experimentais, variabilidade biológica e possíveis consequência com efeitos adversos.

A aplicabilidade na prática deste estudo mostra-se essencial para orientação do uso indiscriminado de suplementos disponíveis no mercado “informal”, muitas vezes mascarado, abrangendo ainda a falta de acompanhamento seja nutricional ou de outro profissional que conheça os efeitos e possíveis consequências destes suplementos se forem utilizados indiscriminadamente, sem conhecimento por conta muitas vezes do “modismo” hoje muito seguido nas mídias sociais.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com  $\beta$ -alanina, promoveu múltiplos efeitos em vias metabólicas, variações do sistema cardiovascular e na regulação da homeostasia energética das fibras musculares, no entanto, não foi eficiente em minimizar as alterações classicamente descrita em músculos imobilizados, condição que pode refletir na manutenção do comprometimento funcional.



## REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

- 1 - Silveria MIA, Perot C, Goubel F. Plasticidade muscular. CCS, 1994; 13 (3): 23-32.
- 2 - Koeppen BM, Stanton BA. Berne e Levy: Fisiologia. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2009.
- 3- Mcardle WD, Katch FI Katch, VL. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 7.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan;2011.
- 4- Minamoto VB. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. Fisioterapia e Pesquisa. 12 (3): 50-55, 2005.
- 5- Slutzky LC. Fisioterapia Respiratória nas Enfermidades Neuromusculares. Editora Revinter, Rio de Janeiro, RJ, 1997.
- 6- Lawry GV. Exame musculoesquelético sistemático. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- 7- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. Physiological Reviews Published. 2011, 91 (4): 1447-1531.
- 8- Machado UF, Katch FI, Katch VL. 2011. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. Arq Bras Endocrinol Metab. 50 (2): 177-189, 2006
- 9- Klip A, Paquet MR. Glucose Transport and Glucose Transporters in Muscle and Their Metabolic Regulation. Diabetes Care. 1990, 13(3): 228-243.
- 10- Pauli JR, Cintra De Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolismo. 2009, 53 (4): 399-408.
- 11- Ropelle ER, Pauli JR, Carvalheira JBC. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. Motriz, Rio Claro, 11 (1): 49-55, 2005.
- 12- Raw I, Mecanismo de ação da insulina. Rev Med (São Paulo). 85(4):124-129, 2006.
- 13- Carvalheira JB, Ribeiro EB, B. GR, Telles MM, Velloso LA, Gontijo JA, et al. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. Diabetes 2002;51:A41.
- 14- Saad MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. Braz. J. med. Biol Res. 1994; 27: 941-957.

---

<sup>2</sup> Baseados na norma do International Committee of Medical Journal-Grupo de Vancouver;2005.

- 15- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378: 785-9.
- 16- Haeusler RA, Mcgraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017, 23 (4): 4 -8.
- 17- Caierão QM, Teodori RM, Minamoto VB. A influência da imobilização sobre o tecido conjuntivo muscular: uma revisão. *Rev Fisioter Movimento*, 2007, 20 (1): 87-92.
- 18- Kunz RI, Coradini JG, Rondon CLS, Brancalhão RMC, Bertolini GRF, Ribeiro LFC. Efeitos da imobilização e remobilização pela combinação natação e salto em meio aquático, sobre a morfologia do músculo tibial anterior de ratos. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa*, 19 (2): 123-129, 2013.
- 19- Piovesana RF, Martins MD, Fernandes KPS, Bussadorid SK, Selistre-De-Araújo HS, Mesquita-Ferrari RA. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. *Fisioter. Mov. Curitiba*, 22 (2): 211-220, 2009
- 20- Baroni BM, Galvão AQ, Ritzel CH, Diefenthaler F, Vaz MA. Adaptações neuromusculares de flexores dorsais e plantares a duas semanas de imobilização após entorse de tornozelo. *Rev Bras Med Esporte*, 2010, 16 (5): 358-362.
- 21- Musacchia XJ, Stefen JM, Fell RD. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. *Exerc Sport Sci Rev*, 1888, 16: 61-87.
- 22- Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res. Braz J Med Biol Res.* 35(11):1329-32, 2002.
- 23- Silva CA, Guirro RRJ, Polacow, MLO, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res.* 2006, 7 (39) 979-985.
- 24- Appell HJ. Skeletal muscles atrophy during immobilization *Int. J. Sports Med.* 1986, 7: 1-5.
- 25- Booth FW, Seider MJ. Early changes in skeletal muscle in protein synthesis after limb immobilization in rats. *J. Appl. Physiol*, 1979, 7:974-977.
- 26 - Urso ML. Disuse atrophy of human skeletal muscle: Cells signaling and potential interventions. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2009, 41(2): 1860-1868.
- 27- Clark BC. In vivo alterations skeltal muscle form and function after disuse atrophy. *Medicine e Science in Sports Exercise.* 2009; 41; 1869 -1875.
- 28-Adams GR. Exercise effects on muscle insulin signaling and action. Invited review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaption. *J. Appl. Physiol.* 2002, 93:1159-1167.

