

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ ROBERTO MACARINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CARNOSINA SOBRE
PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS JOVENS**

CRICIÚMA, MAIO DE 2013

JOSÉ ROBERTO MACARINI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA CARNOSINA SOBRE
PARAMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA, MAIO DE 2013

Folha Informativa

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório e Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

À memória de meus pais João Macarini
e Irma Stradiotto Macarini

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Gustavo da Costa Ferreira, meu amigo e meu “irmão”, por me acolher, pelos seus ensinamentos, cobranças e conselhos, pela sua paciência, pela amizade que firmamos e por me fazer acreditar que era possível.

Ao professor Emílio, sempre prestativo, pelo apoio e disposição para a realização deste trabalho.

À professora Maria Inês, pelo estímulo e incentivo que sempre prestou para que realizássemos este trabalho.

À professora Patricia que, com sua simpatia, amizade e superação, apesar de tão jovem, nos ensina a viver.

Aos colegas de mestrado, Marcos, Ana Paula, Fernanda, Alessandra, Tatiana, Camila, Débora e Luciana pela convivência maravilhosa, feliz, harmoniosa e alegre que tivemos, e pelo apoio nos momentos de dificuldade.

Aos bolsistas de iniciação científica José Henrique Cararo, Soliany Grassi Maravai, e Cinara pela sua dedicação e apoio incessante, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de profissão Dra. Patricia Simões Pires, pelo apoio em iniciar esta caminhada e durante seu trajeto, e ao prof. Renan Ceretta que prontamente me acolheu para realização do estágio na prática docente.

Ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, que tão bem me acolheu me oportunizando conhecimento científico além de crescimento profissional e pessoal.

Aos meus irmãos Antonio Carlos e Eliza Fátima pela amizade e carinho.

A minha cunhada Ivonete pela disposição em sempre querer colaborar.

Aos meus filhos Stefano e Roberta, pelo estímulo e força que me emprestaram nesta caminhada.

À minha esposa Ivânia, meu porto seguro e exemplo de dedicação à família, por seu estímulo com tanta tenacidade na minha busca pelo conhecimento nesta e nas jornadas anteriores, por compreender com tanta serenidade os momentos de minha ausência, sendo sempre prestativa e amorosa.

Ao Grande Arquiteto do Universo por me proporcionar esta oportunidade e me emprestar à vida.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa
ignorância”

John F. Kennedy

RESUMO

Carnosina (β -alanil-L-histidina) é um dipeptídeo composto pelos aminoácidos β -alanina e L-histidina, amplamente distribuído em músculo esquelético de mamíferos. O dipeptídeo é sintetizado por uma ligase, a carnosina sintetase; e é hidrolisado a seus precursores pelas metaloproteases carnosinase sérica e carnosinase citosólica. Níveis séricos elevados de carnosina e dipeptídeos análogos são encontrados em indivíduos com disfunção neurológica e alterações neuromusculares, associadas à deficiência hereditária de carnosinase sérica. No presente trabalho, objetivou-se investigar os efeitos da administração aguda e crônica de carnosina sobre parâmetros do metabolismo energético em músculo esquelético de Wistar machos de 30 dias de vida. Para o experimento agudo, os animais receberam uma dose única do dipeptídeo (100 mg/kg i.p.) e, decorridas 24 horas, foram mortos por decapitação. Já no tratamento crônico, os animais receberam uma dose diária de carnosina (100 mg/kg i.p.) durante 5 dias, e posteriormente foram mortos por decapitação 1 hora após a última injeção intraperitoneal. O músculo esquelético (soleus) foi dissecado e homogeneizado para posterior avaliação da atividade dos complexos I-III, II e II-III da cadeia respiratória e das enzimas succinato desidrogenase, malato desidrogenase e creatina quinase. Neste estudo, demonstrou-se que, em comparação com o grupo controle, os animais que receberam carnosina agudamente apresentaram uma redução estatisticamente significativa da atividade dos complexos I-III e II da cadeia respiratória. Verificou-se também uma tendência de redução, porém não estatisticamente significativa, da atividade do complexo II-III, da malato desidrogenase e da creatina quinase de ratos do grupo carnosina. Por outro lado, em animais administrados cronicamente com o dipeptídeo, observou-se apenas uma tendência de diminuição, embora não estatisticamente significativa, da atividade do complexo I-III do grupo carnosina em comparação com o grupo. Concluindo, a administração aguda de carnosina é capaz de inibir enzimas-chave do metabolismo energético de ratos. É provável que uma disfunção energética secundária ao acúmulo de carnosina possa ajudar a explicar os sintomas neuromusculares observados em pacientes com deficiência de carnosinase sérica, bem como desvendar mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa rara doença.

Palavras-chave: L-carnosina; cadeia respiratória mitocondrial; ciclo de Krebs; creatina quinase; metabolismo energético.

ABSTRACT

Carnosine (β -alanil-L-histidine) is dipeptide widely found in mammal skeletal muscle. The compound is synthesized by a ligase and hydrolyzed to its precursors by the enzyme serum carnosinase and cytosolic carnosinase. High serum levels of carnosine and its analogue dipeptides are found in individuals with neurological dysfunction and neuromuscular alterations associated to the hereditary deficiency of serum carnosinase. In the present work we investigated the effects of acute and chronic carnosine administration on parameters of energy metabolism in skeletal muscle of 30-day-old Wistar rats. For the acute experiments, animals received a single dose of carnosine (100 mg/kg; i.p.) and were euthanized by decapitation 24 hour later. For the chronic experiments, animals received a single injection of carnosine (100 mg/kg; i.p.) during 5 days and euthanized by decapitation 1 hour later. Skeletal muscle (soleus) of the animals was dissected and homogenized for the evaluation of the respiratory chain complex I-III, II and II-III, succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase and creatine kinase enzyme activities. It was demonstrated that animals receiving carnosine acutely showed a decrease of complex I-III and II enzyme activity, as compared to controls. It was also verified a trend of decrease of complex II-III, malate dehydrogenase and creatine kinase activities, although non-significantly. On the other hand, animals receiving carnosine chronically did not show any significant alteration on the tested enzyme activities, only a trend of reduction of complex I-III activity. Concluding, acute carnosine administration impairs important enzymes of energy metabolism of rat skeletal muscle. It is presumed that energy dysfunction secondary to carnosine accumulation may play a role on the pathophysiology of neuromuscular symptoms observed in carnosinase-deficient patients.

Keywords: L-carnosine; mitochondrial respiratory chain; Krebs cycle; creatine kinase; energy metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Via metabólica da carnosina	16
Figura 2: Atividade enzimática do complexo I-III em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg).....	31
Figura 3: Atividade enzimática do complexo II em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg).....	32
Figura 4: Atividade enzimática do complexo II-III em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg).....	32
Figura 5: Atividade enzimática da creatina quinase (CK) em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg).....	33
Figura 6: Atividade enzimática da succinato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados.....	34
Figura 7: Atividade enzimática da malato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg).....	34
Figura 8: Atividade enzimática do complexo I-III em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg).....	35
Figura 9: Atividade enzimática do complexo II em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg).....	36
Figura 10: Atividade enzimática do complexo II-III em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg).....	36
Figura 11: Atividade enzimática da creatina quinase em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg).....	37
Figura 12:Atividade enzimática da succinato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg).....	38
Figura 13: Atividade enzimática da malato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil CoA – acetil-coenzima A

ADP – difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)

ATP – trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)

ATPase – adenosina trifosfatase (do inglês *adenosine triphosphatase*)

CK – creatina cinase (do inglês *creatine kinase*)

CK-BB – creatina quinase cérebro cérebro (do inglês *creatine kinase brain brain*)

CK-MB - creatina quinase músculo cérebro (do inglês *creatine kinase muscle brain*)

CK-MM – creatina quinase músculo músculo (do inglês *creatine kinase muscle muscle*)

CoQ - coenzima Q

DOPA – dopamina

DCIP – dicloroindofenol

EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

EIM – erro inato do metabolismo

ERO – espécies reativas de oxigênio

FADH₂ – dinucleotídeo de flavina adenina (forma reduzida) (do inglês *flavin adenine dinucleotide*)

GTP – trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)

HCT – hidrocarbonetos totais

NAD⁺ - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma oxidada) (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma reduzida) (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

SNC – sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ERROS INATOS DO METABOLISMO	13
1.2	DEFICIÊNCIA DE CARNOSINASE	15
1.2.1	Efeitos biológicos da carnosina	19
1.3	METABOLISMO ENERGÉTICO	20
1.3.1	Ciclo de Krebs	20
1.3.2	Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa	20
1.3.3	Creatina quinase	22
1.3.4	Disfunção do Metabolismo Energético em EIM	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	GERAL	25
2.2	ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	MATERIAL	26
3.1.1	Animais	26
3.2	MÉTODOS	26
3.2.1	Preparação da amostra e incubação	26
3.2.2	Determinação das atividades do complexo da cadeia respiratória	27
3.2.2.1	Determinação da atividade do Complexo I + COQ + III (NADH: citocromo c oxirredutase):	27
3.2.2.2	Determinação da atividade do Complexo II (succinato:DCIP oxirredutase):	27
3.2.2.3	Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase):	28

3.2.3	Determinação da atividade da enzima creatina quinase	28
3.2.4	Determinação das atividades das enzimas do ciclo de Krebs.....	29
3.2.5	Dosagem de proteínas.....	30
3.2.6	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS	31
5	DISCUSSÃO	39
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo “erro inato do metabolismo” (EIM) foi utilizado pela primeira vez por Garrod, em 1908, baseado em seus estudos realizados em pacientes com alcaptonúria, doença que apresenta aumento da excreção de ácido homogentísico na urina. Em seus estudos, este autor observou que, na maioria das vezes, um ou mais indivíduos da mesma família eram afetados sem que seus pais apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação de tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Atualmente, mais de 450 EIM foram descritos na literatura, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de biomoléculas no organismo (Scriver et al., 2001).

