

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO**

Giuseppe Potrick Stefani

**Efeitos da Suplementação de
Precusores de Carnosina Associada
ao Treinamento Combinado Sobre
Capacidade Funcional e Parâmetros
Bioquímicos em Ratos com
Insuficiência Cardíaca**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2020

Giuseppe Potrick Stefani

**Efeitos da Suplementação de
Precusores de Carnosina Associada
ao Treinamento Combinado Sobre
Capacidade Funcional e Parâmetros
Bioquímicos em Ratos com
Insuficiência Cardíaca**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Dal Lago

Porto Alegre
2020

**Efeitos da Suplementação de Precusores de Carnosina Associada
ao Treinamento Combinado Sobre Capacidade Funcional e
Parâmetros Bioquímicos em Ratos com Insuficiência Cardíaca**

BANCA AVALIADORA

Prof. Dr. Marlus Karsten
Departamento de Fisioterapia
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Prof. Dr. Luís Fernando Deresz
Departamento de Educação Física
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof. Dr. Gustavo Duarte Pimentel
Faculdade de Enfermagem e Nutrição
Universidade Federal de Goiás (UFG)

Porto Alegre
2020

AGRADECIMENTO

Meu agradecimento inicialmente é direcionado a minha família **Potrick Stefani**, em especial meu pai, minha mãe e minha irmã que sempre acreditaram em mim. Muito obrigado por tudo.

À minha noiva **Samantha Peixoto Silva**, agradeço imensamente por todo suporte que me deste neste período. Esteve ao meu lado desde situações ruins até as nossas conquistas. Compreendeste sempre o quanto esta etapa acadêmica exigiria do meu tempo e energia e mesmo assim me incentivou para concluir da melhor forma possível. Sou muito grato por ser esta parceira e companheira perfeita que escolhi para a vida!

Ao meu orientador Professor **Pedro Dal Lago**, gostaria de agradecê-lo por tudo que fizeste por mim. Foste meu professor na graduação, mestrado e agora no doutorado. A inspiração que o senhor provocou em mim desde a primeira aula de Fisiologia Humana ressona até hoje em minha memória com muito afago. Sempre muito solícito, líder e competente me mostraste o que é trabalhar em equipe e de forma ética. Agradeço por toda confiança que tiveste em mim em mais de dez anos de trabalho. Muito obrigado por tudo!

Ao meu amigo **Thiago Gomes Heck**, quero agradecer pela parceria que tivemos. Me forneceste oportunidades que poderia apenas sonhar em aprender análises, realizar imersão em ciência. Sempre admirei a sua competência e motivação de fazer ciência. Cresci muito aprendendo com você nestes anos e apenas tenho que agradecer por todas as oportunidades que ofereceste na minha formação. Sou eternamente grato.

Ao meu colega de doutorado e amigo **Lucas Capalonga**, agradeço por toda camaradagem que tivemos. Ingressamos no doutorado relativamente no mesmo período, embora já fôssemos amigos e colegas no mestrado, mas conseguimos realizar experimentos em conjunto, estágios de pesquisa em outros laboratórios juntos e crescermos nesta trajetória acadêmica. Te agradeço por tudo, esta tese tem contribuições enormes da sua parte. Muito obrigado!

Aos meus amigos de longa data **Jadson Pereira Alves** e **Ramiro Barcos Nunes**, gostaria de agradecer por tudo que fizeram por mim. Fui aluno de iniciação científica de vocês dois, colega no mestrado e doutorado. Posso dizer que o que cresci com vocês é imensurável. Sempre torceram por mim e participaram ativamente

na minha formação acadêmica. O resultado desta tese é um dos produtos da motivação que compartilhamos desde o início do grupo de pesquisa. Sou eternamente grato pela parceria e aprendizado!

Ao meu antigo aluno de iniciação científica e amigo **Lucas Ribeiro da Silva**, pude te ver motivado com os experimentos e processos criativos que envolvem a pós-graduação. Sempre muito solícito, extremamente competente e educado, não poderia pedir um aluno de iniciação científica melhor para participar das etapas do doutorado do que você. Te agradeço imensamente por toda dedicação e parceria nesta tese.

Aos colegas do **Laboratório de Biologia Celular**, gostaria de agradecer em especial a incrível professora **Márcia Rosângela Wink**, **Ana Paula Santin Bertoni** e **Samlai Vedovatto** pelo suporte e incrível dedicação aos trabalhos desta tese. Tive a oportunidade de aprender em amplitudes que não imaginava com todas vocês. A motivação de vocês é contagiante. Sou eternamente grato pela oportunidade e por toda parceria.

Aos colegas do **Grupo de Interação Cardiopulmonar (GPIC)**, quero agradecer por todos os momentos incríveis que vivemos juntos. Estar inserido em um grupo de pesquisa com pessoas que se ajudam e buscam o avanço da ciência é a melhor condição que podia pedir para o doutorado. Muito obrigado a todos e a todas por tudo!

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan

RESUMO

O treinamento combinado tem sido associado a respostas positivas no estado clínico de pacientes com insuficiência cardíaca. Outras ferramentas não farmacológicas, como a suplementação de aminoácidos, podem melhorar ainda mais sua adaptação. Ao longo da trajetória no Laboratório de Fisiologia Experimental uma série de estudos com suplementos alimentares e treinamentos físicos foram realizados em modelos animais de insuficiência cardíaca a fim de observar os efeitos funcionais e moleculares. Sendo assim, o objetivo desta tese foi testar se a suplementação de precursores de carnosina (β -alanina e L-histidina) associada ao treinamento combinado (aeróbio e força) poderiam apresentar respostas melhores na capacidade funcional, variáveis bioquímicas de ratos com insuficiência cardíaca. Para os dois estudos foram utilizados 24 ratos machos Wistar. Todos os animais foram submetidos a cirurgia de indução de infarto agudo do miocárdio por meio da ligadura da artéria coronariana. Após o período de indução de insuficiência cardíaca, os animais foram divididos em três diferentes grupos: sedentários, treinamento combinado suplementado com placebo e treinamento combinado suplementado com β -alanina e L-histidina. Os animais foram submetidos a protocolos de treinamento de força em agachamento adaptado para ratos (3x/semana) e treinamento aeróbio contínuo em esteira para ratos (2x/semana). As modalidades de treinamento ocorreram em dias distintos. Animais suplementados com β -alanina e L-histidina receberam produtos por meio de gavagem (250 mg/kg/dia) diluídos em água destilada diariamente. Para placebo foi utilizada solução salina. Tanto treinamento, quanto suplementação foram realizados por oito semanas. Antes e após o período experimental, os animais realizaram testes máximos de capacidade funcional, força máxima e ecocardiografia. Ao término das últimas avaliações, os animais foram eutanasiados para seus tecidos serem coletados (coração, pulmões, fígado, gastrocnêmios e sóleos) e posteriormente analisados. A suplementação de β -alanina e L-histidina foi eficiente em aumentar o conteúdo de carnosina de músculos esqueléticos, no entanto, não aumentou o conteúdo de carnosina no coração. Não foram encontradas alterações nos parâmetros ecocardiográficos e morfológicos entre os grupos. A capacidade funcional e força máxima foram maiores nos grupos treinados, comparados ao grupo sedentário. Entretanto, o grupo suplementado com β -alanina e L-histidina demonstrou melhorar ainda mais estes parâmetros, comparado ao grupo treinado suplementado com placebo. Adicionalmente, a suplementação de β -alanina e L-histidina demonstrou menor estresse oxidativo, marcadores de inflamação e maior expressão de proteínas de choque térmico, expressão de mRNA de ATP1a2 e ATP2a2 no músculo esquelético, em comparação ao grupo sedentário. O treinamento combinado e a suplementação de β -alanina e L-histidina em ratos com insuficiência cardíaca melhoraram a capacidade funcional e os parâmetros bioquímicos de forma mais positiva que o treinamento isolado. A carnosina provocou adaptações positivas na resposta ao estresse celular no músculo esquelético e na expressão negativa de mRNA do transporte de cálcio.

Palavras-chave: Carnosina; Suplementos Nutricionais; Exercício Físico; Teste de Esforço; Insuficiência Cardíaca; Ratos.

ABSTRACT

Combined training has been associated with positive responses in the clinical status of patients with heart failure. Other non-pharmacological tools, such as amino acid supplementation, can further improve its adaptation. Throughout the trajectory at the Experimental Physiology Laboratory, a series of studies with dietary supplements and physical training were carried out in animal models of heart failure in order to observe the functional and molecular effects. Thus, the objective was to test whether the supplementation of carnosine precursors (β -alanine and L-histidine) associated with combined training (aerobic and strength) could present improved responses in functional capacity, biochemical variables of rats with heart failure. For both studies, 24 male Wistar rats were used. All animals were submitted to surgery to induce acute myocardial infarction by coronary artery ligation. After the heart failure induction period, the animals were divided into three different groups: sedentary, combined training supplemented with placebo and combined training supplemented with β -alanine and L-histidine. The animals were submitted to strength training protocols in squats adapted for rats (3x/week) and continuous aerobic training on a treadmill for rats (2x/week). The training modalities took place on different days. Animals supplemented with β -alanine and L-histidine received products by gavage (250 mg/kg/day) diluted in distilled water daily. For placebo saline was used. Both training and supplementation were carried out for eight weeks. Before and after the experimental period, the animals performed maximum tests of functional capacity, maximum strength and echocardiography. At the end of the last evaluations, the animals were euthanized for their tissues to be collected (heart, lungs, liver, gastrocnemius, and soleus) and subsequently analyzed. Supplementation of β -alanine and L-histidine was efficient in increasing the carnosine content of skeletal muscles; however, it did not increase the carnosine content in the heart. There were no changes in echocardiographic and morphological parameters between groups. Functional capacity and maximum strength were higher in the trained groups, compared to the sedentary group. However, the group supplemented with β -alanine and L-histidine was shown to improve these parameters even further, compared to the trained group supplemented with placebo. Additionally, β -alanine and L-histidine supplementation demonstrated less oxidative stress, inflammation markers and greater expression of heat shock proteins, expression of ATP1a2 and ATP2a2 mRNA in skeletal muscle, compared to the sedentary group. Combined training and β -alanine and L-histidine supplementation in rats with heart failure improved functional capacity and biochemical parameters more positively than isolated training. Carnosine caused positive adaptations in the response to cellular stress in skeletal muscle and in the negative expression of calcium transport mRNA.

Keywords: Carnosine; Dietary Supplements; Exercise; Exercise Test; Heart Failure; Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alvo de EROs no domínio intracelular de fibras musculares cardíacas e esqueléticas.....	27
Figura 2 – Ciclo vicioso da inatividade física com disfunção ventricular esquerda e inserção do treinamento físico como terapia não-medicamentosa	29
Figura 3 – Efeitos já descritos na literatura científica do treinamento físico em pacientes com IC	30
Figura 4 – Estruturas químicas da carnosina e seus derivados	35
Figura 5 – Absorção intestinal de carnosina	36
Figura 6 – Estrutura tridimensional da enzima CS	37
Figura 7 – Reação de biossíntese da carnosina	37
Figura 8 – Captação da β -alanina e biossíntese de carnosina na fibra muscular esquelética	38
Figura 9 – Isoformas das carnosinases, enzimas responsáveis pela degradação da carnosina	39
Figura 10 – Efeitos da carnosina em fibras musculares esqueléticas	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da poli farmácia sobre o estado nutricional de pacientes com IC.....	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

O_2^-	Ânion Radical Superóxido
$\dot{V}O_2$	Consumo de Oxigênio
$\dot{V}O_{2max}$	Consumo Máximo de Oxigênio
$\dot{V}O_{2pico}$	Pico de Consumo de Oxigênio
1O_2	Oxigênio Singlete
ADP	Adenosina Difosfato
AHA	<i>American Heart Association</i>
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPGD1	<i>ATP-grasp domain containing protein 1</i>
BNP	Peptídeo Natriurético do Tipo B
Ca^{2+}	Íon Divalente de Cálcio
Cl^-	Íon Monovalente de Cloro
CN1	Carnosinase-1
CN2	Carnosinase-2
CS	Carnosina Sintase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FE	Fração de Ejeção
$HO\cdot$	Radical Hidroxila
H^+	Íon Monovalente de Hidrogênio
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HSP72	Proteína de Choque Térmico Isoforma 72 kDa
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Insuficiência Cardíaca
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

MeSH	<i>Medical Subject Heading</i>
Na ⁺	Íon Monovalente de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NT-proBNP	Peptídeo Natriurético Pró-Tipo B N-Terminal
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
ONOO ⁻	Peróxinitrito
PEPT1	Transportador de Oligopeptídeos 1
PEPT2	Transportador de Oligopeptídeos 2
pH	Potencial de Hidrogênio
PHT1	Transportador de Peptídeos 1
PHT2	Transportador de Peptídeos 2
P _i	Fosfato Inorgânico
pK _a	Constante de Ionização Ácida
RyR	Receptor de Rianodina
RyR1	Receptor de Rianodina Tipo 1
RyR2	Receptor de Rianodina Tipo 2
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase sarco/endoplasmática
SLC15	Transportador de Solutos 15
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	18
2.2 FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	19
2.3 REMODELAMENTO CARDÍACO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	22
2.4 BIOMARCADORES NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	23
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	25
2.6 O EXERCÍCIO FÍSICO COMO UMA FERRAMENTA NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	28
2.7 SUPORTE NUTRICIONAL NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	32
2.8 SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	33
2.9 CARNOSINA	34
2.10 FISIOLOGIA DA CARNOSINA.....	35
2.11 CARNOSINA E DESEMPENHO FÍSICO	44
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	49
5 ARTIGO 1.....	65
6 ARTIGO 2.....	77
7 CONCLUSÃO GERAL	107
ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta complexidade tanto para o seu diagnóstico, quanto para o seu tratamento. O coração é incapaz de bombear adequadamente sangue a todos os tecidos e com isso, compromete a capacidade de atender as necessidades metabólicas de diferentes órgãos e tecidos (TANAI; FRANTZ, 2016). Esta condição representa alterações morfológicas e funcionais do coração que estão relacionados com sinais e sintomas clássicos, como congestão pulmonar, extremidades frias, dispneia e intolerância ao esforço físico.

Esta síndrome pode ser diagnosticada como aguda ou crônica, no entanto, o baixo débito cardíaco é comum aos diferentes tipos de IC em repouso ou no esforço físico. A gravidade da IC é estratificada com o intuito de facilitar monitoramento e classificar risco de mortalidade e comorbidades. A terapia básica para o tratamento da IC compreende um conjunto de medicamentos que visam estabilizar o quadro clínico por meio de diferentes mecanismos. Como exemplo, são utilizados fármacos como inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de receptores de angiotensina II, antagonistas de aldosterona, betabloqueadores e diuréticos (ROHDE et al., 2018). Mesmo com o uso da terapia medicamentosa, pacientes com IC apresentam elevada taxa de mortalidade de 1 a 5 anos após diagnóstico e baixa qualidade de vida. Por este motivo, a equipe multidisciplinar passa ter notável importância no tratamento de pacientes com IC.

Pacientes com IC se beneficiam fortemente com orientações multiprofissionais. Para o sucesso do tratamento, a educação tanto dos pacientes, quanto dos cuidadores é primordial para maior impacto em desfechos clínicos (RICH et al., 1995). Fatores envolvidos no autocuidado diário são essenciais para sucesso do tratamento, como atividade física, alimentação saudável, uso regular de medicamentos, monitorização de sinais e sintomas de descompensação e limitação funcional.

Atualmente, o padrão-ouro para acompanhamento de pacientes com IC é a equipe multiprofissional, composta por médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, nutricionistas, farmacêuticos, educadores físicos, psicólogos e assistentes sociais (PONIKOWSKI et al., 2016; ROHDE et al., 2018). Após a alta hospitalar, recomendações nutricionais como restrição de sódio, controle de peso, restrição hídrica para alguns casos fazem parte da rotina de serviços especializados.

Entretanto, acompanhamento nutricional isoladamente já é um grande desafio, mesmo para pacientes não portadores de IC.

Programas de reabilitação cardíaca são incentivados a fazerem parte da rotina de pacientes com IC por demonstrarem inúmeros benefícios funcionais e de desfechos clínicos (PIEPOLI, 2013). As modalidades envolvidas na reabilitação cardíaca compõem exercícios físicos, como treinamento aeróbio e de força, que melhoram o prognóstico de seus pacientes de forma segura (ROHDE et al., 2018). Por mais que os resultados atingidos ao final da reabilitação cardíaca, sejam positivos, após o período do programa, geralmente em torno de oito a doze semanas, é comum os pacientes descompensarem seu quadro clínico. Provavelmente, esta descompensação pode estar associada ao fato de os pacientes terem dificuldade em modificar os hábitos de vida, como ser fisicamente mais ativo na sua rotina diária.

Devido a situações que envolvem o cuidado físico e nutricional, novas estratégias nutricionais além das modificações dietéticas citadas anteriormente tem ganho atenção nas últimas décadas. Suplementos alimentares são compostos derivados de alimentos que buscam complementar alguma carência total ou parcial, mas também são justificáveis em situações onde o composto desejado é virtualmente impossível de consumir pela alimentação em concentrações ideais. Na IC, o panorama de qualidade da alimentação é muito grave, o que impõe uma série de desafios à abordagem multiprofissional. Por este motivo, vitaminas, minerais, aminoácidos e entre outros compostos tem sido testados em estudos experimentais com animais e com seres humanos para avaliar o seu potencial terapêutico (HOPPER et al., 2020).

Unir o conjunto de um composto nutricional a ser suplementado que poderia auxiliar no tratamento clínico de sinais e sintomas, mas também impactar positivamente a capacidade funcional de pacientes com IC pode ser ambicioso. Por meio de estudos com outras doenças, especialmente diabetes mellitus, a carnosina mostrou-se contemplar estes requisitos no passado (RIEDL et al., 2011; SHEN et al., 2010; SOLIMAN; MOHAMED; METWALLY, 2007). A carnosina é um dipeptídeo intracelular com funções-chave na homeostase do estado redox, porém participa no processo de tamponamento ácido-básico muscular esquelético (BLANCQUAERT; EVERAERT; DERAIVE, 2015). Adicionalmente, a IC pode induzir um quadro de acidose muscular devido a mecanismos fisiopatológicos que favorece a condição de intolerância ao esforço físico (PIEPOLI et al., 2010a).

Seguindo neste raciocínio, a carnosina demonstra potencial terapêutico na IC por possivelmente modular positivamente variáveis de capacidade funcional e bioquímicas. Entretanto, nenhum estudo até o presente momento investigou associar treinamento físico, especialmente nas modalidades aeróbia e de força, com a suplementação de carnosina na IC. A hipótese desta tese envolve a possibilidade de um composto isolado, carnosina, ser eficiente e poder fazer parte de recomendações nutricionais no futuro, a qual estaria atuando de forma coadjuvante a terapia tradicional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A IC é caracterizada pela inadequada função do coração em manter o fluxo sanguíneo necessário às atividades metabólicas do organismo, o que pode levar a fatores limitantes como congestão pulmonar, dispneia, fadiga e intolerância ao exercício (PONIKOWSKI et al., 2016). Atualmente IC representa um conjunto de diferentes formas de IC, como IC com fração de ejeção reduzida, IC com fração de ejeção preservada, IC com disfunção sistólica, entre outras (ROHDE et al., 2018).

A gravidade da IC é estratificada de acordo com a classificação funcional da *New York Heart Association* (NYHA). A classificação possui quatro diferentes níveis, sendo o nível I o mais brando e o nível IV o mais grave. Critérios como gravidade de sintomas e sinais de atividade física fazem parte dos pilares classificatórios de classe da NYHA, como palpitações, dispneia e incapacidade de realizar atividades físicas de baixo esforço físico (VAN DER MEER; GAGGIN; DEC, 2019). Instrumentos de classificação auxiliam profissionais de saúde a avaliar estado atual do paciente e avaliar opções de tratamentos mais adequados de forma individualizada.

A síndrome de IC impõe um enorme risco ao paciente e aos familiares devido às hospitalizações recorrentes de descompensações do quadro clínico. Comumente, a cada hospitalização a qualidade de vida do paciente com IC é gravemente afetada, mesmo após a alta (TIMONET-ANDREU et al., 2020). O cenário é complexo, pois por mais que medicações sejam ajustadas e corretamente utilizadas, fatores físicos e nutricionais demonstram piora progressiva. Como resultado final, o paciente com IC reduz significativamente a qualidade de vida, tornando-se parte de um ciclo vicioso degenerativo com difícil reinserção à vida social (COROTTO et al., 2013).

A IC representa atualmente como um problema recorrente tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, a IC demonstra prevalência de 6,2 milhões de pacientes, sendo responsável por 1 milhão de internações hospitalares como principal causa e em torno de 2 milhões de internações como causa secundária anualmente (BENJAMIN et al., 2019). De acordo com dados levantados para projeções em 2030, um a cada 33 americanos serão diagnosticados com IC (HEIDENREICH et al., 2013). Um cenário grave como este carrega consigo elevado custo envolvido no tratamento. No caso dos Estados Unidos,

a IC impõe custo entre 1 a 2% do orçamento com cuidados em saúde, com internações representando a maioria dessa despesa (KILGORE et al., 2017; LESYUK; KRIZA; KOLOMINSKY-RABAS, 2018; SOLOMON et al., 2007). As re-hospitalizações e eventos são comuns em pacientes com IC, a qual aumenta drasticamente não somente o custo, como aumenta em torno de três vezes risco ajustado para idade de mortalidade para todas as causas, comparado a sujeitos saudáveis (ADAMS et al., 2005; JENCKS; WILLIAMS; COLEMAN, 2009).

No Brasil, o cenário atual concebe a IC como a principal causa de re-hospitalizações por causa da má aderência à terapêutica medicamentosa básica e, também apresenta uma elevada taxa de mortalidade intra-hospitalar (BOCCHI et al., 2013). A sobrevivência após 5 anos de diagnóstico permanece em torno de 35%, piorando progressivamente com o aumento da faixa etária (BLEUMINK et al., 2004). Condições graves como a IC no Brasil infelizmente recebem baixo investimento governamental, o que está acompanhado com inadequado acesso ao atendimento e monitoramento médico em níveis primário ou terciário (ROHDE et al., 2018). Por estes motivos, fatores-chave favorecem o aumento dos casos de IC no Brasil.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A IC possui causas distintas, como infecções virais, hipertensivas, cardiomiopatias, alterações valvares, miocardite, má formação congênita, bem como infarto agudo do miocárdio (ROHDE et al., 2018). Esta última causa é a principal etiologia de IC no Brasil e no mundo (TRIPOSKIADIS et al., 2016). O evento cardiovascular (infarto agudo do miocárdio) é resultado do processo aterosclerótico cumulativo, o qual causa isquemia de grandes vasos do ventrículo esquerdo.

Em relação a aspectos funcionais após o infarto agudo do miocárdio (IAM), é comum que aconteça uma queda do volume ejeção do ventrículo esquerdo, consequência da perda de tecido muscular, aumentando, então, a tensão diastólica (pré-carga) e o volume do ventrículo esquerdo e restabelecendo, inicialmente, sua função normal (PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016). A hipertrofia cardíaca do ventrículo esquerdo é construída a partir de um conjunto de alterações estruturais decorrentes de apoptose das células endoteliais e miocárdicas com progressiva disfunção da contratilidade do miócito. Adicionalmente, alteração na função do

fibroblasto cardíaco e extenso remodelamento da matriz extracelular contribuem significativamente para a hipertrofia cardíaca patológica (LORELL; CARABELLO, 2000). Pacientes com IC apresentam também modificações no metabolismo energético de cardiomiócitos, reduzindo não somente a eficiência energética, ou seja, aumentando a predominância de geração de ATP por meio de oxidação de ácidos graxos, mas também induzem disfunção na capacidade de gerar ATP mitocondrial (KIYUNA et al., 2018). Todas estas alterações induzem alterações transcricionais dos genes associados com a IC em relação à contratilidade cardíaca (TSCHÖPE et al., 2019).

O acúmulo de tecido fibroso no coração infartado altera o comportamento elétrico e também as funções sistólica e diastólica do ciclo cardíaco (TANAI; FRANTZ, 2016). A fibrose intersticial em excesso indica um importante aspecto negativo da hipertrofia ventricular esquerda crônica e da IC, além disso, o estresse oxidativo é bem conhecido por ser uma condição fortemente associada a processos pró-fibróticos em vários órgãos, incluindo o coração (TAKIMOTO; KASS, 2007).

Logo após a injúria, o remodelamento cardíaco resulta no aumento da massa ventricular (hipertrofia) sem, no entanto, ocorrer um aumento no volume do ventrículo esquerdo (dilatação). Essa alteração é definida, então, como hipertrofia concêntrica, que tem como característica a organização dos sarcômeros em paralelo, consequência de uma sobrecarga por pressão, induzindo aumento do diâmetro celular do cardiomiócito. Com a progressão do remodelamento ventricular, é iniciada a fase de dilatação do ventrículo esquerdo relativo ao aumento da massa ventricular; este processo é definido como hipertrofia excêntrica e está diretamente ligado à sobrecarga de volume, resultando em adição de sarcômeros em série, que aumenta a célula no seu comprimento (MESSERLI; RIMOLDI; BANGALORE, 2017; PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016).

No passado se imaginava que o coração afetado ou em estado disfuncional seria o único alvo terapêutico para intervenções. Entretanto, devido a falha de promover melhora consistente em sinais e sintomas destes pacientes, inúmeros estudos científicos trouxeram avanços tanto de conhecimento da fisiopatologia, quanto de prováveis alvos terapêuticos (ROHDE et al., 2018). A IC possui de fato alterações centrais (cardíacas), porém é uma síndrome em que outros sistemas fisiológicos são afetados direta e indiretamente. São exemplos clássicos destas alterações o sistema respiratório, neuro-humoral, muscular esquelética entre outros.

Estes sistemas são afetados principalmente pela incapacidade do coração de atender a demanda metabólica nos diferentes tecidos (ROGERS; BUSH, 2015).

Além disso, muitos destes fatores limitantes estão intimamente relacionados com a perda de massa magra e força muscular, o que demonstra um cenário característico encontrado em pacientes com IC (DEL BUONO et al., 2019). Pacientes com IC em diferentes estágios apresentam intolerância ao esforço que não apenas pode levar a piora da aptidão cardiorrespiratória, como também afeta diretamente a qualidade de vida. Muitos pacientes tornam-se dependentes e apresentam internações recorrentes pela piora do quadro, que está relacionado com este ciclo degenerativo que possui como forte fator o descondicionamento físico progressivo nesta população (WEISS et al., 2017).

Apesar dos grandes progressos de desfechos clínicos em relação às terapias farmacológicas, pacientes com IC possuem uma reduzida capacidade funcional e uma baixa qualidade de vida. Este cenário, característico de pacientes com IC, está, em parte, relacionado às alterações tanto estruturais quanto funcionais do sistema cardiovascular e do músculo esquelético, prejudicando a função hemodinâmica e a atividade muscular (DHAKAL et al., 2015).

Os pacientes com IC apresentam um grave desbalanço do estado redox e alguns marcadores de estresse oxidativo têm sido correlacionados com a disfunção miocárdica e severidade global da IC. Um mecanismo evidente pelo qual o estresse oxidativo do miocárdio pode prejudicar a função cardíaca é através de dano oxidativo de proteínas celulares e membranas, assim, induzindo a disfunção celular ou morte por apoptose e necrose (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011).

Além de mecanismos fisiopatológicos envolvendo modificações negativas da função cardíaca, é importante ressaltar o processo inflamatório que a IC induz. Pacientes com IC apresentam estado pró-inflamatório sistêmico crônico de alto grau (PAULUS, 2000). Diversos estudos experimentais e clínicos demonstraram esta relação de severidade da síndrome e grau de inflamação (BUCKLEY et al., 2019; DICK; EPELMAN, 2016; SHIRAZI et al., 2017). O processo de injúria do miocárdio é responsável por ativar sistemas imunológicos inatos e adaptativos com a finalidade de proteger o coração da agressão hemodinâmica. No entanto, no caso da IC, o processo de lesão é tão grave que a resposta inflamatória fisiológica é incapaz de proteger adequadamente o órgão inicialmente afetado (coração) que se observa

progressão para inflamação crônica de característica sistêmica na IC (ADAMO et al., 2020).

Além de repercussões deletérias sobre a estrutura do miocárdio, a IC leva uma série de alterações hemodinâmicas que afetam indiretamente diversos órgãos e sistemas. Alterações pressóricas do ventrículo esquerdo tanto sistólicas, quanto diastólicas tornam ainda mais grave as consequências extra cardíacas, como a hipoperfusão (HABAL; GARAN, 2017). Na IC, é comum observar queda na pressão sistólica final do ventrículo esquerdo, o que compromete diretamente o débito cardíaco. Adicionalmente, por meio de alterações no relaxamento da musculatura cardíaca e no processo fibrótico imposto tanto pela cicatriz oriunda do IAM localizada no ventrículo esquerdo, quanto por processos indiretos (estresse oxidativo) a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo apresenta valores superiores em pacientes com IC (MIELNICZUK et al., 2007). Estas alterações de pressão, volume de pré, pós-carga e contratilidade cardíaca estão intimamente relacionadas com mudanças no mecanismo de Frank-Starling (TANAI; FRANTZ, 2016).

A disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo permite um ciclo vicioso de prejuízo na distribuição sanguínea a todos órgãos e estruturas periféricas, levando à progressão e severidade da IC (PONIKOWSKI et al., 2016). A rigidez miocárdica usualmente é o maior determinante sobre a rigidez de câmaras ventriculares cardíacas, sendo mais proeminente que estruturas adjacentes do coração, como o pericárdio e a pressão intratorácica (FUJIMOTO et al., 2011). Desta forma, torna-se importante buscar opções farmacológicas e não-farmacológicas que possam atenuar a rigidez do miocárdio que é apresentada em pacientes portadores de IC.

2.3 REMODELAMENTO CARDÍACO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Remodelamento cardíaco é um processo decorrente de elevada demanda cardíaca. A hipertrofia cardíaca é um tipo de remodelamento cardíaco. A hipertrofia cardíaca pode ser subdividida em dois grandes grupos: fisiológica e patológica. A hipertrofia fisiológica é observada em indivíduos fisicamente ativos e mulheres grávidas e não está associado às alterações de funcionamento cardíaco (MIHL; DASSEN; KUIPERS, 2008). Já a hipertrofia cardíaca patológica é resultante da

sobrecarga de volume, pressão ou até mesmo eventos cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio (KEHAT; MOLKENTIN, 2010).

A hipertrofia muscular do ventrículo esquerdo na IC é construída a partir de um conjunto de alterações estruturais decorrentes de apoptose e necrose das células endoteliais e miocárdicas, progressiva disfunção da contratilidade do miócito, alteração na função do fibroblasto cardíaco e extenso remodelamento da matriz extracelular (HUTCHINSON; STEWART; LUCCHESI, 2010). Neste processo, o estresse oxidativo causa alterações morfológicas na mitocôndria, induzindo inchaço da matriz e aumento da espessura do espaço intermembrana mitocondrial. Estas alterações resultam na produção desenfreada de ânion radical superóxido (O_2^-), redução na eficiência da produção de ATP e alterações transcricionais dos genes associados com a IC em relação à contratilidade cardíaca (NOJIRI et al., 2006). Este processo na IC é denominado de disfunção mitocondrial (ROSCA; HOPPEL, 2013) e está intimamente relacionado com todos os estágios do remodelamento cardíaco.

O remodelamento cardíaco resulta no aumento da massa ventricular (hipertrofia muscular cardíaca), no entanto, sem ocorrer um aumento no volume do ventrículo esquerdo (dilatação). Essa alteração é definida como hipertrofia concêntrica patológica, que tem como característica a organização dos sarcômeros em paralelo, consequência de uma sobrecarga por pressão, induzindo aumento do diâmetro celular do cardiomiócitos (CARABELLO, 2002).

O acúmulo de tecido fibroso no coração infartado altera o comportamento elétrico e também as funções sistólica e diastólica do ciclo cardíaco. A fibrose intersticial em excesso indica um importante aspecto negativo da hipertrofia ventricular esquerda crônica e da IC, além disso, o estresse oxidativo desempenha um importante papel no processo pró-fibrótico em vários órgãos, incluindo coração (GANDHI et al., 2011).

2.4 BIOMARCADORES NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

O termo biomarcador foi introduzido no final da década de 80 no *Medical Subject Heading* (MeSH). Está relacionado como característico de ser mensurado e avaliado como indicador de processos biológicos normais, processos patológicos, bem como respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas (ATKINSON et al.,

2001; GAGGIN; JANUZZI, 2013). Na IC diversas alterações são observadas em diferentes sistemas fisiológicos e que podem ou não estar diretamente relacionados entre si. Por este motivo, atualmente alguns analitos são considerados biomarcadores na IC por contemplarem todos estes aspectos citados anteriormente (GAGGIN; JANUZZI, 2013; SILVESTRE-ROIG et al., 2020). A inflamação é um processo que ocorre desde a gênese da IC e perdura ao longo do processo patológico desta síndrome. Algumas moléculas de interesse que representam adequadamente o cenário da IC, como citocinas pró e anti-inflamatórias.

Na IC, o comportamento do perfil inflamatório é distinto desde o seu surgimento (infarto agudo do miocárdio, por exemplo) comparado a um paciente estável com IC. Citocinas são moléculas com baixo peso molecular e proteínas biologicamente ativas. A grande maioria das citocinas estão envolvidas na modulação de função celular (SHARMA; COATS; ANKER, 2000). As citocinas pró-inflamatórias estão elevadas na IC como uma tentativa de adaptar o organismo a redução do débito cardíaco. Ao secretar mais citocinas pró-inflamatórias, o resultado obtido é o contrário do esperado: imunossupressão, redução da função cardíaca, aumento de estresse oxidativo, redução de qualidade de vida que, inexoravelmente, piora o prognóstico de pacientes com IC (STANCIU, 2019; WANG et al., 2020).

Na IC, é conhecido aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Adicionalmente, pesquisas experimentais demonstram que a interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, encontra-se reduzida no sangue e em músculos esqueléticos em animais com IC (CALEGARI et al., 2018; LOPES et al., 2010). Apesar de o panorama da inflamação na IC ser conhecido, até hoje se debate se a inflamação é a causa de desfechos clínicos em pacientes com IC, como mortalidade e hospitalizações, ou se é meramente consequência desta cadeia de efeitos deletérios que a síndrome induz.

Em uma recente revisão, foi demonstrado que na intenção de melhorar o cenário de opções terapêuticas de pacientes com IC, estudos de grande porte e complexidade foram conduzidos nos últimos anos para testar esta opção de tratamento. Estudos clínicos de fase III, como o ensaio CANTOS, publicado em 2019 que teve o objetivo de testar uma droga cujo alvo terapêutico seria a IL-1 β , trouxe achados divergentes de tentativas frustradas no passado (DICK; EPELMAN, 2016; VAN LINTHOUT; TSCHÖPE, 2017). Nesta ocasião, os pesquisadores envolvidos

encontraram que a droga experimental demonstrou tendência significativa dose-dependente na redução da incidência de desfechos clínicos, como hospitalização por IC e mortalidade por IC (EVERETT et al., 2019).

Outros biomarcadores tem ganho atenção nas últimas décadas que podem ser utilizados além de critérios de diagnóstico, especialmente como variáveis de monitoramento e estratificação de risco de pacientes com IC. Um exemplo disto é peptídeo natriurético do tipo B (BNP) e peptídeo natriurético pró-tipo B N-terminal (NT-proBNP). O BNP e NT-proBNP são peptídeos cuja função está relacionada em atuar como hormônios contra regulatórios de mudanças em volume e pressão (MAISEL; DURAN; WETTERSTEN, 2018). Níveis elevados destes peptídeos estão associados com o aumento na probabilidade de dispneia causada por IC (MAISEL et al., 2008).

O aumento da concentração de BNP e NT-proBNP se dá pela disfunção sistólica e/ou diastólica, doença valvar, hipertrofia patológica do ventrículo esquerdo, isquemia do miocárdio ou pela combinação destes fatores (VOLPE; RUBATTU; BURNETT, 2014). O importante é que estes biomarcadores são incluídos atualmente no algoritmo de diagnóstico da IC, especialmente para casos onde alterações clássicas não são observadas em avaliações ecocardiográficas (PONIKOWSKI et al., 2016). Estes são alguns biomarcadores que demonstraram ser mais robustos para aplicação clínica. Entretanto, novos biomarcadores podem surgir no futuro que complementem exames clássicos que sejam sensíveis e precisos para diagnóstico, estratificação de risco e monitoramento de pacientes com IC.

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A biologia de diferentes mamíferos envolve o entendimento da biologia do oxigênio. O gás oxigênio torna-se necessário para a manutenção da vida, porém o seu desequilíbrio pode criar cenários deletérios que facilitam o desenvolvimento de doenças e agravos crônicos (SAMANTA; PRABHAKAR; SEMENZA, 2017; WAYPA; SMITH; SCHUMACKER, 2016). Este estado onde se observa maior dano celular é conhecido como estresse oxidativo. O estresse oxidativo possui como conceito um estado de desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e agentes antioxidantes.

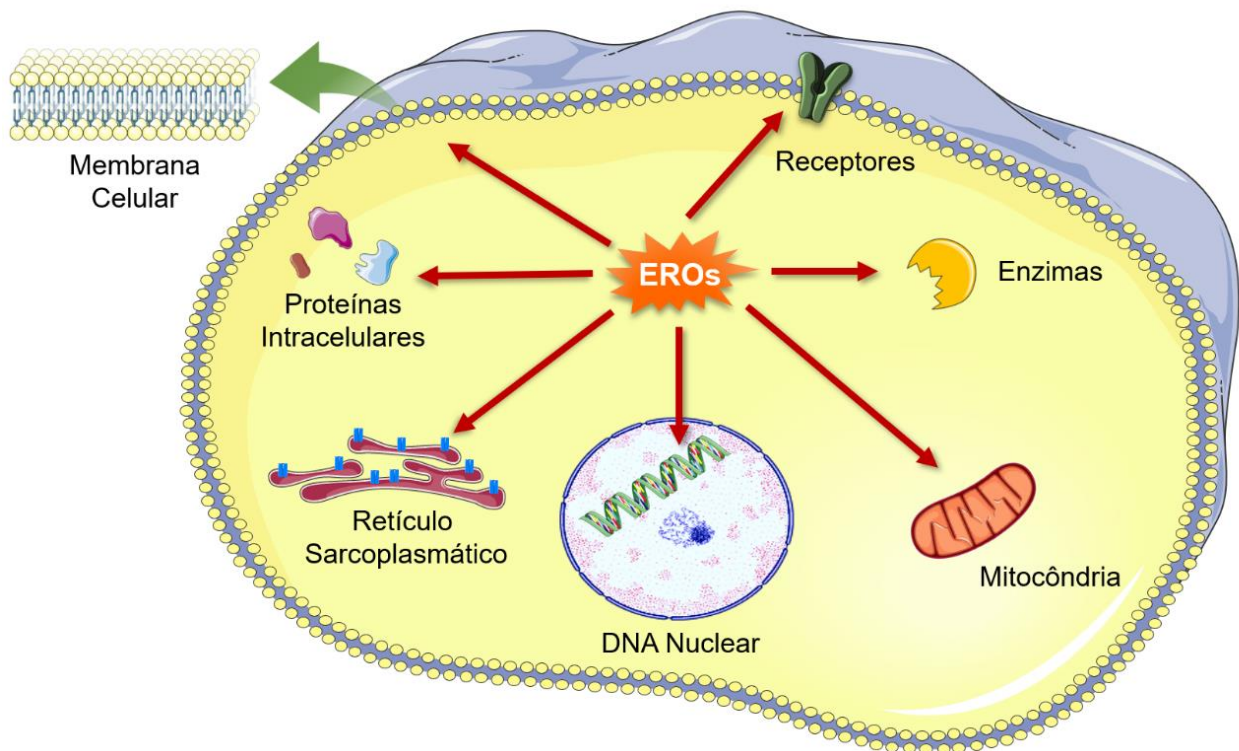
Como agentes oxidantes, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas por meio de diversas vias. Existem diferentes formas de EROs, sendo radicais livres ou não. Todas as EROs que são consideradas radicais livres possuem estrutura eletroquímica em seus *spins* de últimos orbitais com características paralelas (TAVERNE et al., 2018). O sentido similar de *spins* aumenta a reatividade da molécula de oxigênio, por exemplo, a procurar um doador de elétrons para estabilizar esta condição.

As principais vias de formação de EROs na IC são: vazamento de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial, metaloproteinases, aumento da atividade da xantina oxidase, aumento da atividade da NADPH oxidase (MILINKOVIĆ et al., 2020; TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011). Na IC, está bem descrito que pacientes portadores da síndrome apresentam a chamada disfunção mitocondrial, especialmente em cardiomiócitos (ZHOU; TIAN, 2018). Nesta situação, as mitocôndrias de pacientes com IC apresentam menor eficiência em produzir ATP utilizando o O₂ proveniente da respiração. Esta condição piorada no transporte de elétrons induz que o oxigênio receba elétrons anormalmente ao formar o gradiente eletroquímico no espaço intermembrana. Isto, por sua vez, culmina na produção de EROs mitocondriais, como O₂⁻ e o radical hidroxila (HO·) os quais podem danificar sucessivamente moléculas adjacentes ao seu sítio de formação (HALLIWELL, 2013).

Por si só, o estresse oxidativo não é considerado um malefício para a célula, mas pode representar um estado adaptativo a agentes agressores. Há muitos anos tem se estudado a relação que as EROs possuem com o estado de doença e saúde. Em uma revisão, Edward Calabrese, professor e pesquisador em toxicologia, debate a importância de um termo que representa com maior robustez estas propriedades de EROs: hormese (*hormesis*, do inglês) (CALABRESE, 2018). O termo refere-se à relação de dose-resposta de um agente agressor (EROs, por exemplo) com respostas biológicas adaptativas (estado redox). Em doses menores de formação de agentes oxidantes, o meio apresenta menor resposta biológica adaptativa, ao passo que o seu aumento até seu ponto ótimo ou doses moderadas são capazes de induzir mais adaptações biológicas. Este é o caso das EROs serem capazes de modular positivamente defesas antioxidantes produzidas endogenamente. E por fim, doses mais elevadas de agentes agressores não induzem mais adaptações biológicas, mas sim induzem lesões e favorecem o cenário de desenvolvimento de doenças ou agravos maiores (CALABRESE, 2004, 2014; CALABRESE; MATTSON, 2017).

O estresse oxidativo é uma condição que pode induzir uma série de consequências negativas ao meio e/ou à célula. As EROs podem induzir danos a diferentes biomoléculas, como fosfolipídeos de membrana celular, proteínas intracelulares, enzimas, receptores de membrana e DNA (nuclear e mitocondrial) (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011). A Figura 1 representa melhor o espectro de ação de EROs no domínio intracelular.

Figura 1: Alvo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no domínio intracelular de fibras musculares cardíacas e esqueléticas.



A evolução de seres vivos permitiu que organismos cada vez mais complexos desenvolvessem defesas contra ataques oxidativos, como em condições de estresse oxidativo. Antioxidantes são compostos ou enzimas capazes de neutralizar direta ou indiretamente a ação das EROs. Os antioxidantes podem ser subdivididos em duas categorias: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são enzimas produzidas endogenamente pelo organismo

com ações muito seletivas a EROs, apresentando ação a um tipo de agente oxidante (VEAL; JACKSON; LATIMER, 2018). Como exemplo, a enzima catalase possui como alvo de neutralização a ERO peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas não apresenta afinidade bioquímica com outras EROs, como o $HO\cdot$. Por este motivo, antioxidantes não-enzimáticos complementam a ação antioxidante total da célula realizando proteção não-seletiva (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018).

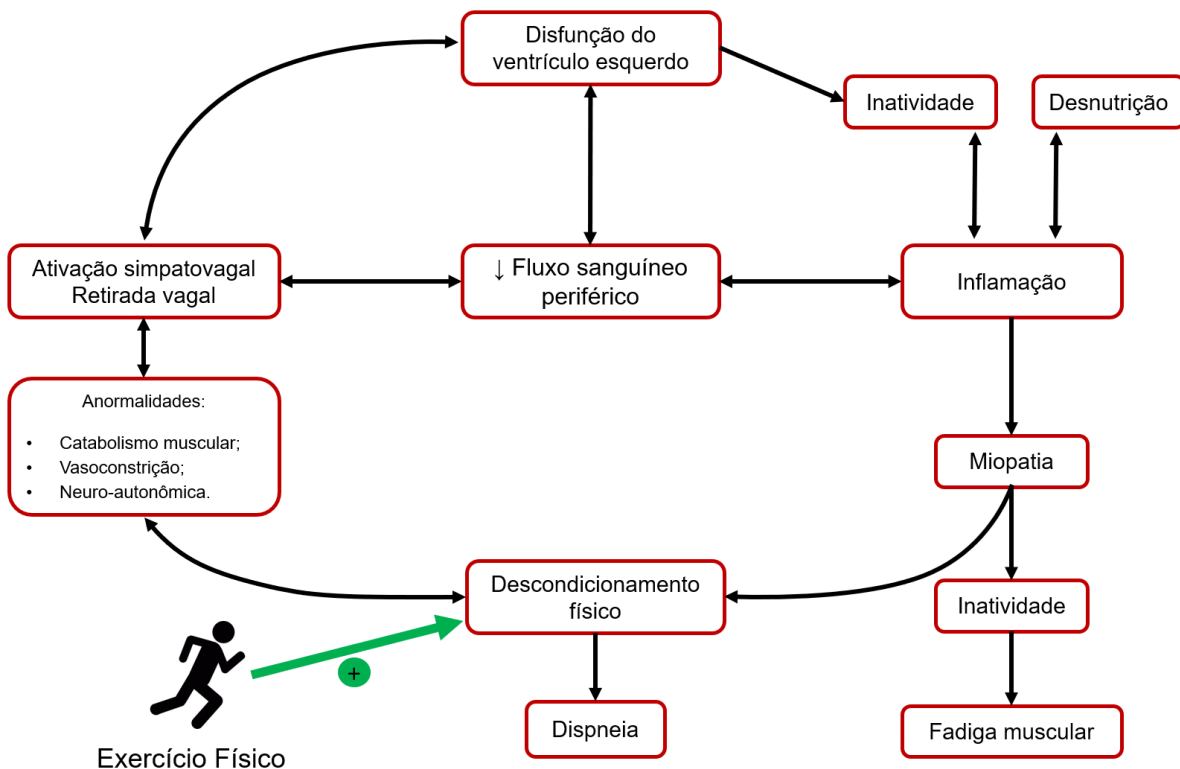
Antioxidantes não-enzimáticos são compostos com características bioquímicas muito interessantes. Geralmente apresentam um radical ou um grupo químico com capacidade de atuar como doador de elétrons. São alguns exemplos de antioxidantes não-enzimáticos bem conhecidos, como vitamina C, vitamina E, resveratrol, ubiquinona (coenzima Q_{10}), entre outros. Existem ainda outros compostos simples, como di ou tripeptídeos com esta capacidade, como glutathiona e carnosina. Interessantemente, este grupo de moléculas antioxidantes geralmente apresentam grupamentos químicos com grande potencial antioxidante e estão em menor concentração na IC (TANAI; FRANTZ, 2016). Por este motivo, diversas moléculas antioxidantes demonstram potencial terapêutico no tratamento coadjuvante na IC.

2.6 O EXERCÍCIO FÍSICO COMO UMA FERRAMENTA NO TRATAMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A melhora do prognóstico de pacientes com doenças cardíacas através de programas de reabilitação cardíaca tem sido bastante efetiva, sendo observado um significativo processo de recuperação da funcionalidade do paciente e sua consequentemente reinserção à vida social (BJARNASON-WEHRENS et al., 2019; KIROLOS et al., 2019). A *American Heart Association* (AHA) recomenda programas de reabilitação cardíaca como classe IA de evidencia para pacientes com IC (YANCY et al., 2013). O treinamento físico regular está associado com melhora da saúde de pacientes com IC estável, reduzindo sintomas, aumentando a tolerância ao exercício e a qualidade de vida, bem como com a diminuição da hospitalização e da mortalidade (TAYLOR et al., 2019). As evidências comprovam os benefícios e a segurança de um programa de treinamento físico para pacientes com IC estável e os efeitos positivos

do exercício físico levam a acreditar que esta estratégia pode ser inserida em programas de reabilitação cardíaca, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2: Ciclo vicioso da inatividade física com disfunção ventricular esquerda e inserção do treinamento físico como terapia não-medicamentosa.



Adaptado de Piepoli *et al*, 2010. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 17(6):637-42.

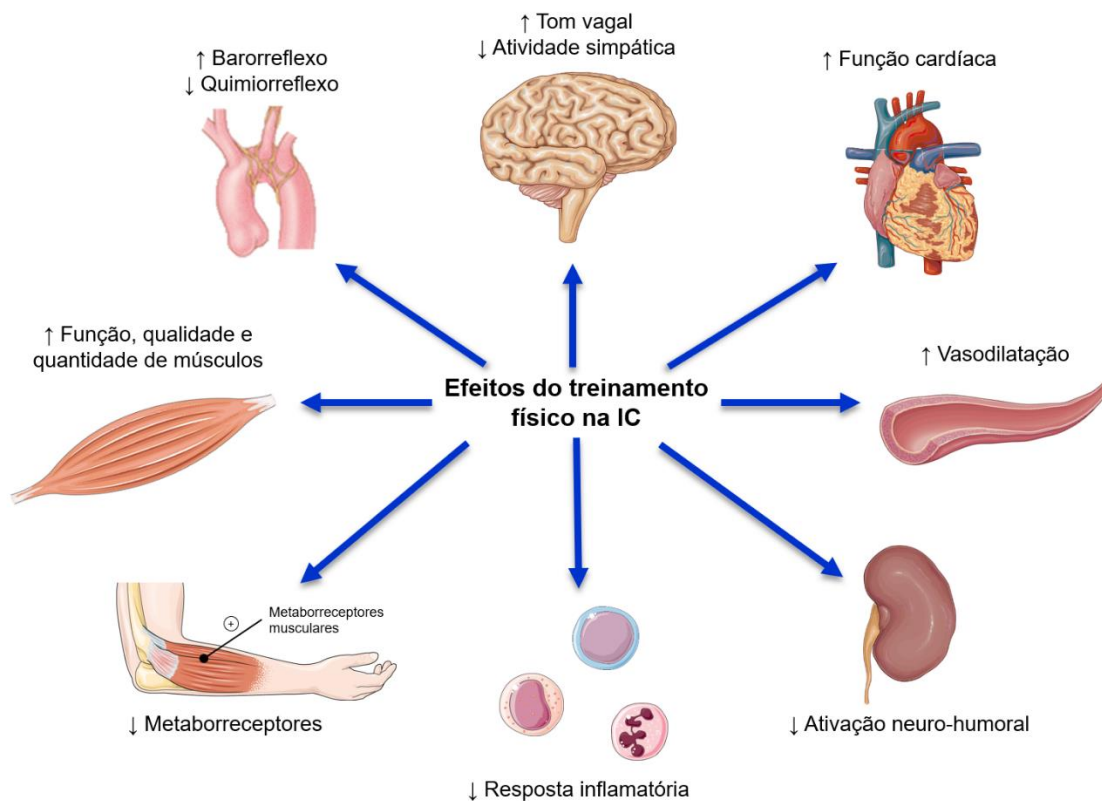
A IC é caracterizada por alterações histológicas e bioquímicas da musculatura periférica, prejudicando o metabolismo energético e este prejuízo parece não ser revertido apenas por medicamentos inotrópicos positivos, mas a prática do exercício físico torna-se um componente auxiliar no tratamento da IC, induzindo adaptações periféricas caracterizadas pela redução da atividade simpática muscular e melhora da função do endotélio (PIEPOLI *et al.*, 2010b).

Atualmente, os benefícios da prática do exercício físico na IC são, fundamentalmente, baseados nas intervenções do treinamento aeróbio (MEHRA *et al.*, 2019; PIEPOLI *et al.*, 2010b). Entretanto, nos últimos anos, o treinamento de força passou a ser considerado uma possível estratégia para prevenção primária e secundária de diferentes cardiopatias (HANSEN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

Alguns estudos têm sugerido que o treinamento de força complementar, quando bem prescrito e supervisionado, tem efeitos favoráveis sobre a força muscular, a resistência, a função cardiovascular, o metabolismo, os fatores de risco coronariano e o bem-estar psicossocial (PRICE et al., 2016). Além disso, esse treinamento previne a perda da massa muscular esquelética, preservando sua função (WANG et al., 2019).

O potencial terapêutico do treinamento físico na IC transcende adaptações à musculatura esquelética, pois é capaz de melhorar aptidão cardiorrespiratória, balanço autonômico, perfil neuro-humoral e qualidade de vida (PIEPOLI et al., 2010c). O resumo de efeitos induzidos pelo treinamento físico na IC pode ser observado na Figura 3.

Figura 3: Efeitos já descritos na literatura científica do treinamento físico em pacientes com IC.



Adaptado de Piepoli et al, 2010. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 17(6):643-8.

Estudos têm recomendado, para prescrição de exercício, a inclusão do treinamento de força ao condicionamento aeróbio para maximizar os efeitos benéficos

do treinamento (GARY et al., 2011; PRICE et al., 2016). O treinamento de força fornece benefícios complementares ao treinamento aeróbio, que inclui preservação da massa muscular magra, aumento do conteúdo mineral ósseo, redução de quedas e aumento da qualidade de vida, logo proporcionando uma melhor execução das atividades de vida diária (WANG et al., 2019).

O treinamento de força realizado por pacientes com IC resulta em uma melhora do pico do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_{2\text{pico}}$), e esta alteração está relacionada ao aumento da capacidade oxidativa do músculo esquelético (JEWISS; OSTMAN; SMART, 2016). No entanto, mais evidências são necessárias sobre os efeitos do treinamento de força em conjunto com o treinamento aeróbio em pacientes com IC, pois a literatura ainda não fornece indícios claros de que a combinação destes dois tipos de treinamento físico demonstra efeitos ainda superiores em desfechos clínicos ao treinamento aeróbio isolado (HAYKOWSKY et al., 2016).

Em um estudo do nosso laboratório, demonstramos que o treinamento de força isolado em modelo experimental de IC em ratos foi capaz de aumentar a força máxima e melhorar o perfil inflamatório após oito semanas (ALVES et al., 2014). Com estes dados, em experimentos prévios do nosso laboratório combinamos o treinamento de força com o treinamento aeróbio contínuo para avaliar benefícios sobre parâmetros de capacidade funcional. Foi observado que após oito semanas de treinamento combinado (força e aeróbio em dias isolados) os animais com IC responderam positivamente aumentando parâmetros de força e de aptidão física (tempo, distância e velocidade em esteira) (ALVES et al., 2017).

Nos últimos anos tem se observado uma tendência favorável de testar em ensaios clínicos a combinação do treinamento de força combinado ao treinamento aeróbio contínuo em pacientes com IC tanto de classes mais brandas de severidade, quanto em classes mais graves (MANDIC et al., 2012; SWANK et al., 2010). Atualmente o treinamento físico combinado tem se demonstrado uma ferramenta eficiente em melhora aptidão cardiorrespiratória, reduzir mortalidade e melhorar função cardíaca em programas de reabilitação cardíaca (FUKUTA et al., 2019; LONG et al., 2019). Em uma recente metanálise, da qual reuniu 44 ensaios clínicos randomizados somando 75 artigos científicos e um total de 5.783 pacientes com IC observou a prática de treinamento físico combinado com duração de seis meses ou mais é eficaz em reduzir a mortalidade em períodos mais longos (mais de 12 meses),

reduzir internações em curto prazo (menos de 12 meses) e aumentar qualidade de vida durante e após a realização da reabilitação cardíaca (LONG et al., 2019).

2.7 SUPORTE NUTRICIONAL NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Pacientes com IC apresentam inúmeras deficiências de nutrientes e riscos para deficiência nutricional (MCKEAG et al., 2017). Este cenário é comumente observado tanto dentro do hospital, quanto fora do hospital. Além de apresentar uma lista consideravelmente longa de medicamentos prescritos, interação droga-nutriente demonstra participar direta ou indiretamente no apetite dos pacientes, bem como absorção de nutrientes ou metabolismo/eliminação de metabólitos (PAGE et al., 2016; PÉTER et al., 2017). A Tabela 1 representa melhor a relação da poli farmácia sobre o estado nutricional de pacientes com IC.

Tabela 1: Efeitos da poli farmácia sobre o estado nutricional de pacientes com IC.

Efeitos sobre	Causados por
	Desconforto gastrointestinal / apetite reduzido
Consumo alimentar	Digestão gastrointestinal / absorção
	Depressão do sistema nervoso central
Absorção de nutrientes	Má absorção gastrointestinal
Metabolismo e eliminação de nutrientes / metabólitos	Perda de função de órgãos (fígado, rins)
	Perda de nutrientes essenciais para o metabolismo

Adaptado de Péter *et al*, 2017. *Eur J Nutr.* 56 (Suppl 2: S23–S36.

Historicamente, o paciente portador de IC possui algumas possibilidades de tratamento dietoterapêutico, como restrição no consumo de sal/sódio. Em função da redução do débito cardíaco, o retorno venoso de pacientes com IC é prejudicado, aumentando as chances de edema periférico. Esta condição é notavelmente mais frequente em IC com fração de ejeção (FE) reduzida, em comparação a IC com FE preservada (GUPTA et al., 2012).

A principal hipótese de mecanismo de tratamento em restringir levemente a severamente o consumo de sal/sódio se daria por parte de reduzir a sobrecarga de volume ao coração. O consumo de sódio exacerbado aumentaria a volemia, prejudicando ainda mais o estado clínico geral do paciente. Entretanto, esta efetividade dietoterapêutica tem sido contestada nos últimos anos.

Em uma recente revisão sistemática, foi constatado que após analisar um total de 479 participantes de oito ensaios clínicos submetidos a restrição de sódio, menos de 25 % demonstraram resultados positivos sobre estado clínico (MAHTANI et al., 2018). Adicionalmente, em recente atualização de prática clínica foi considerado que a terapia de restrição de sal/sódio demonstra efeitos inconclusivos como tratamento coadjuvante na IC sobre desfechos clínicos, como mortalidade, hospitalizações e eventos cardiovasculares (SEFEROVIC et al., 2019).