29-Mohamed BA, Gerrard D, Watkins BA, Hannon K. Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB. J*, 18:221-223,2004.

30-Henring SW, Grimm AF; Grimm BR. Regulation of sarcomere number in skeletal muscle: a comparison of hypothesis. *Muscle Nerve*. 1984; 7: 161 -173.

31-kang, C, Yeo D. Muscle immobilization activates mitophagy and disrupts mitochondrial dynamics in mice. *218 (3): 188–197*, 2016.

32- Reardon, KA., Fracp, BS, Davis J, Kapsa, R M I, Choong P, Fracs MD. et al. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle e Nerve*. v.24, p.893-99, 2001.

33- Jozsa I, Thoring J, Jarvien M, Kannus P, Lehto M, Kvist M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: An experimental study in the rat calf muscles. *Exp. Mol. Pathol*. 49:267-278, 1988.

34- Lieber RL. Skeletal muscle structure and function implications for rehabilitation and sports medicine. Baltimore, Williams e Wilkins, cap 5, p.210-259, 2002.

35- Silverthorn DU. *Fisiologia Humana. Uma Abordagem Integrada*. ART MED; 7ª edição, 2017

36- Baynes JW, Dominickzak MD, Path RC. *Bioquímica Médica*. Elsevier, 3ª edição, 2017.

37- Snyder AC. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. *Medicine and Science and Sports Exercise*.1998, 30(7): 1146-1150.

38- Hirrose M, Kaneki M. Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279(6):1235-41.

39- Nicholson WF, Watson PA. Glucose uptake and glycogen synthesis in muscles from immobilized limbs. *J. Appl. Physiol*, 56:431-435, 1984.

40- Aldini G, Boldyrev AA, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, 2013, 93 (4): 1803-1845.

41-Derave W, Everaert I, Beeckman S, Baguet A. Muscle carnosine metabolism and  $\beta$ -alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Medicine*, 2010, 40 (3): 247-263.

42- Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha Junior AH. The Role of  $\beta$ -alanine Supplementation on Muscle Carnosine and Exercise Performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2010. Publish Ahead of Print DOI: 10.1249/MSS.0b013e3181c74e38