Os EIM são alterações genéticas que correspondem geralmente a um defeito enzimático capaz de acarretar a interrupção de uma via metabólica (Bickel, 1987; Sainz, 2002; Araujo, 2004). Sob uma perspectiva fisiopatológica, os EIM podem ser divididos em três diferentes grupos (Saudubray et al., 2012):

1- Distúrbios levam à intoxicação: este grupo inclui EIM intermediário, que levam a uma intoxicação aguda ou progressiva pelo acúmulo de compostos tóxicos próximos a etapa em que ocorre o bloqueio metabólico;

2- Doenças que envolvem o metabolismo energético: estes são constituídos de EIM com sintomas consequentes, pelo menos em parte, a uma deficiência na produção ou utilização de ATP em células do fígado, miocárdio, cérebro e músculo esquelético, entre outros tecidos. Este grupo pode ser dividido em doenças com déficit energético mitocondrial ou citoplasmático. Defeitos mitocondriais são mais graves e geralmente sem tratamento. Defeitos citoplasmáticos são geralmente menos pronunciados;

3- Distúrbios envolvendo moléculas complexas: este grupo envolve organelas celulares e inclui doenças que perturbam a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas.

Pacientes com algum tipo de EIM apresentam sintomatologia variada e inespecífica, mesmo em pacientes acometidos pela mesma doença. Essa variedade de fenótipos se deve a diferentes graus da deficiência enzimática, tecidos afetados e vias metabólicas envolvidas, podendo variar de episódios de vômitos e diarreia, até acometimentos do SNC, retardo neuropsicomotor, neurodegeneração progressiva e morte (Burton,1987). As crianças portadoras de muitos dos EIM, especialmente os de manifestação aguda, apresentam-se perfeitamente normais ao nascimento e o aparecimento dos sintomas ocorre quando há alteração, por fatores exógenos, do equilíbrio bioquímico do indivíduo (Jardim & Ashton-Prolla, 1996).

O diagnóstico dos EIM é essencialmente laboratorial (Blau, 1966; Hommes, 1991). O atraso no diagnóstico pode ser fatal para os casos mais graves, e, por isso, uma parte considerável dos pacientes afetados por EIM morre sem diagnóstico (Ogier et al., 1990).

Apesar da incidência isolada de cada uma das doenças metabólicas ser relativamente pequena (aproximadamente 1:500 a 1:1000 nascidos vivos), até o

presente momento já foram descritos mais de 450 doenças metabólicas hereditárias com etiologia definida (Martins, 1999; Sanseverino et al., 2000; Scriver et al., 2001; Martins, 2003; Araujo, 2004). Deve-se ressaltar que uma parte considerável destes distúrbios pode apresentar tratamento efetivo, desde que detectados precocemente (Vargas, 2001).

1.2 DEFICIÊNCIA DE CARNOSINASE

Deficiência de carnosinase, também referida por deficiência de carnosinase sérica, é uma doença hereditária do metabolismo de herança autossômica recessiva da via catabólica do dipeptídeo carnosina (beta-alanina-L-histidina) (Figura 1), cuja prevalência é desconhecida, embora já tenham sido relatados aproximadamente 30 casos até hoje. A localização cromossômica precisa do gene codificante para a carnosinase sérica ainda permanece obscura (Jaeken, 2004), apesar de haver forte suspeita de que seja a região terminal 21.3 do braço longo do cromossomo 18 (18q21.3). É provável que uma deleção envolvendo essa região cromossômica seja a etiologia dessa doença (Willi et al., 1997)

A via de biossíntese da carnosina, a partir de seus aminoácidos constituintes, ocorre pela atividade de uma enzima ligase específica, a carnosina sintetase (EC 6.3.2.11) (Pegova et al., 1999), proteína expressa em células musculares e gliais (Bauer et al., 1982; Bakardjiev & Bauer, 1994; Hoffmann et al., 1996) e em oligodendrócitos (Hoffmann et al., 1996; Bonfanti et al., 1999). Sua hidrólise, assim como a da homocarnosina (γ -aminobutiril-L-histidina) (Willi et al., 1997; Pegova et al., 2000; Schoen et al., 2003) e anserina (β -alanil-1-metil-L-histidina) (Jackson et al., 1991), é realizada pela enzima hidrolase carnosinase sérica (EC 3.4.13.20) (Teufel et al., 2003; Otani et al., 2008), que é expressa no fígado e em células

nervosas (Teufel et al., 2003). Entretanto, outras enzimas são capazes de hidrolisar carnosina nos tecidos biológicos, tais como a carnosinase citosólica (Lenney et al., 1985), proteína expressa em vários tecidos, tais como rins, fígado, cérebro, baço, gônadas, pulmões e pâncreas (Teufel et al., 2003). Os produtos da hidrólise desse dipeptídeo (β -alanina e L-histidina) são metabolizados e excretados na urina (Boldyrev & Severin, 1990). As concentrações dessa enzima sérica são indetectáveis nos recém-natos e aumentam com o avançar da idade (Peters, 2011). Mamíferos não primatas, como os roedores, não produzem a carnosinase sérica, sendo assim não apresentam essa atividade plasmática ou a nível do sistema nervoso central (Bellia et al., 2009).

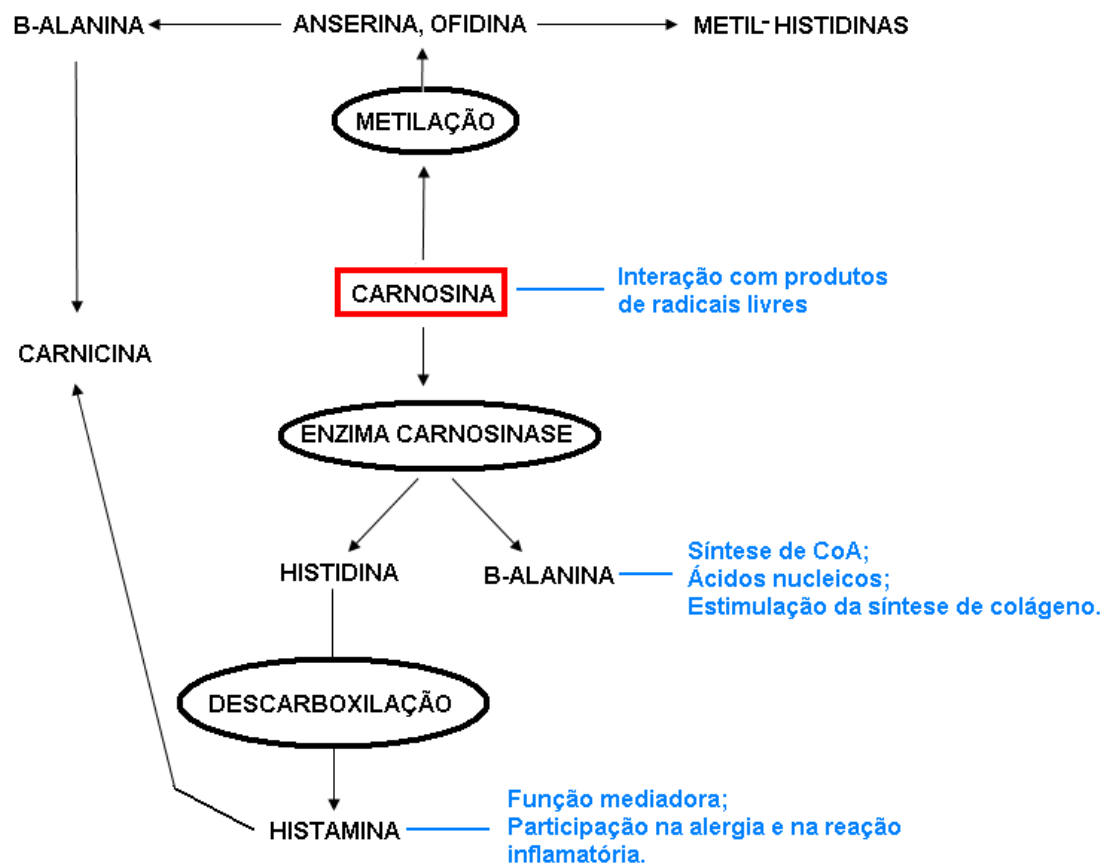


Figura 1: Via metabólica da carnosina. Fonte: do autor

A deficiência de carnosinase é caracterizada pelo acúmulo de carnosina no soro e na urina, possivelmente em virtude da baixa atividade da carnosinase do plasma (Perry et al., 1968) ou da sua deficiência no fígado (Gordon et al., 1977). As manifestações clínicas atribuídas a essa doença são inespecíficas, incluindo retardo mental, retardo psicomotor severo, ataques mioclônicos e de grande mal, retardo de crescimento, bradicinesia, neurodegeneração progressiva (Murphey et al., 1973). Também podem ser observados nos pacientes acometidos pela doença: quadriparesia espástica atetoide severa, atrofia óptica, neuropatia sensorial periférica, sinais suprabulbares (Fleisher et al., 1980). Por outro lado, já foram descritos portadores de deficiência de carnosinase sérica saudáveis ou assintomáticos (Jaeken, 2004).

A excreção de carnosina por humanos com dieta balanceada é insignificante (Tocci & Bessman, 1967; Pearl et al., 2007); a excreção aumenta após dietas ricas em dipeptídeos imidazólicos, tais como dietas à base de carnes. Dessa forma, dipeptidúria persistente durante uma dieta livre de carne é um achado que sugere deficiência de carnosinase (Pearl et al., 2007). Indivíduos saudáveis excretam 1-metil-L-histidina após ingerir anserina (β -alanil-1-metil-L-histidina) (Perry et al., 1967; Pearl et al., 2007); já os indivíduos com deficiência de carnosinase excretam pouca ou nenhuma quantidade desse metabólito (Perry et al., 1967; Van Heeswijk et al., 1969; Murphey et al., 1973; Pearl et al., 2007). Pessoas saudáveis, em jejum, não apresentam carnosina em seu plasma (Perry et al., 1967; Pearl et al., 2007), enquanto que indivíduos com deficiência de carnosinase sérica acumulam grandes quantidades (Perry et al., 1967; Murphey et al., 1973; Leininger et al., 1980; Pearl et al., 2007). Além disso, indivíduos com deficiência de carnosinase sérica podem ter níveis normais (Scriver & Davies, 1965; Perry et al., 1967; Cohen et al., 1985; Pearl

et al., 2007) ou aumentados (Lenney et al., 1983) de homocarnosina no fluido cerebrospinal.