Outros estudos buscaram testar a eficácia do aconselhamento nutricional para promover reeducação nutricional em pacientes com IC. Em uma revisão sistemática que buscou avaliar diferentes metodologias para promover reeducação nutricional, observou que os programas de aconselhamento nutricional foram eficazes em reduzir o número de hospitalizações e aumentar a qualidade de vida dos pacientes participantes (ABSHIRE et al., 2015). Nestas intervenções que se basearam em aconselhamento nutricional, a sua grande maioria apresentava similaridade entre os estudos selecionados para a revisão. Os estudos abordavam assuntos-chave, como qualidade de nutrientes (tipos de gorduras, carboidratos), consumo de alimentos processados e ultra processados, dicas para manutenção de alimentação saudável fora de casa e receitas saudáveis com alimentos *in natura* (ABSHIRE et al., 2015; DUNBAR et al., 2014).

2.8 SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Pacientes com IC demonstram um potencial notável em receber suporte de nutrientes isolados com o intuito de promover benefícios a saúde cardiovascular. Por ser de difícil manejo, o tratamento da IC além de medicamentoso pode receber auxílio de suplementos alimentares como coadjuvantes no seu tratamento. Algumas substâncias foram mais testadas em estudos pré-clínicos e ensaios clínicos que ganharam atenção, como o óleo de peixe, coenzima Q₁₀ e L-arginina (HOPPER et al.,

2020). Entretanto, na sua maioria, estes suplementos estão mais intimamente relacionados à mudanças de biomarcadores clássicos da IC e/ou de hospitalizações.

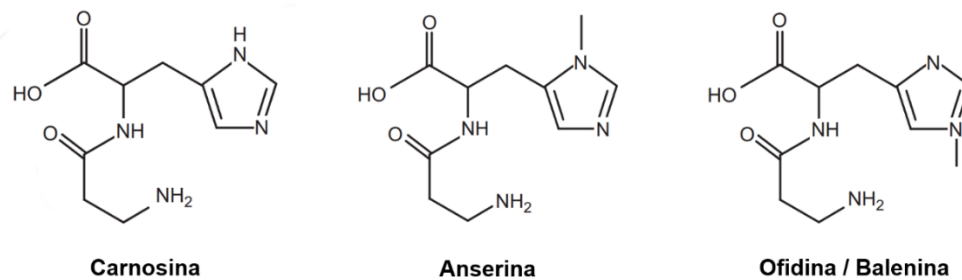
Um dos desafios no manejo do paciente com IC, tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento é a intolerância ao esforço (ALVAREZ; HANNAWI; GUHA, 2016). Por este motivo, alguns compostos isolados de plantas ou alimentos poderiam auxiliar neste pilar potencialmente terapêutico. Para esta tese de doutorado, foi selecionado um destes compostos derivados de aminoácidos, a carnosina, que será apresentada e discutida com maior profundidade nos tópicos a seguir.

2.9 CARNOSINA

A carnosina foi descoberta em 1900 por um bioquímico russo Vlademir S. Gulevich. Nesta ocasião, o pesquisador identificou a estrutura química de um composto nitrogenado não-proteico em extrato de carne. Por este motivo, a molécula descoberta recebeu a nomenclatura da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) como (2S)-2-[(3-Amino-1-oxopropil)amino]-3-(3H-imidazol-4-yl)ácido propanoico. Entretanto, é mais conhecida atualmente como β -alanil-L-histidina ou simplesmente carnosina.

Este composto é um dipeptídeo derivado de dois aminoácidos, a β -alanina e a L-histidina. A carnosina apresenta uma história da evolução de seres vivos muito peculiar. A molécula de carnosina possui análogos ou derivados com pequenas mudanças na estrutura química. Estas substâncias são denominadas de compostos derivados de histidina. Quase todos os animais vertebrados, incluindo répteis, aves e peixes expressam compostos derivados de histidina, especialmente no músculo esquelético (KWIATKOWSKI; KIERSZTAN; DROZAK, 2018). Alguns compostos similares podem ser elencados além da carnosina, como anserina (descoberta no músculo de gansos), ofidina/balenina (descoberto em músculo de baleias) que desempenham papéis similares ao da carnosina, porém estão presentes em diferentes espécies de animais vertebrados (Figura 4) (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; KWIATKOWSKI; KIERSZTAN; DROZAK, 2018).

Figura 4: Estruturas químicas da carnosina e seus derivados.



Estes compostos derivados de carnosina permanecem no domínio intracelular exercendo suas funções fisiológicas, não participando de reações na corrente sanguínea. Algumas espécies de mamíferos, como o ser humano e alguns roedores, possuem a carnosina como composto principal contendo histidina em tecidos-alvo. Como exemplo, gansos apresentam apenas a anserina em sua composição de músculos pela codificação de genes, não apresentando concentrações de ofidina ou carnosina (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

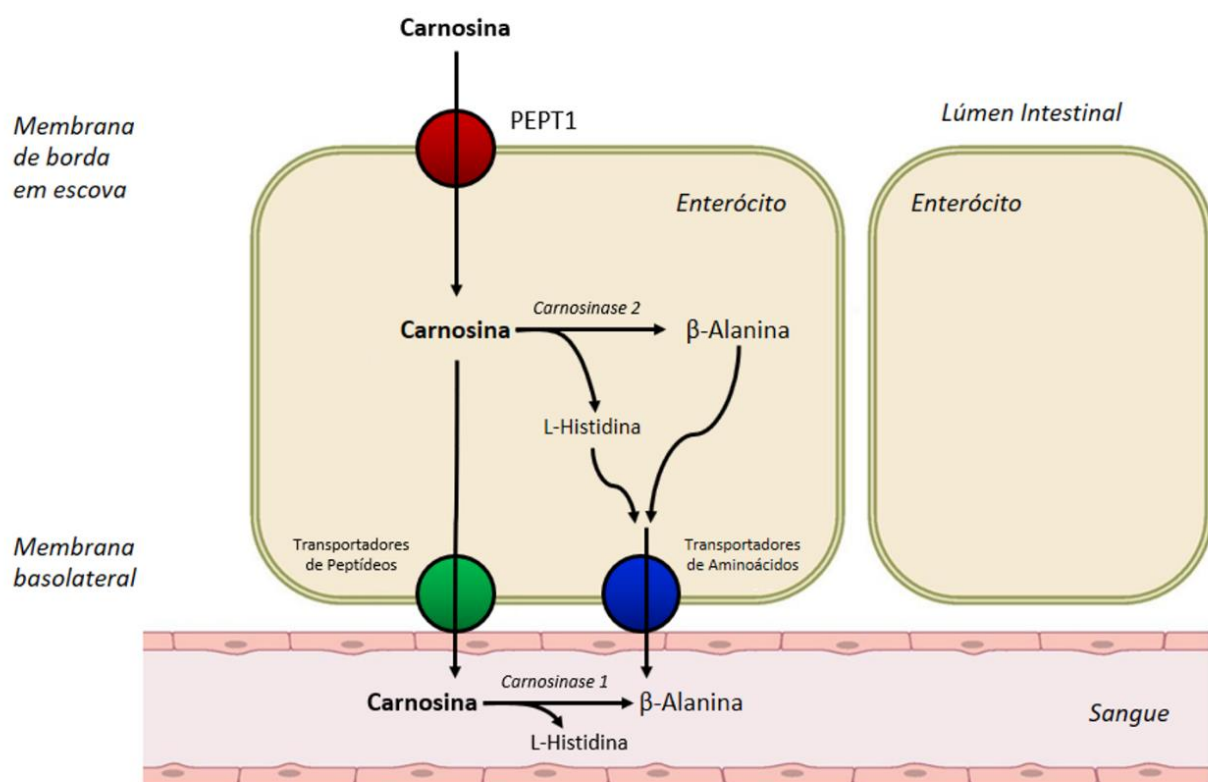
2.10 FISILOGIA DA CARNOSINA

A carnosina pode ser transportada por meio de oligopeptídeos transportadores acoplados a prótons (SLC15, como exemplo). Mamíferos geralmente captam carnosina por meio de dois transportadores: transportador de oligopeptídeos 1 e 2 (PEPT1 e PEPT2) e também por meio de transportadores de peptídeos 1 e 2 (PHT1 e PHT2) (DANIEL, 2004). Todos estes potenciais transportadores de carnosina não são exclusivos do dipeptídeo, pois podem transportar outros análogos metilados da carnosina. Os PEPT1 e PEPT2 mencionados anteriormente são capazes de transportar mais de 400 dipeptídeos e em torno de 8.000 tripeptídeos, entretanto, são incapazes de transportar aminoácidos livres ou peptídeos maiores (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

No intestino delgado, especificamente em células de borda em escova, a carnosina é captada por transportadores mencionados anteriormente, porém pode sofrer degradação no domínio intracelular (TEUFEL et al., 2003). A carnosina possui papéis importantes na fisiologia de enterócitos, no entanto, seu efeito é maior em condições específicas de estresse celular. Na grande maioria, a carnosina sofre

degradação e seus subprodutos (β -alanina e L-histidina) são transportados para a corrente sanguínea para distribuição à tecidos-alvo. Existe, entretanto, alguns transportadores que são capazes de transportar a carnosina por meio de enterócitos sem sofrerem degradação de enzimas intracelulares ou até mesmo por transporte paracelular. No entanto, devido a expressão de outra isoforma destas enzimas degradadoras no plasma, a carnosina é inexoravelmente hidrolisada a β -alanina e L-histidina para posterior distribuição (Figura 5) (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

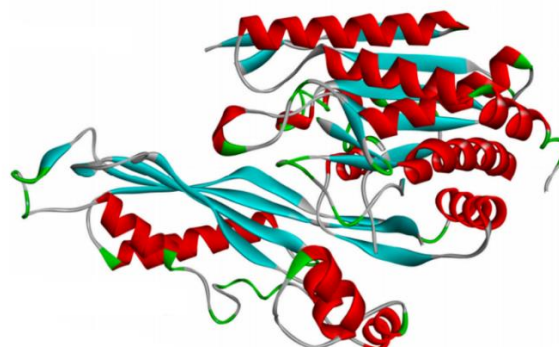
Figura 5: Absorção intestinal de carnosina.



Adaptado de Boldyrev *et al*, 2013. *Physiol Rev.*;93(4):1803-45.

O processo de biossíntese da carnosina se dá por meio de uma reação enzimática catalisada pela carnosina sintase (CS) (Figura 6). Esta enzima possui algumas características investigadas há relativamente pouco tempo. Se administrado via oral ou por meio de outra via (peritoneal, endovenosa, por exemplo) carnosina muito dificilmente será captada e mantida com seu efeito nas células-alvo. O motivo para este fenômeno se dá pela expressão da enzima degradadora da carnosina, a carnosinase.

Figura 6: Estrutura tridimensional da enzima carnosina sintase (CS).



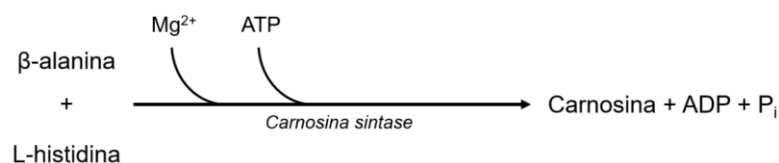
Carnosina Sintase (CS)

Pertence a família de enzimas ligases
Utiliza como co-fatores Mg^{2+} e uma molécula de ATP

Adaptado de Drozak *et al*, 2010. *J Biol Chem*. 26;285(13):9346-56.

A CS é uma enzima que faz parte da família de enzimas ligases, especificamente a *ATP-grasp domain containing protein 1* (ATPGD1). Em 2010, pesquisadores foram capazes de determinar se a CS produzia AMP ou ADP a partir do ATP para síntese da carnosina (DROZAK *et al.*, 2010). Esta enzima é um homotetrâmero que apresenta em torno de 430 kDa de peso molecular, cuja reação degrada ATP estequiometricamente a uma molécula de ADP e P_i para cada molécula de carnosina sintetizada (Figura 7). Devido a possuir muitos resíduos de cisteína em sua sequência, acredita-se que a atividade desta enzima seja potencialmente regulada por meio de equilíbrio redox (DROZAK *et al.*, 2010).

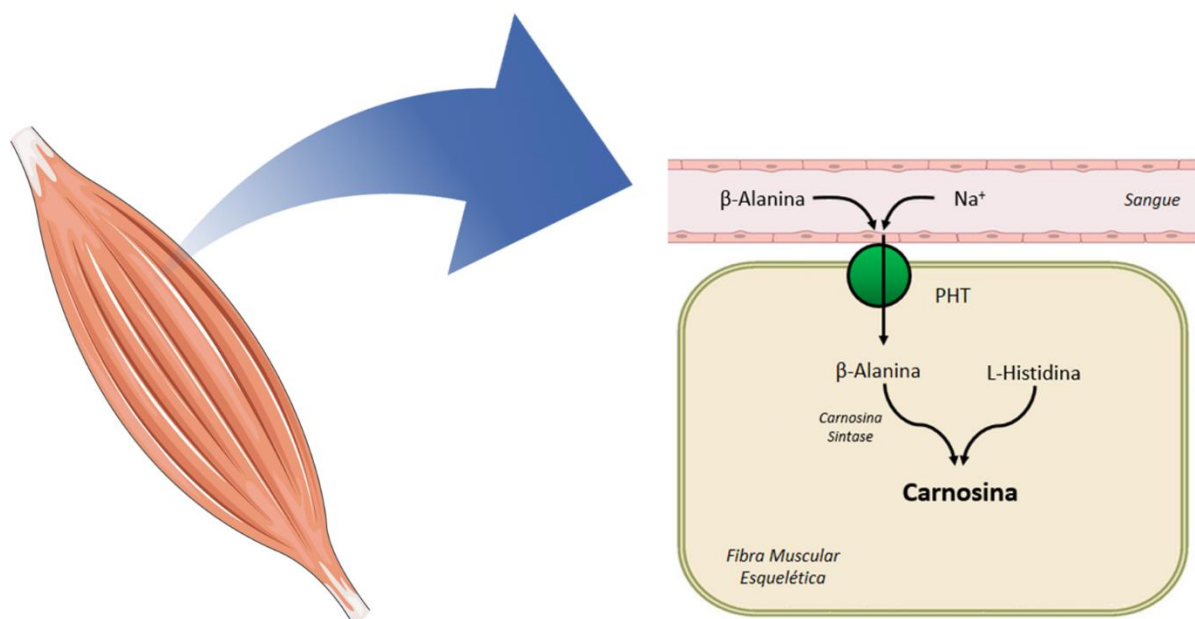
Figura 7: Reação de biossíntese da carnosina.



A carnosina é sintetizada em tecidos-alvo, como músculo esquelético, bulbo olfatório, fígado e, em menor proporção, no músculo cardíaco (DROZAK *et al.*, 2010).

Os seus precursores disponíveis na circulação sanguínea são captados por transportadores inespecíficos de aminoácidos e dentro do citosol da célula são sintetizados em carnosina (Figura 8). No meio intracelular, a carnosina exerce seu efeito fisiológico até que seja posteriormente degradado para posterior excreção.

Figura 8: Captação da β -alanina e biossíntese de carnosina na fibra muscular esquelética.



Adaptado de Boldyrev *et al*, 2013. *Physiol Rev.*;93(4):1803-45.

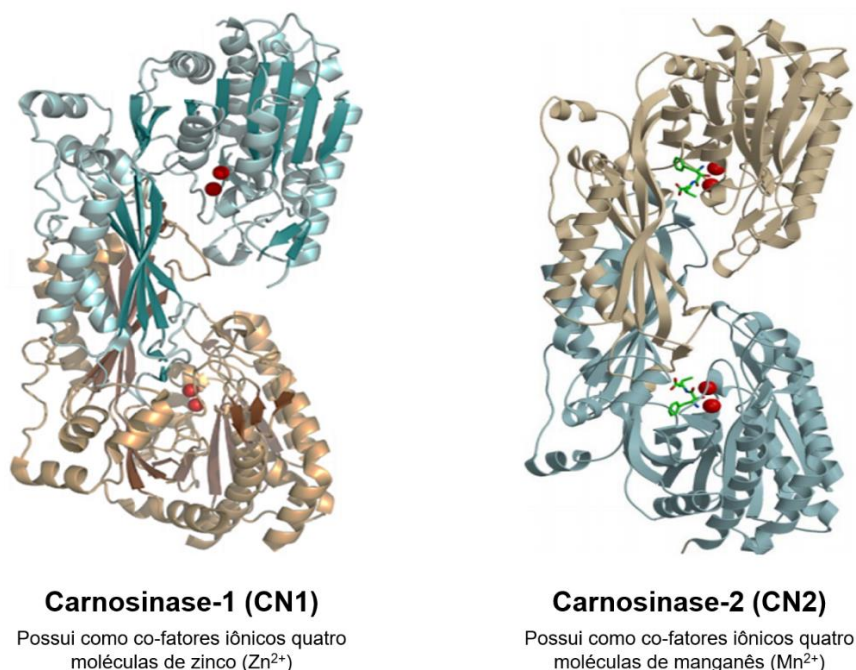
O principal fator limitante da biossíntese de carnosina, especialmente para seres humanos, é a presença de β -alanina (PERIM *et al.*, 2019). Uma vez internalizada por meio de transporte simporte de Na^+ , a β -alanina é internalizada na fibra muscular esquelética. Devido à natureza da molécula de β -alanina ser ácida, transportadores com maior polaridade eletroquímica são necessários para internalizar o aminoácido ao domínio intracelular.

A carnosina não é degradada por qualquer dipeptidase, como outros dipeptídeos. A carnosina sofre ação de hidrólise de uma enzima nomeada carnosinase que degrada o dipeptídeo em β -alanina e L-histidina (PERIM *et al.*, 2019).

A descoberta de enzimas envolvidas no processo de degradação da carnosina foi descoberto apenas 49 anos após a descoberta da molécula. Na ocasião, pesquisadores americanos purificaram a enzima oriunda em fígado de porcos (HANSON; SMITH, 1949).

Atualmente, a carnosinase é dividida em duas classes: carnosinase-1 (CN1) e carnosinase-2 (CN2). A CN1 está presente no soro, por este motivo também é conhecida como carnosinase sérica. Já a CN2 está disponível em uma gama de tecidos demonstrando atividade citosólica. É interessante observar que ambas enzimas possuem estrutura de homodímeros e fazem parte da família de metaloproteínas, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9: Isoformas das carnosinases, enzimas responsáveis pela degradação da carnosina.



Adaptado de Bellia *et al*, 2014. *Molecules*. 19(2): 2299–2329.

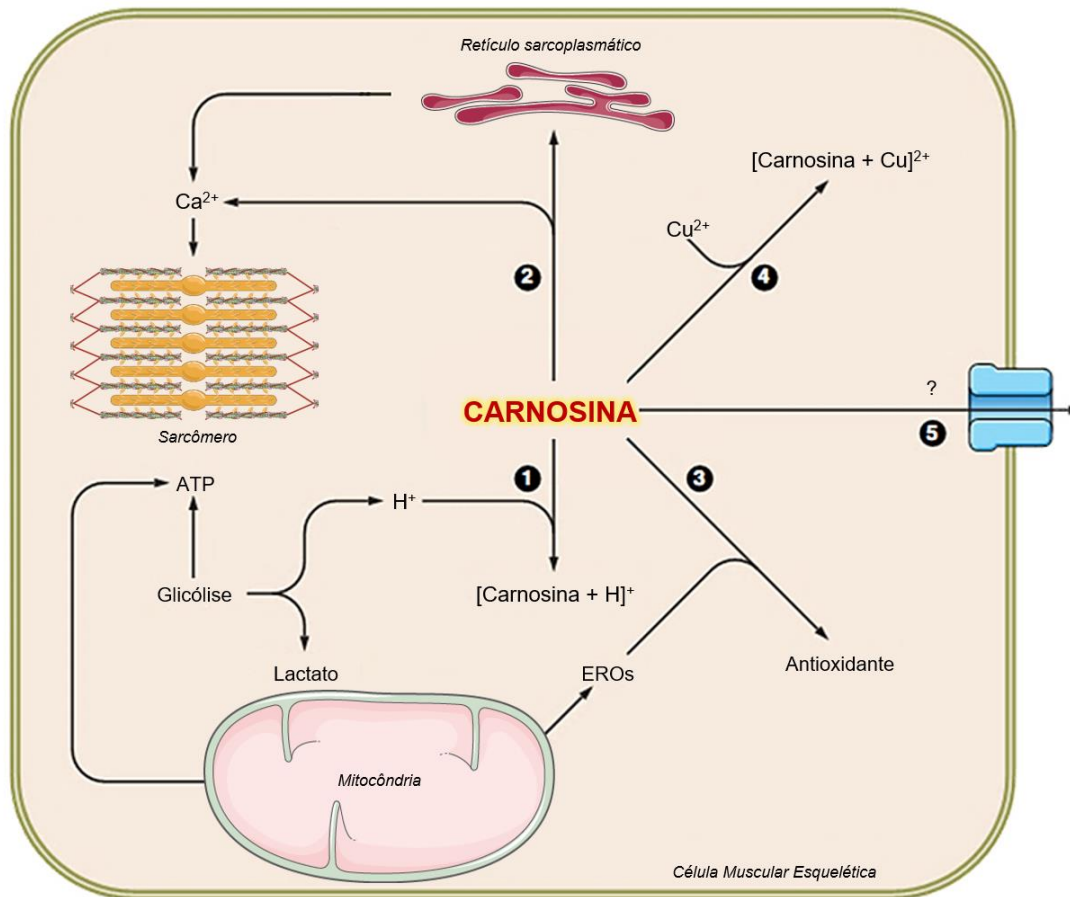
A CN1 é conhecida como carnosinase humana pelo fato de ter sido descoberta em uma condição que estaria afetando carnosinemia em crianças (PERRY; HANSEN;

LOVE, 1968). Esta isoforma é expressa não somente no soro de seres humanos, mas em alguns outros tecidos, como encéfalo, fígado e glomérulo renal (PETERS et al., 2010). Entretanto, esta enzima não é expressa em mamíferos não primatas, com exceção de uma espécie de hamster. Esta isoforma é produzida pelo tecido (fígado) e posteriormente secretada à circulação. Sua ação de degradação é mediada no sangue. Qualquer perturbação na homeostasia do ambiente hepático, como cirrose, pode afetar significativamente os níveis de carnosinase no sangue de hepatopatas (PETERS et al., 2011).

A primeira isoforma a ser descoberta, CN2, apresenta ações relativamente similares a isoforma sérica humana, no entanto com algumas variações bioquímicas. A CN2 utiliza outro metal como co-fator enzimático (manganês), ela também apresenta pH ótimo mais alcalino (8,5 para CN1 e 9,5 para CN2). Adicionalmente, esta enzima não possui a maior afinidade com a carnosina, mas sim com outros derivados de compostos com histidina, especialmente anserina e ofidina (PANDYA et al., 2011). Esta enzima não é secretada por nenhum tecido, conferindo sua ação catalisadora no domínio intracelular, especificamente no citoplasma. Por este motivo, esta enzima tem sido relatada como uma dipeptidase citosólica não específica (TEUFEL et al., 2003).

A carnosina apresenta uma série de efeitos fisiológicos e não se restringe apenas ao mesmo efeito em diferentes tecidos. Atualmente ainda está em discussão os possíveis efeitos que a carnosina pode exercer em tecidos que apresentam menor concentração, como pulmões e pâncreas. Por este motivo, a maioria dos efeitos já estudados se restringem predominantemente a tecidos com maiores concentrações de carnosina (músculo esquelético, encéfalo) (KAMAL et al., 2009). O resumo de efeitos fisiológicos da carnosina sobre a fibra muscular esquelética pode ser observado na Figura 10.

Figura 10: Efeitos da carnosina em fibras musculares esqueléticas.



Adaptado de Boldyrev *et al*, 2013. *Physiol Rev.*;93(4):1803-45.

Como um dos principais efeitos fisiológicos da carnosina na musculatura esquelética e cardíaca se dá pelo tamponamento ácido-básico. Em situações de acidose, como exercício físico intenso ou hipoperfusão ou isquemia, glicólise anaeróbia se torna predominante como via de síntese de energia para o músculo. Nesta situação, são produzidas grandes concentrações de ácido láctico que imediatamente se dissociam em íons de lactato e prótons de hidrogênios (H^+). A carnosina é capaz de neutralizar H^+ sintetizadas na ocasião no domínio intracelular, postergando o processo de fadiga muscular (LANCHA JUNIOR *et al.*, 2015; SAUNDERS *et al.*, 2017). Em uma das primeiras teorias de efeito da carnosina no músculo esquelético, se observou que esta capacidade de tamponamento da carnosina *in vivo* era em torno de 40% e aproximadamente 25% em condição de *rigor mortis* (SMITH, 1938).

A carnosina apresenta pKa de 6,83 (ligeiramente ácida) tornando-a uma molécula elegível para contribuir no sistema de tamponamento no tecido muscular durante condições anaeróbias (ARTIOLI et al., 2010). O sistema de tamponamento é composto por diversas moléculas, como bicarbonato, proteínas, fosfato inorgânico e compostos derivados de histidina, que contribuem para a homeostase do pH tecidual. Por este motivo, a carnosina pode apresentar diferentes espectros de contribuição para a homeostasia ácido-básica da musculatura esquelética. Adicionalmente, o tipo de fibra muscular pode variar consideravelmente a concentração de carnosina, bem como a espécie de animais (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

A composição química da molécula da carnosina fornece características únicas em relação ao seu efeito bioquímico em determinados cenários. A carnosina possui em sua composição o anel imidazol, o qual é oriundo da L-histidina. Este grupamento químico é importante, pois confere a molécula a capacidade de atuar como acceptor de elétrons (TAMBA; TORREGGIANI, 1998). Em condições de desequilíbrio do estado redox, como estresse oxidativo e/ou nitrosativo a carnosina tem a capacidade realizar atividade antioxidante direta para tanto espécies reativas, quanto para alguns radicais livres, como oxigênio singlete (1O_2) (HARTMAN; HARTMAN; AULT, 1990). Quanto a outras espécies reativas, como O_2^- , a carnosina apresenta potencial antioxidante próximo de antioxidantes extensivamente estudados como o ácido ascórbico e α -tocoferol (KLEBANOV et al., 1997).

Efeitos antioxidantes da carnosina tem sido relatado desde a década de 80, mostrando propriedades incomuns de observar em peptídeos. Um exemplo é a capacidade da carnosina extinguir ou atuar como um *quencher* do $HO\cdot$. O $HO\cdot$ é uma das espécies reativas de oxigênio mais destrutivas em sistemas biológicos por dificilmente apresentar defesas antioxidantes inatas para contrapor a sua formação (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Por este motivo, ao ser formado em doenças crônicas ou em estados de agressão celular, o radical hidroxila tem capacidade de induzir estresse oxidativo a qualquer biomolécula. O fato da carnosina poder neutralizar este tipo de radical livre confere a ela uma de suas propriedades químicas mais notáveis.

Adicionalmente, observar moléculas com efeitos antioxidantes a espécies reativas de oxigênio é interessante, porém conferir potencial antioxidante a espécies reativas de nitrogênio é algo diferencial. A carnosina possui afinidade com uma

espécie reativa de nitrogênio, o peróxinitrito (ONOO^-). O peróxinitrito possui características potencialmente destrutivas por sua meia-vida ser relativamente mais longa que outras espécies reativas e maior capacidade de dissipação do seu local de formação. Em outras palavras, o ONOO^- tem potencial de ser formado no domínio extracelular e poder danificar ácidos nucleicos presentes no núcleo de células eucarióticas (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Interessantemente, esta propriedade antioxidante a este tipo específico de espécie reativa não é restrito à carnosina, mas também está presente na anserina e outros derivados de histidina (FONTANA et al., 2002).

Com o corpo de evidências científicas construídas até o presente momento relacionado ao efeito antioxidante da carnosina em modelos *in vivo*, esta molécula apresenta mecanismos de proteção oxidativa não-enzimática notáveis. A maioria dos estudos que avaliaram efeitos antioxidantes da administração de carnosina envolviam sobrecarga de xenobióticos (etanol, quimioterápicos, entre outros) ou até mesmo em condições fisiológicas. Como exemplo, alguns estudos observaram redução de biomarcadores de lipoperoxidação em tecidos distintos (cérebro, fígado e rins) após suplementar animais com carnosina (AYDIN et al., 2010a, 2010b; BAYKARA et al., 2014; LIU; LIU; YIN, 2008; OZEL TURKCU et al., 2010). Interessantemente, outras investigações observaram aumento na atividade ou expressão de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e/ou glutathione peroxidase) (KIM et al., 2011). Para este fenômeno de modulação enzimática, pode ser explicado que a carnosina pode suprimir outras espécies reativas de oxigênio por meio de efeito direto e indireto, permitindo maior atividade destas enzimas antioxidantes protegendo ao estado redox celular.

O processo de excitação-contração muscular representa uma série de eventos complexos que culminam na contração sarcomérica de fibras musculares. Este fenômeno tem despertado interesse de pesquisadores envolvidos com estudos com carnosina. O motivo do interesse científico da modulação da excitação-contração de células musculares surgiu pela carnosina estar relacionado direta e indiretamente com diversas etapas (BATRUKOVA; RUBTSOV, 1997). Tecidos carregados com carnosina apresentam maior geração de força e potência. O principal mecanismo de ação envolvido na geração de força muscular por parte da carnosina estaria relacionado com maior sensibilização de Ca^{2+} para liberação ao sarcoplasma e reabsorção mais rápida (DUTKA; LAMB, 2004).