- 43- Harris RC, Dunnett M, Greenhaff PL. Carnosine and taurine contents in individual fibres in human vastus lateralis muscle. *Journal of Sports and Science*. 1998,16: 639-643.
- 44- Harris, R. C., Stellingwerff, T. (2013).  $\beta$ -alanine supplementation on high-intensity exercise performance. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser*, 76, 61-71.
- 45- Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM, Harris RC. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids*. Vol. 6. Num. 44. 2013. p.1477-1491.
- 46- Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry*, 2000, 65 (7): 757-765.
- 47- Jordan T, Lukaszuk J, Misic M, Umoren J. Effect of  $\beta$ -alanine supplementation on the onset of blood lactate accumulation (OBLA) during treadmill running: Pre/post 2 treatment experimental design. *Journal of International Society and Sports Nutrition*. 2010, 7: 20.
- 48-Dutka TL, Lambolley CR, Mckenna MJ, Murphy RM, LAMB GD. Effects of carnosine on contractile apparatus  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release in human skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*, 2012,112(5):728-36
- 49-Vincent GK; Leveritt MD, Brennan CT, Slater CJ, Jenkins D G. Prevalence, knowledge and attitudes relating to  $\beta$ -alanine use among professional footballers. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 20 (1): 12-16, 2017.
- 50- Courten B. Effects of carnosine supplementation on glucose metabolism: Pilot clinical trial. *Obesity*. 2016, 24: 1027–1034.
- 51-Blancquaert L, Baba SP, Kwiatkowski S, Stautemas J, Stegen S, barbaresi S, Chung W, Boakye AA, Hoetker JD, Bhatnagar A, Delanghe J, Vanheel B, Veiga-Da-Cunha M, Derave W, Everaert I. Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by  $\beta$ -alanine transamination. *J Physiol*. 2016 Sep 1;594(17):4849-63
- 52- Jones RL, Barnett CT, Davidson J, Maritza B, Fraser WD, Harris R, Sale C.  $\beta$ -alanine supplementation improves in-vivo fresh and fatigued skeletal muscle relaxation speed. *Eur J Appl Physiol*. 2017; 117(5):867-879
- 53- Brencher L, Verhaegh R, Kirsch M. Attenuation of intestinal ischemia-reperfusion-injury by  $\beta$ -alanine: a potentially glycine-receptor mediated effect. *Journal of Surgical Research*. 2017, 211 (1): 233-241.
- 54- Stelzl T, Geillinger-Kästle KE, Stolz J, Daniel H. Glycans in the intestinal peptide transporter PEPT1 contribute to function and protect from proteolysis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 312 (6): G580-G591, 2017.

- 55- Bex T, Chung W, Baguet A, Eric Achten E, Derave W. Exercise training and beta-alanine-induced muscle carnosine loading. *Frontiers in Nutrition*. 2 (13): 1-6, 2015.
- 56- Naderi A, Sadeghi M, Sarshin A, Imanipour V, Nazeri SA, Farkhayi F, et al. Muscle carnosine concentration with the co-ingestion of carbohydrate with  $\beta$ -alanine in male rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2017,14 (4): 373-9.
- 57-Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm. Metab. Research*. 1984, 13(9): 531-532.
- 58- Rafacho LP, Roma SR, Boschero AC. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2007, 85(5): 536-545.
- 59-Costa W, Riera ARP, Costa FA, Bombig MTN, Paola AAV, Carvalho ACC, et al. Correlation of electrocardiographic left ventricular hypertrophy criteria with left ventricular mass by echocardiogram in obese hypertensive patients. *J Electrocardiol*. 2008;41(6):724-9.
- 60- Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets fo Langerhans. *Diabetologia*. 1981; 21: 470-475.
- 61- Kokubun E. Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos. Efeito do exercício e do estado alimentar. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, 1990.
- 62- Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol*. 1970; 28(2):234-236
- 63- Bellinger PM.  $\beta$ -alanine supplementation for athletic performance: An update. *J Strength Cond Res* 28(6): 1751–1770, 2014
- 64- Hipkiss AR, Cartwright SP, Bromley C, Gross SR, Bill RM. *Chem Cent J*. 2013 Feb 25;7(1):38. doi: 10.1186/1752-153X-7-38.
- 65- Artun BC, Küskü-Kiraz Z, Güllüoğlu M, Cevikbaş U, Koçak-Toker N, Uysal M: The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010, 29: 659–665
- 66- Boldyrev A. Carnosine as a modulator of endogenous  $Zn^{2+}$  effects. *Trends Pharmacol Sci*. 2001, 22: 112–113.
- 67- Nagai K, Tanida M, Niijima A, Tsuruoka N, Kiso Y. Role of L-carnosine in the control of blood glucose, blood/pressure, thermogenesis and lipolysis by autonomic nervous system in rats: involvement of the circadian clock and histamine. *Amino Acids*. 2012, 43: 97 – 109.