A homocarnosinase, doença que tem sido alvo de muitos relatos (Gjessing et al., 1974; Sjaastad et al., 1976; Perry et al., 1979; Lenney et al., 1983; Gjessing et al., 1990; Pearl et al., 2007), trata-se provavelmente de uma deficiência severa de carnosinase sérica. Em uma família afetada pela doença, uma mulher norueguesa de 72 anos era saudável, e seus três filhos, os quais tinham níveis elevados de homocarnosina no fluido cerebrospinal, tinham paraplegia espástica, deterioração mental progressiva, e pigmentação retinal. Talvez o principal motivo para se considerar a homocarnosinose como uma manifestação severa da deficiência de carnosinase sérica é o fato de o soro de pacientes com homocarnosinose conter uma proteína imunorreativa que é indistinguível da banda vista para a carnosinase do soro normal, sugerindo a produção de uma forma inativa de carnosinase sérica por esses pacientes (Jackson & Lenney, 1992; Pearl et al., 2007).

O diagnóstico da deficiência de carnosinase segue cerca de três etapas: 1) teste de triagem, no qual se realiza a análise de aminoácidos na urina e/ou no soro, por partição ou cromatografia em coluna, após uma dieta livre de carne (Scriver & Gibson, 1995; Pearl et al., 2007) 2) se a dipeptidúria persistir após essa dieta, procede-se a ingestão de anserina; 3) se a ingestão de anserina não produzir seu metabólito urinário, 1-metil-L-histidina, a atividade da carnosinase sérica poderá ser medida com o método apropriado (Lenney et al., 1982; Pearl et al., 2007). O efeito da idade deve ser considerado na interpretação do resultado (Pearl et al., 2007). Se a deficiência de carnosinase não for, casualmente, associada à doença neurológica (Gjessing et al., 1990), o tratamento não é indicado (Pearl et al., 2007). Todavia, nenhum tratamento eficiente para essa doença hereditária do metabolismo é

atualmente disponível (Jaeken, 2004), e estudos têm demonstrado apenas uma modesta melhora no quadro clínico de pacientes afetados e em tratamento dietético (Van Heeswijk et al., 1969; Pearl et al., 2007)

1.2.1 Efeitos biológicos da carnosina

Um vasto número de propriedades bioquímicas e efeitos fisiológicos foram atribuídos à carnosina por pesquisadores, desde o tempo de sua descoberta, em extratos de músculo esquelético de frango (Gulevitch & Amiradzibi, 1900). O dipeptídeo demonstra propriedades que incluem atividade antioxidante (Yen et al., 2002), quelante de íons Fe^{2+} e outros cátions divalentes (Kang, 2010), radioprotetora (Tanaka et al., 2005), tamponante do pH intracelular (Caruso et al., 2012) e antiglicosilante (Aldini et al., 2005). Estudos têm demonstrado que a carnosina é capaz de diminuir significativamente os danos induzidos por isquemia / reperfusão (Kurata et al., 2006); prevenir a formação e agregação de peptídeo β -amiloide, e atenuar o déficit cognitivo na doença de Alzheimer (Corona et al., 2011), além de potencializar a terapia com DOPA, contribuindo para aliviar os sintomas neurológicos de pacientes com doença de Parkinson (Boldyrev et al., 2008). Esses, e muitos outros efeitos que não foram enunciados, podem ser justificados pelas propriedades bioquímicas desse dipeptídeo, embora os mecanismos fisiológicos envolvidos requeiram mais estudos para sua efetiva elucidação.

1.3 METABOLISMO ENERGÉTICO

1.3.1 Ciclo de Krebs

Também chamado de ciclo do ácido cítrico ou dos ácidos tricarboxílicos, é uma via catabólica central em que compostos derivados da quebra de carboidratos, gorduras e proteínas são oxidados até CO_2 , com a conservação da energia de oxidação armazenada na forma dos equivalentes reduzidos FADH_2 e NADH . A primeira etapa é a condensação do acetil CoA com o oxaloacetato, pela ação da enzima citrato sintase, formando citrato. Nas reações subsequentes, que incluem duas descarboxilações (com a liberação de duas moléculas de CO_2), ocorre a regeneração do oxaloacetato (Kaplan, 1985). Para cada molécula de acetil CoA completamente oxidado pelo ciclo de Krebs, ocorre a formação de três moléculas de NADH , uma de FADH_2 e uma de GTP. Além disso, por se tratar de uma via metabólica aberta, qualquer composto que der origem a um intermediário do ciclo de Krebs, por exemplo, os produtos da quebra de muitos aminoácidos, podem ser oxidados por esta via metabólica. Por outro lado, o ciclo de Krebs é considerado anfibólico, isto é, serve tanto para o catabolismo como para o anabolismo, uma vez que intermediários podem ser desviados para outras vias e empregados como blocos construtores para vários produtos biossintéticos (Eastmond et al., 2001; Marks et al., 2008). O fluxo através desta via é regulado pela demanda energética, pelas concentrações dos substratos e dos produtos finais da via.

1.3.2 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

A cadeia respiratória é composta por 5 complexos proteicos e dois transportadores móveis de elétrons, a coenzima Q (ou ubiquinona) e o citocromo c.

Nas mitocôndrias, os íons hidreto removidos durante a oxidação dos substratos energéticos, por desidrogenases que operam com o NAD⁺, doam elétrons para o complexo I da cadeia respiratória e estes são subsequentemente transferidos pelos outros complexos da cadeia respiratória até o oxigênio molecular, que é o aceptor final de elétrons nesta via. Neste processo, os elétrons são transferidos do complexo I para a ubiquinona, através de uma série de centros de Fe-S. A ubiquinona transfere os elétrons para o citocromo *bc₁* (complexo III), que transporta os elétrons, um de cada vez, através do citocromo *c* para a citocromo *c* oxidase (complexo IV). Essa enzima, que contém cobre e também os citocromos *a* e *a₃*, transfere os elétrons para o O₂, reduzindo-o para formar H₂O (Nicholls et al., 2002). Por outro lado, os elétrons provenientes da oxidação do succinato são transportados diretamente pela succinato desidrogenase (complexo II), uma flavoproteína que apresenta centros de Fe-S, para a ubiquinona, enquanto os da oxidação dos ácidos graxos são transferidos para a coenzima Q através de uma flavoproteína transferidora de elétrons (Weber et al., 1997).

A teoria quimiosmótica postula que a energia liberada pelo fluxo de elétrons através da cadeia respiratória é conservada pelo bombeamento concomitante de prótons para o espaço intermembranas, levando à formação de um gradiente eletroquímico. De acordo com esta teoria, a energia liberada pela dissipação deste gradiente através da ATP sintase (complexo V), a força próton-motriz, é utilizada para a condensação de ADP+Pi formando ATP, acoplado o fluxo de prótons à fosforilação do ADP (Mitchell, 1961; Hansford, 1980).

1.3.3 Creatina Cinase

A creatina cinase (CK) é uma enzima que possui um papel fundamental na homeostase energética, atuando como um efetivo sistema de tamponamento dos níveis de ATP intracelular (Pilla et al., 2003.). Esta enzima catalisa a transferência reversível do grupamento γ -fosfato do ATP para o grupamento guanidino de creatina, formando fosfocreatinina e ADP. A CK está presente em grandes quantidades de tecidos que requerem altas e flutuantes demandas de energia, como músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro (Wyss & Kaddurak-Daouk, 2000).

A CK consiste de um dímero composto de duas subunidades (B e M) que são agrupadas originando três formas moleculares distintas: a CK-BB, encontrada predominantemente no cérebro, CK-MB, predominante no miocárdio e CK-MM, predominante no músculo esquelético (Lang et al., 1982; Fredercks et al., 2002). O músculo esquelético contém quase exclusivamente CK-MM, com pequenas quantidades de CK-MB. A quantidade de ATP nos músculos estriados só fornece energia para 1-2 segundos de atividade muscular intensa. Uma reserva adicional é constituída por fosfocreatinina, que se encontra em concentrações 3-5 vezes maiores que as de ATP, produzida por fosforilação da creatina a custa de ATP. Esta reação é prontamente reversível, e processa-se no sentido de regeneração de ATP, o doador imediato de energia para a contração muscular (Apple et al., 1988).

1.3.4 Disfunção do Metabolismo Energético em EIM

Nos últimos anos, diversas evidências foram descritas indicando que a disfunção mitocondrial está direta ou indiretamente envolvida na fisiopatologia de

vários EIM (Leonard & Schapira, 2000a, b; Schapira 2006, 2008). A disfunção mitocondrial em algumas destas doenças é, em geral, devido a mutações em genes nucleares das enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico ou na fosforilação oxidativa, enquanto em outros, parece resultar de influências tóxicas de compostos endógenos para a mitocôndria (Wajner & Goodman, 2011).

Deficiência de enzimas da cadeia respiratória vistas em tecidos de pacientes com algumas acidemias orgânicas sugerem a ocorrência de dano mitocondrial secundário, enquanto que os defeitos do metabolismo intermediário (piruvato desidrogenase, do ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia respiratória) são considerados as causas primárias da disfunção mitocondrial (Wajner & Goodman, 2011). Além disso, uma vez que os derivados de acil-CoA muitas vezes reagem com L-carnitina, defeitos de beta-oxidação mitocondrial também apresentam a capacidade de afetar a função mitocondrial (Schuck et al., 2009; Tonin et al., 2010). Neste sentido, diversos estudos demonstram a toxicidade de compostos acumulados em diferentes EIM, incluindo acidemia metilmalônica (Chandler et al., 2009), acidemia propionica (Schwab et al., 2006), acidúria 2-metil-3-hidroxi-butírica (Rosa et al., 2005), acidúria glutárica Tipo I (Wajner et al., 2004b; Fereira et al., 2005), acidúria D-2 hidroxiglutárica D-2-OHGA (da Silva et al., 2002).