O exato ponto que a carnosina parece estar mais envolvida nesta cadeia complexa de fenômenos de excitação-contração da fibra muscular esquelética ainda tem se discutido. É hipotetizado que a carnosina estaria aumentando expressão de receptores de rianodina (RyR) e por este motivo, causaria maior mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma (DUTKA; LAMB, 2004). Entretanto, pela natureza do tamanho das isoformas mais expressas de RyR (RyR1 e RyR2) as quais compreendem pouco mais de 10% do tamanho de um ribossomo, torna-se pouco provável que este seria o alvo principal da carnosina modular (LANNER et al., 2010). Por isso, outras enzimas-chave no processo dinâmico de excitação-contração, como a Ca^{2+} -ATPase sarco/endoplasmática (SERCA), podem contribuir de forma mais significativa na geração de força e potência observada por diversos estudos (BATRUKOVA; RUBTSOV, 1997; DUTKA et al., 2012; LAMONT; MILLER, 1992; SUDO et al., 1997).

2.11 CARNOSINA E DESEMPENHO FÍSICO

Pesquisas de ciências do esporte utilizando carnosina como recurso ergogênicos tem demonstrado notável crescimento nos últimos anos (SAUNDERS et al., 2017). A carnosina tem sido testada em situações controladas e até mesmo em esportes coletivos. Na sua grande maioria, os resultados têm sido favoráveis de aumentar desempenho esportivo. O mecanismo de ação da carnosina como recurso ergogênico está intimamente relacionado com a demanda específica do exercício físico para exercícios intensos (predominantemente anaeróbios) (BLANCQUAERT; EVERAERT; DERAIVE, 2015). A seguir, será apresentado uma gama de estudos que demonstraram efeitos interessantes da sua suplementação com enfoque em fisiologia do exercício.

A suplementação de carnosina para seres humanos, onde se tem desenvolvido mais pesquisas relacionando desempenho físico, utilizam a suplementação do seu precursor (β -alanina). Em um estudo direcionado para atletas de judô, foi observado que dosagens de 6,4 gramas por dia de β -alanina por quatro semanas foi capaz de induzir aumento em parâmetros de desempenho específico do esporte, como número de lançamentos por série e total de lançamentos por teste (DE ANDRADE KRATZ et al., 2017). Adicionalmente, em outro estudo que testou a suplementação de β -alanina

em homens treinados (força) observou que a mesma dosagem (6,4 gramas de β -alanina por dia por quatro semanas) foi capaz de aumentar o tempo até exaustão em teste máximo em isocinético. Interessante ressaltar que neste estudo o aumento de tempo até exaustão devido a suplementação de β -alanina em comparação ao grupo controle foi de aproximadamente 17% e não apresentou efeitos ergogênicos sobre força isocinética e isotônica, apenas sobre a força isométrica (BASSINELLO et al., 2019).

Atividades aquáticas, como polo aquático, demonstram ser esportes elegíveis para suplementação de β -alanina. Em um estudo brasileiro, pesquisadores recrutaram atletas de polo aquático e realizaram testes de esforços incrementais e teste de esforço máximo nadando. O grupo suplementado com β -alanina demonstrou aumentar força crítica, mas apresentou resultados mistos em relação a quantidade de trabalho que pode ser realizada acima da força crítica. Os autores encontraram possível aumento na força associada ao pico de consumo de oxigênio em teste de esforço incremental em piscina (PINHEIRO BRISOLA et al., 2018).

Em outra investigação com polo aquático, atletas adolescentes foram suplementados com β -alanina por seis semanas e foram avaliados parâmetros de arremessos de bola, bem como tiros repetidos (atividades de alta intensidade). Os pesquisadores observaram aumento na força de arremesso e velocidade média da bola e menor tempo de realização de tiros de nado após seis semanas suplementando β -alanina (CLAUS et al., 2017). Estes dados indicam resultados interessantes para determinadas variáveis em esportes que utilizam alta intensidade de forma intervalada, porém a β -alanina parece não influenciar em todos os parâmetros que estão direta ou indiretamente envolvidos na geração de força e/ou potência específico do esporte.

Em 2017 foi publicada uma metanálise, que analisou resultados de 40 estudos com amostra acumulada de 1.461 participantes envolvendo 70 tipos de exercícios. Os pesquisadores que conduziram a revisão relataram que a suplementação de β -alanina é capaz de induzir efeito ergogênico e que possui diferenciação de tamanho de efeito de acordo com a duração do exercício físico. Análise de tamanho de efeito para exercícios de curta duração e alta intensidade (< 30 segundos) mostrou não ser influenciado pela suplementação. Interessantemente, a janela com maior tamanho de efeito devido a suplementação de β -alanina demonstrou compreender entre 30 segundos até 10 minutos de duração, sendo estas atividades de alta intensidade

(SAUNDERS et al., 2017). Neste intervalo de duração de exercício físico, o praticante poderia se beneficiar do aumento da carnosina muscular para atenuar o processo de acidose muscular esquelética, aumentando por sua vez o desempenho esportivo.

Diante do exposto, a IC apresenta uma série de lacunas que novos estudos podem contribuir para desenvolver novos tratamentos coadjuvantes eficientes. É consenso que o treinamento físico é eficiente em trazer melhoras aos pacientes com IC, mas a combinação das modalidades aeróbia com força carece de respaldo científico, principalmente quando associadas a suplementação nutricional. O panorama de alterações nos músculos esqueléticos orquestrado pela redução do débito cardíaco mostra-se desafiador para outras ferramentas. A suplementação de componentes que poderiam atenuar a incapacidade ao exercício físico, como a carnosina, torna-se um campo instigante para desenvolver novos estudos com animais para testar a sua eficácia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos fisiológicos, bioquímicos e de capacidade funcional da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado em ratos com insuficiência cardíaca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre a capacidade funcional em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre função ventricular esquerda em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre o estresse oxidativo em diferentes tecidos em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre a atividade de enzimas antioxidantes em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias em diferentes tecidos em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre concentrações de HSP72 kDa em diferentes tecidos em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre a expressão de genes envolvidos na contração muscular esquelética e cardíaca em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

- Avaliar o impacto da suplementação de β -alanina e L-histidina associadas ao treinamento combinado sobre variáveis bioquímicas plasmáticas em ratos com insuficiência cardíaca induzida por IAM.

4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ABSHIRE, M. et al. Nutritional Interventions in Heart Failure: A Systematic Review of the Literature. **Journal of Cardiac Failure**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 989–999, 2015.

ADAMO, L. et al. Reappraising the role of inflammation in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 269–285, 2020.

ADAMS, K. F. et al. Characteristics and outcomes of patients hospitalized for heart failure in the United States: Rationale, design, and preliminary observations from the first 100,000 cases in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). **American Heart Journal**, [s. l.], v. 149, n. 2, p. 209–216, 2005.

ALVAREZ, P.; HANNAWI, B.; GUHA, A. Exercise And Heart Failure: Advancing Knowledge And Improving Care. **Methodist DeBakey cardiovascular journal**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 110–115, 2016.

ALVES, J. P. et al. Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: Experimental model of heart failure. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2014.

ALVES, J. P. et al. High-intensity resistance training alone or combined with aerobic training improves strength, heart function and collagen in rats with heart failure. **American Journal of Translational Research**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 5432–5441, 2017.

ARTIOLI, G. G. et al. Role of β -alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 1162–1173, 2010.

ATKINSON, A. J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.

AYDIN, A. F. et al. Effect of carnosine against thioacetamide-induced liver cirrhosis in

rat. **Peptides**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 67–71, 2010. a.

AYDIN, A. F. et al. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. **Biogerontology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 103–109, 2010. b.

BASSINELLO, D. et al. Beta-alanine supplementation improves isometric, but not isotonic or isokinetic strength endurance in recreationally strength-trained young men. **Amino Acids**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 27–37, 2019.

BATRUKOVA, M. A.; RUBTSOV, A. M. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1324, n. 1, p. 142–150, 1997.

BAYKARA, B. et al. The protective effects of carnosine in alcohol-induced hepatic injury in rats. **Toxicology and Industrial Health**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 25–32, 2014.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, United States, v. 139, n. 10, p. e56–e66, 2019.

BJARNASON-WEHRENS, B. et al. Exercise-based cardiac rehabilitation in patients with reduced left ventricular ejection fraction: The Cardiac Rehabilitation Outcome Study in Heart Failure (CROS-HF): A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], 2019.

BLANCQUAERT, L.; EVERAERT, I.; DERAIVE, W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 63–70, 2015.

BLEUMINK, G. S. et al. Quantifying the heart failure epidemic: Prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure - The Rotterdam Study. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 1614–1619, 2004.

BOCCHI, E. A. et al. The reality of heart failure in Latin America. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 62, n. 11, p. 949–958, 2013.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. **Physiological Reviews**, [s. l.], 2013.

BUCKLEY, L. F. et al. Potential role for interleukin-1 in the cardio-renal syndrome. **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 385–386, 2019.

CALABRESE, E. J. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. **EMBO reports**, [s. l.], v. 5, n. S1, 2004.

CALABRESE, E. J. Hormesis: A fundamental concept in biology. **Microbial Cell**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 145–149, 2014.

CALABRESE, E. J. Hormesis: Path and progression to significance. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 10, 2018.

CALABRESE, E. J.; MATTSON, M. P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? **npj Aging and Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2017.

CALEGARI, L. et al. Exercise training improves the IL-10/TNF- α cytokine balance in the gastrocnemius of rats with heart failure. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 154–160, 2018.

CARABELLO, B. A. Concentric versus eccentric remodeling. **Journal of Cardiac Failure**, [s. l.], v. 8, n. 6 SUPPL., 2002.

CLAUS, G. M. et al. Beta-alanine supplementation improves throwing velocities in repeated sprint ability and 200-m swimming performance in young water polo players. **Pediatric Exercise Science**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 203–212, 2017.

COROTTO, P. S. et al. Heart Failure Patient Adherence. *Epidemiology, Cause, and*

Treatment. **Heart Failure Clinics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 49–58, 2013.

DANIEL, H. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 361–384, 2004.

DE ANDRADE KRATZ, C. et al. Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in highly-trained athletes. **Journal of Science and Medicine in Sport**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 403–408, 2017.

DEL BUONO, M. G. et al. Exercise Intolerance in Patients With Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 73, n. 17, p. 2209–2225, 2019.

DHAKAL, B. P. et al. Mechanisms of exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: The role of abnormal peripheral oxygen extraction. **Circulation: Heart Failure**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 286–294, 2015.

DICK, S. A.; EPELMAN, S. Chronic heart failure and inflammation. **Circulation Research**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 159–176, 2016.

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

DUNBAR, S. B. et al. A pilot test of an integrated self-care intervention for persons with heart failure and concomitant diabetes. **Nursing Outlook**, [s. l.], 2014.

DUTKA, T. L. et al. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca²⁺ sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in human skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], 2012.

DUTKA, T. L.; LAMB, G. D. Effect of carnosine on excitation-contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 203–213, 2004.

EVERETT, B. M. et al. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for the prevention of hospitalization for heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 139, n. 10, p. 1289–1299, 2019.

FONTANA, M. et al. Prevention of peroxynitrite-dependent damage by carnosine and related sulphonamido pseudodipeptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 546–551, 2002.

FUJIMOTO, N. et al. Effects of pericardial constraint and ventricular interaction on left ventricular hemodynamics in the unloaded heart. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], 2011.

FUKUTA, H. et al. Effects of exercise training on cardiac function, exercise capacity, and quality of life in heart failure with preserved ejection fraction: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Heart Failure Reviews**, United States, v. 24, n. 4, p. 535–547, 2019.

GAGGIN, H. K.; JANUZZI, J. L. Biomarkers and diagnostics in heart failure. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1832, n. 12, p. 2442–2450, 2013.

GANDHI, M. S. et al. Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. **Heart Failure Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 23–34, 2011.

GARY, R. A. et al. Combined aerobic and resistance exercise program improves task performance in patients with heart failure. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [s. l.], v. 92, n. 9, p. 1371–1381, 2011.

GUPTA, D. et al. Dietary sodium intake in heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 479–485, 2012.

HABAL, M. V.; GARAN, A. R. Long-term management of end-stage heart failure. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 153–166, 2017.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 637–644, 2013.

HANSEN, D. et al. Dynamic strength training intensity in cardiovascular rehabilitation: is it time to reconsider clinical practice? A systematic review. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 1483–1492, 2019.

HANSON, H. T.; SMITH, E. L. Carnosinase; an enzyme of swine kidney. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 179, n. 2, p. 789–801, 1949.

HARTMAN, P. E.; HARTMAN, Z.; AULT, K. T. Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 59–66, 1990.

HAYKOWSKY, M. J. et al. Heart Failure: Exercise-Based Cardiac Rehabilitation: Who, When, and How Intense? **Canadian Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. S382–S387, 2016.

HEIDENREICH, P. A. et al. Forecasting the impact of heart failure in the united states a policy statement from the american heart association. **Circulation: Heart Failure**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 606–619, 2013.

HOPPER, I. et al. Nutraceuticals in Patients With Heart Failure: A Systematic Review. **Journal of Cardiac Failure**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 166–179, 2020.

HUTCHINSON, K. R.; STEWART, J. A.; LUCCHESI, P. A. Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 564–569, 2010.

JENCKS, S. F.; WILLIAMS, M. V.; COLEMAN, E. A. Rehospitalizations among patients in the medicare fee-for-service program. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 360, n. 14, p. 1418–1428, 2009.

JEWISS, D.; OSTMAN, C.; SMART, N. A. The effect of resistance training on clinical outcomes in heart failure: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 221, p. 674–681, 2016.

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

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, [s. l.], v. 122, n. 25, p. 2727–2735, 2010.

KILGORE, M. et al. Economic burden of hospitalizations of Medicare beneficiaries with heart failure. **Risk Management and Healthcare Policy**, [s. l.], v. 10, p. 63–70, 2017.

KIM, M. Y. et al. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. **Nutrition Research and Practice**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 421–428, 2011.

KIROLOS, I. et al. Cardiac physiology in post myocardial infarction patients: the effect of cardiac rehabilitation programs—a systematic review and update meta-analysis. **Annals of Translational Medicine**, China, v. 7, n. 17, p. 416–416, 2019.

KIYUNA, L. A. et al. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 129, p. 155–168, 2018.

KLEBANOV, G. I. et al. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. **Biochemistry and Molecular Biology International**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 99–106, 1997.

KWIATKOWSKI, S.; KIERSZTAN, A.; DROZAK, J. Biosynthesis of Carnosine and

Related Dipeptides in Vertebrates. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], 2018.

LAMONT, C.; MILLER, D. J. Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 454, n. 1, p. 421–434, 1992.

LANCHA JUNIOR, A. H. et al. Nutritional Strategies to Modulate Intracellular and Extracellular Buffering Capacity During High-Intensity Exercise. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 45, p. 71–81, 2015.

LANNER, J. T. et al. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 2, n. 11, 2010.

LESYUK, W.; KRIZA, C.; KOLOMINSKY-RABAS, P. Cost-of-illness studies in heart failure: A systematic review 2004-2016. **BMC Cardiovascular Disorders**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2018.

LIU, W. hu; LIU, T. chung; YIN, M. chin. Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver injury. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1503–1509, 2008.

LONG, L. et al. Exercise-based cardiac rehabilitation for adults with heart failure. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2019, n. 1, 2019.

LOPES, R. D. et al. Alterações na produção de IL-10 e TNF- α no músculo esquelético em ratos com insuficiência cardíaca secundária ao infarto do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 94, n. 3, 2010.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: Pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 470–479, 2000.

MAHTANI, K. R. et al. Reduced Salt Intake for Heart Failure: A Systematic Review. **JAMA Internal Medicine**, [s. l.], v. 178, n. 12, p. 1693–1700, 2018.

MAISEL, A. et al. State of the art: Using natriuretic peptide levels in clinical practice. **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 824–839, 2008.

MAISEL, A. S.; DURAN, J. M.; WETTERSTEN, N. Natriuretic Peptides in Heart Failure: Atrial and B-type Natriuretic Peptides. **Heart Failure Clinics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 13–25, 2018.

MANDIC, S. et al. Resistance versus aerobic exercise training in chronic heart failure. **Current Heart Failure Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 57–64, 2012.

MCKEAG, N. A. et al. Dietary micronutrient intake and micronutrient status in patients with chronic stable heart failure: An observational study. **Journal of Cardiovascular Nursing**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 148–155, 2017.

MEHRA, V. M. et al. Systematic review of cardiac rehabilitation guidelines: Quality and scope. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], 2019.

MESSERLI, F. H.; RIMOLDI, S. F.; BANGALORE, S. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. **JACC: Heart Failure**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 543–551, 2017.

MIELNICZUK, L. M. et al. Left ventricular end-diastolic pressure and risk of subsequent heart failure in patients following an acute myocardial infarction. **Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 209–214, 2007.

MIHL, C.; DASSEN, W. R. M.; KUIPERS, H. Cardiac remodelling: Concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. **Netherlands Heart Journal**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 129–133, 2008.

MILINKOVIĆ, I. et al. Oxidative stress and inflammation in heart failure: The best is yet to come. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 490–493, 2020.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.

NOJIRI, H. et al. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 44, p. 33789–33801, 2006.

OZEL TURKCU, U. et al. Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 339, n. 1–2, p. 55–61, 2010.

PAGE, R. L. et al. Drugs that may cause or exacerbate heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 134, n. 6, p. e32–e69, 2016.

PANDYA, V. et al. Mass spectrometry assay for studying kinetic properties of dipeptidases: Characterization of human and yeast dipeptidases. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 418, n. 1, p. 134–142, 2011.

PAULUS, W. J. Cytokines and heart failure. **Heart failure monitor**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 50–56, 2000.

PERIM, P. et al. Can the Skeletal Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation Be Optimized? **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 6, 2019.

PERRY, T. L.; HANSEN, S.; LOVE, D. L. Serum-carnosinase deficiency in carnosinaemia. **Lancet**, [s. l.], v. 1, n. 7554, p. 1229–1230, 1968.

PÉTER, S. et al. Public health relevance of drug–nutrition interactions. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 23–36, 2017.

PETERS, V. et al. Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity. **Amino Acids**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1607–1615, 2010.

PETERS, V. et al. Anserine inhibits carnosine degradation but in human serum carnosinase (CN1) is not correlated with histidine dipeptide concentration. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 412, n. 3–4, p. 263–267, 2011.

PIEPOLI, M. F. et al. Exercise intolerance in chronic heart failure: Mechanisms and therapies. Part II. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 643–648, 2010. a.

PIEPOLI, M. F. et al. Secondary prevention through cardiac rehabilitation: From knowledge to implementation. A position paper from the cardiac rehabilitation section of the European association of cardiovascular prevention and rehabilitation. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–17, 2010. b.

PIEPOLI, M. F. et al. Exercise intolerance in chronic heart failure: Mechanisms and therapies. Part I. **European Journal of Preventive Cardiology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 637–642, 2010. c.

PIEPOLI, M. F. Exercise training in chronic heart failure: Mechanisms and therapies. **Netherlands Heart Journal**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 85–90, 2013.

PINHEIRO BRISOLA, G. M. et al. Effects of 4 weeks of β -alanine supplementation on aerobic fitness in water polo players. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 10, 2018.

PONIKOWSKI, P. et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 37, n. 27, p. 2129–2200m, 2016.

PRABHU, S. D.; FRANGOIANNIS, N. G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. **Circulation Research**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 91–112, 2016.

PRICE, K. J. et al. A review of guidelines for cardiac rehabilitation exercise programmes: Is there an international consensus? **European Journal of Preventive**

Cardiology, [s. l.], v. 23, n. 16, p. 1715–1733, 2016.

RICH, M. W. et al. A multidisciplinary intervention to prevent the readmission of elderly patients with congestive heart failure. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 333, n. 18, p. 1190–1195, 1995.

RIEDL, E. et al. Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in stz diabetic rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 279–288, 2011.

ROGERS, C.; BUSH, N. Heart Failure: Pathophysiology, Diagnosis, Medical Treatment Guidelines, and Nursing Management. **Nursing Clinics of North America**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 787–799, 2015.

ROHDE, L. E. P. et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 111, n. 3, p. 436–539, 2018.

ROSCA, M. G.; HOPPEL, C. L. Mitochondrial dysfunction in heart failure. **Heart Failure Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 607–622, 2013.

SAMANTA, D.; PRABHAKAR, N. R.; SEMENZA, G. L. Systems biology of oxygen homeostasis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2017.

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

SEFEROVIC, P. M. et al. Clinical practice update on heart failure 2019: pharmacotherapy, procedures, devices and patient management. An expert consensus meeting report of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1169–1186, 2019.

SHARMA, R.; COATS, A. J. S.; ANKER, S. D. The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: Cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 175–186, 2000.

SHEN, Y. et al. Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knockout mice by reducing glutamate excitotoxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 727–735, 2010.

SHIRAZI, L. F. et al. Role of Inflammation in Heart Failure. **Current Atherosclerosis Reports**, [s. l.], v. 19, n. 6, 2017.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress: Annual Review of Biochemistry. **Annual Review of Biochemistry**, United States, v. 86, n. 1, p. 715–748, 2017.

SILVESTRE-ROIG, C. et al. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], 2020.

SMITH, E. C. B. The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 336–343, 1938.

SOLIMAN, K. M.; MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. S. Attenuation of some metabolic deteriorations induced by diabetes mellitus using carnosine. **Journal of Applied Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 16, p. 2252–2260, 2007.

SOLOMON, S. D. et al. Influence of nonfatal hospitalization for heart failure on subsequent mortality in patients with chronic heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 116, n. 13, p. 1482–1487, 2007.

STANCIU, A. E. Cytokines in heart failure. **Advances in Clinical Chemistry**, United States, v. 93, p. 63–113, 2019.

SUDO, G. Z. et al. Calcium-Sensitizing Function for the Dipeptide Carnosine in Skeletal Muscle Contractility. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 7, n.

2, p. 81–92, 1997.

SWANK, A. M. et al. Effect of resistance training and aerobic conditioning on muscular strength and submaximal fitness for individuals with chronic heart failure: Influence of age and gender. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 1298–1305, 2010.

TAKIMOTO, E.; KASS, D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **Hypertension**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 241–248, 2007.

TAMBA, M.; TORREGGIANI, A. A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution. **International Journal of Radiation Biology**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 333–340, 1998.

TANAI, E.; FRANTZ, S. Pathophysiology of heart failure. **Comprehensive Physiology**, Major Reference Works. [s. l.], v. 6, n. 1, Major Reference Works, p. 187–214, 2016.

TAVERNE, Y. J. et al. Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life. **BioEssays**, [s. l.], v. 40, n. 3, 2018.

TAYLOR, R. S. et al. Impact of Exercise Rehabilitation on Exercise Capacity and Quality-of-Life in Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 1430 LP-1443, 2019.

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

TIMONET-ANDREU, E. et al. Health-Related Quality of Life and Use of Hospital Services by Patients with Heart Failure and Their Family Caregivers: A Multicenter Case-Control Study. **Journal of Nursing Scholarship**, United States, v. 52, n. 2, p. 217–228, 2020.

TRIPOSKIADIS, F. et al. Reframing the association and significance of co-morbidities in heart failure. **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 744–758, 2016.

TSCHÖPE, C. et al. Cardiac contractility modulation: mechanisms of action in heart failure with reduced ejection fraction and beyond. **European Journal of Heart Failure**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 14–22, 2019.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 301, n. 6, p. 2181–2190, 2011.

VAN DER MEER, P.; GAGGIN, H. K.; DEC, G. W. ACC/AHA Versus ESC Guidelines on Heart Failure: JACC Guideline Comparison. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 73, n. 21, p. 2756–2768, 2019.

VAN LINTHOUT, S.; TSCHÖPE, C. Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both? **Current Heart Failure Reports**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 251–265, 2017.

VEAL, E.; JACKSON, T.; LATIMER, H. Role/s of ‘antioxidant’ enzymes in ageing. **Subcellular Biochemistry**, [s. l.], v. 90, p. 425–450, 2018.

VOLPE, M.; RUBATTU, S.; BURNETT, J. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: Current use and perspectives. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 35, n. 7, 2014.

WANG, X. Y. et al. The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. **BioMed Research International**, United States, v. 2020, p. 2018035, 2020.

WANG, Z. Q. et al. Effects of combined aerobic and resistance training in patients with heart failure: A meta-analysis of randomized, controlled trials. **Nursing and Health Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 148–156, 2019.

WAYPA, G. B.; SMITH, K. A.; SCHUMACKER, P. T. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 47–48, p. 76–89, 2016.

WEISS, K. et al. Fatigability, Exercise Intolerance, and Abnormal Skeletal Muscle Energetics in Heart Failure. **Circulation: Heart Failure**, [s. l.], 2017.

YANCY, C. W. et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], 2013.

ZHOU, B.; TIAN, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 128, n. 9, p. 3716–3726, 2018.

5 ARTIGO 1

**β -ALANINE AND L-HISTIDINE SUPPLEMENTATION ASSOCIATED WITH
COMBINED TRAINING INCREASED FUNCTIONAL CAPACITY AND MAXIMUM
STRENGTH IN HEART FAILURE RATS**


(Artigo publicado pelo periódico *Experimental Physiology*)

Fator de Impacto: 2,431. Qualis (Educação Física): A2



RESEARCH PAPER

β -Alanine and L-histidine supplementation associated with combined training increased functional capacity and maximum strength in heart failure rats

Giuseppe Potrick Stefani^{1,2} | Lucas Capalonga¹ | Lucas Ribeiro da Silva¹ | Pedro Dal Lago^{1,2} 

¹Laboratory of Experimental Physiology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil

²Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil

Correspondence

Pedro Dal Lago, Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil.

Email: pdallago@ufcspa.edu.br

Edited by: Jason Peart

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Combined training (CT) has been associated with positive responses in the clinical status of patients with chronic heart failure (CHF). Other non-pharmacological tools, such as amino acid supplementation, may further enhance its adaptation. However, the effects of β -alanine and L-histidine supplementation in CHF remain unclear. In the present study, the aim was to test whether supplementing carnosine precursors with CT could give improved responses in the functional capacity and echocardiographic variables of rats with CHF. Twenty-four Wistar rats, were submitted to myocardial infarction and allocated to three groups: animals with CHF kept in sedentary conditions (SED, $n = 8$), animals with CHF submitted to CT in strength and aerobic exercise supplemented with placebo (CT-P, $n = 8$) and animals with CHF submitted to CT in strength and aerobic exercise supplemented with β -alanine and L-histidine (CT-S, $n = 8$). The trained animals were submitted to a strength protocol three times per week with intensity of 65–75% of one repetition maximum test. Aerobic training was conducted two times per week (50 min, 15 m min^{-1}). The supplemented group received β -alanine and L-histidine orally (each 250 mg $\text{kg}^{-1} \text{day}^{-1}$). No changes in echocardiographic and morphological parameters were found among the groups ($P > 0.05$). Functional capacity, $\Delta \dot{V}_{\text{O}_2\text{max}}$ and maximum strength were higher in CT-P than in SED and even higher in CT-S than in CT-P ($P < 0.01$). The CT was able to improve functional capacity, but the supplementation was shown to enhance these parameters even further in the CHF rats. We conclude that the increase in functional capacity and strength gained through CT and supplementation were associated with the improvement in peripheral parameters with no changes in cardiac variables.

KEYWORDS

carnosine, exercise, heart failure

1 | INTRODUCTION

Heart failure is a complex syndrome in which the heart is unable to maintain an adequate blood supply to other tissues (Rogers & Bush, 2015; Tanai & Frantz, 2016). It is considered one of the major causes of mortality in developed and undeveloped countries (Dharmarajan & Rich, 2017). Additionally, patients with chronic heart failure (CHF) generally present exercise intolerance due to central and peripheral adjustments (Piepoli et al., 2017; Weiss et al., 2017). This physical inability is sustained by several factors, such as hypoperfusion

in skeletal muscles during exercise, metabolic changes in skeletal muscle fibres and endothelial dysfunction (Booth, Roberts, Thyfault, Rueggsegger, & Toedebusch, 2017). Moreover, reduced functional capacity is commonly observed, which contributes to the reduced quality of life in this population.

Several non-pharmacological therapies have been tested consistently in humans and animals to address these complications in combination with traditional pharmacological treatments (Taylor et al., 2019). One of the tools that have been found particularly valuable throughout the years of extensive primary and clinical research is

exercise training (Taylor et al., 2014). Physical exercise can increase functional capacity and strength when it is appropriately prescribed. Training patients with heart failure in aerobic exercises combined with strength exercises has been shown to enhance their functional capacity compared with aerobic training alone (Wang, Peng, Li, & Wu, 2019).

Patients with heart failure commonly demonstrate unmet nutritional requirements. A few factors can influence the quantity and quality of food, such as reduced appetite and the low intake of fruits and vegetables (Abshire et al., 2015; Arnett et al., 2019). This phenomenon is interesting because it indirectly affects the uptake of crucial micronutrients that regulate the metabolism of several physiological systems, especially the heart and skeletal muscles. Supplementation with amino acids was investigated in a few studies, which showed promising results (Cicero & Colletti, 2017; McCarty & DiNicolantonio, 2014). Carnosine is an emerging supplement that has been positively tested in the sports sciences.