- 68- Trombley PQ, Horning MS, Blakemore LJ. Carnosine modulates zinc and copper effects on amino acid receptors and synaptic transmission. *Neuroreport*. 1998, 9: 3503–3507.
- 69- Araújo MB, Junior RCV; Moura LP, Junior MC; Dalia RA, Sponton ACS; RIBEIRO C, MELLO MAR. Influence of creatine supplementation on indicators of glucose metabolism in skeletal muscle of exercised rats. *Motriz: Rev. Educ. Fis.* 2013, 19 (4): 709- 716.
- 70- Huang M, Joseph JW. Metabolomic analysis of pancreatic  $\beta$ -cell insulin release in response to glucose. *Islets*. 2012, 4(3):210-22.
- 71- Cripps M, Hanna K, Lavilla C, Sayers SR, Carton PW, Sims C, Girolamo LD, SALE C, Turner MD. Carnosine scavenging of glucopilotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake. *Scientific reports*, 2017, 7: 113-133.
- 72- Wajchenberg BL, Santomauro ATMG, Nery M, Santos RF, Rossi Merl, Ursich MJM, Roch DM. Resistência à Insulina: Métodos Diagnósticos e Fatores que Influenciam a Ação da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 1999, 43 (2): 73 -85.
- 73- Everaert I, Mooyaart A, Baguet A, Zutinic A, Baelde H, Achten E, Taes Y, Heer ED, Derave W. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*. 2011; 40:1221–29.
- 74-Kendrick IP, Kim HJ, Harris RC, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, Bui TT, Wise JÁ. The effect of 4 weeks beta alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentration in type I and II human skeletal muscle fibers. *Eur J. Appl Physiol*. 2009, 106: 131-138.
- 75- Painelli VS, Roschel H, DE Jesus F, Sale C, Harris RC, Solis R. Ergogenic effect of Beta-Alanine Combined With Sodium Bicarbonate on Swimming Performance. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 2013.
- 76- Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2014, 6, a009191
- 77- Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. GSK and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signaling network. *Adv Biol Regul*. 2017, 65: 5 – 15.
- 78- Krishnapuram R, Kirk-Ballard H, Dhurandhar EJ, Dubuisson O, Messier V, Rabasa-Lhoret R, Hegde V, Aggarwal S, Dhurandhar NV. Insulin receptor-independent upregulation of cellular glucose uptake. *Int. J. Obes*. 2017, 37: 146 – 153.
- 79- Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, Van Loon LJ. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol*. 2014, 201 (3): 600 -611.

80- Atherton PJ, Greenhaff PL, Phillips SM, Bodine SC, Adams CM, Lang CH. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am. J. Physiol Endocr Metab.* 2016, 311 (3): E594 – 604.

81- Araujo TR, Freitas IN, Vettorazzi JF, Batista TM, Santos-Silva JC, onfleur ML, Balbo SL, Boschero AC, Carneiro EM, Ribeiro RA. *Eur J Nutr.* 2017 Sep;56(6):2069-2080.

82- Snimonii GV, Tatishvili NI, Shiliia DSH, Bakanidze NT, Khachidze MV. The effect of carnosine on the activity of Na,K,ATPase: prospective uses in clinical cardiology. *Biokhimiia.* 1992 Sep;57(9):1343-7

83-Smith-Ryan AE, Fukuda DH, Stout JR, Kendall K.L. High-velocity intermittent running: effects of beta-alanine supplementation. *Journal of Strength and Conditioning research.* 2012, 26, (10): 2798-805.

84 -Zaloga GP, Clark JD, Roberts PR. *Crit Care Med.* 2000 Nov;28(11):3679-83. Inhibition of nitric oxide synthase enhances the myocardial toxicity of phenylpropanolamine.

85- Cabrini, FPH C112i Implantação do modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. Avaliação eletrocardiográfica– Campinas, SP: [s.n.], 2009.

86- Henkens IR, Mouchaers KT, Vonk-Noordegraaf A, Boonstra A, Swenne CA, Maan AC, et al. (2008) Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular pressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging.. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H2150-7.(A).

87- ARNOLDS, D.E.; CHU, A.; MCNALLY, E.M. *et al.* The emerging genetic landscape underlying cardiac conduction system function. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, v.91, p.578-585, 2011.