Ressalte-se que *i)* a enzima que degrada a carnosina altera seu padrão de expressão ao longo do desenvolvimento, aumentando sua quantidade e, em decorrência disso, resultando em uma baixa capacidade de indivíduos jovens em lidar com altos níveis desta substância; *ii)* neste estágio do desenvolvimento, os pacientes acometidos pela deficiência da carnosinase apresentam altos níveis plasmáticos e teciduais de carnosina; e *iii)* na deficiência de carnosinase, o aparecimento dos sintomas nos pacientes acometidos por esta doença ocorre

durante o período neonatal. Portanto, o presente trabalho investigará os efeitos da carnosina sobre parâmetros do metabolismo energético em músculo esquelético de ratos jovens de 30 dias de vida.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar os efeitos *in vivo* da carnosina sobre vários parâmetros importantes de bioenergética no músculo esquelético de ratos de 30 dias de idade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito *in vivo* da administração aguda de carnosina sobre as atividades dos complexos I-III, II e II-III da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos jovens;
- Investigar o efeito *in vivo* da administração aguda de carnosina sobre as atividades das enzimas do ciclo de Krebs, succinato desidrogenase e malato desidrogenase, em músculo esquelético de ratos jovens;
- Investigar o efeito *in vivo* da administração aguda de carnosina sobre a atividade da enzima creatina quinase em músculo esquelético de ratos jovens;
- Investigar o efeito *in vivo* da administração crônica de carnosina sobre as atividades dos complexos I-III, II e II-III da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos jovens;
- Investigar o efeito *in vivo* da administração crônica de carnosina sobre as atividades das enzimas do ciclo de Krebs, succinato desidrogenase e malato desidrogenase, em músculo esquelético de ratos jovens;
- Investigar o efeito *in vivo* da administração crônica de carnosina sobre a atividade da enzima creatina quinase em músculo esquelético de ratos jovens.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias de idade. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº. 67/2012) e os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação nº 85-23, revisada em 1996).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação da amostra e incubação

Ratos Wistar machos de 30 dias de idade foram utilizados para todas as técnicas. Para o tratamento agudo, os animais foram tratados com uma dose única de 100mg/kg de carnosina, administrada por via intraperitoneal (i.p.) e eutanasiados 24 horas após a administração. Para o tratamento crônico foi administrada uma dose diária de 100mg/kg de carnosina durante 05 (cinco) dias, via de administração i.p., e os animais foram eutanasiados 1 hora após a última administração, os animais do grupo controle receberam solução salina nos mesmos volumes. No dia dos

experimentos, os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina e sem anestesia, e o músculo esquelético foi retirado para as subseqüentes análises bioquímicas.

3.2.2 Determinação das atividades do complexo da cadeia respiratória

3.2.2.1 Determinação da atividade do Complexo I + COQ + III (NADH: citocromo c oxirredutase):

O tampão de reação contendo 20 mM de fosfato de potássio pH 8,0, 2 mM de KCN, 10 μ M de EDTA, 50 μ M de citocromo c e 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado foi mantido a 30 °C por 1 minuto. A reação se iniciou pela adição de 25 μ M de NADH, as absorbâncias foram registradas por 3 minutos, após os quais foram adicionados 10 μ M de rotenona. As absorbâncias continuaram sendo registradas por mais 3 minutos. A atividade do complexo I+CoQ+III foi medida pelo aumento na absorbância causada pela redução do citocromo c a 550 nm. A atividade do complexo I+CoQ+III correspondeu à atividade da NADH: citocromo c redutase sensível à rotenona (Schapira et al., 1990). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.2.2.2 Determinação da atividade do Complexo II (succinato:DCIP oxirredutase):

O meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e DCIP (8 μ M). Inicialmente pré-incubou-se com 40-80 μ g de proteínas do homogeneizado a 30°C por 20 minutos. Depois, foram

adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação iniciou-se com adição de 40 μM de DCIP. As absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi medida pela diminuição da absorbância causada pela redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$

3.2.2.3 Determinação da atividade do Complexo II+CoQ+III (succinato: citocromo c oxirredutase):

O meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 μg de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ de citocromo *c* e as absorbâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi medida pelo aumento da absorbância causado pela redução do citocromo *c* (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.2.3 Determinação da atividade da enzima creatina cinase

Após um período de 15 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada com a adição de ADP a uma concentração final de 3,2 mM em 100 μL de meio contendo 7,08 mM de fosfocreatina e de 0,8 a 1 μg de proteínas (homogeneizado). Após um período de 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 20 μL de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) 50 mM e a coloração rósea foi obtida pela adição

de 100 μL de α -naftol 20%, 680 μL de água MilliQ e 100 μL de diacetil 20%. A leitura foi feita por espectrofotometria a 540 nm segundo o método de Hughes (1962). Para calcular a atividade da CK nas amostras, foi executada uma curva de calibração com creatina nas concentrações de 4 nmol/mL (60 μL de fosfocreatina, 10 μL de creatina-padrão e 10 μL de água MilliQ) e 8 nmol/mL (60 μL de fosfocreatina e 20 μL de creatina-padrão). Daí obteve-se o fator de calibração médio necessário para os cálculos de atividade da enzima. Os resultados estão expressos em μmol de creatina $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.2.4 Determinação das atividades das enzimas do ciclo de Krebs

3.2.4.1 Determinação da atividade da enzima succinato desidrogenase:

Para a medida da atividade da enzima succinato desidrogenase, ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 62,5 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1 %, succinato de sódio 1 mM e dicloroindofenol (DCIP) 9 μM , foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 μg de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 μM , metassulfato de fenazina 1 mM e DCIP 42 μM . A redução do DCIP é determinada em 600 nm durante 5 minutos a 25°C (Fischer et al., 1985). A atividade está expressa em nmol $\cdot (\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína)⁻¹.

3.2.4.2 Determinação da atividade da enzima malato desidrogenase:

A atividade da malato desidrogenase foi medida em um tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, contendo Triton X-100 0,1 %, rotenona 10 μ M, NADH 0,14 mM e ácido oxalacético 0,30 mM e a atividade foi determinada pela oxidação do NADH em espectrofluorímetro em comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 466 nm, respectivamente (Kitto, 1969). A atividade foi expressa em μ M . (min. mg de proteína)⁻¹.

3.2.5 Dosagem de proteínas

Foi feita através do método de Lowry (1951), usando-se a albumina sérica bovina como padrão.

3.2.6 Análise estatística

Assumindo que os dados possuem comparação entre duas médias, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Statistic versão 7.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

Inicialmente investigou-se o efeito do tratamento agudo de carnosina na atividade dos complexos I-III, II, II-III da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos Wistar de 30 dias de vida. Observou-se uma diminuição na atividade do complexo I-III (figura 2) e complexo II (figura 3), em relação aos animais do grupo controle que receberam com salina. No complexo II-III, verificou-se uma tendência à diminuição da atividade, no entanto esta alteração não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

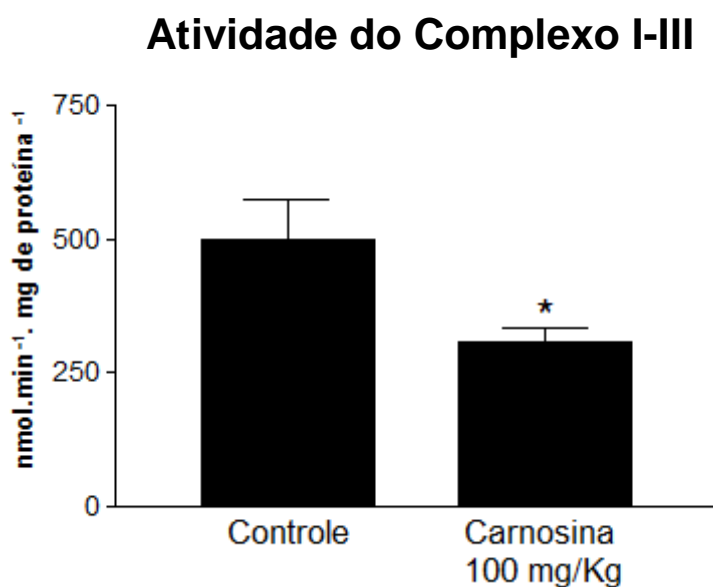


Figura 2: Atividade enzimática do complexo I-III em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ (Teste *t* de Student para amostras independentes)

Atividade do Complexo II

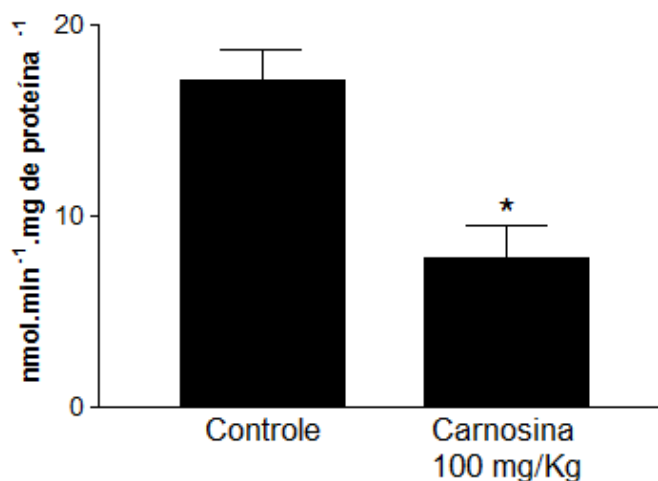


Figura 3: Atividade enzimática do complexo II em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$. (Teste *t* de Student para amostras independentes)

Atividade do Complexo II-III

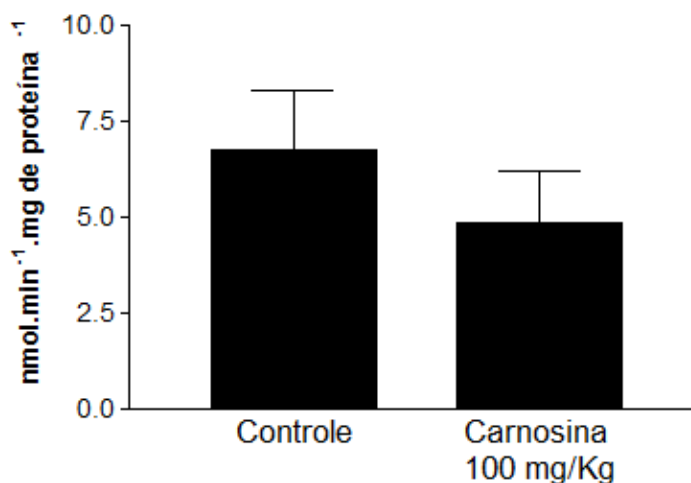


Figura 4: Atividade enzimática do complexo II-III em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (Teste *t* de Student para amostras independentes)

A seguir, avaliou-se a atividade da enzima CK (figura 5), e apesar de uma tendência de diminuição, a atividade desta enzima não foi alterada pela presença do dipeptídeo.