Carnosine is a cytoplasmic dipeptide that is found in high concentrations in skeletal muscles, brain and heart (Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013; Derave, Everaert, Beeckman, & Bague, 2010). Previous experiments showed that carnosine exerts both direct and indirect effects on skeletal muscles in different roles, such as acid buffering, Ca^{2+} handling and antioxidant effect (Kumral et al., 2015; Lopachev et al., 2016; Zaloga et al., 1997). However, although previous investigations in sports physiology demonstrated positive results, very few studies have evaluated the effects of increased carnosine in skeletal muscles on skeletal muscle performance in heart failure patients. Therefore, this study aimed to assess the effects of carnosine precursor supplementation associated with combined exercise training in rats with heart failure.

2 | METHODS

2.1 | Ethical approval

The Committee of Animal Ethics of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) approved the protocol of this study (approval number 198/16). All experimental procedures were conducted according to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication 8th edition, revised 2011) and the principles and regulations of preclinical studies described by the ARRIVE protocol (Grundy, 2015). All efforts were made to minimize suffering.

2.2 | Animals

Male Wistar rats ($n = 24$) weighing between 220 and 300 g (approximately 70–90 days of age) were selected for the study. All rats were kept in standard breeding conditions of two or three animals per cage. The rats received food and water *ad libitum* in a room without significant noise under a 12–12 h light–dark cycle at 22°C. All rats were obtained from the Animal Breeding Unit of the UFCSPA. Figure 1 shows a flowchart of the experimental protocol.

New Findings

- **What is the central question of the study?**

Does β -alanine with L-histidine supplementation associated with endurance and strength training improve echocardiographic parameters, functional capacity, and maximum strength in rats with chronic heart failure?

- **What is the main finding and its importance?**

β -Alanine with L-histidine supplementation associated with endurance and strength training increased functional capacity and maximum strength through increasing exercise capacity peripherally but did not affect echocardiographic parameters in rats with chronic heart failure.

All animals were submitted to myocardial infarction surgery (as described in section 2.4) before group allocation. Briefly, 24 rats were randomly allocated to one of three groups: SED, CT-P and CT-S. The SED ($n = 8$) animals with chronic heart failure were kept in sedentary conditions. The CT-P ($n = 8$) animals with chronic heart failure were submitted to combined resistance and aerobic training (combined training, CT) supplemented with a placebo. The CT-S ($n = 8$) animals with chronic heart failure were submitted to combined resistance and aerobic training supplemented with β -alanine and L-histidine.

2.3 | Experimental design

The timeline of the experimental protocol is shown in Figure 2. In this experiment, the animals were submitted to myocardial infarction, and after 4 weeks, echocardiography was performed to confirm heart failure. It was determined that the animals developed heart failure 4 weeks after the myocardial infarction. After this period, the animals were adapted to the treadmill and resistance training apparatus and further evaluated by two maximal tests: maximum strength and functional capacity. In the sixth week, the trained groups initiated the combined exercise training (i.e. resistance training associated with continuous aerobic training) with supplementation by β -alanine and L-histidine in the supplemented group. The procedures were 8 weeks in duration, and they occurred at the same time of day in each training session. Finally, the animals were again evaluated by echocardiography, maximum strength and functional capacity tests. In following the week, the animals were killed. Their tissue was collected, and their morphological measurements were taken.

2.4 | Myocardial infarction induction

To induce heart failure, the animals were subjected to coronary artery ligation surgery before the experimental treatments. The animals were anaesthetized using 2% isoflurane mixed with 100% O_2 at a breathing rate of 60 breaths min^{-1} . The myocardial infarction model followed the same procedure as previously described in previous studies conducted

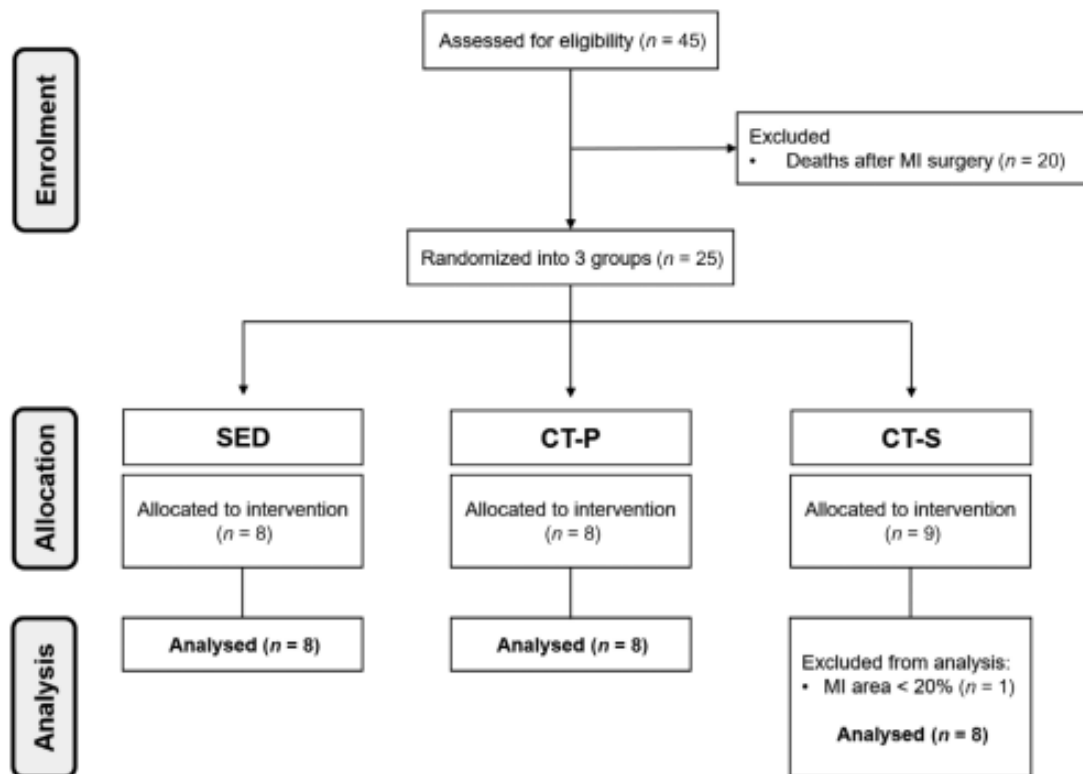


FIGURE 1 Flowchart of animals selected for the experiments. MI, myocardial infarction

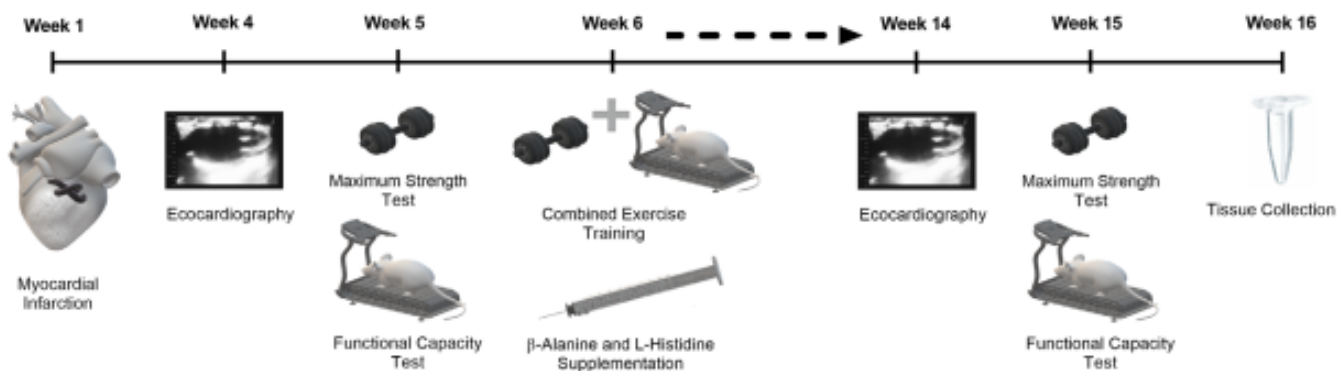


FIGURE 2 Experimental timeline of the study

in our laboratory (Alves et al., 2017; Hentschke et al., 2017; Jaenisch et al., 2017).

For pain and inflammatory effects of the surgical procedure, the analgesic ketoprofen (5.0 mg kg^{-1}) was administered orally, by gavage at 12/12 h during the first 24 h of the postoperative period. The presence of pain was assessed in this period according to animal behaviour. In addition, after surgery, a 1.0 ml saline solution was applied intraperitoneally at room temperature, for fluid replacement along with a dose of gentamicin (20.0 mg kg^{-1} dosage) intramuscularly, as prophylaxis for infections. For a period of 8 h after myocardial infarction surgery, the animals were kept in their boxes heated with a light source and were given water and feed *ad libitum*. For this postoperative period, the water and food consumption of all animals were monitored.

2.5 | Echocardiographic measurements

Before initiating the training and supplementation protocols and 48 h before the last functional capacity test, the animals underwent non-invasive cardiac function evaluations using echocardiography (GE Vivid I, GE Medical Systems, TelAviv, Israel). The equipment was coupled to an 8–13 MHz electronic transducer by a trained operator experienced in small animal echocardiography. All echocardiographic evaluations and measurements were performed by the same researcher, who was blinded to the groups of the animals. The echocardiographic examination followed the recommendations of the American College of Echocardiography (Lang et al., 2005). The animals were anaesthetized using 2% isoflurane mixed with 100% O_2 and they were set in a lateral decubitus position (45 deg angle). An ultrasound transmitted gel was applied to previously shaved rat chests,

and M-mode tracings were derived from a 2D-mode obtained from parasternal short-axis views of the left ventricle (LV) at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at the papillary muscle level) and apical (distal to the papillary muscle but before the final curve cavity).

Regarding the cardiac structural parameters, the following structural variables were measured: interventricular septum in diastole (IVSd, mm); interventricular septum in systole (IVSs, mm); left ventricular end-diastolic diameter (LVEdD, mm); left end-systolic diameter (LVEsD, mm); left ventricular posterior wall in diastole (LVPWd, mm); and left ventricular posterior wall in systole (LVPWs, mm). The measurements obtained were the means of at least three cardiac cycles on each of the three levels, and the final value of each rat was the mean of three described planes. Then the following secondary variables of the left ventricular systolic function were obtained: end-diastolic volume (LVEdV); end-systolic volume (LVEsV); left ventricular ejection fraction (EF); left fractional ventricular shortening (FS); relative wall thickness (RWT); and left ventricular end-diastolic diameter to body mass (LVEDD/body mass).

$$\text{LVEdV (ml)} = 1.047 \times (\text{LVEdD})^3$$

$$\text{LVEsV (ml)} = 1.047 \times (\text{LVEsD})^3$$

$$\text{LVEsV (ml)} = 1.047 \times (\text{LVEsD})^3$$

$$\text{EF (\%)} = \left[\frac{\text{LVEdV} - \text{LVEsV}}{\text{LVEdV}} \right] \times 100$$

$$\text{FS (\%)} = \frac{\text{LVEdD} - \text{LVEsD}}{\text{LVEdD}} \times 100$$

$$\text{RWT (mm)} = \frac{\text{IVSd} + \text{LVPWd}}{\text{LVEdD}}$$

$$\text{LVEDD/BW (mm/kg)} = \frac{\text{LVEDD}}{\text{Weight of Animal}}$$

For diastolic function, the measurements of the mitral diastolic flow by pulsed Doppler were obtained from the view in four cameras and the sample volume was positioned at the tip of the mitral valve in order to obtain the speed of the mitral diastolic flow, which was used to measure the peak velocities of E wave and A wave (cm s^{-1}), as well as the ratio between them (E/A ratio). In addition, heart rate was calculated using an average of the three consecutive interval cycles.

2.6 | Functional capacity tests and maximal oxygen uptake measurements

Four weeks after myocardial infarction surgery, the animals were adapted to the treadmill exercise and test environment for 1 week. Each adaptation session was 5 min day^{-1} , at 10 m min^{-1} speed, three times per week (Alves et al., 2017). In the next week, the rats were submitted to an incremental speed protocol of exercise to exhaustion. This maximal oxygen uptake exercise test was conducted using a small treadmill adapted for rats with a metabolic chamber linked to O_2 and CO_2 analyser (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brazil). The apparatus

enabled the continuous monitoring of oxygen uptake (\dot{V}_{O_2}) and carbon dioxide (\dot{V}_{CO_2}).

The protocol for the incremental maximal exercise test consisted of 5 m min^{-1} of speed increments every 3 min. The test was finished when maximal oxygen uptake ($\dot{V}_{\text{O}_{2\text{max}}}$) was reached, or the animal reached exhaustion. Detailed information about the experimental procedure was published by Capalunga et al. (2016). The animals underwent this maximal test before beginning the training and repeated it after 8 weeks.

2.7 | Maximum strength tests

A familiarization period for all animals was performed in the adapted squat apparatus (Alves, Nunes, Stefani, & Dal Lago, 2014). The familiarization period consisted of performing 5–10 repetitions at 40–60% of their body weight three times in one week.

To determine the maximum load raised in one repetition, the one repetition maximum test (1RM) was used. The percentage load for performing the training protocol was determined from the obtained value. In response to training, strength was increased, which made it necessary to carry out a new test every 2 weeks to adjust the training load.

2.8 | Resistance training protocol

The animals in the trained groups were submitted to a resistance training protocol. The rats were placed in a neoprene vest that left them in a bipedal position in the lower limbs. An electrical stimulus (45 mA, 0.3 s, 3 s intervals between each repetition) was applied to the rat tails through a surface electrode, which caused extension and flexion movements of the lower rat limbs, thus increasing the burden in the squat apparatus. This stimulation was of low intensity and did not causing any injury to the physical integrity of the animals (Tamaki, Uchiyama, & Nakano, 1992). All training sessions were performed in a dark room.

The duration of this training protocol was 8 weeks at a frequency of three times a week. Each training session consisting of four sets of 10 repetitions at 65–75% of 1 MR load and 90 s of rest between each series (Alves et al., 2014; Stefani et al., 2018). The training programme followed the recommendations of the American Physiological Society (2006).

2.9 | Aerobic training protocol

The aerobic training protocol was organized to occur on different days of the resistance training at the same time each day. The frequency of this training consisted of two times per week. Each training session had a duration of 45 min at 10 m min^{-1} . After 4 weeks of training, the training volume and intensity were adjusted to 45 min at 15 m min^{-1} (Alves et al., 2017). This adjustment was maintained until the completion of the 8 weeks of experimentation.

2.10 | Supplementation protocol

In this experiment, we supplemented two precursors of carnosine: β -alanine and L-histidine. Other non-supplemented groups received daily placebo solution via gavage (saline solution) for 8 weeks. The reason for supplementing with two amino acids and not carnosine was that carnosine synthesis has limiting factors. The standard ration used in Wistar rats generally has low concentrations of L-histidine, and β -alanine is absent. For this reason, we supplemented orally via gavage β -alanine (250 mg kg⁻¹ day⁻¹) and L-histidine (250 mg kg⁻¹ day⁻¹) daily for 8 weeks (Evrans et al., 2014; Russ et al., 2015) immediately after the exercise training session. This dosage increased the carnosine concentration in skeletal muscles by 160% (Everaert, Stegen, Vanheel, Taes, & Derave, 2013).

2.11 | Tissue collection

After the final experimental procedures in maximal exercise tests, the animals were anaesthetized with 2% isoflurane mixed with 100% O₂ and immediately killed by decapitation. In this study, the entire rat heart was collected, and the left and right ventricles, lungs, liver, gastrocnemius and soleus were separated.

2.12 | Morphological measurements

Cardiac hypertrophy (i.e. entire heart, left ventricle and right ventricle) was measured by the ratio to body weight (Alves et al., 2014; Fernandes et al., 2011; Nunes et al., 2015). The size of the infarct was determined by planimetry (Lindpaintner et al., 1993). Additionally, the ratio of gastrocnemius and soleus weight to body weight was determined to measure the proportionality of the tissues. The following equation was used to evaluate lung and liver congestion:

$$\text{Congestion (\%H}_2\text{O)} = \frac{(\text{Wet weight} - \text{Dry weight})}{(\text{Wet weight} \times 100)}$$

2.13 | Carnosine quantification in skeletal muscle

For confirmation of increase in carnosine content in target tissue (skeletal muscle), we measured carnosine concentration by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For this analysis we used approximately 80.0 mg of gastrocnemius. The muscles were homogenized in 0.1% formic acid. In order to extract low mass compounds, such as carnosine, we filtered the homogenate with a paper filter in contact with the homogenate supernatant. Low mass compounds were extracted by capillarization. After the extraction, the filtered homogenate was centrifuged at 15,339 g for 10 min at 4°C. The amino acid separation was performed on a Zorbax Phenyl-hexyl column (4.6 × 50 mm, 1.8 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), using a mobile phase consisted of (A) 0.1% AF and (B) 0.1% AF in acetonitrile, in gradient mode at flow rate of 0.6 ml min⁻¹, at 50 °C. The gradient started with 5% B, passing to 95% B after 3 min and returning to the start condition after 1 min. Carnosine was analysed using transitions m/z 227.3–156.4 and m/z 227.3–110.1 and m/z 156.2–110.1 and m/z 156.2–93.1. Each measurement was performed in triplicate. All results are expressed in μ g g⁻¹ of tissue.

2.14 | Statistical analysis

For sample size calculation, we used the minimum number of animals to conduct this experiment. To detect a minimum difference of 1.87 (g body weight⁻¹) and standard deviation of 0.85 for maximum strength as the main outcome (Alves et al., 2014), with a power of 90.0% and an error α of 5.0%, in a total of three groups the minimum number for each group is eight animals per group. For the sample calculation, SigmaPlot software version 12.0 for Windows Systat Software (San Jose, CA, USA) was used.

All data are presented in means \pm standard deviation (SD). To assess the normality of the variables included in the study, a D'Agostino–Pearson normality test was performed. To compare the experimental groups, a two-way ANOVA was conducted, followed by Holm–Sidak's *post hoc* test. The significance level was 5%. To further examine the statistical differences obtained, we performed Cohen's *D* test to measure the effect size (Wassertheil & Cohen, 2006), which was followed by a power analysis of the comparison. We considered a reliable power analysis of at least 80.0%. All statistical analyses were performed using SigmaPlot software version 12.0 for Windows, GraphPad Prism software version 7.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), and GPower software version 3.1.9.2 for Windows (University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany). All images and graphs were created using GraphPad Prism software version 7.0 for Windows.

3 | RESULTS

3.1 | Mortality

The mortality in myocardial infarction during or immediately after surgery was 44.44% ($n = 20$). No deaths were associated with adverse effects in the trained rats or in the rats that received the supplementation.

3.2 | The supplemented group increased less in weight over time

Every 2 weeks, the animals were weighed, and it was observed that all groups increased in weight compared with the initial evaluation of the same group ($P < 0.01$). The sedentary and combined trained group showed a similar weight curve increment ($P > 0.05$). However, the supplemented group demonstrated, starting in the second week of the experimental protocol, lower body weight compared with the sedentary group, which remained lower to the end of the experiment ($P < 0.01$). All results regarding body weight are shown in Figure 3.

3.3 | Morphological parameters unaffected by exercise training or amino acid supplementation

Regarding the infarcted area, all groups presented similar values of approximately 30% ($P > 0.05$). The sedentary, trained and supplemented groups showed similar results for pulmonary and liver

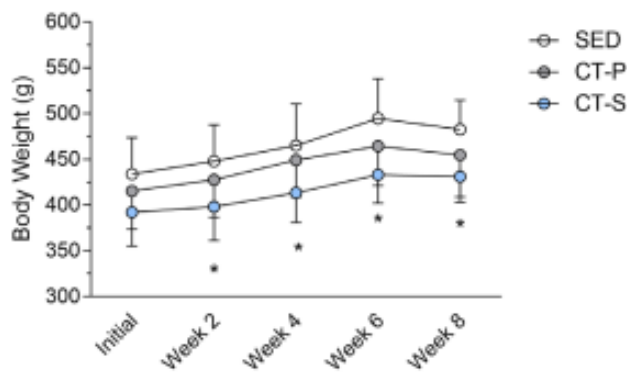


FIGURE 3 Body weight curve during the experimental period. SED ($n = 8$), animals with chronic heart failure kept in sedentary conditions; CT-P ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with placebo; CT-S ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with β -alanine and L-histidine. * $P < 0.05$ versus SED at the same time point

congestion ($P > 0.05$), as well as all heart weight to body weights (i.e. whole heart, left ventricle and right ventricle, $P > 0.05$). Additionally, soleus and gastrocnemius muscle weights to body weight showed no difference among the groups ($P > 0.05$). All morphological parameters are shown in Table 1.

3.4 | Carnosine content in skeletal muscle increased with β -alanine and L-histidine supplementation

Supplemented groups demonstrated higher carnosine content in gastrocnemius, compared to sedentary and trained groups ($P < 0.05$). The increase in carnosine concentration was approximately 70% higher in CT-S versus non-supplemented groups.

3.5 | Systolic and diastolic function unaffected by combined training or supplementation

In all parameters of the echocardiographic evaluation, all groups demonstrated similar values for systolic and diastolic function in the baseline evaluation before exercise training and supplementation

($P > 0.05$). After 8 weeks, other variables obtained from the echocardiographic evaluations were not affected by exercise training or supplementation. The results of all parameters are shown in Table 2.

3.6 | Exercise training combined with β -alanine and L-histidine supplementation increased functional capacity, $\dot{V}_{O_{2max}}$ and maximum strength

As shown in Figures 4 and 5, all animals showed no differences in all parameters of the functional capacity tests of the baseline evaluation ($P > 0.05$) as well as in \dot{V}_{O_2} ($P > 0.05$). This result demonstrated that the animals were similar in the baseline condition before both the combined exercise training and the β -alanine plus L-histidine supplementation. After 8 weeks of exercise training and supplementation, the CT-S group showed higher running distance, maximal velocity, time to exhaustion and $\dot{V}_{O_{2max}}$ in the maximal treadmill test compared with the SED group ($P < 0.05$). Moreover, the trained combined with supplementation group showed even higher running distance, time to exhaustion and $\dot{V}_{O_{2max}}$ in the maximal treadmill test compared with the CT-P group ($P < 0.05$).

Regarding the first evaluation of maximum strength, all groups showed no differences ($P > 0.05$). However, in the final 1RM test, the combined training group demonstrated higher maximum strength compared with its baseline 1RM test and the sedentary group ($P < 0.05$). Interestingly, the CT-S group showed even higher strength gain compared with its baseline test and the SED and CT-P groups ($P < 0.05$), which was further explained by higher strength gains over time ($P < 0.05$). The pattern of strength gain is illustrated in Figure 6, which shows the maximum strength in the first test compared with the second test as well as variations in the initial tests of strength gain.

4 | DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study is the first to show that associating carnosine precursor supplementation with combined

TABLE 1 Morphological parameters and carnosine content in skeletal muscle of experimental groups

Parameter	SED ($n = 8$)	CT-P ($n = 8$)	CT-S ($n = 8$)	P (ANOVA)
Infarcted area (%)	29.9 \pm 5.1	29.1 \pm 9.7	29.7 \pm 6.9	0.9704
H/BW (mg g^{-1})	2.4 \pm 0.2	2.6 \pm 0.4	2.6 \pm 0.2	0.2161
LV/BW (mg g^{-1})	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	0.1388
RV/BW (mg g^{-1})	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.6250
Pulmonary congestion (%)	82.1 \pm 2.5	80.7 \pm 1.2	82.2 \pm 2.3	0.2553
Hepatic congestion (%)	71.9 \pm 2.6	71.7 \pm 2.0	70.9 \pm 0.5	0.5294
Gastrocnemius (g kg^{-1})	4.8 \pm 0.6	5.0 \pm 0.5	5.3 \pm 0.3	0.1954
Soleus (g kg^{-1})	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.2124
Carnosine ($\mu\text{g g tissue}^{-1}$)	355.6 \pm 80.9	356.1 \pm 104.1	602.3 \pm 184.5*#	0.0164

Values are means \pm SD. Statistical analysis: two-way ANOVA, followed by Holm-Sidak's post hoc test. * $P < 0.05$ versus SED. # $P < 0.05$ versus CT-P. H/BW, heart weight to body weight ratio; LV/BW, left ventricle weight to body weight ratio; RV/BW, right ventricle weight to body weight ratio.

TABLE 2 Echocardiographic parameters of experimental groups

Parameter	SED (n = 8)		CT-P (n = 8)		CT-S (n = 8)		P (ANOVA)
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	
Heart rate (beats min ⁻¹)	403.8 ± 46.7	373.7 ± 38.5	398.0 ± 39.1	361.3 ± 27.7	392.7 ± 39.9	382.3 ± 45.1	0.8673
IVSd (mm)	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.4	0.5010
IVSs (mm)	2.5 ± 0.9	2.5 ± 0.6	2.3 ± 0.8	2.1 ± 0.8	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.7	0.6285
LVEsD (mm)	7.1 ± 1.2	8.2 ± 1.1	8.0 ± 1.9	9.0 ± 1.9	8.0 ± 1.3	8.2 ± 0.9	0.5238
LVPWd (mm)	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.15 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.6590
LVPWs (mm)	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.2	0.9670
LVEdD/BW	21.9 ± 2.2	19.5 ± 2.2	25.1 ± 5.6	22.4 ± 4.0	25.7 ± 3.8	22.1 ± 1.4	0.2268
EF (%)	52.3 ± 13.8	44.7 ± 13.3	39.9 ± 14.6	38.7 ± 15.5	42.4 ± 14.3	38.3 ± 12.8	0.4028
FS (%)	22.5 ± 7.6	18.3 ± 6.6	17.5 ± 7.2	15.6 ± 7.2	17.3 ± 7.1	15.2 ± 6.1	0.4718
RWT	3.3 ± 0.5	2.9 ± 0.4	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.6	3.1 ± 0.5	3.1 ± 0.4	0.7648
E (cm s ⁻¹)	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.9193
A (cm s ⁻¹)	± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2340
E/A	2.1 ± 0.5	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.5	2.0 ± 0.6	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.3	0.5451

Values are means ± SD. Statistical analysis: two-way ANOVA, followed by Holm–Sidak's post hoc test. Symbols represent the comparison between pre versus post within the same group. A, late peak velocity; E, maximal early diastolic peak velocity; EF, left ventricular ejection fraction; FS, left ventricular fractional shortening; IVSd, interventricular septum in diastole; IVSs, interventricular septum in systole; LVEdD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEdD/BW, left ventricular end-diastolic diameter to body weight ratio; LVEsD, left ventricular end-systolic diameter; LVPWd, left ventricular posterior wall in diastole; LVPWs, left ventricular posterior wall in systole.

exercise training increased functional capacity and maximum strength in rats with CHF. The evidence of this effect was provided by higher strength gains, running distance and time to exhaustion as well as an increase in $\dot{V}_{O_{2max}}$ in the supplemented group after 8 weeks of intervention.

We demonstrated that the supplemented animals gained less weight over time compared with the sedentary animals. We believe that this finding may be related to the increased volume of exercise, which was demonstrated by the enhancement in training thresholds after supplementation with β -alanine and histidine. No previous study has shown similar results of weight dynamics by supplementing β -alanine in healthy humans or animals (Hoffman, Gepner, & Cohen, 2019; Outlaw et al., 2016; Varanoske et al., 2018).

Regarding the morphological parameters (i.e. heart variables and infarcted area), we did not observe any difference in the trained groups of sedentary animals. Moreover, other morphological parameters, such as skeletal muscle weight, were not affected by the combined training or associated with carnosine precursor supplementation. Previous studies aimed to test whether in combining β -alanine with other leucine metabolites protein synthesis or breakdown mediators would be affected. One example is Russ et al. (2015), who sought to evaluate the effects of β -alanine associated with β -hydroxy- β -methyl butyrate (HMB) on muscle function. After 8 weeks, the aged rats showed no effect of combining β -alanine with HMB on protein synthesis or protein breakdown, which were measured by p70s6k phosphorylation and myostatin expression, respectively (Russ et al., 2015).

Only a scant amount of research has evaluated whether carnosine could modulate cardiac function. Zaloga and colleagues (1997) investigated the effects of carnosine in isolated rat hearts. In their study, the authors showed that carnosine increased heart contra-

tility in a controlled environment. The mechanisms underlying this phenomenon were explained by the increased Ca^{2+} concentration in cardiomyocytes sarcoplasm (Zaloga et al., 1997). It should be noted that no studies have been conducted to test whether carnosine could increase cardiac function in heart failure conditions. In the present study, we demonstrated that trained and supplemented animals did not improve systolic and diastolic dysfunction in CHF rats, which contrasts with the results of Zaloga et al. (1997). We believe that in the failing heart, carnosine might not be the most crucial factor that modulates the contractile properties of cardiac function.

The present study is not of a clinical nature, but one of the few investigations that used carnosine in CHF to evaluate the effects of carnosine supplementation on exercise performance and quality of life in patients with CHF is that of Lombardi et al. (2015). The authors showed that supplementation alone was able to improve distance in the 6-min walking test as well as in peak \dot{V}_{O_2} . In this investigation, compared with the control group, the results ranged from 4.0 to 16.0% in the exercise performance tests. In the present study using animals, we found even more significant gains in functional capacity tests and maximum strength tests. We believe that our results were more pronounced possibly because the rats were in a more controlled environment, and they underwent not only the supplementation protocol but also combined exercise training. It was expected that exercise would increase those variables. However, our findings corroborated those found in a human trial that used only supplementation as an intervention strategy (Lombardi et al., 2015).