88- Blancquaert L, Baba SP, Kwiatkowski S, Stautemas J, Stegen S, Barbaresi S, Chung W, Boakye AA, Hoetker JD, Bhatnagar A, Delanghe J, Vanheel B, Veiga-da-Cunha M, Derave W, Everaert I. *J Physiol.* 2016 Sep 1;594(17):4849-63. doi: 10.1113/JP272050. Epub 2016 Jun 2.

89- Aldrini G, Oriolli M, Rossioni G, Saul F, Braidotti P. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidemia and renal function in Zucker obese rats. *J.Cell Mol Med,* 2011, 15: 1339 – 1384.

90-Nijima A, Okui T, Matsumura Y, Yamano T, Tsumoka N. Effects of L-carnosine on renal sympathetic nerve activity and DOCA salt hypertension in rats. *Auton Neurosci.* 2002, 97: 99-102.

Universidade Metodista de Piracicaba



Comitê de Ética sobre o Uso de Animais

---

Piracicaba, 29 de março de 2017.

Para: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

De: Comissão de Ética no Uso de Animais

Ref.: Aprovação do protocolo de pesquisa nº 02/2017

### Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Metodista de Piracicaba APROVOU o protocolo de pesquisa -Mestrado nº 02/2017: "*Padrão quimiometabólico de músculos tratados com beta alanina*" analisado por esta comissão.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, which appears to be "M. de S. Silva", is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Comissão de Ética no uso de Animais

R.S. 11.151.544



ANEXO : SAÚDE REV. UNIMEP, 17 (47): 3-9, 2017

## Suplementação com $\beta$ -alanina: ação nas reservas glicogênicas musculares e no perfil eletrocardiográfico de ratas

*Supplementation with  $\beta$ -alanine: action in muscle glycogen reserves and electrocardiographic profile*

**RESUMO** Um recurso ergogênico que tem sido alvo de estudos é a  $\beta$ -alanina, frente à sua capacidade de promover melhora no desempenho atlético. O objetivo deste trabalho foi avaliar as reservas glicogênicas (GLI) dos músculos ventrículo (V), diafragma (D) e peitoral (P), além de parâmetros eletrocardiográficos em ratas tratadas com  $\beta$ -alanina. Foram utilizadas 15 ratas Wistar jovens, submetidas a cuidados ideais de bioterismo, divididas em grupos denominados controle (C), tratados com  $\beta$ -alanina por 7 dias (A7) e por 15 dias (A15). Os grupos tratados receberam a  $\beta$ -alanina (Beta Cálcio Alanine<sup>®</sup>) disponível na água para beber na concentração de 1,8%. Dentro do período experimental, os animais foram anestesiados e os segmentos ST e QT captados (Heart Ware System<sup>®</sup>); a seguir, os animais foram eutanasiados e os músculos coletados para a avaliação das GLI. Os dados foram avaliados por meio de Anova one way e Teste de Tukey;  $p < 0,05$ . No grupo A7, o ST e QT foram mais lentos se comparados ao C, e no grupo A15 foram mais rápidos se comparados ao C e A7 ( $p < 0,05$ ), indicando que a  $\beta$ -alanina pode modificar a condutância elétrica no músculo cardíaco. O GLI também foi modificado, sendo observado que nos músculos P e D houve aumento progressivo do 7<sup>o</sup>. a 15<sup>o</sup>. dia de suplementação, condição não observada no V, cujo aumento do GLI ocorreu significativamente no 15<sup>o</sup>. dia. Os dados indicam que a  $\beta$ -alanina pode modificar a condução elétrica no ECG e indiretamente promover elevação nas reservas de glicogênio, por ser secretagogo da insulina.