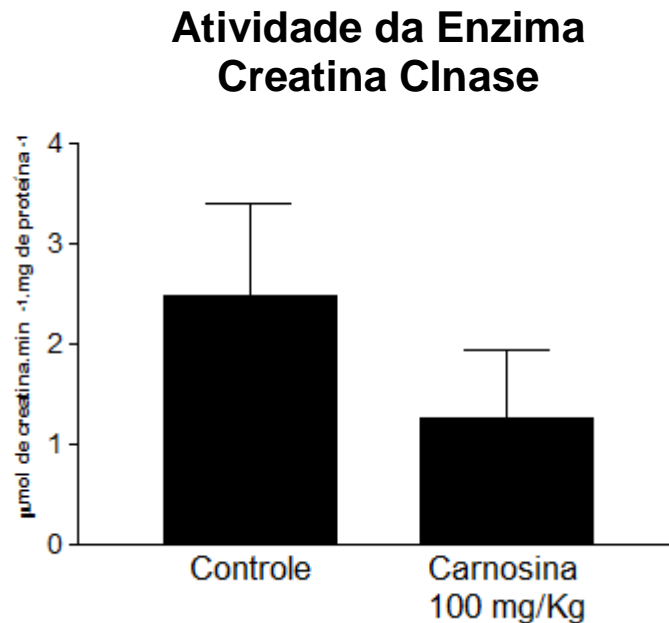


Figura 5: Atividade enzimática da creatina cinase (CK) em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\mu\text{mol de creatina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Em seguida, investigou-se o efeito do tratamento agudo de carnosina na atividade de importantes enzimas do ciclo do ácido cítrico, succinato desidrogenase e malato desidrogenase, em músculo esquelético de ratos Wistar de 30 dias de vida. Observou-se que a enzima succinato desidrogenase não apresentou diferença de atividade quando comparado ao grupo controle (figura 6), enquanto que na malato desidrogenase houve uma leve tendência à diminuição da atividade, mas que não se apresentou estatisticamente significativa (figura 7).

Atividade da Enzima Succinato Desidrogenase

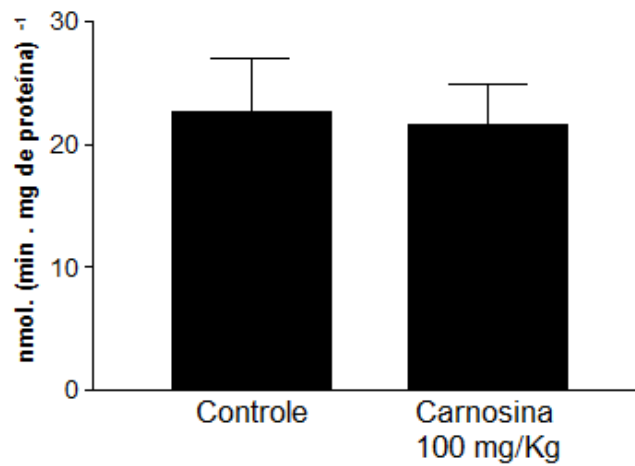


Figura 6: Atividade enzimática da succinato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados. A atividade está expressa em $\text{nmol. (min. mg de proteína)}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Atividade da Enzima Malato Desidrogenase

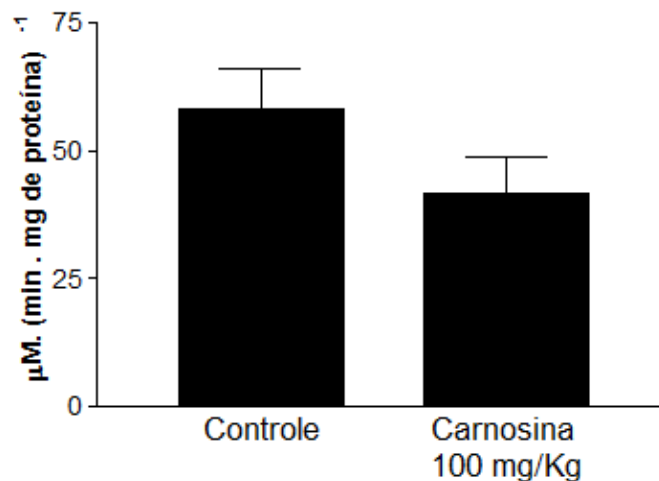


Figura 7: Atividade enzimática da malato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados agudamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\mu\text{M. (min. mg de proteína)}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Nosso próximo passo foi investigar o efeito da administração crônica de carnosina (5 dias) sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos jovens. Não foi detectada uma diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) na atividade dos complexos I-III, II e II-III da cadeia respiratória (figuras 8, 9 e 10). No entanto, o complexo I-III apresentou uma sutil tendência à diminuição da atividade.

Atividade do Complexo I-III

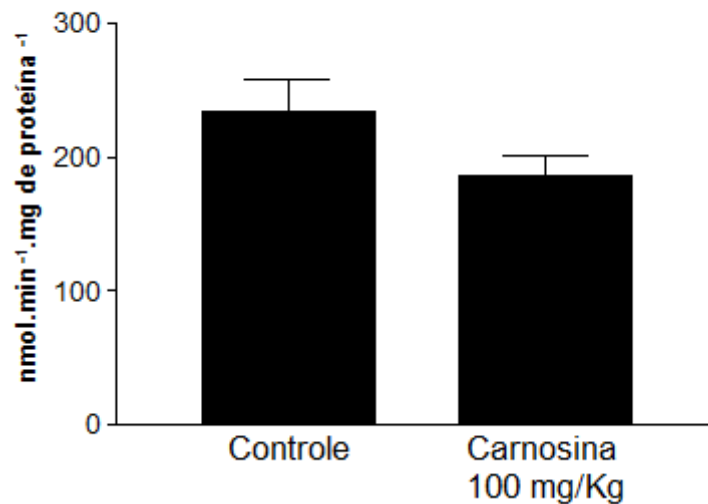


Figura 8: Atividade enzimática do complexo I-III em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Atividade do Complexo II

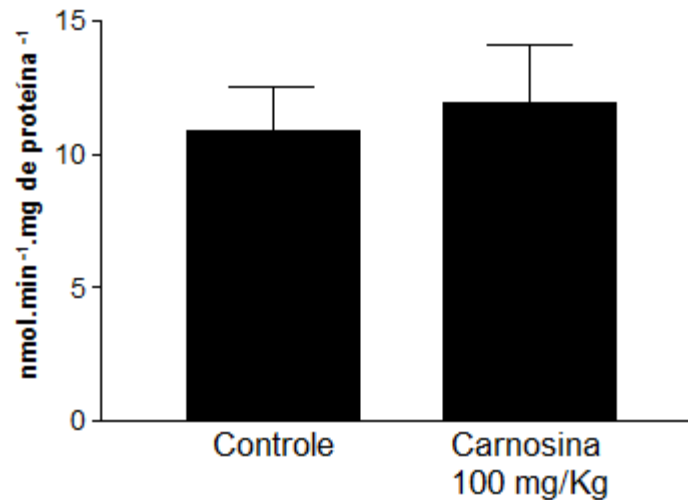


Figura 9: Atividade enzimática do complexo II em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Atividade do Complexo II-III

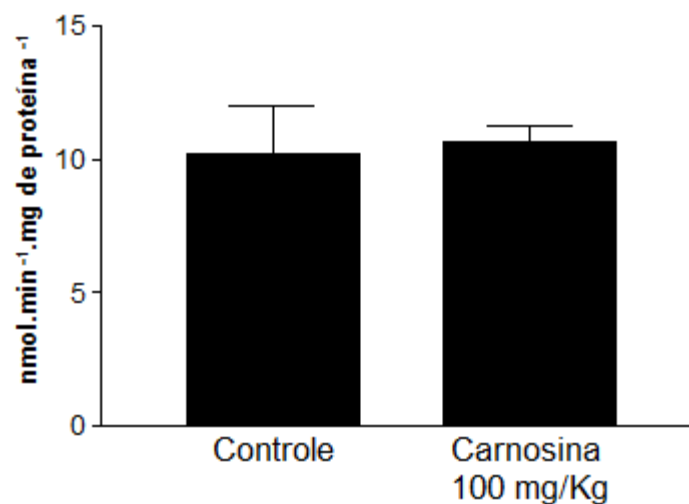


Figura 10: Atividade enzimática do complexo II-III em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

A seguir, foi avaliada a atividade da enzima CK (figura 11) em músculo esquelético de ratos jovens e verificou-se que esta enzima não foi alterada pela administração do dipeptídeo. Não foi observada alteração significativa entre os grupos.

Atividade da Enzima Creatina Cinase

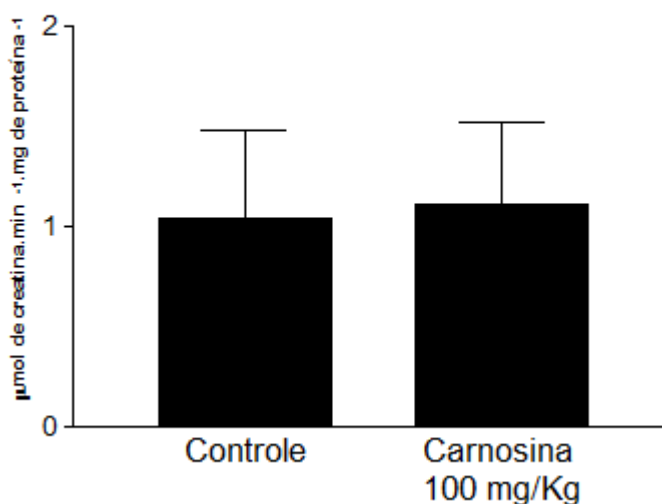


Figura 11: Atividade enzimática da creatina cinase em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\mu\text{mol de creatina} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Finalmente, foi investigado o efeito do tratamento crônico de carnosina na atividade das enzimas succinato desidrogenase e malato desidrogenase em músculo esquelético de ratos Wistar de 30 dias de vida. As atividades destas enzimas não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos animais que receberam a carnosina, quando comparado ao grupo controle (figuras 12 e 13, respectivamente).