In heart failure, exercise intolerance is commonly observed. We found a huge effect size in comparing carnosine precursor supplementation in rats with CHF for 8 weeks with rats that received a placebo with regard to both maximum strength and functional

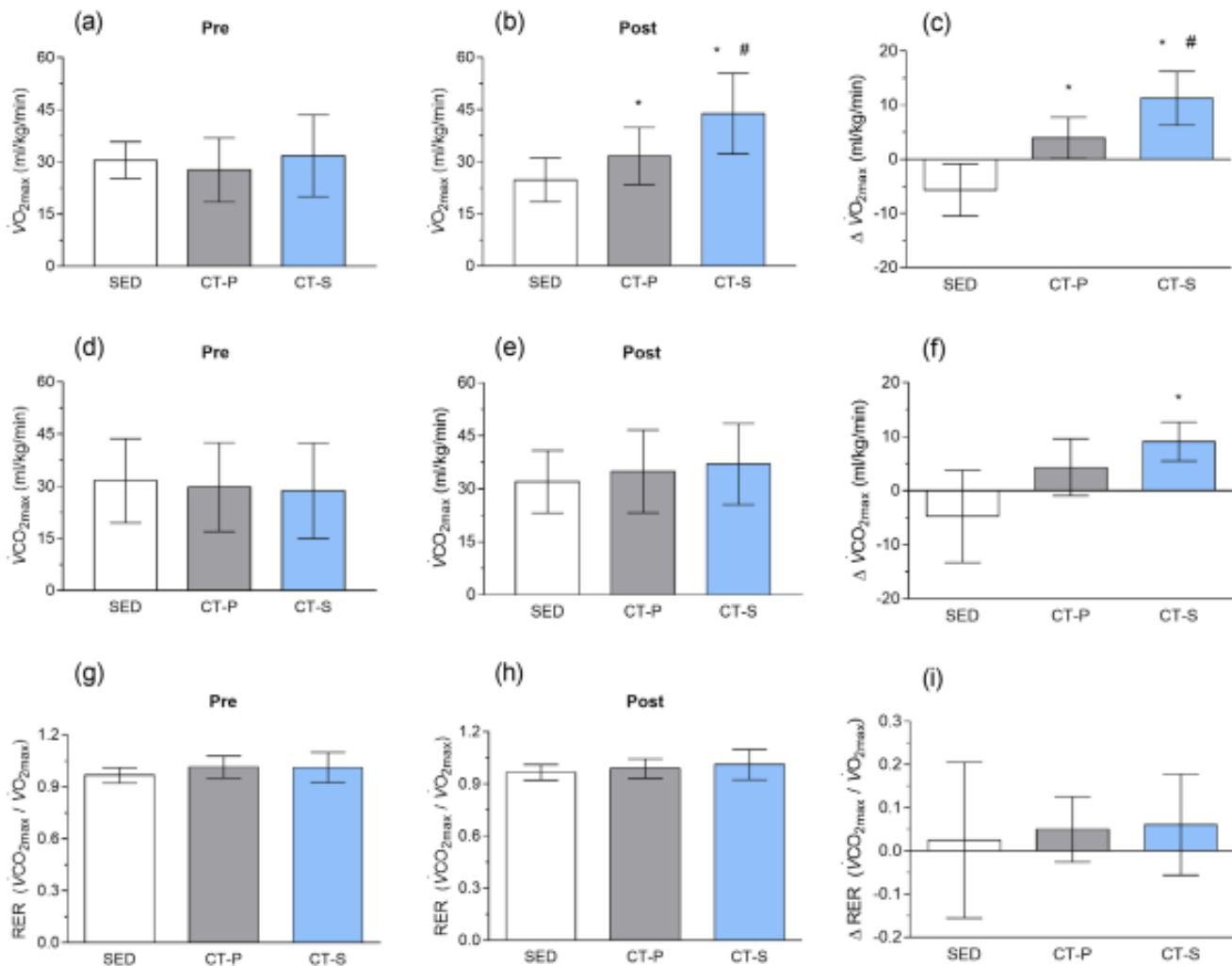


FIGURE 4 Oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$) and carbon dioxide production ($\dot{V}CO_{2max}$) variables pre- and post-experiment in rats with chronic heart failure. (a) $\dot{V}O_{2max}$ pre-experiment; (b) $\dot{V}O_{2max}$ post-experiment; (c) variation in $\dot{V}O_{2max}$ between pre- and post-experiment; (d) $\dot{V}CO_{2max}$ pre-experiment; (e) $\dot{V}CO_{2max}$ post-experiment; (f) variation in $\dot{V}CO_{2max}$ between pre- and post-experiment; (g) RER pre-experiment; (h) RER post-experiment; (i) variation in RER between pre- and post-experiment. SED ($n = 8$), animals with chronic heart failure kept in sedentary conditions; CT-P ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with placebo; CT-S ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with β -alanine and L-histidine. RER, respiratory exchange ratio; $\dot{V}O_{2max}$, maximal oxygen uptake; $\dot{V}CO_{2max}$, maximal carbon dioxide production. * $P < 0.05$ versus SED. # $P < 0.05$ versus CT-P

capacity in maximal exercise tests. The findings of ergogenic aid from supplementing β -alanine are not novel in all research fields. For instance, in sports nutrition, its supplementation has been well-documented and consistently tested in different conditions, sports and exercises (Bassinello et al., 2019; Bellinger & Minahan, 2016; Wang et al., 2019). In a robust systematic review performed by Saunders et al. (2017), a meta-analysis of 40 selected studies revealed that β -alanine was considered useful as an ergogenic aid in healthy humans. The supplementation of β -alanine, which is the limiting factor in carnosine biosynthesis in humans, was shown to be more effective in increasing exercise capacity than in increasing exercise performance. Additionally, in the same meta-analysis, β -alanine supplementation showed a larger effect size in improving exercise capacity in non-trained individuals compared with trained individuals. We believe that in this particular condition of CHF, β -alanine and L-histidine

supplementation in the dosage that we used may play a fundamental role in increasing carnosine content in skeletal muscles, thus increasing the exercise capacity after 8 weeks of combined training. Naderi et al. (2017) supplemented Wistar rats with a similar dosage of β -alanine and observed an increase of approximately 150% in carnosine content in skeletal muscles.

This study has limitations that should be considered in interpreting the results. We did not conduct biochemical analyses in this investigation. We believe that understanding the mechanisms of the synergistic effect of supplementation and combined exercise training may clarify the functions of carnosine in heart failure.

In conclusion, our findings indicate that 8 weeks of β -alanine and L-histidine supplementation associated with combined exercise training further enhanced the already observed benefits of physical exercise training in rats with CHF. The effect of supplementing β -alanine

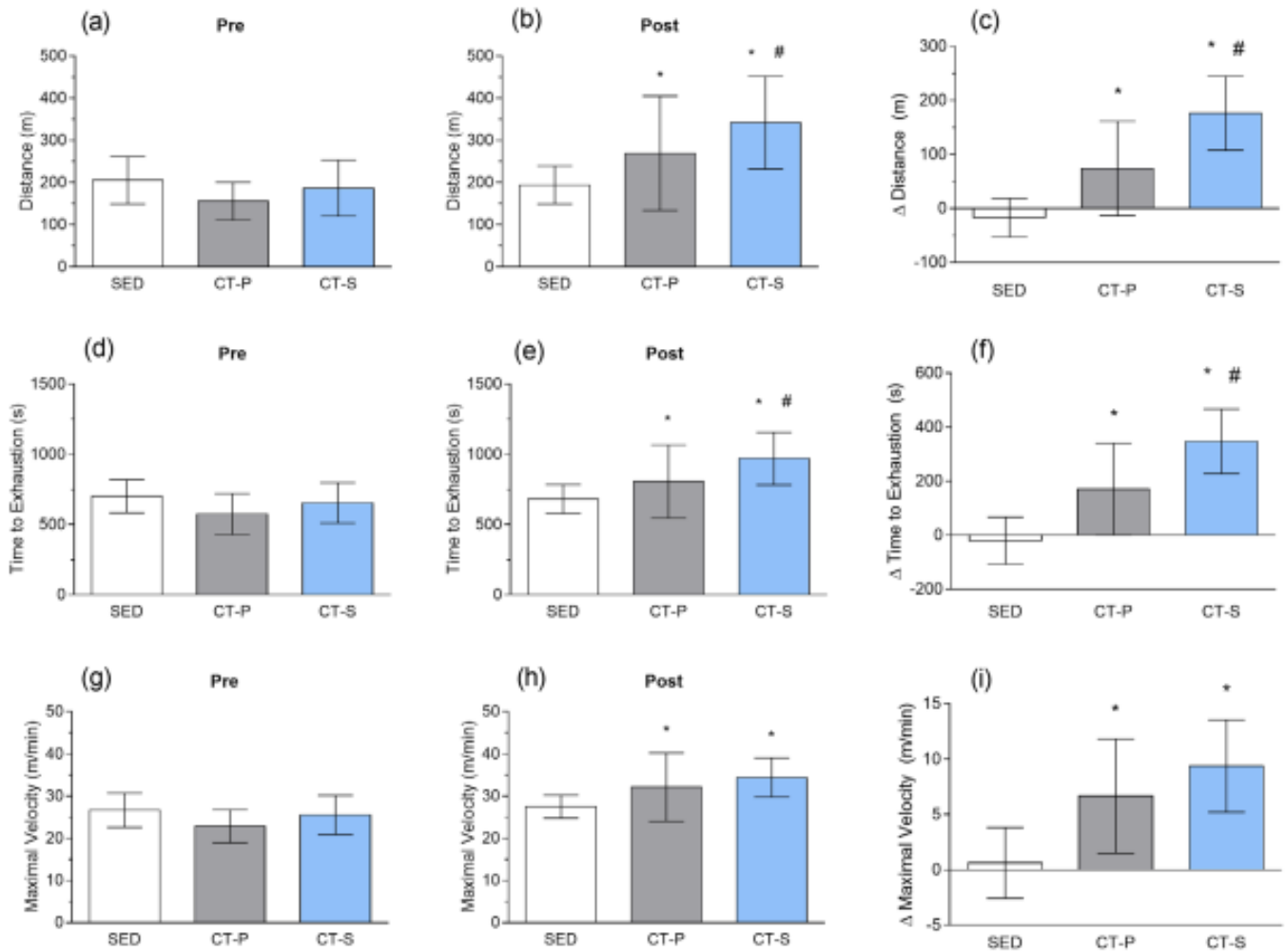


FIGURE 5 Functional capacity variables (i.e. distance, time to exhaustion and maximal velocity) pre- and post-experiment in rats with chronic heart failure. (a) Distance pre-experiment; (b) distance post-experiment; (c) variation in distance between pre- and post-experiment; (d) time to exhaustion pre-experiment; (e) time to exhaustion post-experiment; (f) variation in time to exhaustion between pre- and post-experiment; (g) maximal velocity pre-experiment; (h) maximal velocity post-experiment; (i) variation in maximal velocity between pre- and post-experiment. SED ($n = 8$), animals with chronic heart failure kept in sedentary conditions; CT-P ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with placebo; CT-S ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with β -alanine and L-histidine. * $P < 0.05$ versus SED. # $P < 0.05$ versus CT-P

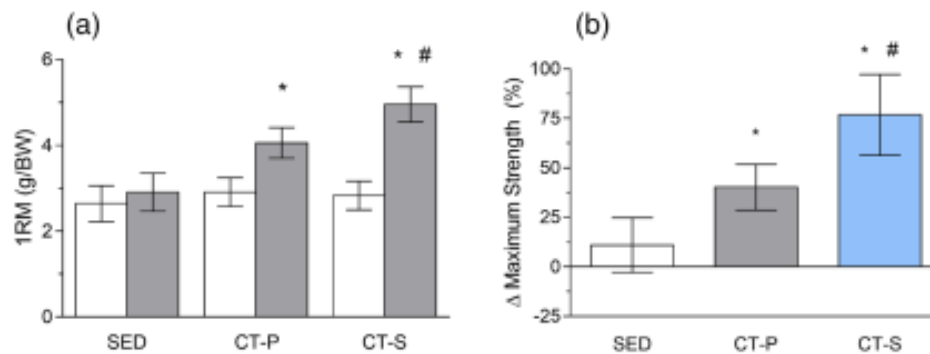


FIGURE 6 Maximum strength variables pre- and post-experiment in rats with chronic heart failure. (a) 1RM test relative to body weight comparison pre-experiment and post-experiment; (b) variation in maximum strength between pre- and post-experiment. SED ($n = 8$), animals with chronic heart failure kept in sedentary conditions; CT-P ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with placebo; CT-S ($n = 8$), animals with chronic heart failure submitted to combined training in strength and aerobic exercise supplemented with β -alanine and L-histidine; 1RM, one repetition maximum test. * $P < 0.05$ versus SED. # $P < 0.05$ versus CT-P

and L-histidine was more pronounced peripherally than centrally, which was due to the increased exercise capacity and increased maximum strength, with no changes in echocardiographic parameters. Further studies are necessary to evaluate whether associating endurance training with strength training and β -alanine and L-histidine supplementation could improve other biochemical and molecular parameters in heart failure conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof. Maria Martha Campos, PhD and Mr Gabriel Rübensam, MSc for the support in carnosine content analysis.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

COMPETING INTERESTS

None.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.P.S. and P.L. conceived and designed the research. G.P.S., L.C. and L.R.S. performed the experiments. G.P.S., L.C. and L.R.S. analysed data. G.P.S., L.C., L.R.S. and P.L. interpreted results of the investigation. G.P.S. and L.C. drafted the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

ORCID

Pedro Dal Lago  <https://orcid.org/0000-0001-9907-7689>

REFERENCES

- Abshire, M., Xu, J., Baptiste, D., Almansa, J. R., Xu, J., Cummings, A., ... Dennison Himmelfarb, C. (2015). Nutritional interventions in heart failure: A systematic review of the literature. *Journal of Cardiac Failure*, 21(12), 989–999.
- Alves, J. P., Nunes, R. B., Ferreira, D. C., Stefani, G. P., Jaenisch, R. B., & Lago, P. (2017). High-intensity resistance training alone or combined with aerobic training improves strength, heart function and collagen in rats with heart failure. *American Journal of Translational Research*, 9, 5432–5441.
- Alves, J. P., Nunes, R. B., Stefani, G. P., & Dal Lago, P. (2014). Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: Experimental model of heart failure. *PLoS ONE*, 9(10), e110317.
- Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., ... Ziaeian, B. (2019). 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: executive summary. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(10), 1376–1414.
- Bassinello, D., de Salles Painelli, V., Dolan, E., Lixandrão, M., Cajueiro, M., de Capitani, M., ... Roschel, H. (2019). Beta-alanine supplementation improves isometric, but not isotonic or isokinetic strength endurance in recreationally strength-trained young men. *Amino Acids*, 51(1), 27–37.
- Bellinger, P. M., & Minahan, C. L. (2016). Metabolic consequences of β -alanine supplementation during exhaustive supramaximal cycling and 4000-m time-trial performance. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41(8), 864–871.
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, 93(4), 1803–1845.
- Booth, F. W., Roberts, C. K., Thyfault, J. P., Rueggsegger, G. N., & Toedebusch, R. G. (2017). Role of inactivity in chronic diseases: evolutionary insight and pathophysiological mechanisms. *Physiological Reviews*, 97(4), 1351–1402.
- Capalonga, L., Karsten, M., Hentschke, V. S., Rossato, D. D., Dornelles, M. P., Souza, A., ... Dal Lago, P. (2016). Light-emitting diode therapy (LEDT) improves functional capacity in rats with heart failure. *Lasers in Medical Science*, 31, 937–944.
- Cicero, A. F. G., & Colletti, A. (2017). Nutraceuticals and dietary supplements to improve quality of life and outcomes in heart failure patients. *Current Pharmaceutical Design*, 23(8), 1265–1272.
- Derave, W., Everaert, I., Beeckman, S., & Baguet, A. (2010). Muscle carnosine metabolism and β -alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Medicine*, 40, 247–263.
- Dharmarajan, K., & Rich, M. W. (2017). Epidemiology, pathophysiology, and prognosis of heart failure in older adults. *Heart Failure Clinics*, 13(3), 417–426.
- Everaert, I., Stegen, S., Vanheel, B., Taes, Y., & Derave, W. (2013). Effect of beta-alanine and carnosine supplementation on muscle contractility in mice. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 45(1), 43–51.
- Evran, B., Karpuzoğlu, H., Develli, S., Betül Kalaz, E., Soluk-Tekkeşin, M., Olğaç, V., ... Uysal, M. (2014). Effects of carnosine on prooxidant-antioxidant status in heart tissue, plasma and erythrocytes of rats with isoproterenol-induced myocardial infarction. *Pharmacological Reports*, 66(1), 81–86.
- Fernandes, T., Hashimoto, N. Y., Magalhães, F. C., Fernandes, F. B., Casarini, D. E., Carmona, A. K., ... Oliveira, E. M. (2011). Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory microRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*, 58(2), 182–189.
- Grundy, D. (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*. *Experimental Physiology*, 100(7), 755–758.
- Hentschke, V. S., Capalonga, L., Rossato, D. D., Perini, J. L., Alves, J. P., Quagliotto, E., ... Lago, P. D. (2017). Functional capacity in a rat model of heart failure: Impact of myocardial infarct size. *Experimental Physiology*, 102(11), 1448–1458.
- Hoffman, J. R., Gepner, Y., & Cohen, H. (2019). β -Alanine supplementation reduces anxiety and increases neurotrophin expression in both young and older rats. *Nutrition Research*, 62, 51–63.
- Jaenisch, R. B., Stefani, G. P., Durante, C., Chechi, C., Hentschke, V. S., Rossato, D. D., ... Dal Lago, P. (2017). Respiratory muscle training decreases diaphragm DNA damage in rats with heart failure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(3), 221–226.
- Kregel, K. C. A. D., Booth, F. W., Fleshner, M. R., Henriksen, E. J., Musch, T. I., O'Leary, D. S., Parks, C. M., Poole, D. C., Ra'anan, A. W., Sheriff, D. D., Sturek, M. S., Toth, L. A. (2006). *Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols*. Bethesda: American Physiological Society.
- Kumral, A., Giriş, M., Soluk-Tekkeşin, M., Olğaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., Türkoğlu, U., & Uysal, M. (2015). Beneficial effects of carnosine and carnosine plus Vitamin E treatments on doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac, hepatic, and renal toxicity in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 35(6), 635–643.

- Lang, R. M., Bierig, M., Devereux, R. B., Flachskampf, F. A., Foster, E., Pellikka, P. A., ... Stewart, W. J. (2005). Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 18(12), 1440-1463.
- Lindpaintner, K., Niedermajer, N., Schieffer, B., Just, H., Ganten, D., & Drexler, H. (1993). Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 25(2), 133-143.
- Lombardi, C., Carubelli, V., Lazzarini, V., Vizzardi, E., Bordonali, T., Ciccarese, C., ... Metra, M. (2015). Effects of oral administration of orodispersible levo-carnosine on quality of life and exercise performance in patients with chronic heart failure. *Nutrition*, 31(1), 72-78.
- Lopachev, A. V., Lopacheva, O. M., Abaimov, D. A., Koroleva, O. V., Vladychenskaya, E. A., Erukhimovich, A. A., & Fedorova, T. N. (2016). Neuroprotective effect of carnosine on primary culture of rat cerebellar cells under oxidative stress. *Biochemistry*, 81, 511-520.
- McCarty, M. F., & DiNicolantonio, J. J. (2014). β -Alanine and orotate as supplements for cardiac protection. *Open Heart*, 1, e000119.
- Naderi, A., Sadeghi, M., Sarshin, A., Imanipour, V., Nazeri, S. A., Farkhayi, F., & Willems, M. E. T. (2017). Muscle carnosine concentration with the co-ingestion of carbohydrate with β -alanine in male rats. *Journal of Dietary Supplements*, 14(4), 373-379.
- Nunes, R. B., Alves, J. P., Kessler, L. P., Dornelles, A. Z., Stefani, G. P., & Lago, P. D. (2015). Interval and continuous exercise enhances aerobic capacity and hemodynamic function in CHF rats. *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 19(4), 257-263.
- Outlaw, J. J., Smith-Ryan, A. E., Buckley, A. L., Urbina, S. L., Hayward, S., Wingfield, H. L., ... Wilborn, C. D. (2016). Effects of β -alanine on body composition and performance measures in collegiate women. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 30(9), 2627-2637.
- Piepoli, M. F., Hoes, A. W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A. L., ... Verschuren, W. M. M. (2017). 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Giornale Italiano Di Cardiologia*, 18(7), 547-612.
- Rogers, C., & Bush, N. (2015). Heart failure: Pathophysiology, diagnosis, medical treatment guidelines, and nursing management. *Nursing Clinics of North America*, 50(4), 787-799.
- Russ, D. W., Acksel, C., Boyd, I. M., Maynard, J., McCorkle, K. W., Edens, N. K., & Garvey, S. M. (2015). Dietary HMB and β -alanine co-supplementation does not improve in situ muscle function in sedentary, aged male rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(12), 1294-1301.
- Saunders, B., Elliott-Sale, K., Artioli, G. G., Swinton, P. A., Dolan, E., Roschel, H., ... Gualano, B. (2017). β -Alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*, 51, 658-669.
- Stefani, G. P., Marmett, B., Alves, J. P., Moller, G. B., Heck, T. G., Frizzo, M. N., ... Rhoden, C. R. (2018). Resistance training and L-arginine supplementation are determinant in genomic stability, cardiac contractility and muscle mass development in rats. *PLoS ONE*, 13(9), e0204858.
- Tamaki, T., Uchiyama, S., & Nakano, S. (1992). A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 24(8), 881-886.
- Tanai, E., & Frantz, S. (2016). Pathophysiology of heart failure. *Comprehensive Physiology*, 6(1), 187-214.
- Taylor, R. S., Sagar, V. A., Davies, E. J., Briscoe, S., Coats, A. J. S., Dalal, H., ... Mordi, I. R. (2014). Exercise-based rehabilitation for heart failure. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), CD003331.
- Taylor, R. S., Walker, S., Smart, N. A., Piepoli, M. F., Warren, F. C., Ciani, O., ... Yeh, G. Y. (2019). Impact of exercise rehabilitation on exercise capacity and quality-of-life in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(12), 1430-1443.
- Varanoske, A. N., Wells, A. J., Kozlowski, G. J., Gepner, Y., Frosti, C. L., Boffey, D., ... Hoffman, J. R. (2018). Effects of β -alanine supplementation on physical performance, cognition, endocrine function, and inflammation during a 24 h simulated military operation. *Physiological Reports*, 6(24), e13938.
- Wang, R., Fukuda, D. H., Hoffman, J. R., La Monica, M. B., Starling, T. M., Stout, J. R., ... Hu, Y. (2019). Distinct effects of repeated-sprint training in normobaric hypoxia and β -alanine supplementation. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(2), 149-161.
- Wang, Z. Q., Peng, X., Li, K., & Wu, C. J. J. (2019). Effects of combined aerobic and resistance training in patients with heart failure: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Nursing and Health Sciences*, 21(2), 148-156.
- Wassertheil, S., & Cohen, J. (2006). Statistical power analysis for the behavioral sciences. *Biometrics*, 26(3), 588.
- Weiss, K., Schär, M., Panjra, G. S., Zhang, Y., Sharma, K., Bottomley, P. A., ... Weiss, R. G. (2017). Fatigability, exercise intolerance, and abnormal skeletal muscle energetics in heart failure. *Circulation: Heart Failure*, 10(7), e004129.
- Zaloga, G. P., Roberts, P. R., Black, K. W., Lin, M., Zapata-Sudo, G., Sudo, R. T., & Nelson, T. E. (1997). Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 272(1), H462-H468.

How to cite this article: Stefani GP, Capalunga L, da Silva LR, Lago PD. β -Alanine and L-histidine supplementation associated with combined training increased functional capacity and maximum strength in heart failure rats. *Experimental Physiology*. 2020;1-11. <https://doi.org/10.1113/EP088327>

6 ARTIGO 2

**EXERCISE TRAINING ASSOCIATED WITH CARNOSINE PRECURSOR
SUPPLEMENTATION INCREASES MAXIMAL STRENGTH AND $\dot{V}O_{2max}$ IN RATS
WITH HEART FAILURE THROUGH THE HSP72, ATP1a2, AND ATP2a2
MODULATION IN THE SKELETAL MUSCLE**

(A ser submetido ao periódico *European Journal of Heart Failure*)

Fator de Impacto: 11,627. Qualis (Educação Física): A1

Exercise training associated with carnosine precursor supplementation increases maximal strength and $\dot{V}O_2$ in rats with heart failure through the HSP72, ATP1a2, and ATP2a2 modulation in the skeletal muscle

Giuseppe Potrick Stefani^{a,b}, Lucas Capalonga^a, Lucas Ribeiro da Silva^a, Thiago Gomes Heck^c, Matias Nunes Frizzo^c, Lucas Machado Sulzbacher^c, Maicon Machado Sulzbacher^c, Diovana de Batista^c, Samlai Vedovatto^d, Ana Paula Santin Bertoni^d, Márcia Rosângela Wink^d, Pedro Dal Lago^{a,1}

^aLaboratory of Experimental Physiology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bSchool of Health and Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cResearch Group in Physiology, Postgraduate Program in Integral Attention to Health (PPGAIS-UNIJUÍ/UNICRUZ), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ), Ijuí, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dLaboratory of Cell Biology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding Author

Pedro Dal Lago, ScD

e-mail: pdallago@ufcspa.edu.br

Address: Rua Sarmiento Leite, 245. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Zip-code: 90050-170

Tel: +55 51 3303-8820

Fax: +55 51 3303-8820

Total word: 3,010 words

Abstract

Aims: Combined exercise training (CET) has been associated with positive responses in the clinical status of patients with heart failure (HF). Other nonpharmacological tools, such as amino acid supplementation, may further enhance its adaptation. In the present study, the aim was to test whether CET associated with supplementing carnosine precursors could present better responses in the functional capacity and biochemical variables of rats with HF.

Methods and Results: Twenty-one male Wistar rats were subjected to myocardial infarction and allocated to three groups: sedentary (SED, n=7), CET supplemented with placebo (CET-P, n=7), and CET with HF supplemented with β -alanine and L-histidine (CET-S, n=7). The trained animals were submitted to a strength protocol three times per week. Aerobic training was conducted twice per week. The supplemented group received β -alanine and L-histidine orally (250 mg/kg per day). Functional capacity was higher in the CET-P group than that in the SED group and even higher in the CET-S group than that in the CET-P group ($P < 0.01$). CET was able to improve the functional capacity, but the supplementation was shown to enhance these parameters even further in rats with HF. CET-S showed lower oxidative stress and inflammation markers and higher heat shock protein and ATP1a2 and ATP2a2 mRNA expression in the skeletal muscle compared to SED.

Conclusion: CET together with β -alanine and L-histidine supplementation in rats with HF can elicit adaptations in both functional capacities and biochemical parameters. Carnosine may influence beneficial adjustments in the cell stress response in the skeletal muscle and upregulate the mRNA expression of calcium transporters.

Keywords: Carnosine, Heart Failure, Exercise

Introduction

Heart failure (HF) embodies a complex syndrome in which the heart reduces its cardiac output, thus diminishing blood supply to other tissues^{1,2}. Patients with HF generally demonstrate exercise intolerance³. Nonpharmacological therapies have been shown to be effective in counteracting several factors of HF, such as exercise training⁴. Physical exercise training can increase functional capacity, quality of life, and survival in patients with HF⁵.

Despite the advancements in exercise training in HF, patients often remain with poor quality of diet in both hospitalized and non-hospitalized scenarios⁶⁻⁸. For this reason, few supplements have been investigated to enhance the effectiveness of other nonpharmacological tools^{9,10}. Carnosine is an emerging supplement that shows potential in treating chronic disorders. Additionally, it has been consistently investigated in sports nutrition and demonstrated positive results in exercise capacity¹¹.

Nevertheless, studies investigating the effects of carnosine supplementation on HF are scarce. Therefore, the present study aimed to evaluate the impact of associating combined exercise training (CET) with carnosine precursor supplementation (β -alanine and L-histidine) on functional capacity and molecular markers of skeletal and cardiac muscle function, as well as its influence on the gene expression of ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -transporting isoforms (ATP1a2 and ATP2a2), ryanodine receptor, and creatine kinase, which are involved in strength generation in rats with HF.

Material and Methods

Detailed methods are described in Supplementary Methods S1.

Cardiorespiratory test

Four weeks after myocardial infarction surgery, the animals were adapted to the treadmill exercise and test environment for one week. In the next week, the rats were subjected to an incremental speed protocol of exercise to exhaustion. The protocol for the incremental maximal exercise test consisted of 5 m/min of speed increments every 3 min. The test was terminated when $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ was reached or the animal reached exhaustion. Detailed information about the experimental procedure is published in¹². The animals underwent this maximal test before beginning the training and repeated it after eight weeks.