**PALAVRAS-CHAVE:** BETA-ALANINA. SUPLEMENTAÇÃO. ELETROCARDIOGRAFIA.

**ABSTRACT** An ergogenic resource that has been the target of studies is  $\beta$ -alanine, against its ability to promote improvement in athletic performance. The objective of this study was to evaluate the muscular glycogen reserves (GLI) represented by the ventricle (V), diaphragm (D) and pectoral (P), as well as electrocardiographic parameters in rats treated with  $\beta$ -alanine. Fifteen young female Wistar rats submitted to optimal bioterium care were used and were divided into groups called Control (C), treated with beta alanine for 7 days (A7) and treated for 15 days (A15). The treated groups received  $\beta$ -alanine (Beta Calcium Alanine<sup>®</sup>) available in drinking water at the concentration of 1.8%. Within the experimental period, the animals were anesthetized and the ST and QT segments captured (Heart Ware System<sup>®</sup>), then the animals were euthanized and the muscles collected for GLI assessment. The data were evaluated through Anova one way and Tukey test,  $p < 0.05$ . In group A7, ST and QT were slower compared to C, and in group A15 they were faster compared to C and A7 ( $p < 0.05$ ), indicating that  $\beta$ -alanine may modify electrical conductance in cardiac muscle. The GLI was also modified, and it was observed that in P and D muscles, there was a progressive increase of the 7th to 15th day of supplementation, a condition not observed in the V, whose GLI increase occurred significantly on the 15th day. The data indicate that  $\beta$ -alanine can modify electrical conduction on ECG and indirectly promote elevation in glycogen reserves, because it is an insulin secretagogue.

**Key-words:** Beta alanine. Supplementation. Electrocardiography.

LUIZ CARLOS ALVES JÚNIOR<sup>1</sup>  
PATRICIA CARLA PAULINO  
BELOTTO<sup>1</sup>  
ADRIANA PERTILLA<sup>2</sup>  
CARLOS ALBERTO SILVA<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidade Metodista de  
Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba/  
SP - Brasil.

Os autores declaram que não há  
conflito de interesse

# Comportamento de ratos Wistar: importância do enriquecimento ambiental

## *Wistar Rats Behavior: Importance of Environmental Enrichment*

### RESUMO

**Introdução:** A metodologia atual indicada para biotérios preconiza que os animais devem ficar confinados em um ambiente considerado padrão, composto de caixa plástica comunitária, água e ração. Atualmente, há grande preocupação com o bem-estar animal, sendo sugerido a necessidade de oferecer aos animais um ambiente com maior quantidade de estímulos sensoriais ou maior espaço físico disponível.

**Objetivo:** O presente estudo teve o objetivo de avaliar o comportamento de ratos criados sob condições ditas controle e compará-los com ratos criados sob enriquecimento ambiental.

**Material e Métodos:** Utilizaram-se ratos machos Wistar adquiridos na fase pós-desmame (21 dias), divididos em dois grupos denominados: Controle (C, criados em condições normais de bioterismo) e Experimental (E, criados sob enriquecimento ambiental), n=10/grupo, nos quais foi avaliado o comportamento após 30 ou 60 dias da chegada dos animais ao biotério da UNIMEP. Na avaliação comportamental, foram empregados o Teste de Campo Aberto (open field); Labirinto em Cruz Elevada (LCE) e o Teste de Contato Social.

**Resultados:** Foi observado menor exploração e maior ansiedade nos animais C30 e C60, enquanto os grupos E30 e E60 apresentaram menor ansiedade, maior exploração no campo aberto e no braço aberto do LCE. Na análise do contato social, foi verificado que os ratos E30 e E60 mostraram-se mais impulsivos e reconheceram os intrusos em menor tempo, se comparado ao C30 e C60, indicando melhora no reconhecimento e conseqüente convívio. **Conclusão:** O ambiente enriquecido favoreceu a manifestação de diferenças comportamentais, indicando melhores condições para o animal e possivelmente menor estresse, condições ímpares para se obter resultados mais fidedignos em estudos voltados à experimentação animal.

**PALAVRAS-CHAVE:** ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL. BEM-ESTAR ANIMAL. COMPORTAMENTO ANIMAL.

### ABSTRACT

**Introduction:** The current methodology recommended for animal breeding recommends that animals should be confined in an environment considered standard, composed of community plastic box, water and feed. Currently there is great concern for animal welfare, being suggested the need to provide the animals an environment with greater number of sensory stimuli or bigger physical space available to the animals.