Atividade da Enzima Succinato Desidrogenase

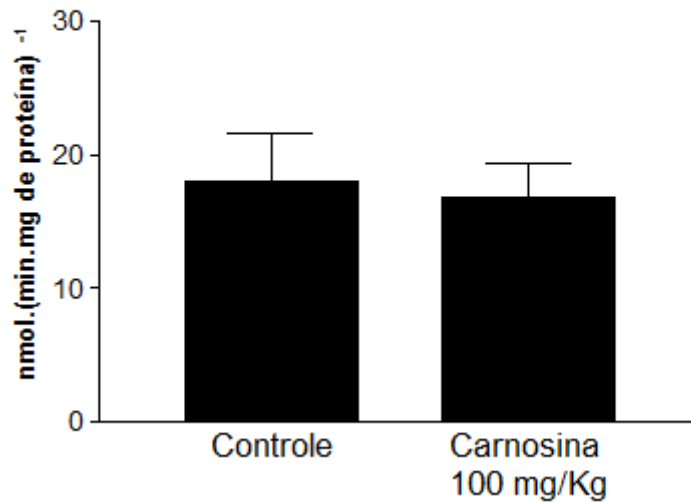


Figura 12: Atividade enzimática da succinato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\text{nmol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg de proteína})^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

Atividade da Enzima Malato Desidrogenase

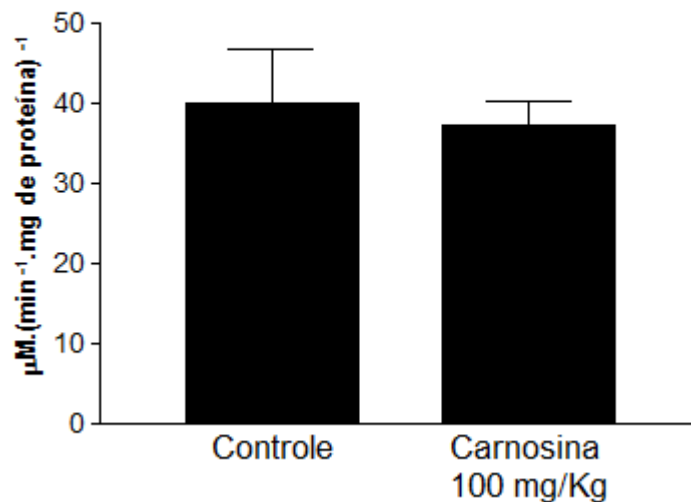


Figura 13: Atividade enzimática da malato desidrogenase em músculo esquelético de ratos tratados cronicamente com carnosina (100 mg/Kg). A atividade está expressa em $\mu\text{M} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg de proteína})^{-1}$ e os dados representam média \pm erro/desvio padrão da média para 6 experimentos independentes realizados em duplicata. Não foi observada alteração significativa entre os grupos. (*Teste t de Student para amostras independentes*)

5 DISCUSSÃO

No músculo esquelético humano, carnosina e homocarnosina (γ -aminobutiril-L-histidina) são sintetizadas por uma enzima ligase dependente da ATP, purificada e caracterizada recentemente, conhecida como carnosina sintetase (EC 6.3.2.11) (Drozak et al., 2010). Nesse tecido, estudos demonstraram que a concentração de carnosina é elevada pela suplementação dietética com β -alanina, o precursor limitante da via biossintética desse dipeptídeo (Derave et al., 2007; Baguet et al., 2009). Os níveis de carnosina no músculo esquelético geralmente se situam entre 30 e 50 mmol / kg de peso seco (Boldyrev & Severin, 1990), e variam também conforme a dieta, o sexo e a idade de um indivíduo (Everaert et al., 2011). O papel biológico da carnosina e de outros dipeptídeos imidazólicos no músculo de vertebrados em geral ainda é controverso, mas há forte evidência de que esses compostos atuem como agentes tamponantes (Abe, 2000).

Existe um número crescente de evidências a respeito dos efeitos da carnosina sobre a maquinaria metabólica. Além de sua atividade antioxidante (Quinn et al., 1992), esse dipeptídeo, bem como seu isômero D-carnosina, possui uma notável propriedade ligante de carbonilas de certos compostos, tais como os aldeídos (Aldini et al., 2011). Muitos desses compostos carbonílicos são produtos tóxicos do metabolismo e, na maior parte dos tecidos, são desintoxicados por oxidoredutases. Essas enzimas catalisam a oxidação ou a redução de aldeídos, ou sua conjugação com aminas e tióis de baixo peso molecular, tais como glutatona reduzida e dipeptídeos imidazólicos (Xie et al., 2013).

Acredita-se que a elevação do fluxo através da via glicolítica provoque aumento da geração de trioses-fosfato e depleção de NAD^+ . Conseqüentemente, o

excesso de trioses-fosfato que não é metabolizado pode ser convertido por uma via alternativa, que resulta em metilglioxal. O metilglioxal é um dos aldeídos tóxicos do metabolismo, os quais se ligam a proteínas e polipeptídeos, gerando macromoléculas aberrantes. Essas moléculas alteradas podem se acumular, acarretando redução da atividade proteolítica do sistema ubiquitina-proteossoma, disfunção mitocondrial, bem como indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Nesse cenário, a carnosina é capaz de reagir com o metilglioxal e outros intermediários reativos do metabolismo, bem como de inibir mecanismos envolvidos na isquemia e no envelhecimento (Hipkiss, 2010).

De fato, a carnosina pode exercer um efeito modulatório sobre a glicólise. Os mecanismos envolvidos são obscuros, mas já se sabe que o dipeptídeo pode inibir o complexo regulatório da respiração celular, conhecido como mTOR, alvo da rapamicina (Hipkiss, 2011). Outro mecanismo possível consiste da ativação de uma enzima da gliconeogênese, a frutose 1,6-bifosfatase, com consequente redução da atividade glicolítica, resultando na morte de células velhas e tumorais, que necessitam de glicólise intensa para suprir as suas necessidades energéticas (Hipkiss et al., 2013).

Korobov e colaboradores (1993) demonstraram que a adição de carnosina a mitocôndrias isoladas de fígado de ratos em adaptação à hipóxia hipobárica elevou a taxa da respiração celular estimulada por ADP com α -cetogluturato. Além disso, esses pesquisadores descobriram que a carnosina pode aumentar a intensidade (+100%) e a eficiência (+30%) da fosforilação oxidativa em mitocôndria de ratos adaptados à hipóxia.

Iovine e colaboradores (2012) relataram que a carnosina inibe a proliferação de células de câncer de cólon humano da linhagem HCT116. Nessas células, a

ativação do oncogene KRAS (*Sarcoma-2 Viral do Oncogene Homologo em ratos Kirsten*) induz a geração de ERO mitocondriais as quais, por sua vez, estimulam a proliferação celular. A expressão do oncogene KRAS resulta em ativação de fatores de transcrição que induzem a produção de ATP a partir da glicólise anaeróbia. A adição de 50–100 mM de carnosina em um meio com células HCT116 reduziu a concentração de ATP e de ERO e interrompeu o ciclo celular na fase G1, efeito que é provavelmente secundário à sua atividade inibitória sobre a glicólise (Hipkiss et al., 2013), bem como propriedades antioxidantes (Quinn et al., 1992).

No presente estudo, demonstrou-se que, em comparação com o grupo controle, a carnosina provocou uma redução estatisticamente significativa da atividade do complexo I-III e do complexo II da cadeia respiratória em ratos tratados agudamente com o dipeptídeo. No tratamento agudo, verificou-se uma tendência de redução, porém não significativa, da atividade do complexo II-III, da malato desidrogenase e da creatina quinase de ratos do grupo carnosina em relação ao grupo controle. Em animais administrados cronicamente com o dipeptídeo, observou-se apenas uma tendência de diminuição, embora não significativa, da atividade do complexo I-III do grupo carnosina em comparação com o grupo controle. Tanto no tratamento agudo quanto no tratamento crônico, não se observou diferença estatisticamente significativa da atividade da succinato desidrogenase entre ambos os grupos.

A atividade da malato desidrogenase dos ratos do grupo carnosina apresentou-se ligeiramente diminuída (administração aguda) ou normal (administração crônica), em relação aos ratos do grupo controle. Esse achado parece corroborar, em parte, algumas evidências da literatura. Neste sentido, Murphey e colaboradores (1973) realizaram biópsias de fígado, rim e baço de um

paciente com deficiência de carnosinase sérica, no intuito de avaliar a atividade da malato desidrogenase e da lactato desidrogenase. Sabe-se que pacientes com essa doença apresentam níveis muito elevados de carnosina no plasma. Esses pesquisadores descobriram que a atividade dessas enzimas estava dentro dos limites normais em todos os espécimes. Ressalta-se, porém, que nesse estudo não foram utilizados extratos de músculo esquelético.

Neste estudo, observou-se também que a atividade da succinato desidrogenase do grupo carnosina não se apresentou estatisticamente diferente à do grupo controle, independentemente do regime de administração utilizado (agudo ou crônico). Previamente, um estudo demonstrou que ratos intoxicados cronicamente com etanol apresentaram atividades reduzidas de várias enzimas hepáticas, incluindo a succinato desidrogenase. A administração profilática de carnosina 2 semanas antes da intoxicação, bem como a administração do dipeptídeo durante 2 semanas, após a abstinência, preveniram ou reverteram o efeito tóxico do etanol sobre esta atividade enzimática (Soliman et al., 2006).