Maximal strength test

A familiarization period for all animals was performed in the adapted squat apparatus¹³. The familiarization period consisted of performing 5 to 10 repetitions at 40%–60% of their body weight three times per week. To determine the maximum load raised in one repetition, the one-repetition maximum test (1RM) was used. The percentage load for performing the training protocol was determined from the obtained value. In response to training, strength was increased, which made it necessary to carry out a new test every two weeks to adjust the training load.

Strength and aerobic training protocols

The animals in the trained groups were subjected to combined exercise training (CET). In this training, the animals were subjected to a strength training protocol as described elsewhere¹⁴. The duration of this training protocol was eight weeks at a frequency of three times a week, alternating strength training session with aerobic training on the following day. Each training session consisted of four sets of 10 repetitions at 65%–75% of 1RM load and 90 s of rest between each series^{13,14}. The frequency of aerobic training consisted of two times per week. Each training session had a duration of 45 min at 10 m/min. After four weeks of training, the training volume and intensity were adjusted to 45 min at 15 m/min¹⁵. This adjustment was maintained until the completion of the eight weeks of experimentation.

Amino acid supplementation protocol

In this experiment, we supplemented two precursors of carnosine: β -alanine and L-histidine. We supplemented orally via gavage β -alanine (250 mg/kg/day, 99.8% of purity) and L-histidine (250 mg/kg/day, 98.8% of purity) diluted in 1.0 mL of distilled water daily for eight weeks¹⁶ immediately after the exercise training session. The dosage was adjusted weekly due to the weight gain of the animals. The trained group without amino acid supplementation (CET-P) received a placebo (saline solution) of 1.0 mL of distilled water daily for eight weeks.

Quantification of carnosine, β -alanine, and L-histidine content

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determined carnosine, β -alanine, and L-histidine levels in the tissues of interest. For this analysis, we used approximately 80 mg of skeletal muscle (gastrocnemius) and left ventricle (non-

infarcted area). Each analysis was performed in triplicates. All results are expressed in $\mu\text{g/g}$ of tissue.

Biochemical and molecular analysis

Biochemical analysis, such as markers of liver and kidney function, markers of oxidative stress, as well as expression of 72 kDa heat shock proteins (HSP72), pro and anti-inflammatory cytokines, were performed in plasma, skeletal muscle and left ventricle. More information can be found at Supplementary Methods S1.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). To assess the normality of the variables included in the study, the D'Agostino-Pearson normality test was performed. To compare the experimental groups, a two-way ANOVA was conducted, followed by Tukey's post hoc test for parametric variables. The significance level was set at 5%. To further examine the statistical differences obtained, we performed Cohen's D test to measure the effect size¹⁷, which was followed by a power analysis of the comparison. We considered a reliable power analysis of at least 80%. All statistical analyses were performed using Sigma plot software version 12.0 for Windows (San Jose, California, USA), GraphPad Prism software version 7.0 for Windows (San Diego, California, USA), and GPower software version 3.1.9.2 for Windows (University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany). All images and graphs were created using GraphPad Prism software version 7.0 for Windows (San Diego, California, USA).

Results

Morphological and biochemical parameters were not altered among groups

The mortality rate in this study was 46.6%. All of the deaths were related to post-surgery complications. After the experiments, no difference was observed in all morphological variables among groups ($P > 0.05$). All groups demonstrated similar infarcted areas ($P > 0.05$) and water percentage in the liver ($P > 0.05$) and in the lungs ($P > 0.05$). Trained groups did not change cardiac mass or skeletal muscle mass (soleus and gastrocnemius) compared to the control group ($P > 0.05$). Biochemical analyses performed in

plasma showed no changes among groups ($P > 0.05$). Table 1 shows the variables regarding the morphological and biochemical parameters of the different experimental groups.

Combined training associated with β -alanine and L-histidine supplementation did not alter echocardiographic variables

Figure 1A, 1B, 1C, 1D, and 1E shows the echocardiographic variables before and after the experimental period. Systolic variables (ejection fraction and the fraction of shortening) demonstrated no difference among groups before experiments ($P > 0.05$) and after eight weeks of exercise training and supplementation ($P > 0.05$). Diastolic variables (E, A, and E/A) also showed no difference between groups both before and after the experimental period ($P > 0.05$).

Combined training associated with β -alanine and L-histidine supplementation increases maximal strength and maximal oxygen uptake in rats with HF

According to Figure 1F, in the first maximal strength test, all groups showed similar results ($P > 0.05$). After four weeks of combined training, the supplemented group demonstrated higher strength gains compared to the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 4.502, huge effect, 99.98% of power), with no difference between the trained group supplemented with placebo ($P > 0.05$). In the last maximal strength test, trained groups showed higher strength gains than the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 2.791, huge effect, 99.98% of power). However, the supplemented group with β -alanine and L-histidine showed even more pronounced strength than the CET-P group ($P < 0.05$; effect size = 5.032, huge effect, 99.99% of power).

Before the beginning of combined training and amino acid supplementation, all groups showed similar results regarding $\dot{V}O_{2\max}$ and $\dot{V}CO_{2\max}$ ($P > 0.05$). After eight weeks of CET with β -alanine and L-histidine supplementation, the $\dot{V}O_{2\max}$ in rats with HF increased compared to the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 1.728, very large effect, 99.34% of power). No difference was found among groups in both $\dot{V}CO_{2\max}$ in the last cardiorespiratory test ($P > 0.05$). The findings regarding cardiopulmonary tests are shown in Figure 1G and 1H.

β -Alanine and L-histidine supplementation leads to an increase in the skeletal muscle carnosine content

After completing eight weeks of supplementation with carnosine precursors, an increase of approximately 50% in carnosine content in the skeletal muscle (gastrocnemius) was observed in the CET-S group compared to that in the other groups ($P < 0.05$; effect size = 1.730, very large effect, 98.35% of power). However, no difference was observed in carnosine content in the heart among groups ($P > 0.05$). Regarding the β -alanine and L-histidine content in the gastrocnemius and heart, all groups showed similar content in both tissues ($P > 0.05$). These results are shown in Figure 2.

Supplementation alters cytokine content in the skeletal muscle and plasma

Figure 3 demonstrates that trained groups had lower interleukin (IL)-6 levels in plasma ($P < 0.05$; effect size = 2.509, huge effect, 99.02% of power), but the supplemented group showed higher IL-10 level ($P < 0.05$; effect size = 2.037, huge effect, 93.73% of power) and lower IL-6/IL-10 ratio in plasma, compared to that in the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 2.056, huge effect, 94.12% of power). In addition, the supplemented group had lower IL-6 levels in the gastrocnemius than that in the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 3.028, huge effect, 99.93% of power). Gastrocnemius IL-10 content was also lower in the supplemented group than that in the SED group ($P < 0.05$; effect size = 3.753, huge effect, 99.99% of power). However, no difference among groups was observed in the IL-6/IL-10 ratio in the gastrocnemius muscle ($P > 0.05$).

Carnosine increases iHSP72 expression in the skeletal muscles, but not in plasma and cardiac muscle

To better understand the mechanism involved in the improvement promoted by amino acid supplementation, we analyzed heat shock proteins (HSPs) in the plasma, skeletal muscle, and left ventricle of animals (Figure 2). In Figure 2E, we observed higher intracellular HSP72 (iHSP72) expression in the skeletal muscle in the CET-S group than that in the SED group ($P < 0.05$; effect size = 2.860, huge effect, 99.82 % of power). As shown in Figure 2M, we also found higher iHSP70 expression in the heart muscle in trained groups than that in the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 2.771, huge effect, 99.72% of power). No difference was observed in plasma extracellular HSP72 (eHSP) levels among groups ($P > 0.05$), as shown in Figure S1. Moreover, eHSP/iHSP ratios for skeletal and heart muscles were similar among groups ($P > 0.05$) (Figure 2F and Figure 2N).

Carnosine shows antioxidant effects in plasma and skeletal muscles, but not in cardiac muscles

Oxidative stress parameters are shown in Figure 2. Trained groups presented a lower malondialdehyde (MDA) concentration in plasma, compared to that in the SED group ($P < 0.05$; effect size = 1.628, very large effect, 79.85% of power), as shown in Figure S2. Interestingly, the supplemented group showed lower lipoperoxidation in the skeletal muscle compared to the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 1.531, very large effect, 74.85% of power). However, no difference among groups was found in the heart muscle MDA content ($P > 0.05$). In addition, we found no difference among groups regarding superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the skeletal muscle ($P > 0.05$).

Combined exercise training associated with carnosine increases mRNA expression of ATP1a2 and ATP2a2 in the skeletal muscle of rats with HF

We analyzed the mRNA expression of possible candidate genes that could be involved in the elevation of the functional capacity observed in the trained and supplemented groups. The findings concerning mRNA expression are shown in Figure 4. We found that ATP1a2 and ATP2a2 were significantly expressed in the skeletal muscle in the CET-S group compared with those in the sedentary group ($P < 0.05$; effect size = 1.538, very large effect, 75.21% of power). No difference was observed in ATP2a2 mRNA expression in the heart muscle among groups ($P > 0.05$). RyR2 mRNA in both skeletal and heart muscles showed no difference among groups ($P > 0.05$), as well as CKM mRNA ($P > 0.05$).

Discussion

In this study, we showed the novelty that not only β -alanine and L-histidine supplementation, but also their association with CET, improved the functional capacity of rats with HF. We found that β -alanine and L-histidine supplementation associated with combined exercise training increased carnosine content in the skeletal muscle, which could in turn influence the physiological, biochemical, molecular, and transcriptional parameters in HF conditions.

The supplemented group with β -alanine and L-histidine showed higher strength gains and a notable increase in $\dot{V}O_{2\max}$ after eight weeks of the experimental period. Our investigation demonstrated that only after eight weeks, a considerably long period for neural

adaptations to resistance training, the trained and supplemented groups showed higher strength gains than that in the CET-P group. The findings of the present study converge with the results of Everaert et al. (2013). This experiment demonstrated that healthy mice supplemented with β -alanine showed higher contractile properties, such as improvement of the force-frequency relationship of fast-twitch muscles (extensor digitorum longus). Besides higher contractile properties, the researchers demonstrated that isolated soleus muscle of long-term supplemented mice reduced fatigability¹⁶. The authors hypothesized that calcium handling or increased sarco-/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity could explain these findings.

Neither supplementation nor combined training was effective in significantly altering biochemical parameters in the plasma of rats with HF in our study. In a different approach, Evran et al. (2014) tested whether myocardial damage and markers in the plasma of oxidative stress could be prevented by treating Sprague-Dawley rats with carnosine. The authors found that increasing doses of carnosine (250 mg/kg/day, i.p.) decreased aspartate aminotransferase in plasma¹⁸. However, in our study, we evaluated the long-term effects of associating β -alanine and L-histidine supplementation with exercise training. The investigation mentioned above tested the effects of carnosine administration in the short term (12 days).

In addition, we showed that the combination of supplementation with aerobic and strength training did not alter the morphological and echocardiographic parameters of infarcted rats. However, an interesting study showed that intravenous administration of carnosine with adriamycin increased the heart contractile properties of rats¹⁹. It is plausible that the mechanisms involved in HF in our study compared to the abovementioned investigation differ drastically and, thus, modify the effectiveness of antioxidants in the genesis of left ventricular dysfunction. One key point interesting to compare the study of Özdoğan et al. (2011) with our study is that in our investigation, we did not observe an increase in carnosine content in heart muscle after supplementation. However, the previous study injected carnosine into the bloodstream, which could elicit the different mechanisms of action of the dipeptide in cardiomyocytes.

Supplementation of β -alanine and L-histidine showed an anti-inflammatory effect in plasma of rats with HF. The supplemented group presented a lower IL-6/IL-10 ratio in plasma, but also lower levels of IL-6 and IL-10 in the skeletal muscle. We believe that IL-10 in the muscle may have been exported since we observed increased levels of IL-10 in the plasma of the supplemented group. Previous studies also demonstrated that carnosine reduced pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-8, and myeloperoxidase activity during

sepsis²⁰ and carcinogenesis²¹. However, in HF condition, no research has been conducted to compare the findings of our experiments.

Higher iHSP72 levels in the gastrocnemius were found in supplemented rats. We hypothesize that carnosine increases iHSP72 expression in the skeletal muscle and participates in lowering oxidative stress and pro-inflammatory cytokine concentration by signaling protective cell stress response. Few studies have shown that carnosine increases HSP70 expression, which is associated with tissue protection^{22,23}. However, most of the studies that observed this scenario are related to an anti-ulcer drug, which is a chelating compound (zinc and L-carnosine), and none observed increased HSP72 expression in the skeletal muscle.

We showed lower lipid peroxidation in plasma and skeletal muscle in the supplemented group. The explanation for this phenomenon is probably the antioxidant activity of carnosine. Several studies have shown similar results of supplementing or administering carnosine and diminishing oxidative stress in rats²⁴⁻²⁶.

Our investigation showed notable increases in functional capacity. To understand the possible mechanisms that could be involved in this phenomenon, we performed mRNA expression of possible genes that could influence these findings. Higher ATP1a2 and ATP2a2 mRNA expression in the skeletal muscle were found in combined training with supplementation. We believe that strength gains observed in our study may be related to increased calcium sensitivity by increased SERCA activity in the skeletal muscle. Mishima et al. (2008) performed an interesting investigation that tested enriched histidine dipeptides for five weeks and tested sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in rats. The authors found that increased carnosine content in the skeletal muscle was able to increase the Ca²⁺ uptake rate to SERCA²⁷. Despite our findings regarding mRNA expression, little is known about the synergistic effect in the skeletal muscle during aerobic exercise with strength exercise combined with β -alanine and L-histidine supplementation.

The present study presents a few limitations regarding mechanistic investigation, such as measurement of SERCA activity in the skeletal muscle, as well as other molecular pathways that could be involved in strength adaptation signaling. Additionally, we analyzed only one type of skeletal muscle (gastrocnemius). We believe that including different types of fibers, such as predominantly oxidative fibers, could enlighten our findings.

In summary, we demonstrated that associating aerobic training with strength training and with β -alanine and L-histidine supplementation in rats with HF can elicit interesting adaptations in both functional capacities and molecular and biochemical parameters.

Carnosine may influence positive adaptations in cell stress response in the skeletal muscle and upregulate the mRNA expression of calcium transport. These findings are summarized in Figure 5. Finally, these findings suggest a promising strategy for future studies aiming to attenuate exercise intolerance in HF patients.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Declaration of competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Professor Maria Martha Campos, PhD, and Mister Gabriel Rübensam, MSc, for their support in the amino acid analysis.

References

1. Melenovsky V, Andersen MJ, Andress K, Reddy YN, Borlaug BA. Lung congestion in chronic heart failure: Haemodynamic, clinical, and prognostic implications. *Eur J Heart Fail* 2015;**17**:1161–1171.
2. Grassi G, Quarti-Trevano F, Esler MD. Sympathetic activation in congestive heart failure: an updated overview. *Heart Fail Rev* United States; 2019;1–10.
3. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Løchen ML, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, Worp HB van der, Dis I van, Verschuren WMM. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice). *G Ital Cardiol (Rome)*

- 2017;**18**:547–612.
4. Taylor RS, Walker S, Smart NA, Piepoli MF, Warren FC, Ciani O, Whellan D, O'Connor C, Keteyian SJ, Coats A, Davos CH, Dalal HM, Dracup K, Evangelista LS, Jolly K, Myers J, Nilsson BB, Passino C, Witham MD, Yeh GY. Impact of Exercise Rehabilitation on Exercise Capacity and Quality-of-Life in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2019;**73**:1430 LP-1443.
 5. Taylor RS, Sagar VA, Davies EJ, Briscoe S, Coats AJS, Dalal H, Lough F, Rees K, Singh SJ, Mordi IR. Exercise-based rehabilitation for heart failure. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014.
 6. Tuttolomondo A, Raimondo D Di, Casuccio A, Velardo M, Salamone G, Cataldi M, Corpora F, Restivo V, Pecoraro R, Corte V Della, Maida C, Simonetta I, Cirrincione A, Vassallo V, Pinto A. Mediterranean diet adherence and congestive heart failure: Relationship with clinical severity and ischemic pathogenesis. *Nutrition United States*; 2019;**70**:110584.
 7. Uysal H, Oz Alkan H, Enc N, Yigit Z. Assessment of Dietary Habits in Patients With Chronic Heart Failure. *J Nurs Res China (Republic : 1949-)*; 2019;
 8. Abshire M, Xu J, Baptiste D, Almansa JR, Xu J, Cummings A, Andrews MJ, Dennison Himmelfarb C. Nutritional Interventions in Heart Failure: A Systematic Review of the Literature. *J. Card. Fail.* 2015.
 9. Cicero AFG, Colletti A. Nutraceuticals and Dietary Supplements to Improve Quality of Life and Outcomes in Heart Failure Patients. *Curr Pharm Des* 2017;
 10. McCarty MF, DiNicolantonio JJ. β -Alanine and orotate as supplements for cardiac protection. *Open Hear* 2014;
 11. Saunders B, Elliott-Sale K, Artioli GG, Swinton PA, Dolan E, Roschel H, Sale C, Gualano B. β -Alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: A systematic review and meta-Analysis. *Br. J. Sports Med.* 2017.
 12. Capalunga L, Karsten M, Hentschke VS, Rossato DD, Dornelles MP, Sonza A, Bagnato VS, Ferraresi C, Parizotto NA, Dal Lago P. Light-emitting diode therapy (LEDT) improves functional capacity in rats with heart failure. *Lasers Med Sci* 2016;
 13. Alves JP, Nunes RB, Stefani GP, Lago PD, Chen X. Resistance Training Improves Hemodynamic Function, Collagen Deposition and Inflammatory Profiles: Experimental Model of Heart Failure. *PLoS One* 2014;
 14. Stefani GP, Marmett B, Alves JP, Moller GB, Heck TG, Frizzo MN, Domenico M Di, Motta GA, Lago PD, Nunes RB, Rhoden CR. Resistance training and L-arginine

- supplementation are determinant in genomic stability, cardiac contractility and muscle mass development in rats. *PLoS One* 2018;**13**.
15. Alves JP, Nunes RB, Ferreira D da C, Stefani GP, Jaenisch RB, Dal Lago P. High-intensity resistance training alone or combined with aerobic training improves strength, heart function and collagen in rats with heart failure. *Am J Transl Res* 2017;**9**:5432–5441.
 16. Everaert I, Stegen S, Vanheel B, Taes Y, Derave W. Effect of beta-alanine and carnosine supplementation on muscle contractility in mice. *Med Sci Sports Exerc* 2013;
 17. Wassertheil S, Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. *Biometrics* 2006;**26**:588.
 18. Evran B, Karpuzoğlu H, Develi S, Betül Kalaz E, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effects of carnosine on prooxidant-antioxidant status in heart tissue, plasma and erythrocytes of rats with isoproterenol-induced myocardial infarction. *Pharmacol Reports* 2014;
 19. Ozdogan K, Taskin E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats. *Anadolu Kardiyol Dergisi/The Anatol J Cardiol* 2011;
 20. Sun C, Wu Q, Zhang X, He Q, Zhao H. Mechanistic Evaluation of the Protective Effect of Carnosine on Acute Lung Injury in Sepsis Rats. *Pharmacology* 2017;
 21. Fouad AA, Qutub HO, Rashed AS Al, Al-Melhim WN. Therapeutic effect of carnosine in rat model of experimental liver carcinogenesis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;
 22. Mikami KI, Otaka M, Watanabe D, Goto T, Endoh A, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K, Sato M, Shibuya T, Segawa D, Kataoka E, Yoshino R, Takeuchi S, Sato W, Odashima M, Watanabe S. Zinc L-carnosine protects against mucosal injury in portal hypertensive gastropathy through induction of heat shock protein 72. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;
 23. Qin Y, Naito Y, Handa O, Hayashi N, Kuki A, Mizushima K, Omatsu T, Tanimura Y, Morita M, Adachi S, Fukui A, Hirata I, Kishimoto E, Nishikawa T, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N, Kokura S, Yoshikawa T. Heat shock protein 70-dependent protective effect of polaprezinc on acetylsalicylic acid- induced apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr* 2011;
 24. Elbarbary NS, Ismail EAR, El-Naggar AR, Hamouda MH, El-Hamamsy M. The effect of 12 weeks carnosine supplementation on renal functional integrity and oxidative

- stress in pediatric patients with diabetic nephropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Pediatr Diabetes* 2018;
25. Caruso G, Fresta C, Musso N, Giambirtone M, Grasso M, Spampinato S, Merlo S, Drago F, Lazzarino G, Sortino M, Lunte S, Caraci F. Carnosine Prevents A β -Induced Oxidative Stress and Inflammation in Microglial Cells: A Key Role of TGF- β 1. *Cells* 2019;
 26. Aydın AF, Bingül İ, Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Doğru Abbasoğlu S, Uysal M. Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol* 2017;
 27. Mishima T, Yamada T, Sakamoto M, Sugiyama M, Matsunaga S, Maemura H, Shimizu M, Takahata Y, Morimatsu F, Wada M. Chicken breast attenuates high-intensity-exercise-induced decrease in rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2008;

Figure Legends

Figure 1: Echocardiographic parameters and functional variables of rats with heart failure before and after the experimental period. **A.** Ejection fraction of left ventricle. **B.** Fraction of left ventricle shortening. **C.** E (maximal early diastolic peak velocity). **D.** A (late peak velocity). **E.** E/A ratio. **F.** Maximum strength measured by one-repetition maximum (1RM). **G.** Maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2\max}$). **H.** Maximal carbon dioxide production ($\dot{V}CO_{2\max}$). Data are in mean \pm SD. * = $P < 0.05$ compared to SED; # $P < 0.05$ compared to CET-P

Figure 2: Carnosine and amino acid content and molecular and oxidative stress analysis in skeletal and cardiac muscles. **A.** Carnosine content in the gastrocnemius. **B.** β -Alanine content in the gastrocnemius. **C.** L-Histidine content in the gastrocnemius. **D.** Malondialdehyde (MDA) concentration in the gastrocnemius. **E.** Intracellular HSP72 (iHSP72) concentration in the gastrocnemius evaluated by ELISA, as described in material and methods section. **F.** Extracellular HSP72 (eHSP72) with iHSP72 ratio in the gastrocnemius evaluated by ELISA, as described in material and methods section. **G.** Superoxide dismutase (SOD) activity in the gastrocnemius. **H.** Catalase (CAT) activity in the gastrocnemius. **I.** Carnosine content in the left ventricle. **J.** β -Alanine content in the left ventricle. **K.** L-Histidine content in the left ventricle. **L.** Malondialdehyde (MDA) concentration in the left ventricle. **M.** Intracellular HSP72 (iHSP72) concentration in the left ventricle evaluated by ELISA, as described in material and methods section. **N.** eHSP72/iHSP72 ratio in the gastrocnemius evaluated by ELISA, as described in material and methods section. **O.** Chromatogram of all compounds in LC-MS/MS. Data are in mean \pm SD. * = $P < 0.05$ compared to SED; # $P < 0.05$ compared to CET-P

Figure 3: Cytokine concentration in plasma and skeletal muscle. **A.** Interleukin 6 (IL-6) concentration in plasma. **B.** IL-6 concentration in the gastrocnemius. **C.** IL-10 concentration in plasma. **D.** IL-10 concentration in the gastrocnemius. **E.** IL-6/IL-10 ratio in plasma. **F.** IL-6/IL-10 ratio in the gastrocnemius. Data are in mean \pm SD. * = $P < 0.05$ compared to SED

Figure 4: Real-time qPCR analysis in the skeletal muscle and the left ventricle. **A.** mRNA expression gel of different primers used in assessed tissues. **B.** ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -transporting 1 (ATP1a2) mRNA melting curve. **C.**

ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-transporting 2 (ATP2a2) mRNA melting curve. **D.** Creatine kinase MM isoform (CKM) mRNA melting curve. **E.** Ryanodine receptor 2 (RyR2) mRNA melting curve. **F.** ATP1a2 mRNA expression in the gastrocnemius. **G.** ATP2a2 mRNA expression in the gastrocnemius. **H.** ATP2a2 mRNA expression in the left ventricle. **I.** RyR2 mRNA expression in the gastrocnemius. **J.** RyR2 mRNA expression in the left ventricle. **K.** CKM mRNA expression in the gastrocnemius. **L.** CKM mRNA expression in the left ventricle. Data are in mean \pm SD. * = $P < 0.05$ compared to SED

Figure 5: Mechanistic overview of carnosine effects associated with combined exercise training in rats with heart failure

Figure 1

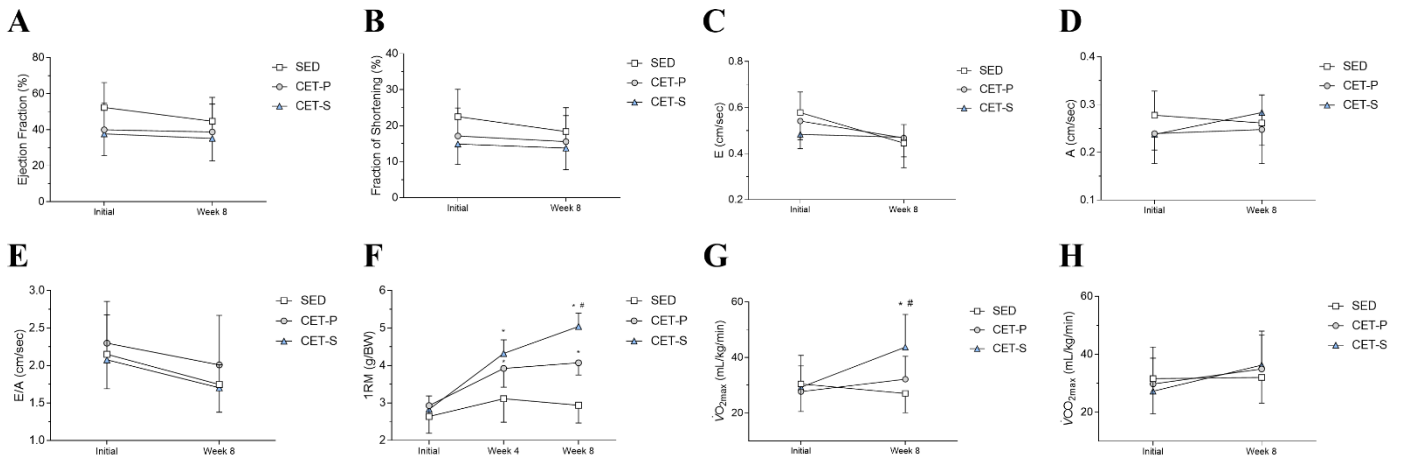


Figure 2

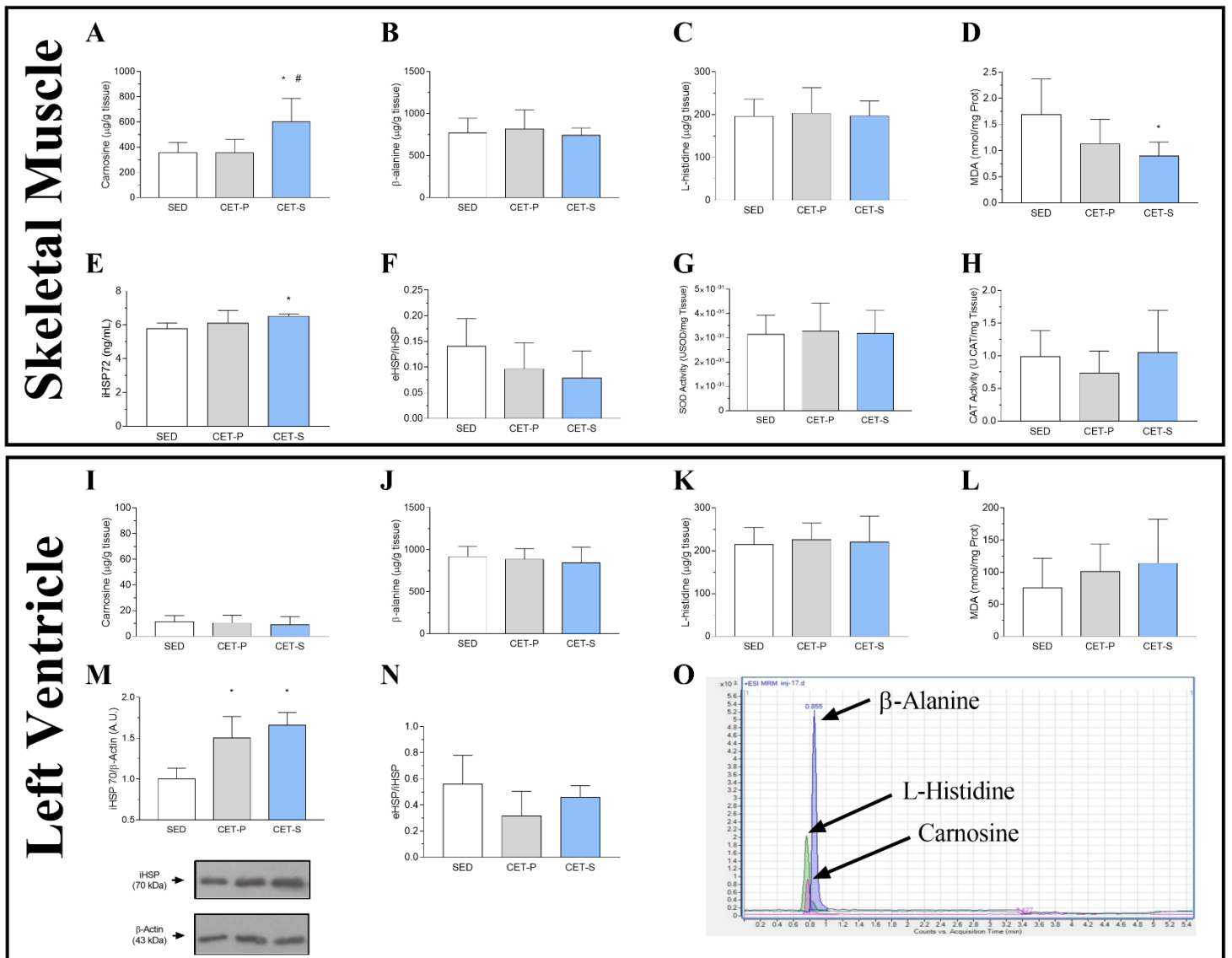


Figure 3

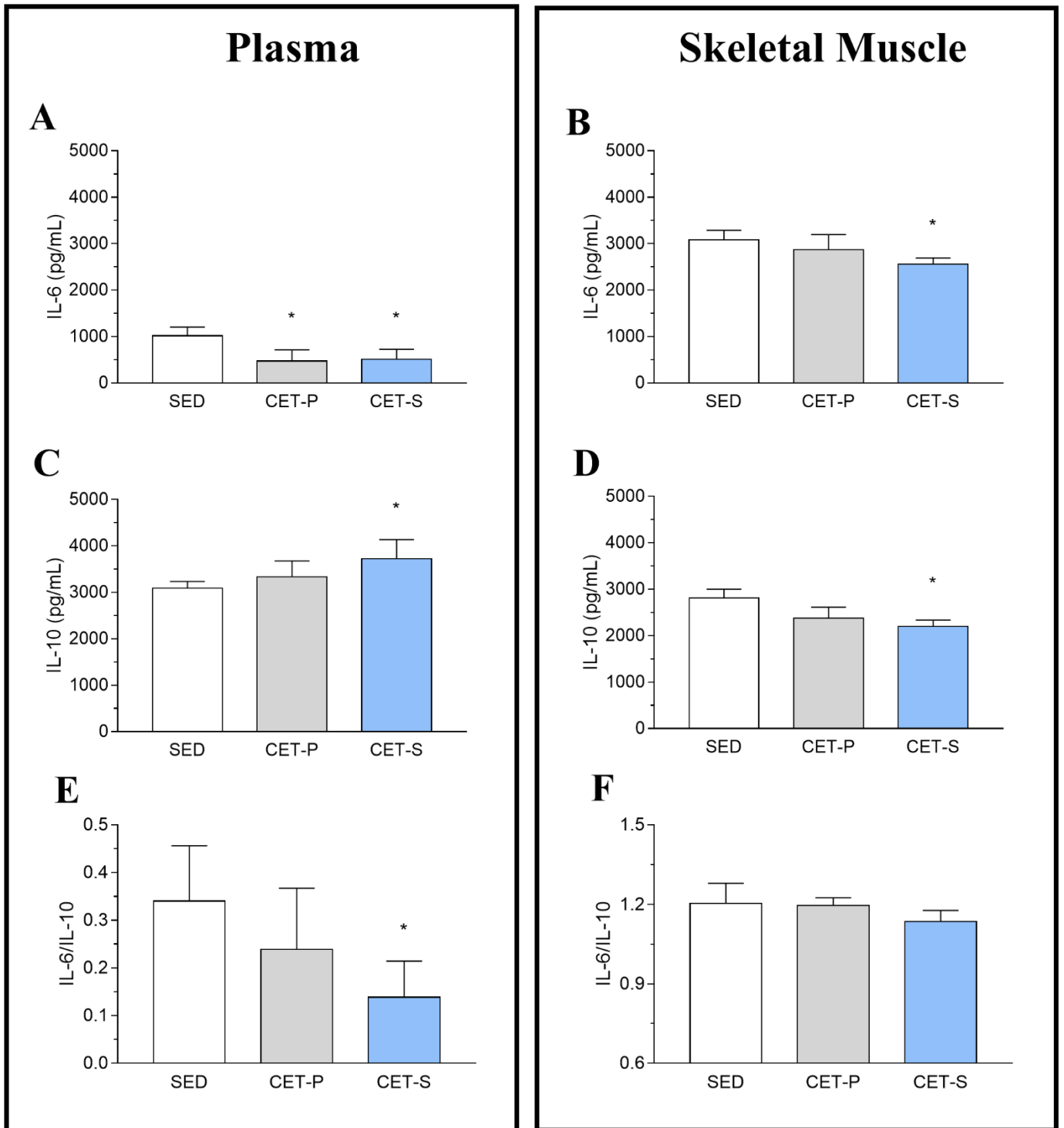


Figure 4

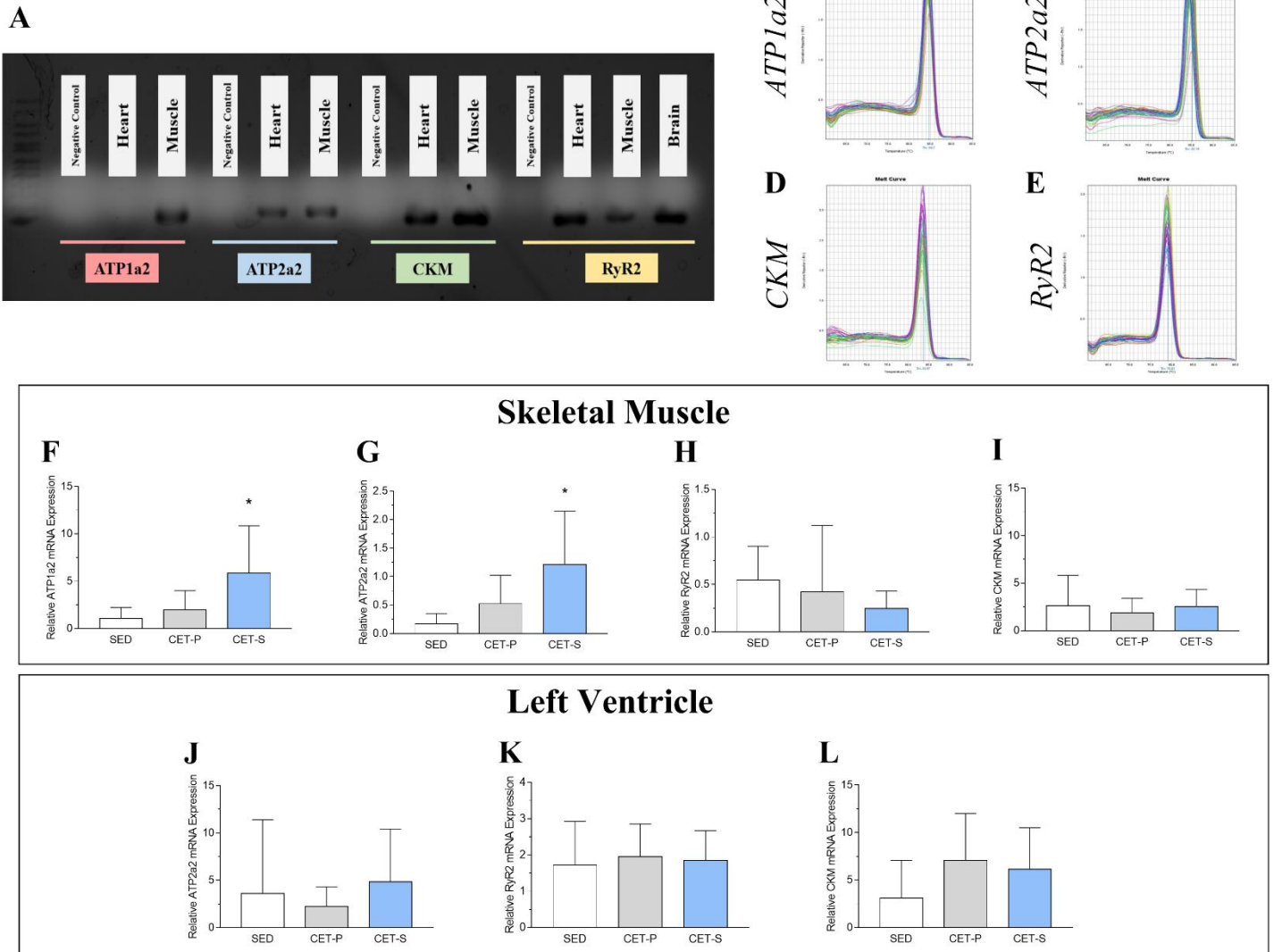
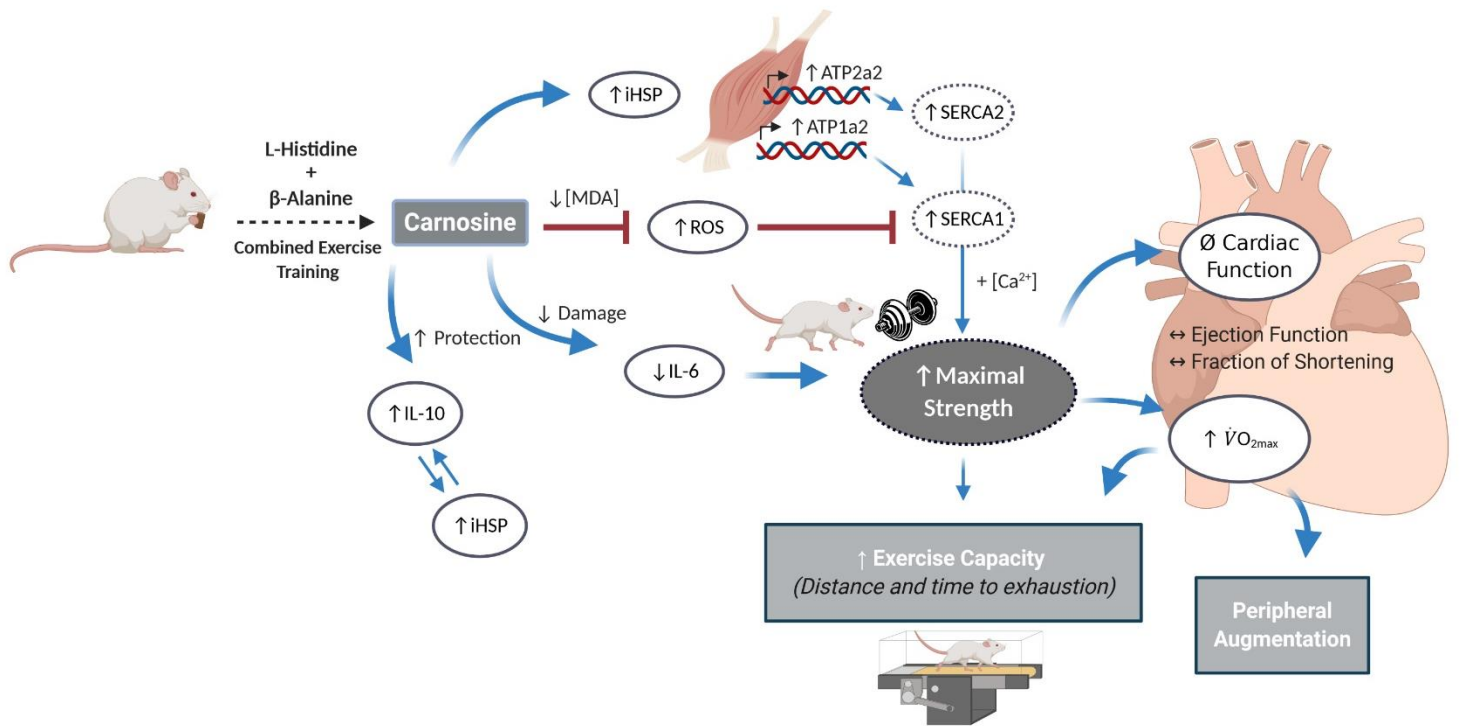


Figure 5



Created with BioRender.com

TABLES

Table 1: Morphological parameters of experimental groups.

Parameter	SED (n=7)	CET-P (n=7)	CET-S (n=7)	P Value (ANOVA)
Infarcted Area (%)	30.82 ± 5.21	33.15 ± 9.51	31.02 ± 6.67	0.8433
H/BW (mg/g)	2.44 ± 0.19	2.73 ± 0.46	2.59 ± 0.22	0.3557
LV/BW (mg/g)	1.91 ± 0.12	2.09 ± 0.21	1.99 ± 0.13	0.1999
RV/BW (mg/g)	0.58 ± 0.12	0.65 ± 0.28	0.67 ± 0.11	0.7521
Pulmonary Congestion (%)	82.56 ± 2.45	80.31 ± 1.02	82.34 ± 2.71	0.1354
Hepatic Congestion (%)	70.59 ± 0.32	72.12 ± 2.48	70.91 ± 0.46	0.1893
Gastrocnemius (g/kg)	4.92 ± 0.55	5.18 ± 0.42	5.23 ± 0.23	0.4003
Creatinine (mg/dL)	0.60 ± 0.01	0.61 ± 0.08	0.61 ± 0.07	0.9349
Urea (mg/dL)	61.67 ± 6.02	57.83 ± 6.24	59.17 ± 5.63	0.5426
Triglycerides (mg/dL)	60.20 ± 8.52	75.30 ± 19.72	75.83 ± 13.59	0.1931
Total cholesterol (mg/dL)	55.50 ± 6.25	61.83 ± 9.66	57.33 ± 6.89	0.3702
AST (UI/L)	196.00 ± 46.17	173.80 ± 33.07	222.50 ± 66.62	0.2784
ALT (UI/L)	61.83 ± 14.27	57.50 ± 9.43	56.67 ± 17.10	0.7921
GGT (UI/L)	1.83 ± 1.16	1.50 ± 0.83	1.33 ± 0.51	0.6163

Abbreviations: ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; GGT: γ -glutamyltranspeptidase; H/BW: heart weight-to-body weight ratio; LV/BW: left ventricle weight-to-body weight ratio; RV/BW: right ventricle weight-to-body weight ratio. Values in mean \pm SD. Statistical analysis: two-way ANOVA. followed by Holm-Sidak's *post hoc* test.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Methods (S1)

Ethical approval

The investigation conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1985) and the principles and regulations of preclinical studies described by ARRIVE protocol ¹. The Committee of Animal Ethics of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre approved the protocol of this study (approval number 198/16).

Animals

Male Wistar rats (n = 21) weighing between 220 and 300 g (approximately 70–90 days of age) were selected for the study. We allocated the animals into three different groups: sedentary rats with heart failure (SED, n = 7), combined exercise-trained rats with heart failure supplemented with placebo (CET-P, n = 7), combined exercise-trained rats with heart failure supplemented with β -alanine and L-histidine (CET-S, n = 7). In two analyses, one sample of one animal per group was lost. Also, one rat from the CET-S group showed a lower myocardial infarction area (< 20 %). For this reason, we excluded these animals for this investigation. The results present in this study are related to animals that were part of a previous experiment that evaluated parameters of functional capacity. In this investigation, we seek to understand the mechanisms involved in the observed outcomes.

All animals were kept in standard breeding conditions. They were kept in a room without significant noise under a 12–12 h light-dark cycle at 22 °C and were separated in two or three animals per cage. All rats were obtained from the Animal Breeding Unit of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. The animals received water and food *ad libitum*. The composition of standard chow contained 22% proteins, 61% sugars, 4% fat, 7% fibers, 1% vitamins, 5% minerals. The diet provided a low concentration of L-histidine (0.04%) and did not provide β -alanine in the diet.

Experimental protocol

In this experiment, the animals were submitted to myocardial infarction, and after four weeks, echocardiography was performed to confirm heart failure. After this period, the

animals were adapted to the treadmill and strength training apparatus and further evaluated by two maximal tests: maximum strength and functional capacity. In the sixth week, the trained groups initiated the combined exercise training (i.e., strength training associated with continuous aerobic training) with supplementation by β -alanine and L-histidine in the supplemented group. The procedures were eight weeks in duration, and they occurred at the same time of the day in each training session. Finally, the animals were again evaluated by echocardiography, maximum strength, and functional capacity tests. In following the week, the animals were euthanized. Their tissue was collected, and their morphological measurements were taken.

Animal model of heart failure

To induce heart failure, the animals were subjected to coronary artery ligation surgery before the experimental treatments. The animals were anaesthetized using 2% isoflurane mixed with 100% O₂ at a breathing rate of 60 breaths/min. The myocardial infarction model followed the same procedure as previously described in previous studies conducted in our laboratory^{2,3} After myocardial infarction, the animals recovered for four weeks to induce cardiac remodelling. The same researcher performed all the surgeries.

Echocardiography

To confirm myocardial infarction, the animals underwent non-invasive echocardiography before initiating physical exercise training and supplementation. Additionally, the echocardiography was performed after the experimental period (48 hours before the last functional capacity test). The echocardiographic examination followed the recommendations of the American College of Echocardiography⁴. The method of echocardiographic evaluation and measurements as described elsewhere⁵. All echocardiographic assessments and analyses were performed by the same researcher, who was blinded to the group allocation of the animals.

Tissue collection and morphologic measurements

After the final experimental procedures in maximal exercise tests, the animals were anaesthetized and killed by decapitation. In this study, the entire rat heart was collected, and the left and right ventricles, lungs, liver, and gastrocnemius were separated. All organs were immediately frozen with liquid nitrogen and kept at - 80 °C for further analysis.

Cardiac hypertrophy (i.e., entire heart, left ventricle, and right ventricle) was measured by the ratio to bodyweight^{6,7}. The size of the infarct was determined by planimetry⁸. Additionally, the ratio of gastrocnemius weight-to-body weight was determined to measure the proportionality of the tissues. The liver and lungs of each animal were weighted and then dehydrated (80 °C) for 48 hours. After this period, the tissues were weighed again to determine water content⁹.

Biochemical, molecular and oxidative stress analyses

It was used plasma for determining the concentrations of urea, creatinine, total cholesterol, triglycerides, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyltranspeptidase (GGT). The analyses were performed by spectrophotometry, using commercial kits of Labtest, following the recommendations of the manufacturer, in a semi-automatic apparatus (Metrolab DR 1600, Wiener).

For oxidative stress markers, we performed TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) in plasma, gastrocnemius, and the heart. SOD (superoxide dismutase) and CAT (catalase) activities were assessed in gastrocnemius. The details regarding methodological procedures of homogenization, reaction, and determination were described elsewhere¹⁰. All analyses were performed in a spectrophotometer. TBARS protocol comprises the formation of malondialdehyde (MDA) in nanomoles per milligram of protein (nmol MDA/mg Prot). SOD and CAT activities are expressed in units of the enzyme per milligram of tissue (U SOD/mg tissue and U CAT/mg tissue, respectively).

Interleukin 6 (IL-6) and interleukin 10 (IL-10) were measured in plasma and gastrocnemius with rat cytokine kit for IL-6 (Ray Biotech, ELR-IL6-1, Norcross, USA) and IL-10 (eBioscience, LSBMS629, Vienna, Austria). All cytokines are reported as pg/mL. Heat shock protein 72 kDa (HSP72) was determined in plasma (eHSP72), gastrocnemius (iHSP72), and in the heart (iHSP70). For plasma and skeletal muscle, it was evaluated by commercial HSP70 high sensitivity ELISA kit for rats (Enzo Life Sciences, ENZ-KIT-101-0001, Farmingdale, USA). HSP72 determined by ELISA kits are reported in pg/mL. HSP70 expression in heart tissue was determined by immunoblot analysis, as described elsewhere¹⁰. Quantification of bands was determined by using ImageJ software (National Health Institute). For heart tissue HSP70 expression, data is presented in arbitrary units, normalized by β -actin expression.

Real-time qPCR analyses

Heart and skeletal muscle tissues from rats were collected after myocardial infarction and were homogenized with Omni Tissue Homogenizer. Their total RNA isolation was performed with TRIzol LS reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's specifications. Total RNA was quantified by Nanodrop ND1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Rockland, USA). The synthesis of complementary DNA (cDNA) occurred with M-MLV reverse transcriptase enzyme (Promega, Madison, WI, USA) and 1 µg total RNA in a final volume of 20 µL with a random hexamer primer according to manufacturer's instructions. Primers for genes of ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 1 (ATP2a1) and ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 2 (ATP2a2), creatine kinase M-type (CKM), prolyl isomerase 1B (Fkbp1b), ryanodine receptor 1 (RyR1) and ryanodine receptor 2 (RyR2) were designed using the Primer-BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and were analyzed using Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer software (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer/>) (Table 1). Relative quantification of mRNA expression was acquired by the standard curve method using a serial dilution of the pooled cDNA sample.

References

1. Grundy D. Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. *Exp Physiol* 2015;**100**:755–758.
2. Hentschke VS, Capalonga L, Rossato DD, Perini JL, Alves JP, Quagliotto E, Stefani GP, Karsten M, Pontes M, Lago PD. Functional capacity in a rat model of heart failure: impact of myocardial infarct size. *Exp Physiol* 2017;
3. Alves JP, Nunes RB, Ferreira D da C, Stefani GP, Jaenisch RB, Dal Lago P. High-intensity resistance training alone or combined with aerobic training improves strength, heart function and collagen in rats with heart failure. *Am J Transl Res* 2017;**9**:5432–5441.
4. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart WJ. Recommendations for Chamber Quantification: A Report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, Developed in Conjunction with the European Association of Echocardiograph. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;**18**:1440–1463.
5. Hentschke VS, Capalonga L, Rossato DD, Perini JL, Alves JP, Stefani GP, Karsten M,

- Pontes M, Lago PD. Maximal oxygen uptake and exercise tolerance are improved in rats with heart failure subjected to low-level laser therapy associated with resistance training. *Lasers Med Sci* 2016;
6. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 2011;
 7. Nunes RB, Alves JP, Kessler LP, Dornelles AZ, Stefani GP, Lago PD. Interval and continuous exercise enhances aerobic capacity and hemodynamic function in CHF rats. *Brazilian J Phys Ther* 2015;**19**:257–263.
 8. Lindpaintner K, Niedermajer N, Schieffer B, Just H, Ganten D, Drexler H. Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1993;
 9. Alves JP, Nunes RB, Stefani GP, Dal Lago P. Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: Experimental model of heart failure. *PLoS One* 2014;**9**.
 10. Kostrycki IM, Wildner G, Donato YH, Santos AB dos, Beber LCC, Frizzo MN, Ludwig MS, Keane KN, Cruzat V, Rhoden CR, Heck TG. Effects of high-fat diet on eHSP72 and extra-to-intracellular HSP70 levels in mice submitted to exercise under exposure to fine particulate matter. *J Diabetes Res* 2019;

Supplementary Tables

Table S1: Primers and conditions for amplification in RT-qPCR.

Accession number	Official Full Name (Official Symbol)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Product length
NM_058213.1	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 1 (ATP2a1)	CCCGAGATGGGGAAGGTCTA	CGGATGTCTGCAGGGACTTT	122 bp
NM_001110139.2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ transporting 2 (ATP2a2)	GTTTGIGGCCCGAAACTACC	TCCCAAGCTCAGTCATGC	143 bp
NM_012530.2	Creatine kinase, M-type (CKM)	TGCTGACTCCTGACCTCTACAA	CGACCGTCATGATGAAAGGGT	120 bp
NM_022675.1	Prolyl isomerase 1B (Fkbp1b)	GCAAGCAGGAAGTCATCAAAG	GTAGCTCCATATGCCACATCA	103 bp
XM_017590442.1	Ryanodine receptor 1 (RyR1)	GGGACTGTCATCAATCGCCA	GACTTTTGGAAGCCACCCT	136 bp
NM_001191043.1	Ryanodine receptor 2 (RyR2)	AGGACCTGACTGTTCTCCCC	TCCTGCTTAGTCTGAACGCTT	92 bp

Abbreviations: bp: base pairs.

Supplementary Figures

Figure S1. Extracellular HSP72 (eHSP72) concentration in plasma evaluated by ELISA, as described in material and methods section. Data are in mean \pm SD.

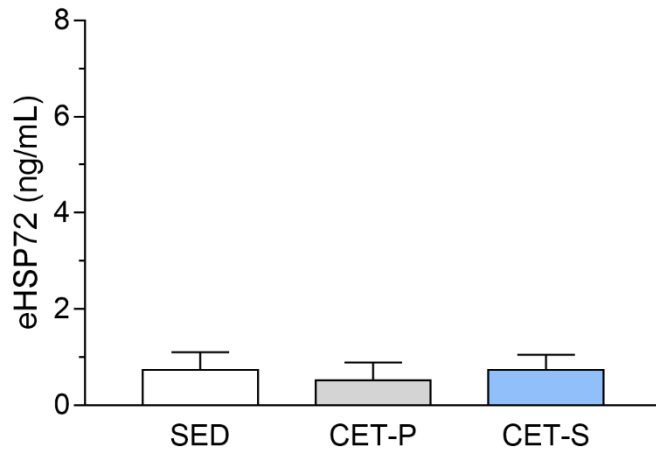
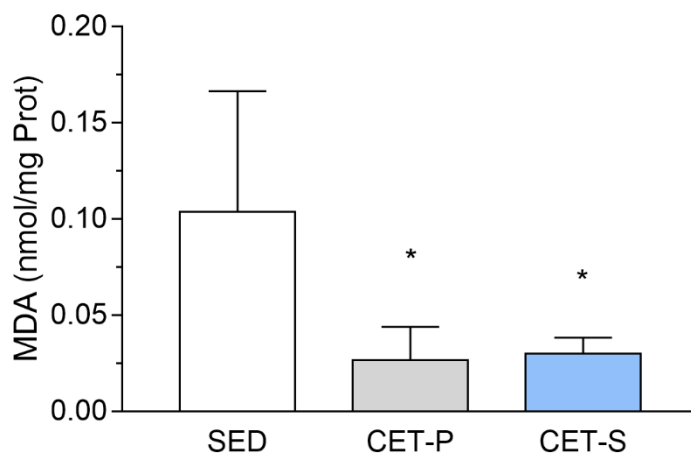


Figure S2. Malondialdehyde (MDA) concentration in plasma. Data are in mean \pm SD.

* = $P < 0.05$ compared to SED.



7 CONCLUSÃO GERAL

O treinamento físico combinado demonstrou e continua demonstrando efeitos positivos sobre parâmetros de capacidade funcional, quanto de força máxima em condições experimentais de insuficiência cardíaca. O treinamento de força e o treinamento de resistência aeróbio contínuo possuem suas peculiaridades e relevância em induzir efeitos adaptativos na melhora do quadro de IC de ratos.

A suplementação de β -alanina e L-histidina tem sido investigada há muito tempo, porém pouco se sabe os efeitos que estes aminoácidos induzirão no cenário da IC. Nesta tese foi demonstrado que a suplementação destes aminoácidos foi capaz de aumentar a concentração de carnosina no músculo esquelético de ratos com IC. O carregamento tecidual de carnosina foi capaz de orquestrar modificações positivas sobre parâmetros de capacidade funcional (capacidade de exercício máximo, $\dot{V}O_{2max}$ e força máxima).

Apesar destes efeitos funcionais, a combinação do treinamento físico com a suplementação de precursores de carnosina não modificou parâmetros ecocardiográficos de ratos com IC. A concentração de carnosina tecidual no ventrículo esquerdo não sofreu modificações com a suplementação de β -alanina e L-histidina por isto não observamos efeitos similares a musculatura esquelética.

Observamos também que a carnosina influenciou uma cascata de modificações bioquímicas e moleculares de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. A associação da suplementação de β -alanina e L-histidina com o treinamento combinado foi capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias no plasma e músculo esquelético e aumentar citocinas anti-inflamatórias no plasma. Estas alterações do perfil inflamatório foram acompanhadas por redução de marcadores de lipoperoxidação, porém sem alterações de atividade de enzimas antioxidantes.

A suplementação de β -alanina e L-histidina em ratos treinados modificou a expressão de HSP72 no músculo esquelético. O seu aumento induziu alterações na expressão de genes envolvidos na sensibilidade do Ca^{2+} de fibras musculares esqueléticas. O carregamento do músculo esquelético com carnosina apresentou aumento na expressão de RNAm de genes envolvidos na geração de força. Estes achados apontam que a suplementação de β -alanina e L-histidina modificou

parâmetros de capacidade funcional devido a estas alterações celulares que permitiram melhora no em parâmetros de aptidão física de ratos com IC.

Com resultados experimentais como desta tese, futuros estudos com seres humanos que possuem IC poderão ser conduzidos com intuito de testar a eficácia desta intervenção como coadjuvante a outras intervenções em âmbito clínico. Pesquisadores no futuro poderão avaliar se a translação do avanço do conhecimento obtido da carnosina em estudos com animais é parcial ou integralmente observável em seres humanos.

ANEXOS

CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 16-198

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

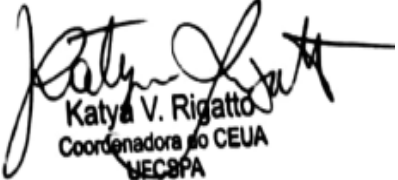
PEDRO DALL'AGO

GIUSEPPE POTRICK STEFANI

Título: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PRECURSORES DE CARNOSINA ASSOCIADA AO TREINAMENTO FÍSICO EM RATO COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 04 de julho de 2017.


Katya V. Rigatto
Coordenadora do CEUA
UFCSPA