PAMELA GOZZER  
Universidade Metodista de  
Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba/  
SP - Brasil  
ELLEN ANDRADE  
Centro de Tecnologia Canavieira,  
Piracicaba/SP - Brasil  
PATRÍCIA CARLA PAULINO BELOTTO  
Universidade Metodista de Piraci-  
caba (UNIMEP), Piracicaba/ SP  
- Brasil  
BRUNO FERREIRA GONÇALVES SILVA  
Universidade Paulista (UNIP),  
Campinas/SP - Brasil  
ANDRÉ ALVES LICO MASCARIN  
Universidade Metodista de Pira-  
cicaba (UNIMEP), Piracicaba/ SP  
- Brasil  
CARLOS ALBERTO SILVA  
UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRA-  
CICABA (UNIMEP), PIRACICABA/  
SP - BRASIL



## Alterações precoces no padrão eletrocardiográfico em ratos tratados com metandrostenolona

*Early changes in the electrocardiographic pattern in methandrostenolone treated rats*

**RESUMO** Jovens fisiculturistas e atletas, na intenção de aumentar rapidamente a força muscular ou melhorar a aparência, contribuem para o crescente consumo de agentes anabolizantes, em especial a metandrostenolona, ainda que o consenso das múltiplas alterações orgânicas acompanhe a utilização desse fármaco. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência cardíaca, as ondas e os segmentos do ECG em ratos tratados com metandrostenolona (10 mg/Kg/semana pela via subcutânea) durante 7 e 15 dias.

**Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar jovens formando o grupo controle e submetidos ao tratamento durante sete dias (M7) e 15 dias (M15), contendo seis animais. Posteriormente, após anestesia com pentobarbital sódico (40 mg/Kg,ip), o ECG foi analisado com o auxílio do eletrocardiógrafo Heart Ware®. **Resultados:** Foi verificado que o tratamento com M promoveu elevação na frequência cardíaca em intensidade crescente concomitante à progressão do tratamento, houve também modificação no segmento QT nos grupos M7 e M15, além de ser observado no último grupo a manifestação de inversão de onda U e episódios de extrasístole isolada.

**Conclusão:** O tratamento com metandrostenolona promoveu alterações eletrocardiográficas precoces, indicando que em doses usualmente utilizadas por praticantes de atividade física promove lesão no miocárdio.

**PALAVRAS-CHAVE:** ESTEROIDES ANABÓLICOS; ELETROCARDIOGRAFIA; RATOS.

**ABSTRACT Objectives:** Physical activity practitioners incessantly seek to improve body aesthetics and athletic performance and to achieve goals, it has been widely reported the use of anabolic agents, especially methandrostenolone (M), although it is a consensus of the multiple organic changes that accompany the use of this drug. The objective of this study was to evaluate heart rate, ECG waves and ECG segments in rats treated with methandrostenolone (10 mg / kg / week by the subcutaneous route) for 7 and 15 days.

**Methods:** Young Wistar rats were used to form the control group and were submitted to treatment for 7 days (M7) and 15 days (M15), containing six animals. Subsequently, after anesthesia with sodium pentobarbital (40 mg / kg, ip), the ECG was analyzed with the aid of the Heart Ware® electrocardiograph.

**Results:** It was verified that the treatment with M promoted elevation

PATRICIA CARLA FERREIRO BRUNETTI  
Universidade Metodista de Piracicaba  
(Unimep), Piracicaba/SP - Brasil  
LEI CARLIN AYLES JUNIOR  
Universidade Metodista de Piracicaba  
(Unimep), Piracicaba/SP - Brasil  
CAROLINA CARRELLA FERREIRO  
Universidade Metodista de Piracicaba  
(Unimep), Piracicaba/SP - Brasil  
MARCOS ANTONIO STANI  
Universidade Metodista de Piracicaba  
(Unimep), Piracicaba/SP - Brasil  
SANDRA DE MOURA VARELLA  
Universidade Metodista de Piracicaba  
(Unimep), Piracicaba/SP - Brasil