Uma pesquisa que investigou o possível efeito da carnosina ($10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) sobre a toxicidade jejunal e hepática induzida por gentamicina em ratos, mostrou que, quando administrados concomitantemente, o dipeptídeo previniu o aumento da atividade da lactato desidrogenase e da succinato desidrogenase em ambos os órgãos, comparando-se aos ratos do grupo gentamicina. Ademais, o uso concomitante da carnosina normalizou a atividade de outras enzimas de ratos tratados com o antibiótico, incluindo as fosfatases ácida e alcalina e a adenosina trifosfatase (ATPase), em comparação com os ratos do grupo gentamicina (Soliman et al., 2006). Por outro lado, quando foi investigado o efeito da carnosina ($10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) sobre a nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos, observou-se que

a carnosina preveniu a elevação da atividade da lactato desidrogenase e inibição das enzimas succinato desidrogenase, fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas, e ATPase, observadas nos animais que receberam a administração isolada de gentamicina (Soliman, 2007).

Também se observou, no presente trabalho, que a atividade da enzima CK dos ratos do grupo carnosina apresentou-se levemente reduzida (administração aguda) ou normal (administração crônica) em relação aos ratos do grupo controle. Recentemente, realizou-se um estudo para investigar o efeito da carnosina ($10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) sobre o dano cardíaco induzido por adriamicina em ratos. Demonstrou-se que o grupo tratado apenas com adriamicina apresentou níveis plasmáticos elevados de marcadores de dano cardíaco (CK, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), em comparação com os ratos do grupo controle e do grupo que recebeu carnosina. Além disso, no grupo que recebeu adriamicina e carnosina, houve redução significativa dessas alterações induzidas por adriamicina em relação aos ratos tratados com adriamicina apenas (Özdoğan et al., 2011). Ainda que estes resultados possam estar relacionados primariamente a uma proteção das células cardíacas, impedindo a translocação da enzima para o plasma, não se pode descartar um efeito direto da carnosina inibindo a atividade da CK, conforme demonstrado neste estudo. É importante salientar que as conclusões deste estudo podem não ser extrapoláveis para a condição da isoenzima CK do músculo esquelético.

Bando e colaboradores (1986) demonstraram que, no hipotireoidismo, a atividade da carnosinase sérica possui correlação significativa com a concentração de tiroxina sérica e correlação negativa com a atividade da CK sérica. Dessa forma, pacientes com hipotireoidismo possuem reduzida atividade da carnosinase sérica.

Ressalta-se que, no tratamento agudo, observou-se redução significativa da atividade dos complexos I-III e II da cadeia respiratória, bem como uma tendência, embora não significativa, de redução da atividade do complexo II-III no grupo carnosina, quando comparado ao grupo controle. Já no tratamento crônico, houve apenas uma tendência não significativa de redução da atividade do complexo I-III no grupo carnosina, enquanto que a atividade dos outros complexos da cadeia respiratória não foi diferente estatisticamente em ambos os grupos. O mesmo poderia ser dito em relação à malato desidrogenase e CK. Tudo isso pode sugerir que essas estruturas se adaptaram às elevadas concentrações de carnosina do meio circundante no músculo esquelético, favorecendo a retomada da velocidade original.

Um mecanismo suposto envolvido nessa adaptação é o aumento da síntese de mitocôndrias, já que a maioria das enzimas investigadas no presente estudo apresenta localização mitocondrial. É possível que esse processo seja mediado primeiramente pela carnosina, ao estimular a síntese de vimentina, uma proteína de citoesqueleto (Ikeda et al., 1999). Nesse sentido, a vimentina é fortemente associada a movimento e localização mitocondrial (Nekrasova et al., 2011).

Concluindo, a administração de carnosina é capaz de inibir enzimas-chave do metabolismo energético de ratos que receberam agudamente este dipeptídeo. Esse achado não corrobora algumas evidências da literatura, que indicam que a carnosina aumenta a eficiência e a intensidade da fosforilação oxidativa mitocondrial de ratos adaptados à hipóxia hipobárica (Korobov et al., 1993). Em humanos, os níveis de carnosinase são praticamente indetectáveis no plasma de neonatos, aumentando com o avançar da idade (Lenney et al., 1982). Portanto, presume-se que uma disfunção energética secundária ao acúmulo de carnosina possa ajudar a explicar os

sintomas neuromusculares observados em pacientes jovens com deficiência de carnosinase sérica, especialmente durante as crises catabólicas agudas, bem como desvendar mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa rara doença.

REFERÊNCIAS

Abe H. Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry*. 2000; 65 (7):891-900.

Aldini G, Orioli M, Rossini G, Savi F, Braidotti P, Vistoli G, Yeum K J, Negrisoli G, Carini M. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats. *J Cell Mol Med*. 2011; 15 (6):1339–54.

Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. Protective effects of carnosine and homocarnosine on ferritin and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *J Cell Mol Med*. 2011; 43(10):683-7.

Apple FS, Hellsten Y, Clarkson PM. Early detection of skeletal muscle injury by assay of creatine kinase MM isoforms in serum after acute exercise. *Clin Chem*. 1988; 34: 1102-04.

Araújo, APQC. Doenças metabólicas com manifestações psiquiátricas. *Rev Psiquiatr Clín*. 2004; 31(6):285-89.

Baguet A, Reyngoudt H, Pottier A, Everaert I, Callens S, Achten E, Derave W. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. *J Appl Physiol*. 2009; 106: 837– 42.

Bakardjiev A, Bauer K. Transport of Betha-alanine by skeletal muscle cells in primary culture. *Eur J Biochem.* 1994; 225:617-23.

Bando K, Ichihara K, Shimotsuji T, Toyoshima H, Koda K, Hayaschi C, Miyai K. Reduced serum carnosinase activity in hypothyroidism. *Ann Clin Biochem.* 1986; 23(2):190–4.

Bauer K, Allermayer KH, Salnikow J, Kleinkaaunf H, Hamprecht B. Biosynthesis of carnosine and related peptides by glial cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1982; 257:3593-7.

Bellia F, Calabrese V, Guarino F, Cavallaro M, Cornelius C, De Pinto V. Carnosinase Levels in Aging Brain: Redox State Induction and Cellular Stress Response. *Antiox Redox Signal.* 2009; 11(11): 2759-75.

Bickel H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Adv Enzym Regul.* 1987; 38(1-4):14-26.

Boldyrev A A. Severin SE. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. In: *Adv Enzym Regul.* 1990; 30:175–188.

Boldyrev A A. Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects. In Tomasi A, Skulachev VP, Özben T, *Free Radicals.* Antalya, Turkey: IOS Press. 2003; 153-69.

Boldyrev A A. Carnosine [in Russian], Moscow State University Publishers, Moscow, 2000.

Boldyrev A A. Carnosine and Oxidative Stress in Cells and Tissues. Nova Publishers. New York, 2006.

Boldyrev A A, Fedorova T, Stepanova M, Dobrotvorskaya I, Kozlova E, Boldanova N, Bagyeva G, Ivanova-Smolenskaya I, Illarioshkin S. Source Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia. Erratum in Rejuvenation Res. 2008; 11(5):988-94.

Boldyrev A A, Severin Serguei E. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. In: Advances in enzyme regulation. 1990; 30:175-88.

Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. Prog Neurobiol. 1999; 56:1-22.

Burton BK. Inborn Errors Metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. Pediatrics. 1987; 79:359.

Caruso J, Charles J, Unruh K, Giebel R, Learmonth L, Potter W. Ergogenic effects of β -alanine and carnosine: proposed future research to quantify their efficacy. Nutrients. 2012; 4(7):585-601.

Chandler RJ, Zerfas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, Venditti CP. Mitochondrial Dysfunction in Mut Methylmalonid Acidemia. *FASEB J.* 2009; 23(4):1252-61.

Corona C, Frazzini V, Silvestri E, Lattanzio R, La Sorda R, Piantelli M, Canzoniero LM, Ciavardelli D, Rizzarelli E, Sensi SL. Carnosine [corrected] increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Res.* 2008; 11(4):821-7.

Cohen M, Hartlage PL, Krawiecki N, Roesel RA, Carter AL, Hommes FA. Serum carnosinase deficiency: a non-disabling phenotype? *J Ment Defic Res.* 1985; 29(4): 383-89.

Da Silva CG, Ribeiro CA, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wyse AT AT, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Jakobs C, Wajner M. Inhibition of cytochrome C oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by d-2 hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1586(1):81–91.

Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Schaftingen EV. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem.* 2010; 285(13):9346-56.

Eastmond PJ, Graham IA. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 2001; 6:72-77.

Everaert I, Mooyaart A, Baguet A, Zutinic A, Baelde H, Achten E, Taes Y, Heer ED, Derave W. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*. 2011; 40:1221–29.

Ferreira G, Viegas CM, Schuck PF, Latini A, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Vargas CR, Wajner M. Glutaric acid moderately compromises energy metabolism in rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 2005; 23(8):687– 693.

Fleisher LD, Rassin DK, Wisniewski K, Salwen HR. Carnosinase deficiency: a new variant with high residual activity. *Pediatr Res*. 1980; 14(4):269–71.

Fredericks S, Murray JF, Carter ND, Chesser AMS, Papachristou S, Yaqoob MM. Cardiac Troponin T and Creatine Kinase MB Content in Skeletal Muscle of the Uremic Rat. *Clin Chem*. 2002; 48:859-868.

Gjessing LR, Lunde HA, Morkrid L, Lenner JF, Sjaastadt O. Inborn errors of carnosine and homocarnosine metabolism. *J Neural Transm*. 1990; 29:91-106.

Gordon JR. A variant of carnosinemia with normal serum carnosinase activity in an infant. *Pediatr Res*. 1977; 11:456.

Gulewitsch W, Amiradzibi S. Über das carnosine, eine neue organische base des fleischextraktes *Ber Dtsch Chem Ges*. 1900; 33:1902–03.

Hansford RG. Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr Top Bioenerget.* 1980; 10:217-78.

Hipkiss AR. Aging proteotoxicity, mitochondria, glycation, NAD⁺ and carnosine: possible inter-relationships and resolution of the oxygen paradox. *Front Aging Neurosci.* 2010; 2(10):1–6.

Hipkiss AR. Energy metabolism, proteotoxic stress and age-related dysfunction – protection by carnosine. *Mol Aspects Med.* 2011; 32:267–278.

Hipkiss AR, Cartwright SP, Bromley C, Gross SR, Bill RM. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? *Chem Cent J.* 2013; 7:38.

Hoffman AM, Bakardjiev A, Bauer K. Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neurosci Lett.* 1996; 215:29-32.

Hommes FA. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics.* 1^a ed. New York: Wiley-Liss Inc, 1991.

Ikeda D, Wada S, Yoneda C, Abe H, Watabe S. Carnosine stimulates vimentin expression in cultured rat fibroblasts. *Cell Struct Funct.* 1999; 24:79–87.

Iovine B, Iannella ML, Nocella F, Pricolo MR, Bevilacqua MA. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* 2012; 315: 122–28.

Jackson MC, Kucera CM, Lenney JF. Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin Chim Acta.* 1991; 196:193-206.

Jackson MC, Lenney JF. Homocarnosinosis patients and great apes have a serum protein that cross-reacts with human serum carnosinase. *Clin Chim Acta.* 1992; 205: 109.

Jaeken J. Carnosinemia. In: Saudubray, Jean-Marie. *Orphanet Encyclopedia*, 2004.

Jardim LB, Ashton-Prolla P. Erros Inatos do Metabolismo em crianças e recém-nascidos agudamente enfermos: guia para seu diagnóstico e manejo. *J. Pediatr.* 1996; 72(2):63-70.

Kang JH. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PloS One.* 2011; 15;6(3):

Korobov VN, Doliba NM, Telegus I. Carnosine in adaptation to hypobaric hypoxia. *Biokhimiia.* 1993; 58 (5):740–44.

Kurata H, Fujii T, Tsutsui H, Katayama T, Ohkita M, Takaoka M, Tsuruoka N, Kiso Y, Ohno Y, Fujisawa Y, Shokoji T, Nishiyama A, Abe Y, Matsumura Y. Source

Department of Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences (Japan), 2006; 569-1094.

Lang H, Wurzburg U. Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clin Chem.* 1982; 1439-47.

Leininger ML. La carnosinémie: première observation française. *Pédiatrie* 1980; 35: 341.

Lenney JF, George RP, Weiss AM, Kucera CM, Chan PWH, Rinzler GS. Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clin Chim Acta.* 1982; 123:221–31.

Lenney JF, Peppers SC, Kucera CM, Sjaastadt O. Homocarnosinosis: lack of serum carnosinase is the defect probably responsible for elevated brain and CSF homocarnosine. *Clin Chim Acta.* 1983; 132:157-65.

Lenney JF. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J.* 1985; 228: 653-60.

Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet.* 2000; 355(9200):299-304.

Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet.* 2000; 355 (9201):389-394.

Lieberman MA, Marks A. Marks', Basic medical biochemistry: Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins, third edition, 2008. p.1024.

Murphey WH, Lindmark DG, Patchen LI, Housler ME, Harrod EK, Mosovich L. Serum carnosinase deficiency concomitant with mental retardation. *Pediat Res.* 1973; 7: 601–06.

Martins AM. Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica. 2ª ed. São Paulo, 2003.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to elétron and hidrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 1961; 191:144-8.

Murphey WH. Serun carnosinase deficiency concomitant with mental retardation, *Pediat Res.* 1973; 7:601-06.

Nekrasova OE, Mendez MG, Chernovivanenko IS, Tyurin-kuzmin PA, Kuczmarski E R, Gelfand VI, Goldman RD, Minn AA. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell.* 2011; 22:2282–89.

Otani H. Colocalization of a carnosine-splitting enzyme, tissue carnosinase (CN2)/cytosolic non-specific dipeptidase 2 (CNDP2), with histidinedecarboxylase in the tuberomammillary nucleus of the hypothalamus. *Neurosci Lett.* 2008; 445:166-69.

Peters V, Jansen EEW, Jakobs C, Riedl E, Janssen B, Yard BA. Anserine inhibits carnosine degradation but in human serum carnosinase (CN1) is not correlated with histidine dipeptide concentration. *Clin Chim Act.* 2011; 412:263-67.

Pegova A, Abe H, Boldyrev A. Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comp Biochem Physiol.* 2000; 127:443-46.

Pilla C, Cardozo RF, Doernelles PK, Dutra-filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM. Kinetic studies on the inhibition of creatine kinase activity by branched-chain alpha-amino acids in the brain cortex of rats. *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21:145-151.

Ogier H, Charpentier C, Saudubray JM. Organic Acidemias. In: Fernandes JM, Saudubray JM, Tada K (eds.) *Inborn Metabolic Diseases*. Berlin, Springer Verlag, 1990.

Özdoğan K, Taskin E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats. *Anadolu. Kardiyol Derg.* 2011; 11(1): 3–10.

Perry TL, Hansen S, Tischler B, Busting R, Berry K. Carnosinemia: metabolic disorder with neurologic disease and mental defect. *New Eng J Med.* 1967; 277:1219-27.

Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk V. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Molec Aspects Med.* 1992; 13:379–444.

Rosa RB, Schuck PF, de Assis DR, Latini A, Dalcin KB, Ribeiro CA, da C Ferreira G, Maria RC, Leipnitz G, Perry ML, Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M. Inhibition of energy metabolism by 2-methylacetoacetate and 2-methyl-3-hydroxybutyrate in cerebral cortex of developing rats. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28(4):501–515.

Sanseverino MTV, Wajner M, Giugliani R. Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. *J Pediatr.* 2000; 375-82.

Scriver CR, Beaudel AL, Valle D. The metabolic and molecular bases on inherited disease. 8ª ed. NY: McGraw-Hill inc, 2001.

Scriver CR, Gibson KM. Disorders of β - and γ -amino acids in free and peptide-linked forms. In: SCRIVER, C. R. et al (Eds.). *The metabolic basis of inherited disease*, 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995; p 1349.

Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet.* 2006; 368(9529):70-82.

Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* 2008; 33(12):2502-9.

Sjaastad O, Berstad J, Gjesdahl P, Gjessing LR. Homocarnosinosis. 2. A familial metabolic disorder associated with spastic paraplegia, progressive mental deficiency, and retinal pigmentation. *Acta Neurol Scand.* 1976; 53:275-290.

Saudubray JM, Walter JH, Van den Berghe G. *Inborn Metabolic Diseases.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.

Schoen P, Everts H, de Boer T, van Oeveren W. Serum carnosinase activity in plasma and serum: validation of a method and values in cardiopulmonary bypass surgery. *Clin Chem.* 2003; 49(11):1930-1932.

Schuck PF, Ferreira G da C, Tonin AM, Viegas CM, Busanello EN, Moura AP, Zanatta A, Klamt F, Wajner M. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Res.* 2009; 3(1296):117-26.

Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LGJ, Rodenburg RJT, Van den Heuvel LP, Dröse S, Brandt U, Hoffmann GF, Ter Laak H, Kölker S, Smeitin, JAM. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J.* 2006; 15(398):107–12

Scriver CR, Davies E. Endogenous renal clearance rates of free amino acids in pre-pubertal children. *Pediatrics.* 1965; 32:592.

Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th New York: McGraw-Hill, 2001.

Soliman KM, Abdull-Hamid M, Othman AI. Effect of carnosine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Med Sci Monit.* 2007; 13(3):73-83.

Soliman KM, Hamed MA, Ali SA. Hepatoprotective effect of carnosine on liver biochemical parameters in chronic ethanol intoxicated rat. *Med J of Islamic World Academy of Sciences* 2006; 16(2)77–86.

Soliman KM, Othman AI, Abdul-Hamid M. Carnosine ameliorates liver and jejunum toxicity induced by gentamicin. *Egypt J Histol.* 2006; 29(2):269–280.

Tanaka RA, Ramos FM de M, Almeida SM de, Vizioli MR, Bóscolo FN. Avaliação do efeito radioprotetor da carnosina (beta-alanil-1- histidina) no processo de cicatrização em ratos. *J Appl Oral Sci.* 2005; 13(3):253-58.

Teufel, M. Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, Cairns NJ, Carter C, Cowley DJ, Duverger D, Ganzhorn AJ, Guenet C, Heintzelmann B, Laucher V, Sauvage C, Smirnova T. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non specific dipeptidase. *The J Biol Chem.* 2003; 278(8):6521-31.

Tocci PM, Bessman SP. Histidine peptiduria. In: Nyhan WL (Ed.). *Amino acid metabolism and genetic variation.* New York: McGraw-Hill, 1967; p 161.

Tonin AM, Ferreira GC, Grings M, Viegas CM, Busanello EN, Amaral AU, Zanatta A, Schuck PF, Wajner M. Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life Sci.* 2010; 86(21-22):825-31

Vargas CR. Investigação de erros inatos do metabolismo. *Rev HCPA.* 2001.

Van Hesswijk PJ. A patient with a deficiency of serum-carnosinase activity. *Acta Paediatr Scand.* 1969; 58:584.

Wajner M, K lker S, Souza DO, Hoffmann GF, de Mello CF. Modulation of glutamatergic and gabaergic neurotransmission in glutaryl-coA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2004b; 27(6):825–828.

Wajner M, Goodman SI. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr.* 2011; 43(1):31-8.

Weber J, Senior AE. Catalytic mechanism of F₁-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1319:19-58.

Willi SM, Zhang Y, Hill JB, Phelan MC, Michaelis RC, Holden KR. A deletion in the long arm of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. *Pediatr Res.* 1997; 41:210-213.

Wim Derave W, Özdemir MS, Harris RC, Pottier A, Reyngoudt H, Kopp K, Wise JA, Achten E. β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J of Appl Physiol*. 2007; 103:1736–43.

Wyss M, Kaddurak Daouk R. Creatine and Creatinine metabolism. *Physiol Rev*. 2000; 80(3):1107-13.

Xie Z, Baba SP, Sweeney BR, Barski OA. Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: from chemistry to clinical implications. *Chem Biol Interact*. 2013; 202(1-3):288-97.

Yen WJ. Inhibition of lipid peroxidation and nonlipid oxidative damage by carnosine. *J Am Oil Chem Soc*. 2002; 79(4):329–33.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER CEUA

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 67/2012

Professor:

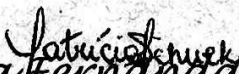
Gustavo da Costa Ferreira

Título: "Avaliação da toxicidade in vivo e in vitro da carnosina sobre parâmetros do metabolismo, de estresse oxidativo e neuroquímicos"

"Assessment of in vivo and in vitro carnosine toxicity on energy metabolism, oxidative stress and neurochemical parameters"

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA. www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 12 de junho de 2012.


Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA