**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

VANDERSON DA SILVA BISPO

**Investigação dos mecanismos biológicos de detoxificação de
aldeídos α,β -insaturados em ratos SOD^{G93A} modelo para ALS.**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
18/06/2015

VANDERSON DA SILVA BISPO

**Investigação dos mecanismos biológicos de detoxificação de
aldeídos α,β -insaturados em ratos SOD^{G93A} modelo para ALS.**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^a. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bispo, Vanderson da Silva
B623i Investigação dos mecanismos biológicos de detoxificação de
aldeídos α,β - insaturados em ratos SOD^{G93A} modelo para ALS /
Vanderson da Silva Bispo -- São Paulo, 2015.
124p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Medeiros, Marisa Helena Gennari de

1. Radicais livres 2. Estresse oxidativo 3. Metabólitos
secundários I. T. II. Medeiros, Marisa Helena Gennari de,
orientador.

574.192 CDD

AGRADECIMENTOS

Ao final de cada ciclo em nossas vidas é inevitável olharmos para trás e percebermos o tamanho da jornada que já percorremos e vemos em cada pegada um companheiro que passou por nós nesse longo trajeto. Contudo, mais gratificante ainda é olharmos ao nosso lado e reconhecermos os que apesar de todas as pedras, ventos ou tempestades, continuam ao nosso lado. Nesse momento um obrigado se torna pouco perto de toda a gratidão que nos enche, mas ainda assim, não pode deixar de ser dito.

Muito obrigado Chrislaine, minha esposa e eterna “Moça” que o destino pôs no meu caminho para tornar cada um dos meus dias menos monótonos! Obrigado por ser aquela que nos últimos 04 anos compartilhou comigo todas as frustrações e alegrias que a vida nos impõe, por estar ao meu lado sempre e por ter sempre a certeza de que não importa as dificuldades sempre poderei contar com você. Obrigado por me fazer uma pessoa melhor e por todas as provações que passamos em busca da família que queremos (e iremos) construir. TE AMO muito!!

Obrigado a minha mãe, minha eterna “Betinha” por cada lágrima (chorada e contida) nesses longos anos de afastamento e pelo amor que mesmo a distância se faz presente em cada instante em minha vida. Obrigado a meu pai pelo apoio incondicional, suporte e acima de tudo por sempre ser um modelo de homem na minha vida. Tenha certeza pai que cada passo que dou é por ser o homem que você me ensinou a ser! Obrigado aos meus irmãos Valberson e Elyonara, cuja vida nos distanciou nos últimos anos, mas que sempre trago com muito carinho no coração.

Obrigado a Prof.^a Marisa Medeiros pela oportunidade que me concedeu em seu grupo de pesquisa, permitido que desenvolvesse esse trabalho com toda liberdade. Muito obrigado também pela compreensão em momentos delicados e pelo suporte (mesmo amigo) quando se fez necessário. Foi uma grande honra fazer parte do seu grupo.

Obrigado ao professor Paolo DiMascio pela liberdade com que pude usufruir da infraestrutura do seu laboratório.

Obrigado a Dona Cristina (minha sogra), Eduardo, Junior, Dayane, Cristiane, Jade e Julia. Pelo carinho e apoio com que me receberam em sua família (agora minha também)!

Obrigado ao Prof. Humberto Matos pelas muitas broncas. E mais ainda aos eternos amigos do LEOPAR: Fabíula, Adriano, Lucas, Isabella e Ray pelas muitas cervejas e pelos tantos momentos de risadas e compartilhamento. Vocês tornaram essa jornada bem mais fácil.

Obrigado às colegas de laboratório Angélica e Adriana pelas conversar amigas, estudos compartilhados, ajuda em experimentos e pelos muitos cafés nos corredores do IQ!! Obrigado a turma do “AREIÃO – CEPE” por ter tornados as terças e quintas muito mais divertidas. Obrigado as técnicas Fernanda, Isaura e Thaís pelo suporte nos experimentos, pelos muitos favores (muitos mesmos!!) e pela amizade nos anos de convivência. Obrigado ao “Osmarção” por em tão pouco tempo tem me ensinado tanto sobre cromatografia e pelo carinho com que me recebeu recém chegado ao grupo.

Obrigado a FAPESP pela bolsa concedida (Proc. 2011/10048-5 e 2012/12663-1) bem como demais apoios financeiros: INCT Redoxoma (FAPESP/CNPq/CAPES; Proc. 573530/2008-4), NAP-Redoxoma (PRPUSP; Proc. 2011.1.9352.1.8), CEPID-Redoxoma (FAPESP; Proc. 2013/07937-8).

Obrigado a vida pelas oportunidades, lágrimas e aprendizado. Obrigado por cada pedra no caminho. Por cada noite de sono mal dormida. Por cada sorriso e por cada por do sol. Obrigado a cada um que por descuido ou esquecimento, não citei. Se não fosse por tudo isso e por todos você não teria chegado até aqui.

Realmente muito obrigado.

Epígrafe

"Quando alguém tiver mérito aos vossos olhos, põe-lhe obstáculos a tudo quanto deseja e a tudo quanto empreende. Se o mérito for real ele saberá por abaixo ou contorná-los"

Stendhal - O vermelho e o negro

RESUMO

Bispo, V.S. **Investigação dos mecanismos biológicos de detoxificação de aldeídos α,β -insaturados em ratos SOD^{G93A} modelo para ALS**. 2015. 124p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A lipoperoxidação gera diversas espécies carbonílicas altamente reativas dentre as quais se destacam acroleína (ACR), malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). A principal via endógena de metabolização desses compostos é através de conjugação com glutatona por ação da glutatona-S-transferase. Contudo, diversos trabalhos têm mostrado que dipeptídeos contendo histidina, tal como a carnosina (CAR), também podem formar conjugados com aldeídos e auxiliar na detoxificação desses compostos. Em nosso trabalho adutos de CAR com ACR, HHE, HHEd₅, HNE e HNEd₁₁ foram sintetizados, purificados e caracterizados. A reação da CAR com ACR foi estudada em detalhes. Resultados mostraram que a carnosina reage com acroleína formando 03 produtos principais: $m/z = 265$, $m/z = 283$ e $m/z = 303$, sendo este último mais estável e mais abundante. Dados de RMN ¹H, COSY e HSQC permitiram elucidar a estrutura dessa molécula ($m/z = 303$) e propor uma rota de reação. Em seguida, uma metodologia baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo “Ion Trap” (ESI⁺ HPLC/MS-MS) foi desenvolvida e validada para quantificação simultânea dos adutos sintetizados. Pelo método desenvolvido é possível quantificar com precisão 25 pmol de CAR-HHE, 1 pmol de CAR-ACR e 1 pmol de CAR-HNE com um coeficiente de variação de aproximadamente 10 % e acurácia de 98 % (HHEd₅ e HNEd₁₁ foram usados como padrão interno). Análise em urina de adultos não fumantes mostraram que os produtos sintetizados estão presentes na urina de humanos em concentrações de $3,6 \pm 1,4$; $2,3 \pm$

1,5 e $1,3 \pm 0,5$ nmol / mg de creatinina, respectivamente para CAR-ACR, CAR-HHE e CAR-HNE. Em ratos transgênicos SOD^{G93A} modelo para esclerose lateral amiotrófica (ELA), a suplementação da dieta dos animais com 35 ± 5 mg carnosina/animal/semana melhorou a manutenção do peso e a sobrevida dos animais. Análises dos adutos sintetizados em amostras de músculo sugerem que a metabolização de aldeídos esteja comprometida nesses animais e que a carnosina poderia funcionar como “scavenger” para esses compostos. Esses resultados comprovam que dipeptídeos de histidina atuam na detoxificação de compostos carbonílicos e participa de suas vias de excreção. Além disso, a caracterização da estrutura e desenvolvimento de método sensível de detecção abre a possibilidade de utilização desses adutos como biomarcadores de estresse redox e exposição a aldeídos.

Palavras-chave: Carnosina, acroleína, HHE, HNE, ESI⁺ HPLC-MS/MS, ELA

ABSTRACT

Bispo, V.S. **Investigation of the α,β -unsaturated aldehydes biological detoxification mechanism in SOD^{G93A} rats model to ALS.** 2015. 124p. PhD Thesis - Pos – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lipid peroxidation generates reactive carbonyl species, including 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), acrolein (ACR), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and malondialdehyde (MDA). One major pathway of aldehyde detoxification *in vivo* is through conjugation with glutathione catalyzed by glutathione-S-transferases or, alternatively, by conjugation with endogenous histidine containing dipeptides, such as carnosine (CAR). The reaction of CAR with ACR was investigated in an effort to assess its possible biological role. One stable adduct was isolated by reverse-phase HPLC and characterized on the basis of extensive spectroscopic measurements. The proposed reaction route for product formation involves the reaction of the CAR amino group with ACR via a Schiff base formation followed by dehydration and cyclization through Michael addition in the imidazole ring forming an instable compound with $m/z = 265$. The subsequent reaction with another molecule of ACR followed by cyclization gives rise to the final product with $m/z = 303$. A highly sensitive method involving HPLC-MS analysis was developed for the simultaneous accurate quantification of CAR-ACR, CAR-HHE and CAR-HNE adducts in human urinary samples from non-smoking adults. This methodology permits quantification of 10 pmol CAR-HHE and 1 pmol of CAR-ACR and CAR-HNE. Adduct levels in urine were 3.6 ± 1.4 , 2.3 ± 1.5 , 1.3 ± 0.5 nmol/mg of creatinine, respectively to CAR-ACR, CAR-HHE and CAR-HNE. In SOD^{G93A} transgenic rats model to amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the food supplementation of the animals with 35 ± 5 mg carnosine/animal/week improve de body weight and the life span of the ALS treated group. Analysis of the synthesized adducts in muscle sample showed suggest

than aldehyde metabolism is compromised in these animals and that may be carnosine work like a scavenger for these compounds. Our results indicate that carnosine adduction can be an important detoxification route of α,β -unsaturated aldehydes. Moreover, carnosine adducts quantification may be useful as redox stress indicator *in vivo*.

Keywords: Carnosine, Acrolein, HHE, HNE, ESI⁺ HPLC/MS-MS, ALS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ACR	Acroleína
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALS	Sigla em inglês para esclerose lateral amiotrófica
CAR	Carnosina
CAR-ACR	Composto com $m/z = 303$ purificado da reação da carnosina com acroleína
CAR-HHE	Composto com $m/z = 341$ purificado da reação da carnosina com HHE
CAR-HNE	Composto com $m/z = 383$ purificado da reação da carnosina com HNE
COSY	Sigla em inglês para ressonância magnética nuclear de correlação homonuclear espectroscópica
dGuo	2'-desoxiguanosina
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EROs	Espécies reativas
ESI	Sigla em inglês para Ionização por eletrospray
FDA	Sigla para <i>U.S. Food and Drug Administration</i>
Gpx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfeto
GST	Glutathione S-transferase
HHE	<i>Trans</i> -4-hidroxi-2(E)-hexenal
HNE	<i>Trans</i> -4-hidroxi-2(E)-nonenal

HPLC/ESI/MS-MS Sigla em inglês para cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray e análise de massas após fragmentação da molécula selecionada

HSQC Sigla em inglês para ressonância magnética nuclear de correlação heteronuclear de simples quanta

MDA Malonodialdeído

MS Sigla em inglês para espectrômetro de massas ou espectrometria de massas

PCR Sigla em inglês para reação em cadeia da polimerase

RAGE Sigla em inglês para receptores para produtos finais da glicação avançada

RMN ¹³C Ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ¹H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SDS Sigla em inglês para dodecilsulfato de sódio

SOD Superóxido dismutase

SOD1 Cu,Zn-superóxido dismutase

SOD1h Cu,Zn-superóxido dismutase humana

SOD1h^{G93A} Enzima Cu,Zn-Superóxido dismutase humana com modificação da glicina 93 por alanina.

SRM Sigla em inglês para monitoramento de reação simples

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Carnosina.....	17
1.1.1 Estrutura, metabolismo e função	17
1.1.2 Atividades Biológicas	21
1.2 Aldeídos Insaturados	24
1.3 Aldeídos α,β - insaturados: potenciais biomarcadores.....	36
1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).....	39
2 OBJETIVO.....	42
2.1 Geral	42
2.2 Específicos.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Reagentes e Materiais	43
3.2 Síntese e Purificação dos Adutos de Carnosina	43
3.2.1 Síntese e Purificação Aduto Carnosina-HHE	43
3.2.2 Síntese e Purificação Aduto Carnosina-HHEd ₅	44
3.2.3 Síntese e Purificação do Aduto Carnosina-HNE	45
3.2.4 Síntese e Purificação do Aduto Carnosina-HNEd ₁₁	46
3.2.5 Síntese e Purificação do Aduto Carnosina-Acroleína.....	46
3.3 Análise do Perfil de Fragmentação.....	47

3.4	Determinação do Coeficiente de Absortividade Molar.....	47
3.5	Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	48
3.6	Metodologia para Quantificação Simultânea de Adutos de Carnosina.....	49
3.7	Validação do método proposto	51
3.8	Análises de Amostras de Urina.....	52
3.9	Curvas Padrões.....	52
3.10	Quantificação de creatinina em urina.....	53
3.11	Experimentação Animal.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	Síntese, Purificação e Caracterização dos Adutos de Carnosina	60
4.1.1	CAR-HHE, CAR-HHEd ₅ , CAR-HNE e CAR-HNEd ₁₁	60
4.1.2	Síntese, Purificação e Caracterização do Aduto CAR-ACR.....	66
4.2	Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação dos Adutos de Carnosina..	76
4.2.1	Seletividade	78
4.2.2	Efeito Matriz.....	80
4.2.3	Linearidade e Faixa de Trabalho	80
4.2.4	Recuperação	82
4.2.5	Precisão	88
4.2.6	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	92
4.2	Animais transgênicos ALS SOD ^{G93A}	96

4.3	Quantificação Simultânea de Adutos de Carnosina em Urina de Humanos	103
5	CONCLUSÃO	107
6	REFERÊNCIAS	108
7	APÊNDICES	124
7.1	Anexo 01 – Parecer 891/CEP (Comissão de Ética de Pesquisa com Seres Humanos, ICB/USP) para o projeto “Estudo de biomarcadores de estresse redox em sangue e urina de humanos”	124
7.2	Anexo 02 – Parecer CECUA-IQ USP (Comissão de Ética em Cuidado e Uso Animal do Instituto de Química – USP) 25/02/2088 para o projeto “Esclerose Lateral Amiotrófica: Investigação de possíveis biomarcadores e novas estratégias antioxidantes em ratos transgênicos SOD ^{G93A} ”	125
	SÚMULA CURRICULAR	126

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carnosina

1.1.1 Estrutura, metabolismo e função

Dipeptídeos contendo histidina são componentes celulares abundantes e amplamente distribuídos pelo reino animal (Xie et al., 2013). A diferença entre os diversos representantes dessa classe se faz principalmente pela presença de aminoácidos não-essenciais ligados a uma molécula de histidina, sendo essa substituição espécie e tecido dependente. A anserina, por exemplo, ou π -metil β -alanil histidina é um peptídeo abundante em músculo peitoral de aves e coelhos (Boldyrev e Severin, 1990). Baleína ou τ -metil β -alanil histidina é encontrado em músculos de baleia e golfinhos (Zapp e Wilson, 1938). A homocarnosina ou γ -hidroxibutiril histidina está presente no sistema nervoso central de humanos (Crush, 1970). Dessa forma, dipeptídeos contendo histidina fazem parte de um seletivo grupo de moléculas de baixa massa molecular encontradas em faixas de concentração milimolar nas mais diversas espécies (Harris et al., 2012). Contudo, apesar da incrível difusão no reino animal a função específica de cada um desses compostos ainda não é totalmente conhecida (Xie et al., 2013).

Em humanos, especial atenção tem sido dada a um desses peptídeos abundante no cérebro e no músculo esquelético: carnosina ou β -alanil histidina. A carnosina foi descoberta em 1900 pelo cientista russo Gulewitsch em amostras de carne, daí seu nome “do latim carnos” = carne (Boldyrev, 2000). Posteriormente Krimberg (1906)

demonstrou que esse peptídeo era composto por β -alanina e histidina. Uma vez que β -alanina não

é um aminoácido comumente presente em proteínas humanas, é amplamente aceito que a concentração tecidual de carnosina não é proveniente do catabolismo protéico (Bauer, 2005). Diversos autores têm demonstrado que suplementação da dieta com carnosina ou β -alanina pode causar um aumento de até 80 % no conteúdo de carnosina no músculo (Hill et al., 2007; Harris et al., 2012), comprovando que a alimentação é a principal fonte de precursores para síntese de carnosina.

O transporte de β -alanina até os músculos é feito por proteínas específicas transportadoras de β -aminoácidos que é dependente de Na^+ e Cl^- numa proporção de 1: 2: 1 respectivamente (Miyamoto et al., 1990; Ramamoorthy et al., 1994), com K_m de 40 μM (Bakardjiev e Bauer 1994). Uma vez no músculo β -alanina é rapidamente convertida a carnosina pela ação da enzima ‘Carnosina Sintetase’ (ATPGD1), a qual utiliza hidrólise de ATP para formação da ligação peptídica com histidina (Bauer, 2005). Considerando-se que o K_m dessa enzima para histidina é 16,8 μM (Horinishi et al., 1978) e para β -alanina 2 mM (Ng e Marshall 1978) e que esses dois aminoácidos são abundantes na célula, é amplamente aceito que a síntese de carnosina é constitutiva e limitada apenas pela disponibilidade citosólica de β -alanina. O excesso desses aminoácidos é excretado na urina (Harris et al., 2006). Já a carnosina em excesso pode ser excretada de forma intacta ou sofrer hidrólise por 02 proteínas da família M20 das metaloproteases (Figura 01):

- CN1 ou Carnosinase possui especificidade por substratos de dipeptídeos X – His (Boldyrev, 1990). Uma vez lançada no plasma grande parte da carnosina é rapidamente hidrolisada por essa enzima aos seus aminoácidos constituintes (Asatoor et al., 1970);

- CN2 ou Peptidase Citosólica Inespecífica a qual não possui especificidade de substrato (Zapp et al., 1938).

Figura 01 – Representação esquemática da síntese e degradação da carnosina. A síntese é realizada pela enzima constitutiva ‘Carnosina sintetase’ presente no citoplasma sob hidrólise de ATP. Essa enzima também catalisa a formação a homocarnosina. A hidrólise dos dipeptídeos de histidina é feita por duas enzimas da família das metaloproteases, sendo a forma chamada CN1(Carnosinase) específica para carnosina.

Como já mencionado anteriormente, apesar de sua alta concentração celular, que em músculo humano é cerca de 20 mmol/Kg de músculo seco (Sale et al., 2010), nenhuma função específica é atribuída a carnosina. Considerando o pKa do anel imidazólico da molécula de 6,83 a idéia de que esse peptídeo atua como tampão celular passou a ser amplamente aceita (Skulachev, 2000; Harris et al., 2012). Harris et al., (1990) usou a fórmula de Henderson-Hasselbalch para estimar o efeito da carnosina sobre o pH citosólico. O cálculo foi feito considerando que sem a carnosina o citosol possui uma capacidade tamponante de aproximadamente 130 mmol H⁺/Kg dm/unidades de pH. Assim, os autores puderam concluir que sem o conteúdo de carnosina o músculo *vastus lateralis* do cavalo, ao final de uma corrida, teria pH em torno de 5 (o que não seria possível, pois as fibras perderiam sua capacidade contrátil bem antes disso). Bate Smith,

(1938) demonstra que cerca de 40 % da capacidade tamponante em músculo esquelético de mamíferos provém de dipeptídeos de histidina. Em *vastus lateralis* de humanos Hill et al., (2007) sugerem que a carnosina é responsável por 10 % da capacidade tamponante desse músculo. O tampão fosfato, por exemplo, um dos mais abundantes e importantes sistemas tamponantes *in vivo*, seria responsável por cerca de 35 % da capacidade tamponante em músculo esquelético de mamíferos (Bate Smith, 1938). Em experimentos com músculo *sartorius* isolado de sapo, Severin et al., (1953) demonstraram aumento da resistência a fadiga por estimulação elétrica, quando em presença de carnosina. Estes autores mostraram que o acúmulo de altas concentrações de lactato poderia ocorrer no músculo, em presença de carnosina, sem que houvesse detrimento da ação muscular. Em contrapartida, em ausência de carnosina, o excesso de lactato levava a acidificação do tecido acarretando fadiga do músculo isolado. Corroborando com esses achados, trabalhos recentes também têm confirmado que a suplementação de atletas com β -alanina aumenta a concentração de carnosina nos músculos esqueléticos, melhora o desempenho e diminui o estresse pós-treino (Hill et al., 2007; Sale et al., 2010; Harris et al., 2012).

Alguns autores têm sugerido que os efeitos da carnosina sobre o músculo esquelético vão além da sua capacidade tamponante. Lamont e Miller (1992) mostraram que a presença de carnosina reduz a quantidade de íons Ca^{2+} necessária para induzir metade da contração máxima em músculo estriado isolado além de aumentar a força de contração do mesmo. Em trabalho semelhante Dutka e Lamb (2004) demonstraram uma correlação linear entre o aumento da sensibilidade ao Ca^{2+} e a adição de carnosina ao citoplasma muscular. Os autores concluíram que os efeitos da carnosina resultam da sensibilização do aparato contrátil aos íons Ca^{2+} , sem causar liberação adicional de íons pelo retículo sarcoplasmático. Isso poderia ser conseguido por estabilização dos íons de cálcio no citoplasma, com posterior liberação, uma vez que diversos

autores já demonstraram a capacidade da carnosina como quelante de metais (Matsukura et al., 1990; Matsukura e Tanaka, 2000).

Juntos, esses achados parecem apoiar a idéia de que, em músculo, a principal função celular das altas concentrações de carnosina seria a manutenção do pH citosólico e da força de contração. Contudo, não parece plausível que em órgãos menos susceptíveis a mudanças bruscas de pH, como cérebro, a carnosina desempenhe a mesma função.

1.1.2 Atividades Biológicas

Desde sua descoberta do início do século XX as mais diversas funções têm sido atribuídas a carnosina. Devido a sua alta concentração no bulbo olfatório Margiolis, (1974) sugeriu que ela poderia funcionar como neurotransmissor olfatório, o que nunca foi totalmente comprovado, mas ainda assim, permanece como uma de suas atribuições. Trabalhos mais recentes têm sugerido que talvez a abundância de carnosina no sistema nervoso central seria uma forma de “reserva cerebral de histidina” para síntese de histamina (Jin et al., 2005), um importante neurotransmissor. Essa teoria tem sido cada vez mais aceita, uma vez que: a histamina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e a carnosina sim (Matsukura e Tanaka, 2000), a suplementação intraperitoneal em ratos causa aumento da concentração de carnosina no hipotálamo, tálamo, hipocampo e amígdala dos animais (Jin et al., 2005) e que esses níveis elevados de carnosina reduz a crise epiléptica induzida por penicilina (que possui correlação direta com os níveis de histamina) (Kosan et al., 2008).

Em verdade os dados da literatura sugerem cada vez mais atividades biológicas centrais para carnosina. Em trabalho com células SH-SY5Y, Brownring et al., (2011), mostraram que o tratamento com carnosina atenua a toxicidade induzida por ‘*melanóide derivado da serotonina*’ aumentando a viabilidade celular. Em células de grânulos cerebelar a carnosina diminui os efeitos

tóxicos do ácido caínico e da 3-morfolinosidnominina (SIN-1) (Boldyrev et al., 1999). Em ratos Stvolinsky et al. (1999), demonstraram que a suplementação dos animais com carnosina atenua os efeitos da isquemia, agindo como neuroprotetor e que esse efeitos são em parte pela modulação de enzimas que controlam a homeostase da célula nervosa como a $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$. Tratamento oral com 5,6 mg de carnosina/dia em camundongos transgênicos modelos para Alzheimer mostrou diminuição do déficit cognitivo (Herculano et al., 2013). Nesse estudo, animais tratados com carnosina tiveram menos ativação da microglia e conseqüentemente menor resposta inflamatória além de uma diminuição da expressão de RAGE (receptores para produtos finais da glicação avançada). Também já foi sugerido que a carnosina seria capaz de proteger o cérebro de ratos contra os efeitos deletérios do etanol (Turkcu et al., 2010).

Em humanos, praticamente inexiste literatura que correlacione a suplementação da dieta com carnosina e seus efeitos sobre o sistema nervoso central. Em um dos poucos estudos disponíveis, Balion et al., (2007) tentam fazer uma correlação entre a atividade de carnosinase plasmática e desordens como demência mista (DM) e Alzheimer (AD) em 37 pacientes atendidos pelo “Geriatric Outpatient Clinic at Hamilton Health Science” em Ontário, Canadá. Os resultados não mostraram diferença entre os pacientes sem demência e os pacientes com AD. Contudo, uma diminuição significativa da atividade de carnosinase sérica foi observada em pacientes com DM e AD (média da diferença = $17,8/\mu\text{mol/mL/h}$). Dieta, fontes de carnosina e medicamentos foram excluídos como fonte da diferença. Considerando o número pequeno de pacientes analisados e a dificuldade em se diagnosticar com precisão essas desordens, tal estudo não foi conclusivo.

Aplicações biológicas da carnosina e seus derivados têm sido cada vez mais exploradas como opções terapêuticas. Em trabalho de 1990, Matsukura et al., descrevem um complexo formado pela carnosina com Zn^{2+} . Os autores perceberam que em presença de metóxido de sódio

a carnosina reage com acetato de zinco, formando um pó branco que posteriormente foi caracterizado como um complexo carnosina-Zn²⁺ ou L-CAZ (Matsukura e Tanaka, 2000). Estudo com 691 pacientes mostrou uma boa taxa de absorção desse composto sem nenhum efeito colateral reportado. Estudos farmacológicos utilizando ¹⁴C – LCAZ demonstraram que, em ratos, cerca 4,1 % da carnosina vinda da dieta é excretada na urina, 13,3 % nas fezes e 38,8 % na exalação. Uma vez que esse complexo L-CAZ apresenta baixa dissociação em pH ácido, como do suco gástrico e demonstrou efeitos tóxicos para bactérias como *H. pylori*, o mesmo teve seu uso clínico aprovado no Japão sob a marca “Polaprezinc” para o tratamento de úlcera gástrica (Matsukura et al., 1990). Benefícios adicionais incluíram a suplementação concomitante com histidina e β-alanina na dieta. Outros exemplos de aplicações clínicas de derivados da carnosina são o lubrificante ocular “Falcon” a base de n-acetilcarnosina e as lentes de carnosina não-hidrolisadas “Can-C”, ambos usados para tratamento e prevenção do glaucoma (Babizhayev et al., 2012). Trabalhos de outros autores têm confirmado que a carnosina pode ser um composto importante para o desenvolvimento de outras moléculas bioativas que sejam capazes de resistir à degradação da carnosinase plasmática ou mesmo possuir características que permitam seu direcionamento para o sítio de interesse (Bertinaria et al. 2011; Karton et al., 2012).

Outra função biológica atribuída a carnosina é a sua capacidade anti-senescente. Em trabalho com cultura de fibroblastos humanos, Holliday e McFarland (2000) demonstraram que a suplementação do meio de cultura com 20 – 30 mM de carnosina aumentou o tempo de vida das linhagens analisadas em até 12 % (o que para algumas culturas representava cerca de 15 passagens). Son et al., (2008) mostraram que carnosina inibe a tradução do mRNA da interleucina-8 em células do epitélio intestinal e Caco-2 mediando a diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. A modificação pós-traducional de proteínas pela adição de carnosina

– ou “carnosinação” – na qual molécula(s) do dipeptídeo de histidina se adiciona em proteínas também já foi demonstrado (Baba et al., 2013), porém, nenhuma função lhe foi atribuída. Como não se conhece enzima que catalise tal reação, acredita-se que ela seja espontânea e aconteça para proteger porções frágeis da proteína da ação de compostos deletérios de forma a preservar a resposta celular. Em uma revisão de 2009, intitulado “On the enigma of carnosine’s anti-ageing actions” o autor Alan Hipkiss faz um interessante apanhado sobre essa diversidade de funções da carnosina.

Trabalhos recentes têm apontado para outra atividade biológica para os dipeptídeos contendo histidina: sua capacidade de reagir com aldeídos reativos, em especial os α,β insaturados (Aldini et al., 2002; Carini et al., 2003; Aldini et al., 2005). Através de “mecanismos sacrificios” esses peptídeos reagiriam com aldeídos (Xie et al., 2013), impedindo danos a moléculas como DNA, proteínas e lipídeos (Loureiro et al., 2000; Garcia et al., 2011, Salomon et al., 2011, Yamada et al., 2004) e facilitando a detoxificação desses produtos. Detalhes sobre essas reações e sua relevância em sistemas vivos serão dados a seguir.

1.2 Aldeídos Insaturados

1.2.1 Química dos Aldeídos

Aldeído é uma função orgânica caracterizada pela presença do grupo formila ($\text{H} - \text{C} = \text{O}$) ligada a um hidrogênio, radical alifático ou aromático. Seu uso é amplamente comum na indústria de alimentos, produção de polímeros, manufatura e etc. (LoPachin et al., 2008). Parte dos membros desse grupo apresenta além do grupo carbonila característico, ao menos uma dupla ligação em sua estrutura. Essa mudança estrutural é suficiente para modificar de forma significativa a reatividade química dessas moléculas. Moléculas com essas características são

classificadas como “alcenos tipo – 2” ou “carbonil – derivados” (LoPachin et al., 2008). Caso essa instauração ocorra no primeiro carbono imediatamente após a carbonila, têm-se os compostos ditos α,β - insaturados. As características eletrofílicas do grupo carbonila, somados a mobilidade eletrônicas dos elétrons π da dupla ligação, causa uma polarização desses elétrons, resultando em uma região e cargas residuais (LoPachin et al., 2008) típica desses compostos.

Na química dessas moléculas, dois tipos particulares de reações têm acentuada relevância: Formação de bases de Schiff e condensação do tipo Michael. Essas reações apresentam acentuada relevância biológica e serão detalhadas a seguir dando especial enfoque nos mecanismos que envolvem aldeídos e aminas.

1.2.1.1 Bases de Schiff

Tal nomenclatura é em homenagem a Ugo Joseph Schiff nascido em Frankfurt na Alemanha em 1834 e um dos fundadores da química moderna. Foi um dos primeiros a usar o termo “bases orgânicas” em um de seus trabalhos “*A New Series of Organic Bases*” fora dos estritos conceitos de ácidos/bases aceitos na época. Schiff também idealizou o “teste de fucsina aldeídica” ou “teste de Schiff”, o qual continua sendo usados até hoje. Parte de seu trabalho foi à base para posterior quantificação de aminoácidos na urina (Qin et al., 2013).

As bases de Schiff, também conhecidas como iminas ou azometinas são compostos representados pela fórmula geral $R_1R_2C = NR_3$ (Figura 02), onde os substituintes R_1 e R_2 podem ser grupamentos alquila, arila, heteroarila ou hidrogênio. O substituinte R_3 pode ser os mesmos anteriormente descritos, além de metais tais como: Si, Al, B, Sn (Esteves-Souza et al., 2004; Qin et al., 2013).

Figura 02 – Representação esquemática da formação da base de Schiff.

Como demonstrado na descoberta original de Schiff, esse mecanismo consiste na reação de uma molécula de aldeído (I) com uma amina primária (II) seguida pela eliminação de água, sendo esse ultimo passo essencial para conversão do intermediário aminol (instável – III) no produto final imina (estável – IV). A acidificação do meio acelera esse processo. Juntos, a catálise ácida e adição de agentes desidratantes aumentam o rendimento da reação de 80 – 95 % (Qin et al., 2013).

Em contraste aos extensivos estudos de reatividade dos sistemas carbonílicos, existem relativamente poucos trabalhos sobre os sistemas imínicos análogos, apesar de haver tantas azometidinas quanto compostos carbonílicos. Em trabalho com derivados difenil-propilamídicos Esteves-Souza et al., (2004) observaram os efeitos de diferentes substituintes sobre a reação de Schiff. Os resultados mostraram que os derivados com substituintes doadores de elétrons permitem ao carbono imínico um maior caráter eletrofílico, apresentando menores valores de carga e densidade eletrônica. Isto foi atribuído ao efeito de ressonância, que concentra densidade eletrônica no carbono adjacente ao carbono imínico. Esta carga negativa adjacente estabilizaria o deslocamento da densidade eletrônica da ligação C=N na direção do nitrogênio. Em contrapartida, substituintes retiradores de elétrons aumentam a eletrofilicidade do carbono

imínico, apresentando valores maiores para carga e densidade eletrônica e desestabilizando no deslocamento de carga da ligação C=N na direção do átomo de nitrogênio.

Bases de Schiff são freqüentemente os produtos mais comuns da reação entre aldeídos α,β – insaturados e aminas primárias (Sayer et al., 1993). Mecanismos alternativos dessa reação, embora menos favoráveis, poderiam levar a formação de intermediários enamina e por consequência um tautômero enol além de derivados pirrólicos (Sayer et al., 1993).

1.2.1.2 Reação de Michael

Essa reação foi originalmente descoberta por Komnemos e Claisen e efetivamente desenvolvida por Arthur Michael em meados de 1887, a partir de estudos da adição de malonatos e enonas catalisados por base (Mattos e Mazorati, 1999). A reação de Michael consiste na formação de uma ligação carbono-carbono por adição de nucleófilos (doadores de Michael) a olefinas (aceptores de Michael). Está difere das reações de alquilação pela regeneração da base, necessitando apenas de quantidades catalíticas da mesma (Mattos e Mazorati, 1999).

O mecanismo clássico de ataque nucleofílico descrito para a reação de Michael pode ser didaticamente dividido em 03 partes (Oare e Heatgcock, 1989) como mostrado na Figura 03:

- I. abstração de próton pela base formando carbânion ou enolato;
- II. ataque nucleofílico ao carbono receptor formando intermediário aniônico (etapa mais lenta da reação);
- III. abstração de próton do meio reacional pelo intermediário aniônico para formar o produto de Michael.

1.2.2 Aldeídos α,β insaturados e sua relevância biológica

As membranas biológicas bem como os demais sistemas com alto conteúdo lipídico estão sujeitas a ação de componentes oxidantes naturalmente presentes nos sistemas vivos como oxigênio molecular, ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio ou mesmo metais de transição como Fe^{2+} e Cu^{2+} . Embora a maioria desses componentes “*per si*” não possuam potencial oxidativo suficiente para abstrair elétrons desses lipídeos, eles podem gerar espécies altamente reativas capazes de iniciar e propagar essa reação genericamente chamada de lipoperoxidação (Carlsen et al., 2005). Por exemplo, o Fe^{2+} e o H_2O_2 . Separadamente, essas espécies não são capazes de iniciar a peroxidação lipídica, contudo uma vez juntos o ferro catalisa a conversão do peróxido em radical hidroxila o qual é capaz de abstrair elétrons da bicamada lipídica – por exemplo – e iniciar o processo da lipoperoxidação. Desse processo forma-se o radical lipídico também capaz de abstrair elétrons de outras moléculas e assim propagar a reação, a qual termina com a aniquilação entre dois radicais. A Figura 04 é um resumo das etapas dessa reação.

Figura 04 – Representação esquemática da lipoperoxidação.

Figura 05 – Representação esquemática da formação do HNE. As bicamadas lipídicas estão sujeitas a degradação enzimática ou química. Os produtos de ambas as vias podem sofrer ataque

de espécies reativas (ERO's) e iniciar a peroxidação lipídica. O esquema acima demonstra como através de múltiplos passos de oxidações, rearranjos e fissão intramolecular o HNE pode ser formado a partir do ácido aracdônico.

Como produtos intermediários e finais dessa cascata formam-se hidroperóxidos lipídicos, alcoóis e aldeídos α,β - insaturados (Figura 05). Dentre esses últimos podemos destacar: acroleína (ACR), malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Reed et al., 2011; Ureley e Marnett, 2012) como produtos majoritários e mais amplamente estudados. Como já mencionado anteriormente, a presença de dupla ligação e da carbonila fornecem a essas moléculas um caráter altamente reativo, conferindo às mesmas capacidades para reagir com lipídeos, proteínas e DNA (Loureiro et al., 2000; Garcia et al., 2011, Salomon et al., 2011, Yamada et al., 2004). Esses efeitos obrigam os organismos vivos a terem mecanismos de defesa e detoxificação para esses compostos (Figura 06).

As principais vias endógenas de metabolização de aldeídos são através da ação da aldeído desidrogenase (gerando o respectivo ácido orgânico) ou pela ação da glutathione-S-transferase (GSTs). Essa enzima catalisa a conjugação desses aldeídos com o grupo sulfeto da glutathione (GSH) formando produtos glutathione-S-conjugados que, posteriormente, são excretados na urina na forma de derivados mercaptúricos (Kidd, 1997; Falletti et al., 2007; Blair, 2010; Xie et al., 2013). Tentativas de monitoramento desses produtos como biomarcadores de estresse redox *in vivo* apresentam inúmeras dificuldades devido à constante conversão da GSH entre sua forma reduzida e oxidada no citosol.

Figura 06 – Vias majoritárias de detoxificação de aldeídos. As principais vias endógenas de metabolização de aldeídos são através da oxidação pela ‘aldeído desidrogenase’ (ALDH), formando o respectivo ácido orgânico, ou por conjugação com ‘glutathiona’ (GSH) gerando produtos “S-glutathionados” que posteriormente são excretados pela urina na forma de derivados mercaptúricos. Alternativamente, esses aldeídos podem sofrer conjugação com a carnosina. Trabalhos recentes têm demonstrado que os produtos ‘carnosina-aldeídos’ são substratos da ‘aldo-ceto-redutase’ e os produtos ‘carnosina-álcoois’ gerados são excretados na urina. Caso essas vias de metabolização falhem, as biomoléculas podem sofrer o ataque desses aldeídos.

Em trabalho recente Morgan et al., (2013) caracterizaram uma proteína em levedura (a qual possui homologia com proteínas humanas) responsável por transportar a glutatona na sua forma oxidada (GSSG) para dentro de vesículas especiais dentro do citoplasma, modificando o balanço GSH/GSSG e o potencial oxi-redutor do citosol. Considerando que as técnicas mais precisas atualmente para quantificação desses produtos, utilizam homogenatos celulares (destruindo a compartimentalização celular) seguido de análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) (Blair, 2010) é de se supor que boa parte desses dados não reflita as concentrações reais de GSH/GSSG citosólica. Além disso, para devida preservação do conteúdo sulfidrílico não oxidado desse peptídeo, passos adicionais de derivatização e/ou proteção de tais grupos, em geral, se faz necessário. Todas essas dificuldades tornam o monitoramento da glutatona e seus derivados bastante complexo e geram os resultados diversos na literatura para esses compostos (Rebrin et al., 2004; Falletti et al. 2007; Blair, 2010; Zhu et al., 2012). Utilizando a expressão de proteínas fluorescentes (GFP's) em levedura Morgan et al., (2013) demonstraram que o potencial redutor do citosol pode ser quase 200 vezes maior do que o reportado atualmente.

Alternativamente, outros componentes celulares também podem participar das vias de metabolização de aldeídos insaturados (Xie et al., 2013). Diversos autores têm demonstrado a capacidade de dipeptídeos contendo histidina de reagir com aldeídos α,β – insaturados. Em trabalhos com HNE Aldini et al., (2002) demonstraram a capacidade da carnosina em formar adutos com essa molécula. O monitoramento dessa reação *in vitro* por ressonância magnética nuclear (RMN) permitiu aos autores descrever em detalhes a reação conforme mostrado na Figura 07.

Figura 07 – Mecanismo de reação da carnosina com HNE. O modelo reacional acima foi proposto por Aldini et al., (2002) após monitoramento da reação CAR + HNE em D₂O por ressonância magnética nuclear (RMN).

Pelo resultado obtido, os autores concluíram que inicialmente a carnosina reage com HNE formando uma base de Schiff (composto I) a qual pode sofrer uma ciclização com anel imidazólico da histidina e formar o composto II. A presença desse intermediário pode ser confirmada pela adição de agente redutor (NaBH₄) que induz redução da base de Schiff e leva a formação de um derivado estável. Na ausência de agentes redutores o composto II sofre rearranjo dando origem à forma hemiacetal do aduto CAR-HNE (composto III), o qual é aceito como o produto mais abundante dessa reação. Esses achados corroboram achados anteriores de Sayer et al. (1993) que sugeriram que em presença de amina o HNE poderia ciclizar formando hemiacetais ou, alternativamente, produzir estruturas pirrólicas com formação de intermediários enamina e tautômero enol (Figura 08). Em trabalho com 4 – hidroxí-hexanal (HHE) Yamanda et al., (2004)

demonstraram a presença do aduto hemiacetal correspondente em reação com a histidina, como demonstrado na Figura 08.

Figura 08 – Esquema de formação de hemiacetal e pirrol pela reação do HNE com amina.

Trabalhos demonstram que HNE pode formar hemiacetais ou estruturas pirrônicas quando em solução com amidas. Cada um desses produtos finais passa por intermediários específicos. Dessa forma, o monitoramento dos intermediários da reação pode permitir prever qual via reacional é majoritária.

Trabalhos com a acroleína e seus possíveis metabólitos são escassos mesmo *in vitro*, uma vez que em solução essa molécula é capaz de polimerizar espontaneamente, o que torna bastante onerosa a separação entre “produtos de interesse” e “subprodutos da reação”. Utilizando infusão direta em espectrômetro de massas Carini et al., (2003) monitoraram a reação da carnosina com acroleína e propuseram uma rota para essa reação bem como estruturas moleculares para os intermediários envolvidos. Furuhashi et al., (2013) demonstraram que a acroleína forma um

derivado pirimidínico com a lisina e que esse composto tem alto potencial carcinogênico. O mecanismo para esse tipo de reação foi sugerido por Jin et al., (2009). Ele se baseia na condensação de moléculas de acroleína em torno de aminas primárias ou amônia (Figura 09) gerando anéis heterocíclicos semelhantes aos obtidos pela reação de Chinchibabin.

Figura 09 – Formação de heterocíclico pela condensação da acroleína com amônia. *Autores já demonstraram que em meio aquoso a acroleína espontaneamente forma estrutura poliméricas. Em presença de amina essas estruturas podem condensar gerando compostos heterocíclicos semelhantes aos obtidos pela reação de Chinchibabin (Jin et al., 2009).*

1.3 Aldeídos α,β -insaturados: potenciais biomarcadores

Apesar de a evolução ter moldado diversos mecanismos de defesa e os organismos evoluído com capacidade para metabolizar aldeídos, cada vez mais evidências têm demonstrado a capacidade desses compostos de reagirem com importantes biomoléculas. Em trabalhos com DNA, Loureiro et al., (2000 e 2002) mostraram como a base nitrogenada 2'- deoxiguanosina (dGuo) pode sofrer ataque e formar diversos adutos com aldeídos. Garcia et al., (2010) mostraram como crotonaldeído e acetaldeído também podem formar diversas estruturas com a dGuo (algumas isoméricas) e posteriormente descreveu, utilizando $[^{13}\text{C}_2]$ -acetaldeído, o mecanismo para formação do 1, N^2 -propano-2'-deoxiguanosina (Garcia et al., 2011). Trabalho seguinte demonstrou que esses adutos estão presentes na urina de humanos expostos a poluição em grandes centros urbanos (Garcia et al., 2013).

Em trabalho com proteínas Yamanda et al. (2004), mostraram que resíduos de lisina podem ser modificados pelo HHE proveniente da oxidação de ácidos graxos n-3 poliinsaturados, formando o produto hemicetal semelhante ao anteriormente descrito para o HNE em reação com aminas (Sayer et al., 1993; Aldini et al., 2002). Também, em estudo com lisina Furuhashi et al., (2003) demonstraram a capacidade desse aminoácido em reagir com acroleína e formar o produto 3-metilpiridíneo lisina, um potente carcinogênico. Baba et al., (2013) mostraram que adutos carnosina-propanais podem conjugar com proteínas cardíacas de camundongos.

Outro exemplo das implicações biológicas dos aldeídos são alguns subprodutos da oxidação não-enzimática da glicose como o glioxal e o metil glioxal. Esses compostos, especialmente alterados no estado diabético, são intermediários entre a glicose e os ditos ‘produtos finais da glicação avançada – em inglês AGE’s (Sartori et al., 2008; Massari et al., 2010). Trabalhos têm demonstrado que esses produtos estão aumentados no paciente diabético e que os mesmos possuem efeitos citotóxicos em células endoteliais humanas (Yamawaki e Hara, 2008). A hemoglobina glicosilada, em especial a variante HbA1C, é um dos compostos gerados pela reação desse subprodutos com a cadeia β da hemoglobina, formando os produtos de Amadori através da reação de Maillard. A via clássica da reação de Maillard, também denominada glicação, inicia-se com a formação de base de Schiff instável, gerada pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina, composto especialmente suscetível à reação. Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos tornando essa estrutura mais estável (os produtos de Amadori), modernamente conhecido como *early Maillard reaction products* (early MRPs) ou produtos iniciais da reação de Maillard. A HbA1C é importante marcador biomolecular e reflete a ocorrência de hiperglicemias nos últimos três meses. Sua determinação é considerada, até o

presente, o indicador mais confiável de progressão do diabetes (Barbosa et al., 2008). Autores têm mostrado que compostos dicarbonílicos como glioxal e metil glioxal chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose para esse tipo de reação (Meade e Gerrard. 2003).

Esse crescente número de evidências mostrando essa capacidade deletéria às biomoléculas por parte dos aldeídos tem despertado cada vez mais o interesse para os possíveis papéis desses produtos no aparecimento, progressão e/ou diagnósticos de diversas patologias em especial as que atingem tecidos que não possuem capacidade de regeneração como neurônios e músculos. Alguns autores já têm destacado a capacidade neurotóxica de aldeídos insaturados. Em trabalho com sinaptossomos *in vitro* LoPachin et al., (2007) demonstraram os efeitos tóxicos da acroleína a essas vesículas, levando a diminuição do transporte de dopamina. Em cultura primária de neurônios corticais de ratos expostos ao HNE Bradley et al., (2012) demonstraram a formação de adutos desse aldeído com proteínas. Esse mesmo trabalho também demonstra a presença de proteínas modificadas por HNE no sistema nervoso central pós-morte de indivíduos com Alzheimer. Trabalho anterior com cérebro de usuários crônicos de metanfetamina já havia demonstrado aumento significativo das concentrações de HNE e malonaldeído, sugerindo que se esses indivíduos vivessem o suficiente, provavelmente manifestariam o mesmo perfil clínico dos portadores de Alzheimer (Fitzmaurice et al., 2006). Em estudo semelhante com cérebros de pacientes com Alzheimer pré-clínico Bradley et al., (2010) demonstraram que em algumas zonas do sistema nervoso central os níveis de acroleína e/ou HNE bem como de adutos desse composto com proteínas estavam aumentados em relação às demais. Os autores sugerem que esses achados indicariam que a peroxidação lipídica deva acontecer nos estágios iniciais da doença e que o estresse oxidativo pode ter um papel central na progressão da patologia.

Todos esses dados apontam para a importância dos aldeídos, em especial os α,β -insaturados tanto na homeostase quanto no estado patológico dos organismos. O estudo e o monitoramento dessas moléculas, seus subprodutos e vias de metabolização podem fornecer informações valiosas e ter papel importante no entendimento e/ou diagnóstico de diversas desordens, em especial de doenças neurodegenerativas.

1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA ou ALS do inglês *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) é um processo degenerativo progressivo do sistema motor em níveis bulbar, cervical, torácico e lombar clinicamente caracterizada por fraqueza e atrofia, fasciculação e câimbra muscular, espasticidade, disartria, dispnéia e labilidade emocional (Mitchell e Borasio, 2007; Krueger et al., 2013). A ELA resulta de mecanismos complexos envolvendo estresse oxidativo, excitotoxicidade por glutamato, disfunção e agregação protéica, peroxidação lipídica e esterificação de colesterol, disfunção mitocondrial, problemas de transporte axonal, autofagia, apoptose e fatores genéticos (Barber e Shaw, 2010; Parakh et al., 2013). É consenso que ELA é uma desordem multifatorial e multissistêmica que afeta a integridade e o funcionamento de neurônios motores e de células não neuronais (Mitchell e Borasio, 2007; Cozzolino et al., 2012).

Seu diagnóstico é fundamentado em anamnese e sintomas clínicos do paciente, bem como por avaliações complementares como os critérios de “El Escorial” (Brooks e Theruvathu., 2000) e “Awaji” (De Carvalho et al., 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para ELA por meio da portaria SAS/MS nº 496 (2009), onde a desordem é classificada como “Doença do Neurônio Motor”. Para diagnósticos são exigidos ressonância magnética (RM), eletroneuromiografia (ENMG) de 4 membros, hemograma

completo, função renal (uréia e creatinina), função hepática (ALT, AST), protrombina e diagnóstico diferencial (mielopatia espondilótica, hipertireoidismo, distrofia muscular e etc). Essa necessidade de grande número de indicadores clínicos, somados a falta de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico claros, aos sinais sutis em estágios precoces, bem como falta de conhecimento e experiência médica fazem com que o diagnóstico correto ocorra em média 12 meses após o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas (Ekegren et al., 2008; Krueger et al., 2013). Até o momento o único tratamento aprovado é o riluzol (50mg, via oral de 12 - 12 horas), o qual se acredita inibir a liberação de glutamato e receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (Cheah et al., 2010; Bellingham, 2011) aumentando a sobrevida dos pacientes em aproximadamente 3 meses (De Groot et al., 2007; Miller et al., 2012). Outros autores demonstraram que com tratamento e suporte médico especializado a expectativa de sobrevida pode ser de 2 – 5 anos (Kiernan et al., 2011; Krueger et al., 2013).

Estudos genéticos em pacientes de ELA descrevem mutações em genes de proteínas com funções diversas, como regulação transcricional (FUS e TDP-43), angiogênese (VEGF) e diferenciação neuronal (ANG). A maioria é autossômica dominante, havendo autossômicas recessivas e ligadas ao sexo. ELA acomete 1,6 vezes mais os homens que mulheres. (Kiernan et al., 2011; Krueger et al., 2013). A mutação no gene que codifica a enzima SOD1 foi a primeira a ser descrita, sendo hoje conhecida mais de 160 modificações possíveis nos 153 códons do gene *SOD*, a maioria *missense* (Rosen et al., 1993). A hipótese inicial era de que a perda de atividade enzimática estivesse relacionada com ELA, mas logo foi demonstrado que animais sem SOD1 não apresentam doença de neurônio motor (Reaume et al., 1996). Entretanto, animais que expressam SOD1 humana modificada em presença da SOD1 endógena apresentam sintomas semelhantes aos de pacientes humanos. O mesmo não ocorre com a forma “selvagem” da SOD1

humana (Gurney et al., 1994). Atualmente, propõe-se ganho de função tóxica das enzimas modificadas como principal causa dos sintomas.

Modelos para ELA incluem células tronco pluripotentes induzidas (Mitne-Neto et al., 2011), modelos transgênicos em *C. elegans* (Ash et al., 2010), *Drosophila melanogaster* (Estes et al., 2011) e peixe-zebra (Kabashi et al., 2010). Ratos transgênicos carregando os genes *SOD1h^{G93A}* e *SOD1^{H46R}* reproduzem a maioria das características fenotípicas de pacientes, como perda seletiva de neurônio motor, inclusões hialinas, ubiquitinação e neuroinflamação (Howland et al., 2002).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar mecanismos biológicos alternativos de detoxificação de aldeídos insaturados e analisar amostras de urina de humanos e tecidos de animais transgênicos *SOD1^{G93A}*.

2.2 Específicos

- Sintetizar, isolar e caracterizar via HPLC-UV/Vis e HPLC-MS/MS adutos de carnosina com 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (HNE) e 4-hidroxi-hexenal (HHE);
- Sintetizar, isolar e caracterizar via HPLC-UV/Vis e HPLC-MS/MS produtos isotopicamente marcados (CAR-HHEd₅ e CAR-HNEd₁₁) para serem usados como padrão interno;
- Sintetizar, isolar e caracterizar via análises de espectrometria de massas (MS/MS) e ressonância magnética nuclear RMN (¹H, COSY e HSQC) o produto com *m/z* = 303 proveniente da reação carnosina com acroleína;
- Avaliar o efeito da suplementação da dieta na progressão clínica e sobrevida de animais ALS transgênicos *SOD1^{G93A}*;
- Quantificar e avaliar a presença dos adutos de carnosina em amostras de músculos de animais ALS transgênicos *SOD1^{G93A}*.
- Quantificar e avaliar a presença dos adutos de carnosina em amostras de urina de adultos não fumantes;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Materiais

L-carnosina (β -alanil-L-histidina) foi obtida da Fluka, acroleína e 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal dimetilacetal e demais solventes deuterados (D_2O , $DMSO-d_5$, piridinad₅) foram obtidos da Sigma-Aldrich, 4-hidroxi-hexenal foi obtido da Cayman Chemical Co (Ann Arbor, USA). *trans*-4-hidroxi-2-nonenal-5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9- d_{11} dimetilacetal e *trans*-4-hidroxi-2-hexenal-5,5,6,6,6- d_5 dimetilacetal foram adquiridos da CDN Isotopes (Quebec, Canadá) e utilizados para síntese dos padrões internos (PI) CAR- $HHEd_5$ e CAR- $HNEd_{11}$. Todos os solventes usados foram grau HPLC e foram obtidos da Sigma-Aldrich. A água foi purificada em um aparelho Milli-Q da Millipore (Bedford, MA). As centrifugações realizadas em centrífuga modelo 5804 R da Eppendorf, (Hamburg, Alemanha), utilizando rotor de ângulo fixo F-45-30-11. As incubações que necessitavam de agitação foram feitas em um termomixer R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha). As medidas de pH foram feitas em um pHmetro da Corning modelo 320 (Sigma). Para pesagem foi utilizada balança analítica da A&D Company (Tóquio, Japão). Os coeficientes de absorvidade molar (ϵ) foram determinados por análise entre 400 a 200 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV 1650 PC.

Demais equipamentos utilizados estão descritos em suas respectivas sessões técnicas.

3.2 Síntese e Purificação dos Adutos de Carnosina

3.2.1 Síntese e Purificação Aduto Carnosina-HHE

O aduto carnosina-HHE foi sintetizado misturando-se 50 μ mol de carnosina com 25 μ L de uma solução etanólica de 4-hidroxi-hexenal (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, USA) 10 mg/mL (25 μ mol) em PBS 10 mM pH 7 sob 1000 rpm, 37 °C overnight. Os produtos resultantes foram

analisados por injeção em HPLC LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) no qual foi adaptado um sistema sequencial de 2 colunas analíticas: primeiro uma Phenomenex Hydra RP 250 x 4,6 mm 4 µm de tamanho de partícula seguida por uma Phenomenex Sinergy Fusion 80 RP 250 x 4,6 mm 4 µm de tamanho de partícula, sob 20 °C com fluxo de 0,6 mL/min. Como fases móveis foram usadas (A) água e (B) acetonitrila 90 % em ácido fórmico 0,1 % (90 mL ACN : 10 mL ácido fórmico 0,1%) num gradiente de eluição linear de 0-95 % de B entre 0-25 min, 95-100 % de B entre 25-30 min, 100-0 % de B entre 30-32 min e de 32-50 min reequilíbrio da coluna. A corrida cromatográfica foi monitorada em 260 nm e a fração contendo o produto com $m/z = 341$ (19 min) foi coletada, liofilizada e mantida a -20 °C em D₂O para posteriores análises.

3.2.2 Síntese e Purificação Aduto Carnosina-HHEd₅

Para síntese e purificação do produto CAR-HHEd₅, utilizado como padrão interno (PI), seguiu-se o mesmo procedimento descrito para o aduto CAR-HHE substituindo-se 4-hidroxi-hexenal (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, USA) por *trans*-4-hidroxi-2-hexenal-5,5,6,6,6-d₅ dimetilacetal (CDN Isotopes, Quebec, Canadá). Inicialmente, 25 µmol *trans*-4-hidroxi-2-hexenal-5,5,6,6,6-d₅ dimetilacetal foram secos em nitrogênio líquido e hidrolisados com 50 µL HCl 1mM 1000 rpm, 4 °C por 45 min. A solução resultante foi misturada com 50 µmol carnosina em 1 mL PBS 10 mM pH 7 sob 1000 rpm, 37 °C por 24 h. Os produtos resultantes foram analisados por injeção em HPLC LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) no qual foi adaptado um sistema sequencial de 2 colunas analíticas: primeiro uma Phenomenex Hydra RP 250 x 4,6 mm 4 µm de tamanho de partícula seguida por uma Phenomenex Sinergy Fusion 80 RP 250 x 4,6 mm 4 µm de tamanho de partícula, sob 20 °C com fluxo de 0,6 mL/min. Como fases móveis foram

usadas (A) água e (B) acetonitrila 90 % em ácido fórmico 0,1 % (90 mL ACN : 10 mL ácido fórmico 0,1%) num gradiente de eluição linear de 0-95 % de B entre 0-25 min, 95-100 % de B entre 25-30 min, 100-0 % de B entre 30-32 min e de 32-50 min reequilíbrio da coluna. A corrida cromatográfica foi monitorada em 260 nm e a fração contendo o produto com $m/z = 346$ (19 min) foi coletada, liofilizada e mantida a -20 °C para posterior análise.

3.2.3 Síntese e Purificação do Aduto Carnosina-HNE

Para a síntese dos adutos de carnosina com HNE foi seguida a metodologia descrita por Aldini et al., 2005 com modificações. Uma alíquota de 25 μ mol de uma solução benzênica de 4-hidroxinonenal-dimetilacetil foi seca em nitrogênio e hidrolisada com 50 μ L HCl 1 mM 1000 rpm, 4 °C por 45 min. A solução resultante foi misturada com 50 μ mol carnosina em 1 mL PBS 10 mM pH 7 sob 1000 rpm, 37 °C por 24 h. Os produtos resultantes foram analisados por injeção em HPLC LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com uma coluna analítica Phenomenex Luna C-18(2) fase reversa 250 x 4,6 mm 5 μ m de tamanho de partícula, sob 25°C com fluxo de 1,2 mL/min e purificados com uma a coluna semi-preparativa Luna C 18 (2) (250 mm x 10 mm i.d., 100 Å, 10 μ m de tamanho de partícula Phenomenex, Torrance, CA), 25 °C, fluxo 5,3 mL/min. Como fases móveis foram usadas (A) ácido fórmico 0,1% e (B) acetonitrila (ACN) com ácido fórmico 0,1%, num gradiente de eluição linear de 0-90% de B entre 0-60 min, 0% de B entre 60-65 min. A corrida cromatográfica foi monitorada em 266 nm e a fração contendo o produto $m/z = 383$ (9 min) foi coletada, liofilizada e mantida a -20 °C em D₂O para posterior análises.

3.2.4 Síntese e Purificação do Aduto Carnosina-HNEd₁₁

Para síntese e purificação do produto CAR-HNEd₁₁ 25 µmol de *trans*-4-hidroxi-2-nonenal-5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-d₁₁dimetilacetal(CDN Isotopes, Quebec, Canadá) foram secos em nitrogênio líquido e hidrolisados com 50 µL HCl 1mM 1000 rpm, 4 °C por 45 min. A solução resultante foi misturada com 50 µmol carnosina em 1 mL PBS 10 mM pH 7 sob 1000 rpm, 37 °C por 24 h. Os produtos resultantes foram analisados por injeção em HPLC LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com uma coluna analítica Phenomenex Luna C-18(2) fase reversa 250 x 4,6 mm 5 µm de tamanho de partícula, sob 25°C com fluxo de 1,2 mL/min e purificados com uma a coluna semi-preparativa Luna C18 (2) (250 mm x 10 mm i.d., 100 Å, 10 µm de tamanho de partícula Phenomenex, Torrance, CA), 25 °C, fluxo 5,3 mL/min. Como fases móveis foram usadas (A) ácido fórmico 0,1% e (B) acetonitrila (ACN) com ácido fórmico 0,1%, num gradiente de eluição linear de 0-90% de B entre 0-60 min, 0% de B entre 60-65 min. A corrida cromatográfica foi monitorada em 266 nm e a fração contendo o produto m/z = 394 (9 min) foi coletada, liofilizada e mantida a -20 °C para posterior análises.

3.2.5 Síntese e Purificação do Aduto Carnosina-Acroleína

Para síntese do aduto de carnosina com acroleína foi utilizada a metodologia descrita por Carini et al., (2003) com modificações. Para tal 45 µmol carnosina foram incubados com 15 µmol de acroleína em tampão fosfato (PBS) 10 mM sob 1000 rpm, 37 °C por 24 h. Os produtos resultantes foram analisados por injeção em HPLC LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com uma coluna analítica Luna NH₂ (150 mm x 3,0 mm i.d., 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, CA), 25 °C, fluxo de 0,6 mL/min e purificados com

uma semi-preparativa Luna NH₂ (250 mm x 10 mm i.d., 100 Å, 10 µm tamanho de partícula Phenomenex, Torrance, CA), 25 °C, fluxo 5,5 mL/min. A fase móvel usada consistia de formiato de amônio 5 mM (A) e acetonitrila (B). As análises e purificações dos adutos foram feitas sob o seguinte gradiente de eluição linear: 95 a 20% de B entre 0-25 min, 20 a 5% de B entre 25 a 50 min, 5 a 95 % de B entre 50 to 60 min para reequilíbrio da coluna. A corrida cromatográfica foi monitorada em 260 nm e a fração contendo os produtos com as $m/z = 265$ (22 min) e $m/z = 303$ (10 min) foram coletas e liofilizadas. Diferentes sínteses foram feitas e os produtos obtidos foram solubilizados em D₂O, DMSO_d₆ e piridinad₅ e mantidas a -20 °C para posteriores análises.

3.3 *Análise do Perfil de Fragmentação*

Para análise foi feita infusão direta (3 µL/min) de solução 100 pmol/µL dos produtos isolados em espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Sob as seguintes condições: Fonte eletrospray em modo Positivo (ESI⁺), 4500 V no capilar, 5 psi de gás de nebulização, 5 L/min de gás de secagem, 135 °C temperatura de secagem. Os dados foram adquiridos utilizando-se software Trap Control 1.0 e analisados via DataAnalysis4.1 (ambos, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

3.4 *Determinação do Coeficiente de Absortividade Molar*

Diferentes concentrações dos adutos purificados foram dissolvidos em água ultra pura e analisados por varredura entre 200 e 400 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV 1650 PC utilizando-se cubetas de quartzo e água ultra pura como branco. Para os resultados de absorbância obtidos em um dado comprimento de onda foi plotado gráfico “*Concentração do produto (M) x Absorbância*” e determinada à equação da reta para produto, onde:

$$y = a + b*x$$

Sendo “y” a absorbância em um dado comprimento de onda;

“x” a concentração molar do produto de interesse num dado comprimento de onda;

“b” coeficiente angular ou inclinação da reta;

“a” o termo independente.

Foram aceitos como coeficientes de extinção molar (ϵ) o valor “b” para a reta de cada composto em determinado comprimento de onda.

3.5 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Depois de sintetizados e purificados todos os produtos obtidos foram dissolvidos em solventes deuterados e transferidos para tubos de vidro e analisados por RMN para confirmação de suas estruturas. Os produtos provenientes da reação da carnosina com HHE e HNE foram dissolvidos em D₂O e testados para RMN H¹ e COSY em aparelho Bruker DRX 500 operando a 500 MHz. O produto com $m/z = 303$ da reação CAR-ACR foi analisado em aparelho Bruker 800 operando a 800 MHz onde foram realizadas análises de RMN H¹, COSY e HSQC em diferentes solventes deuterados (D₂O, DMSO-d₆ e piridina-d₅).

O Esquema 01 resume as reações estudadas, bem como as metodologias aplicadas nesse projeto.

Esquema 01 – Representação esquemática da metodologia adotada. *L-Carnosina* foi incubada com diferentes aldeídos e a mistura analisada por HPLC, HPLC/MS e RMN. Os compostos purificados dessas reações foram utilizados como padrões para quantificação em urina de humanos.

3.6 Metodologia para Quantificação Simultânea de Adutos de Carnosina

Para análise HPLC-MS/MS foi usado um sistema HPLC LC 20 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado com espectrômetro de massas Amazon Speed eletrospray "Ion Trap" (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em modo positivo (ESI^+), 4500 V no capilar, 35 psi de gás de nebulização, 10 L/min de gás de secagem e 250 °C de temperatura, com duas colunas sequenciais: primeiro uma Kinetex C18 100 x 3 mm 2,6 μm , seguida por uma Synergy Fusion RP 100 2,5 μm 100 x

2,0 mm ambas Phenomenex, Torrance, CA sob 40 °C e fluxo de 0,3 mL/min. Os demais detalhes da metodologia estão ilustrados no Esquema 02.

Esquema 02 – Representação esquemática do método HPLC/MS-MS utilizado para quantificação dos adutos de carnosina.

3.7 Validação do método proposto

Uma vez estabelecida a metodologia para quantificação simultânea dos adutos de carnosina sintetizados e purificados. Experimentos foram desenvolvidos no intuito de validar o método proposto. Para tal utilizou-se como fonte de instrução:

- ICH (1996). Validation of analytical procedures: methodology – ICH Harmonised Tripartite Guideline;
- Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011;
- Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOC-CGCRE-008, Revisão 04 – Jul 2011, INMETRO.

Os parâmetros avaliados bem como os critérios de aceitação empregados estão descritos no Quadro 01.

Quadro 01 - Resumo dos critérios de validação aplicados.

OBJETIVO	PARÂMETRO	CRITÉRIO DE ACEITABILIDADE
<i>Seletividade</i>	Estabelecimento de transição e tempo de retenção específicos $m/z = \text{parental} \rightarrow \text{filho}$	-
<i>Efeito de Matriz</i>	-	-
<i>Precisão</i>	Repetitividade, Reprodutibilidade	$\%SD_{\text{calc}} \leq 30\%$
<i>Linearidade</i>	Avaliação de Tendências e Faixa de Trabalho	$R^2 \geq 0,99$ Inspeção visual
<i>Recuperação</i>	Recuperação em Matriz Fortificada	$\% \text{ Rec} > 80\%$ $\text{Var} \leq 5 \%$
<i>LQ e LD</i>	Relação sinal / ruído (s/r)	LQ (s/n = 10) LD (s/n = 3)

3.8 *Análises de Amostras de Urina*

Amostras da primeira urina diária foram obtidas de adultos saudáveis não fumantes, 9 homens e 6 mulheres entre 21 – 40 anos e imediatamente analisadas. Inicialmente, todas as urinas foram centrifugadas a 11000 rpm, 10°C por 10 min. Em seguida, 125 µL foram misturados com 125 pmol CAR-HHEd₅, 50 pmol CAR-HNEd₁₁ diluídos em 50 µL formiato de amônio 5 M pH 7,0 e avolumado para 250 µL com água ultra-pura. Dessa mistura 25 µL foram analisados no sistema HPLC-MS/MS anteriormente descrito. Curvas padrões foram obtidas ao mesmo tempo em água e em urina. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo como parte do projeto intitulado “O estudo de biomarcadores de estresse redox em sangue e urina de humanos” (891/CEP – Anexo 01).

3.9 *Curvas Padrões*

Para compensar o efeito de supressão ou desenvolvimento que a matriz poderia causar, foram utilizados padrões dissolvidos em urina. Para tal, amostras de urina foram fortificadas com diversas concentrações dos padrões sintetizados da seguinte forma:

	Urina (µL)	Padrão Interno (µL)*	Adutos de CAR (µL)**	Formiato de Amônio 10 mM pH 7 (µL)
Urina Branca	125	50	-	75
Urina Fortificada	125	50	75	-

*50 µL de Formiato de Amônio 5 M pH 7 contendo 1 nmol CAR-HHEd₅ e 50 pmol CAR-HNEd₁₁;

**75 µL dos Adutos (CAR-ACR; CAR-HHE e CAR-HNE) nas concentrações desejadas diluídos em Formiato de Amônio 10 mM pH 7.

Gráficos foram obtidos fazendo-se a relação das concentrações dos compostos de interesse pela relação das *áreas dos padrões / padrões isotopicamente marcados* usando-se o seguinte cálculo:

$$\text{Razão} = (\text{Área Urina Fortificada} - \text{Área Urina Branca}) / \text{Área PI}$$

CAR-HHEd₅ foi utilizado para normalização de CAR-ACR e CAR-HHE. CAR-HNEd₁₁ foi utilizado para normalização de CAR-HNE. As concentrações dos padrões utilizadas para obtenção das curvas variaram de 1 a 200 pmol.

3.10 Quantificação de creatinina em urina.

A quantidade total de creatinina nas amostras de urina foi analisada utilizando kit da Labtest Diagnóstica (Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Uma curva de calibração foi feita utilizando soluções de concentrações (mg×mL⁻¹) conhecidas de creatinina. A concentração de creatinina de cada amostra foi utilizada como normalizador para expressão dos resultados.

3.11 Experimentação Animal

3.11.1 Modelo Animal

Para experimentação animal foram utilizados ratos Sprague–Dawley transgênicos SOD1^{G93A} hemizigotos superexpressando a enzima superóxido dismutase humana modelo para ELA. Estes animais apresentam níveis de SOD1h^{G93A} até oito vezes maiores que os de SOD1 endógena, expressa em todos os tecidos. Todos os animais provieram da colônia do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo fundada em 2007 a partir de matrizes adquiridas na Taconic (Germantown, USA). Os experimentos obedeceram às diretrizes e normas preconizadas pela

NIH-National Institute of Health, pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e pela lei nº 11.794, Sérgio Arouca de 2008. Todos os procedimentos foram ainda revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química – USP (CEUA/IQ USP 04/2012). Os animais foram mantidos na área de experimentação do biotério supracitado com controle de ciclo claro/escuro de 12 h, água e alimentação *ad libitum*.

3.11.2 Genotipagem dos animais

Amostras da orelha dos filhotes foram coletadas aos 25 dias e mantidas em gelo seco até o momento da análise. Os animais foram genotipados conforme descrito por (Howland et al., 2002) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*): sodi3-f (GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA) e sodE4-r (CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA). Inicialmente, foram adicionados ao tecido 300 µL de tampão de digestão (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,5% SDS) seguido de incubação 65 °C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão de digestão contendo proteinase K ($1,25 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) e a amostra foi digerida sob incubação a 55 °C *overnight*. A seguir as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 5 min, o sobrenadante diluído 20 vezes em água Milli-Q autoclavada e aquecido a 95° C por 15 min. Uma alíquota de 2 µL foi utilizada para reação em cadeia de polimerase (Esquema 03) via kit de PCR da Qiagen seguindo as instruções do fabricante.

Esquema 03 – Ciclo de PCR utilizado para genotipagem dos ratos SOD^{G93A}.

Ao fim da amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, com $0,2 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ de brometo de etídio, a 100 V, por uma hora e posteriormente revelado sob luz ultravioleta. As amostras dos animais positivos para o gene *sod1humano* apresentaram uma banda de aproximadamente 200 pares de base visível na revelação do gel.

3.11.3 Condições experimentais e Tratamento

Uma vez estabelecidos os animais que possuíam os genes de interesse (ALS +) e os que não (controles), os mesmos foram divididos em grupos experimentais e mantidos na área de experimentação do biotério supracitado com controle de ciclo claro/escuro de 12 h, água e alimentação *ad libitum*. Cada grupo foi disposto em caixas contendo não mais que 05 animais em cada uma da seguinte forma:

- ✓ Controle (Cont) – animais negativos para o gene SOD^{G93A} . Não receberam tratamento;
- ✓ Controle Tratado (Cont+CAR) – animais negativos para o gene SOD^{G93A} . Os bebedouros continham solução de carnosina 1 mg/mL *ad libitum*;
- ✓ ALS – animais positivos para o gene SOD^{G93A} . Não receberam tratamento;
- ✓ ALS Tratado (ALS+CAR) – animais positivos para o gene SOD^{G93A} . Os bebedouros continham solução de carnosina 1 mg/mL *ad libitum*.

Para o tratamento, solução de carnosina 1 mg/mL (Herculano et al., 2013) foi oferecida aos animais aos 60 ± 05 dias de idade e mantida por todo o período experimental. O monitoramento do volume ingerido foi feito 03 vezes por semana bem como a reposição da solução de carnosina nos bebedouros. Paralelamente, os animais tiveram diversos parâmetros clínicos (como peso e capacidade muscular) acompanhados segundo protocolo descrito por Basso

et al., (1995) com modificações (Quadro 02). Os animais foram eutanasiados quando foi notado atrofia total de algum dos membros e/ou perda de 20 % de massa em relação ao maior peso notado. Para tal foi utilizada solução de quetamina (50 µL/Kg) e xilazina (25 µL/Kg) intraperitonealmente como anestésico e em seguida amostras de tecido foram coletadas, lavadas com solução salina gelada e imediatamente congeladas (-75 °C) para posterior análises.

Quadro 02 – Planilha de monitoramento dos animais.

Número do Animal	Marcação (caixa)	Peso Máximo (g)	% perdido	Movimento do Membro												Observações
				Pêlvicos						Torácicos						
				Direito			Esquerdo			Direito			Esquerdo			
				Quadril	Joelho	Tornozelo	Quadril	Joelho	Tornozelo	Ombro	Cotovelo	Punho	Ombro	Cotovelo	Punho	
291	BD			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
292	BE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
293	PDE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
299	BDE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
301	PE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
303	D			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
304	L			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
307	BE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
327	BDE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
329	PE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
				0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
290	D			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
				0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
312	BD			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
322	BE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
323	PD			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
295	C			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
297	L			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
315	BD			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
316	BE			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	
320	D			0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	0 S E	

Continuação **Quadro 02 – Planilha de monitoramento dos animais.**

Grupo	Caixa	Consumo hídrico	Idade (dias)	Número do Animal	Marcação (caixa)	Peso (gramas)	Suspensão			Levanta na caixa	Plano Inclinado		Endireitamento em 30 seg	Arrastando parte do corpo	Cauda Arastando	torção do corpo	Resiste	Extensão Membros Torácicos	
							Tempo Suspensão o (seg)	Suspensão pelas dianteiras	Suspensão pelas Traseiras		Inclinação (graus)	Tempo (seg)						Direito	Esquerdo
Cont. ALS não Trat.	Caixa 01		393	291	BD		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	292	BE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	293	PDE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	299	BDE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	301	PE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
Cont. ALS não Trat.	Caixa 01		392	303	D		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			392	304	L		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	307	BE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			387	327	BDE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			387	329	PE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
Cont. ALS não Trat.	Caixa 02						0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			392	290	D		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393				0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			391	312	BD		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	322	BE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
Cont. ALS Trat.	Caixa 03		393	323	PD		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	295	C		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			393	297	L		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			392	315	BD		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
			392	316	BE		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2
Cont. ALS Trat.	Caixa 04		392	320	D		0 1 2 3 4 5 >5	DE	DE	S N		0 1 2 3 4 5 >5	S 1 L N	S N	S N	0 S E	DE	0 1 2	0 1 2

3.11.4 Análise em tecido

Para experimento foram utilizados amostras do músculo posterior da pata direita traseira dos animais. Para tal 300 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de Tampão Fosfato 1 mM pH 7,4, 200 μ L butil-hidroxitolueno (BHT) 15 mg/mL e 200 pmol CAR-HHEd₅ e 50 pmol de CAR-HNEd₁₁ como padrão interno. À mistura resultante foram adicionados 250 μ L de clorofórmio, misturado vigorosamente por 1 min e em seguida centrifugada a 14.000 rpm, 9 °C por 15 min. O precipitado protéico foi guardado para posterior quantificação de proteína via método de Bradford (Bradford, 1957) usando-se albumina como padrão. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana 0,22 μ m e 10 μ L injetados em sistema HPLC-MS/MS para análise nas condições anteriormente descritas. Os resultados foram expressos como concentração do aduto por miligrama (mg) de proteína.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese, Purificação e Caracterização dos Adutos de Carnosina

4.1.1 CAR-HHE, CAR-HHed₅, CAR-HNE e CAR-HNEd₁₁

Trabalhos anteriores haviam sugerido que dipeptídeos contendo histidina poderiam agir por mecanismos de “sacrifício” (Orioli et al., 2005) com compostos eletrofílicos como HNE evitando dano às biomoléculas e participando da detoxificação celular desses compostos (Aldini et al., 2002; Aldini et al., 2005; Orioli et al., 2007; Yeum et al., 2010). Dessa forma, inicialmente a carnosina foi incubada *in vitro* com acroleína, HNE e HHE nas condições anteriormente descritas.

Os produtos isolados por essa metodologia foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e concentrados por liofilização. Em seguida, foram feitas varreduras entre 400 a 200 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV 1650 PC para a avaliação de pureza e determinação dos respectivos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) dos compostos purificados. Os diferentes espectros obtidos nesses experimentos são mostrados na Figura 10 e permitiram determinar os coeficientes de absorvidade em: $\epsilon_{260} = 2,50 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para CAR-HHE $m/z = 341$ e $\epsilon_{265} = 1,92 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para CAR-HNE $m/z = 383$.

Figura 10 – Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) dos produtos sintetizados.

A – resultados para aduto CAR-HHE. **B** – resultados para aduto CAR-HNE. **C** – resultados para aduto CAR-ACR.

Em seguida, esses mesmos produtos tiveram seus perfis de fragmentação avaliados por infusão direta em espectrômetro tipo Ion Trap (Bruker Daltonics, Alemanha). Os resultados das fragmentações sequenciais são mostrados nas Figuras 11 e 12. A comparação entre as estruturas sugeridas e os dados dos perfis de fragmentação bem como as análises de RMN (Figuras 13 e 14) foram condizentes com os dados da literatura para os adutos CAR-HHE e CAR-HNE (Aldini et al., 2002; Yamanda et al., 2004; Orioli et al., 2007). Para os produtos isotopicamente marcados resultados semelhantes foram obtidos. Assim, os resultados obtidos indicam que os produtos obtidos são os adutos de interesse e que os mesmos estão em pureza suficiente para serem utilizados como padrões para quantificação em amostras biológicas.

Figura 11 – Perfil de fragmentação aduto CAR-HHE. Para experimento solução 100 pmol/ μ L do produto foi solubilizado em ácido fórmico 0,1% em água e infundido a 3 μ L/min em

espectrômetro de massas do tipo Ion Trap (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos por fragmentações sequenciais dos íons mais intensos.

Figura 12 – Perfil de fragmentação aduto CAR-HNE. Para experimento solução 100 pmol/ μ L do produto foi solubilizado em ácido fórmico 0,1% em água e infundido a 3 μ L/min em espectrômetro de massas do tipo Ion Trap (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos por fragmentações sequenciais dos íons mais intensos.

Figura 13 – Ressonância Magnética Nuclear ^1H para aduto CAR-HHE em D_2O . Para experimento cerca de 1 mg do produto CAR-HHE foi diluído em D_2O e analisado em aparelho operando a 500 MHz como descrito na metodologia.

Figura 14 – Ressonância Magnética Nuclear ^1H para CAR-HNE em D_2O . Para experimento cerca de 1 mg do produto CAR-HNE foi diluído em D_2O e analisado em aparelho operando a 500 MHz, como descrito na metodologia.

4.1.2 Síntese, Purificação e Caracterização do Aduto CAR-ACR

Em trabalho de 2003, Carini et al., descreveram a reação entre carnosina e acroleína. Baseado no monitoramento da reação *in vitro* em diferentes tempos, seguido de análises de seus produtos por injeção direta em espectrômetro de massas os autores propuseram a o esquema reacional mostrado na Figura 15 abaixo:

Figura 15 – Proposta de cascata reacional da carnosina com acroleína e estrutura de seus adutos. Essa cascata reacional foi sugerida por Carini et al.,(2003) com base em resultados do monitoramento da reação da carnosina com acroleína *in vitro* por experimentos de espectrometria de massas.

Pelo modelo proposto por Carini et al., (2003) inicialmente o nitrogênio imidazólico da carnosina reage com a dupla ligação dos carbonos da acroleína seguindo mecanismo da reação de Michael e produzindo $m/z = 283$ (Figura 15, estrutura 2). Em seguida, essa estrutura sofre desidratação e ciclização formando $m/z = 265$ (Figura 15, estrutura 4). Outra molécula de acroleína pode ser adicionada a essa estrutura, formando o produto $m/z = 321$ que ao desidratar formaria $m/z = 303$ (Figura 15, estrutura 6), que é responsável pelo sinal mais proeminente do espectro após 24 horas e aceito como produto majoritário da reação. Adicionalmente, outras moléculas de acroleína podem ser adicionadas formando produtos secundários em menor proporção (Figura 15, estrutura 7).

Tentativas de reprodução dessa reação seguida de análises de seus produtos por espectrometria de massas demonstraram essa mesma “lógica” reacional ao longo do tempo. Inicialmente, observava-se sinal $m/z = 283$, seguida por $m/z = 265$ e ao final, o produto com $m/z = 303$ se mostrava como o íon mais intenso do espectro (Figura 16). Contudo, os perfis de fragmentação obtidos não se encaixaram nas estruturas propostas por Carini et al., (2003), principalmente para $m/z = 303$ (Figura 15, estrutura 6). Dessa forma, especial atenção foi dada a esse composto, que foi isolado de diferentes sínteses e teve sua estrutura minuciosamente analisada por perfil de fragmentação com massa exata e ressonância magnética nuclear por: ^1H , COSY e HSQC em diferentes solventes deuterados (D_2O , $\text{DMSO-}d_6$, piridinad $_5$).

Os resultados da análise de massa exata (Figura 17) demonstraram que o produto isolado apresenta $m/z = 303,1415$. Essa massa molecular é compatível com a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3$ (CompassIsotop Parttern, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Mais uma vez tentativas de atribuir o espectro encontrado a estrutura molecular proposta por Carini et al., (2003) não obtiveram sucesso.

Figura 16 – Cromatograma da reação CAR-ACR. A reação descrita por Carini et al., (2003) foi reproduzida e analisada em diferentes intervalos de tempo (12, 24 e 48 horas). Os resultados acima se referem à preparação após 24 horas de reação e apresentou mesmo perfil de massas descrito por Carini et al., (2003), com a $m/z = 303$ como sinal mais proeminente do espectro. O pico em 9 minutos referente, a essa massa, foi coletado e concentrado para caracterização do produto.

Figura 17 – Perfil de fragmentação com massa exata do aduto CAR-ACR 303. Para experimento foi preparada solução 100 pmol/mL de CAR-ACR em ácido fórmico 0,1% e analisado por infusão direta espectrômetro de massas (Max3G, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)

Resultados dos experimentos de RMN ^1H , COSY e HSQC (Figuras 18 e 19) em $\text{DMSO-}d_6$ demonstraram a presença de 2 hidrogênios não ligados a carbono em torno de 6,7 ppm que desaparecem em D_2O , bem como 3 hidrogênios ligados a carbonos em 8,8 ppm, 7,4 ppm e 7,1

ppm, todos com J em torno de 8 (Figura 20). Juntos, esses resultados sugerem que apenas 2 dos 3 nitrogênios (ligados a hidrogênio), presentes na molécula de carnosina, estão livres no composto $m/z = 303$, o que descarta a estrutura proposta por Carini et al., (2003). Dados adicionais de COSY e HSQC (Figura 19) sugerem o aparecimento de um segundo anel na molécula além do imidazol da histidina. Sayer et al., (1993) havia demonstrado que aldeídos α,β - insaturados podem reagir com aminas primárias e formar estruturas pirrólicas. Alternativamente, também foi descrito por Jin et al., (2009) que moléculas de acroleína podem condensar em torno de grupos aminas e formar estruturas conhecidas como β -picolina. Ambas as estruturas poderiam explicar o segundo ciclo observado. Análise detalhada dos experimentos de RMN demonstrou que não existe o acoplamento geminal esperado para o produto pirrólico descritos por Sayer et al., (1993) e que todos os demais acoplamentos de hidrogênios obtidos no COSY (Figura 19) são compatíveis com a molécula de β -picolina (Jin et al., 2009). Análises de varredura entre 400 a 200 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV 1650 PC para a avaliação de pureza do composto purificado demonstraram o aparecimento de uma banda de absorção em 266 nm característica de compostos cíclicos nitrogenados derivados da piridina (Figura 10C). O conjunto dos resultados nos permite concluir que a estrutura molecular da $m/z = 303$ obtido da reação carnosina + acroleína possui um anel β -picolina.

Os diferentes espectros obtidos na varredura em espectrofotômetro são mostrados na Figura 10C e permitiram determinar o coeficiente de extinção molar (ϵ) para CAR-ACR $m/z = 303$ em: $\epsilon_{266} = 5,19 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Figura 18 – Ressonância Magnética Nuclear ^1H do produto CAR-ACR 303. *Para experimento cerca de 1 mg do produto CAR-ACR foi dissolvido em DMSO_{d6} e analisado em aparelho Bruker 800 MHz.*

Figura 19 – Ressonância Magnética Nuclear COSY e HSQC do produto CAR-ACR 303.

A – experimento COSY para aduto CAR-ACR 303; **B** – ampliação da região 9 – 6 ppm do experimento COSY para aduto CAR-ACR 303; **C** - experimento HSQC para aduto CAR-ACR 303; **D** – ampliação da região 9 – 6 ppm do experimento HSQC para aduto CAR-ACR 303.

Posição na molécula	Deslocamento Químico (ppm)		Constante de Acoplamento (J)
	1H	^{13}C	
2	4,74	57,60	6,6
3	2,91	35,00	6,5
6	6,74	-	-
14	7,45	136,0	-
15	6,65	-	-
16	7,50	133,0	-
17	8,95	144,9	-
19	7,46	138,7	8,0
20	7,09	126,8	6,2
21	8,60	153,5	6,1
22	1,97	24,10	-

Figura 20 – Relação entre estruturas propostas e resultados de RMN para aduto CAR-ACR

303. Todas as estruturas acima se encaixam na fórmula molecular $C_{15}H_{19}N_4O_3$ e fornecem $m/z = 303,1415$. A estrutura proposta por Carini et al., (2003) foi descartada por não se encaixar no perfil de fragmentação obtido. A estrutura I não apresenta o segundo heterocíclico observado

nos experimentos RMN. A estrutura II exigiria um acoplamento geminal entre os átomos 21 e 22 que não aparecem nos dados experimentais de RMN. A estrutura III se encaixa em todos dados experimentais e foi aceita como estrutura molecular do composto $m/z = 303,1415$ proveniente da reação CAR+ACR.

Assim, os dados nos permitiram propor uma nova rota para descrever a reação entre a carnosina com acroleína (Figura 21), fundamentada não somente em nossos resultados experimentais, mas também em vários trabalhos que descrevem os mecanismos de reação da carnosina e/ou de aldeídos insaturados. Dessa forma, como foi descrito para o HNE por Aldini et al., (2002), inicialmente o grupo amina da carnosina reage com o grupamento aldeídico da acroleína por uma ligação tipo base de Schiff. Em seguida, ocorre uma desidratação e posteriormente uma ciclização entre anel o imidazólico da carnosina e a dupla ligação da molécula de acroleína, formando o produto instável $m/z = 265$ (Sayre et al., 1993; Zhou et al., 1999; Aldini et al., 2002; Carini et al., 2003). A seguir, outra molécula de acroleína é adicionada e após desidratações e rearranjos forma-se o produto $m/z = 303$ 1-(3-{[1-carboxi-2-(1*H*-imidazol-4-il)etil]amino}-3-oxopropil)-3-metilpiridínio ou 3-metilpiridínio carnosina, como demonstrado na Figura 21. Esse conjunto de reações gera os mesmos produtos descritos na chamada “condensação de Chinchibabin” (Jin et al., 2009).

Figura 21 – Esquema reacional proposto para reação carnosina + acroleína. A figura foi produzida a partir de dados experimentais e dados da literatura (Sayer et al., 1993; Zhou e Deker, 1999; Carini et al., 2003; Jin et al., 2009)

Em conjunto, esses resultados nos permitiram concluir que o produto CAR-ACR $m/z = 303$ isolado da reação entre a carnosina e a acroleína possui estrutura cíclica e corresponde a molécula 3-metilpiridínio carnosina, diferente do que foi proposto por Carini et al., (2003). Esse composto foi obtido com pureza suficiente para ser utilizado como padrão de trabalho para quantificação em amostras biológicas.

O Esquema 04 é um resumo dos produtos obtidos entre a carnosina e os aldeídos α,β -insaturados acroleína, HHE e HNE.

Esquema 04 – Resumo dos produtos reacionais da carnosina com acroleína, HHE e HNE.

4.2 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação dos Adutos de Carnosina

Uma vez elucidadas as estruturas moleculares dos produtos sintetizados e sendo os mesmos obtidos com grau de pureza suficiente para utilização como padrão de trabalho para realização as análises, uma metodologia baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro tipo “Ion Trap” com fonte electrospray em modo positivo (ESI^+ HPLC–MS/MS) foi desenvolvida e validada para quantificação dos mesmos em amostras biológicas.

Trabalhos anteriores já descreveram a utilização de HPLC–MS/MS para a quantificação de adutos de carnosina com aldeídos insaturados (Orioli et al., 2005; Orioli et al., 2007; Baba et al., 2013). Contudo, em geral esses trabalhos monitoram apenas um determinado produto de interesse (Orioli et al., 2007) ou utilizam métodos de “limpeza” e/ou concentração das amostras como extração em fase sólida (Baba et al., 2013). Isso se faz necessário porque embora peptídeos ionizem muito bem na fonte eletrospray em modo positivo, as colunas cromatográficas utilizadas, em geral C18, promovem uma separação muito pobre desses compostos (Xie et al., 2013). Com isso, a complexidade das matrizes biológicas acaba por dificultar a quantificação dos compostos de interesse.

A metodologia por nós empregada, utilizando duas colunas com características diferentes, controle do pH por adição de formiato de amônio e uso de “válvula” no sistema HPLC–MS/MS, permitiu a separação dos compostos de interesse de grande parte dos produtos interferentes presentes nas amostras “*online*” sem necessidade de pré-concentração. Isso, somado ao uso de padrões isotopicamente marcados garantiram a qualidade do método desenvolvido como será demonstrado.

Segue-se a descrição dos resultados obtidos nos experimentos de validação.

4.2.1 Seletividade

Para garantir a seletividade do método proposto foram utilizados os dados obtidos nas análises dos perfis de fragmentação dos compostos de interesse. Dessa forma, foram determinadas suas respectivas massas (massas parentais $\pm 0,5$ Da) e de seus respectivos íons filhos ($\pm 0,5$ Da) bem como condições ideais de fragmentação e tempos de retenção. As condições estabelecidas para cada um dos compostos de interesse estão descritas no Quadro 03 abaixo:

Quadro 03 – Condições experimentais do método desenvolvido.

Composto	Ion Parental (<i>m/z</i>)	Janela Escaneamento	Cut Off	Amplitude	Ion Filho (<i>m/z</i>)	Janela Escaneamento
CAR-ACR	303	4	100	0,5	166	4
CAR-HHE	341	2	150	2,3	224	4
CAR-HHed ₅	346	2	150	2,3	229	4
CAR-HNE	383	4	170	1,5	266	4
CAR-HNEd ₁₁	394	4	170	1,5	277	4

A Figura 22 é um cromatograma demonstrativo do resultado obtidos pelo método desenvolvido em amostra de urina.

Figura 22 – Cromatogramas dos adutos de carnosina. A figura é um representativo dos cromatogramas obtidos em amostras de urina pelo método desenvolvido.

4.2.2 *Efeito Matriz*

Análises preliminares em amostras de músculos demonstraram que o método desenvolvido apresentou boa recuperação e precisão. Contudo, em amostras de urina, trabalhos anteriores (Garcia et al., 2013) e análises preliminares demonstraram que essa interferência é significativa. A urina é uma mistura complexa e possui em sua composição elementos como carbonato, sódio, cloro, sulfetos e nitratos, além de faixas de pH que mesmo em condições fisiológicas podem variar entre 3 - 6. Considerando que os produtos de interesse são derivados de aminoácidos, esses fatores são interferentes potenciais e podem causar supressão ou desenvolvimento dos sinais dos compostos analisados. Para contornar esse problema duas medidas foram adotadas:

- para normalização do pH, 50 µL de solução 5 M de Formiato de Amônio pH 7 foram adicionados a cada amostra (mesmo nas curvas padrões);
- para quantificação em urina todas as curvas padrões foram obtidas em amostras de urina fortificada (seguindo o descrito no item 3.9 Curvas Padrões). Para as amostras de tecido os padrões foram diluídos em formiato de amônio 10 mM.

Esses dois procedimentos juntos garantiram a homogeneidade dos resultados como será demonstrado a seguir.

4.2.3 *Linearidade e Faixa de Trabalho*

Para determinação da faixa de trabalho linear, diferentes amostras de urina foram fortificadas em concentrações de 0,5 – 200 pmols e analisadas pelo método proposto. Exemplos das curvas analíticas (expressas por média $\pm$ desvio padrão para 5 curvas em matriz) juntamente com as equações da reta e coeficientes de correlação estão demonstrados nos gráficos abaixo:

pmol	Média (CAR-HHE/PI)	Desvio (CAR-HHE/PI)
200	0,709	0,058
150	0,592	0,078
100	0,394	0,084
50	0,216	0,064
25	0,154	0,026

Figura 23 – Curvas padrões de CAR-HHE em urina. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão para 5 curvas em matriz. CAR-HHE_{d5} foi utilizado como padrão interno (IS) e para elaboração das curvas foi utilizada a relação *área CAR-HHE / área PI*.

pmol	Média (CAR-HNE/PI)	Desvio (CAR-HNE/PI)
100	0,041	2,01E-04
50	0,023	5,25E-04
25	0,011	5,37E-04
10	0,004	1,56E-04
1	4,21E-04	7,67E-05

Figura 24 – Curvas padrões de CAR-HNE em urina. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão para 05 curvas em matriz. CAR-HNE_{d11} foi utilizado como padrão interno (IS) e para elaboração das curvas foi utilizada a relação *área CAR-HNE / área PI*.

pmol	Média (CAR-ACR/PI)	Desvio (CAR-ACR/PI)
100	0,566	0,048
50	0,329	0,057
25	0,157	0,031
10	0,073	0,015
1	0,021	0,004

Figura 25 – Curvas padrões de CAR-ACR em urina. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão para 5 curvas em matriz. CAR-HHed₅ e foi utilizado como padrão interno (IS) e para elaboração das curvas foi utilizada a relação *área CAR-ACR / área PI*.

Quadro 04 – Resumo das faixas de trabalho para quantificação dos adutos de carnosina.

Composto	Faixa de trabalho (pmol)
CAR-HHE	25 – 250
CAR-HNE	1 – 200
CAR-ACR	1 – 200

4.2.4 Recuperação

Uma vez estabelecida a faixa de trabalho para cada produto sintetizado, experimentos posteriores foram realizados visando garantir que as medidas de ajuste de pH e curvas em matriz foram suficientes para impedir oscilações significativas na recuperação do método, em especial nas concentrações mais baixas (próximas de 1 pmol). Para tal, diferentes amostras de urinas foram fortificadas nas faixas de trabalho para cada um dos produtos isolados e posteriormente verificou-se: média, desvio padrão, variância e percentual de recuperação para cada um dos mesmos. Os dados referentes a esses experimentos estão descritos abaixo.

Quadro 05 – Resultado dos experimentos de recuperação para aduto CAR-HHE.

Concentração Teórica (pmol)	Concentração Obtida (pmol)	% de Recuperação
25,00	24,20	96,80
25,00	21,40	85,60
25,00	27,60	110,40
25,00	18,00	72,00
25,00	28,70	114,80
Média	23,98	95,92
Desvio	4,41	17,65
Variância	0,88	3,53
50,00	52,10	104,20
50,00	53,80	107,60
50,00	48,80	97,60
50,00	51,70	103,40
50,00	60,70	121,40
Média	53,42	106,84
Desvio	4,45	8,90
Variância	0,89	1,78
75,00	86,00	114,67
75,00	76,60	102,13
75,00	82,70	110,27
75,00	77,45	103,27
75,00	79,00	105,33
Média	80,35	107,13
Desvio	3,93	5,24
Variância	0,79	1,05
100,00	100,97	100,97
100,00	95,40	95,40
100,00	95,02	95,02
100,00	100,90	100,90
100,00	103,60	103,60
Média	99,18	99,18
Desvio	3,78	3,78
Variância	0,76	0,76
150,00	146,30	97,53
150,00	133,67	89,11
150,00	147,13	98,09
150,00	152,50	101,67
150,00	140,85	93,90
Média	144,09	96,06
Desvio	7,14	4,76
Variância	1,43	0,95
200,00	202,30	101,15
200,00	211,80	105,90
200,00	203,75	101,88
200,00	195,40	97,70
200,00	223,10	111,55
Média	207,27	103,64
Desvio	10,60	5,30
Variância	2,12	1,06
Média % de Recuperação		101,46
Desvio % de Recuperação		9,44

Figura 26 – Gráfico de dispersão para aduto CAR-HHE. O gráfico representa quanto à recuperação para cada amostra variou em termos percentuais. O eixo central representa 100 % de recuperação.

Quadro 06 – Resultado dos experimentos de recuperação para aduto CAR-HNE.

Concentração Teórica (pmol)	Concentração Obtida (pmol)	% de Recuperação
1,00	1,20	120,00
1,00	0,70	70,00
1,00	1,08	108,00
1,00	0,86	86,00
1,00	1,30	130,00
Média	1,03	102,80
Desvio	0,25	24,60
Variância	0,05	4,92
5,00	4,40	88,00
5,00	5,70	114,00
5,00	5,46	109,20
5,00	4,30	86,00
5,00	5,60	112,00
Média	5,09	101,84
Desvio	0,68	13,67
Variância	0,14	2,73
10,00	12,00	120,00
10,00	10,70	107,00
10,00	10,10	101,00
10,00	9,90	99,00
10,00	8,80	88,00
Média	10,30	103,00
Desvio	1,17	11,73
Variância	0,23	2,35
25,00	30,00	120,00
25,00	25,10	100,40
25,00	27,70	110,80
25,00	26,80	107,20
25,00	22,90	91,60
Média	26,50	106,00
Desvio	2,68	10,71
Variância	0,54	2,14
50,00	60,00	120,00
50,00	53,30	106,60
50,00	54,50	109,00
50,00	55,80	111,60
50,00	51,80	103,60
Média	55,08	110,16
Desvio	3,12	6,24
Variância	0,62	1,25
100,00	120,00	120,00
100,00	99,70	99,70
100,00	99,80	99,80
100,00	98,00	98,00
100,00	100,45	100,45
Média	103,59	103,59
Desvio	9,22	9,22
Variância	1,84	1,84
Média % de Recuperação		104,57
Desvio % de Recuperação		13,01

Figura 27 – Gráfico de dispersão para aduto CAR-HNE. O gráfico representa quanto à recuperação para cada amostra variou em termos percentuais. O eixo central representa 100 % de recuperação.

Quadro 07 – Resultado dos experimentos de recuperação para aduto CAR-ACR.

Concentração Teórica (pmol)	Concentração Obtida (pmol)	% de Recuperação
1,000	1,1	110,00
1,000	1,0	102,00
1,000	0,6	60,00
1,000	0,7	70,00
1,000	1,0	95,00
Média	0,87	87,40
Desvio	0,21	21,42
Variância	0,04	4,28
5,000	3,5	70,80
5,000	4,5	90,00
5,000	4,5	90,00
5,000	6,3	126,00
5,000	4,7	94,00
Média	4,71	94,16
Desvio	1,00	19,96
Variância	0,20	3,99
10,000	9,9	99,00
10,000	8,4	84,00
10,000	12,0	120,00
10,000	11,0	110,00
10,000	9,0	89,60
Média	10,05	100,52
Desvio	1,47	14,70
Variância	0,29	2,94
25,000	21,0	84,12
25,000	25,6	102,56
25,000	26,0	104,00
25,000	30,0	120,00
25,000	29,2	116,80
Média	26,37	105,50
Desvio	3,55	14,19
Variância	0,71	2,84
50,00	45,50	91,00
50,00	48,68	97,36
50,00	48,20	96,40
50,00	50,00	100,00
50,00	52,00	104,00
Média	48,88	97,75
Desvio	2,39	4,79
Variância	0,48	0,96
100,00	94,27	94,27
100,00	97,21	97,21
100,00	108,00	108,00
100,00	115,90	115,90
100,00	96,00	96,00
Média	102,28	102,28
Desvio	9,32	9,32
Variância	1,86	1,86
Média % de Recuperação		97,93
Desvio % de Recuperação		15,06

Figura 28 – Gráfico de dispersão para aduto CAR-ACR. O gráfico representa quanto à recuperação para cada amostra variou em termos percentuais. O eixo central representa 100 % de recuperação.

4.2.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através de análise da repetitividade e da precisão intermediária (reprodutibilidade). Para verificação da repetitividade, foram feitas injeções consecutivas de cinco amostras de urina fortificada com diferentes concentrações dos adutos sintetizados no sistema anteriormente descrito. A reprodutibilidade, também conhecida como precisão intermediária, foi avaliada sob as mesmas condições da repetitividade, porém com preparações e dias diferentes. Os dados referentes a esses experimentos estão expressos nos quadros abaixo.

Quadro 08 – Análise da precisão do método desenvolvido para quantificação aduto CAR-HHE. A precisão foi avaliada através da verificação da repetitividade e da reprodutibilidade do método.

REPETITIVIDADE					
	25 pmol	50 pmol	75 pmol	100 pmol	150 pmol
Rep 1	24,2	52,1	86,0	101,0	146,3
Rep 2	21,4	53,8	76,6	95,4	133,7
Rep 3	27,6	48,8	82,7	95,0	147,1
Rep 4	18,0	51,7	77,5	100,9	152,5
Rep 5	28,7	60,7	79,0	103,6	140,9
Média	24,0	53,4	80,4	99,2	144,1
SD	4,4	4,4	3,9	3,8	7,1
%SD	18,4	8,3	4,9	3,8	5,0

REPRODUTIBILIDADE					
	25 pmol	50 pmol	75 pmol	100 pmol	150 pmol
Rep 1	26,2	59,5	79,6	99,7	151,00
Rep 2	35,0	35,5	62,7	127,0	153,20
Rep 3	23,0	41,0	84,1	86,8	148,80
Rep 4	29,5	51,7	78,0	121,8	146,40
Rep 5	25,0	45,0	59,9	92,0	160,40
Média	25,86	49,98	76,60	102,32	148,03
SD	4,73	7,79	8,64	12,69	7,25
%SD	18,28	15,59	11,27	12,40	4,90

Quadro 09 – Análise da precisão do método desenvolvido para quantificação aduto CAR-HNE. A precisão foi avaliada através da verificação da repetitividade e da reprodutibilidade do método.

REPETITIVIDADE					
	1 pmol	5 pmol	10 pmol	25 pmol	50 pmol
Rep 1	1,2	12,0	30,0	60,0	120,0
Rep 2	0,7	10,7	25,1	53,3	99,7
Rep 3	1,1	10,1	27,7	54,5	99,8
Rep 4	0,9	9,9	26,8	55,8	98,0
Rep 5	1,3	8,8	22,9	51,8	100,5
Média	1,0	10,3	26,5	55,1	103,6
SD	0,2	1,2	2,7	3,1	9,2
%SD	23,9	11,4	10,1	5,7	8,9

REPRODUTIBILIDADE					
	1 pmol	5 pmol	10 pmol	25 pmol	50 pmol
Rep 1	0,88	10,17	27,00	52,60	99,40
Rep 2	1,38	10,3	33,00	45,50	111,30
Rep 3	1,25	9,3	21,50	49,50	95,00
Rep 4	0,88	10,23	25,60	55,50	103,00
Rep 5	1,06	10,17	24,30	49,63	108,00
Média	1,06	10,17	26,39	52,81	103,47
SD	0,22	0,84	3,36	4,04	6,52
%SD	21,13	8,27	12,74	7,64	6,31

Quadro 10 – Análise da precisão do método desenvolvido para quantificação aduto CAR-ACR. A precisão foi avaliada através da verificação da repetitividade e da reprodutibilidade do método.

REPETITIVIDADE					
	1 pmol	5 pmol	10 pmol	25 pmol	50 pmol
Rep 1	1,1	3,5	9,9	21,0	45,5
Rep 2	1,0	4,5	8,4	25,6	48,7
Rep 3	0,6	4,5	12,0	26,0	48,2
Rep 4	0,7	6,3	11,0	30,0	50,0
Rep 5	1,0	4,7	9,0	29,2	52,0
Média	0,9	4,7	10,1	26,4	48,9
SD	0,2	1,0	1,5	3,5	2,4
%SD	24,5	21,2	14,6	13,5	4,9

REPRODUTIBILIDADE					
	1 pmol	5 pmol	10 pmol	25 pmol	50 pmol
Rep 1	1,4	3,6	9,0	27,0	53,0
Rep 2	0,8	4,6	8,9	33,0	64,0
Rep 3	0,9	3,6	7,5	21,5	40,0
Rep 4	0,8	7,0	10,2	29,0	40,3
Rep 5	1,1	5,2	9,5	24,8	49,0
Média	0,9	4,7	9,5	26,7	49,1
SD	0,2	1,2	1,3	3,8	6,8
%SD	25,2	24,4	13,7	14,1	13,9

4.2.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Segundo Manual de Garantia de Qualidade (2011), limite de quantificação “*é a menor concentração que pode ser quantificada com incerteza aceitável*”. Dessa forma a determinação de quanto e qual a ‘incerteza aceitável’ passa a ser o primeiro passo para determinação do LQ. Por consequência, valores abaixo do LQ, ainda que possam ser detectados não podem ser quantificados com certeza aceitável e caracterizam o LD.

Como a técnica de quantificação utilizada nesse estudo foi cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, um “ruído basal” proveniente da fonte de ionização é o limitante mais importante para quantificações em baixas concentrações. Diferenciar de forma clara o que seria “ruído” do que seria “sinal” proveniente do composto de interesse foi então tomado como critério para determinação do limite de quantificação. Dessa forma, o LQ foi determinado experimentalmente por estresse da curva de calibração e aceitou-se como tal quando a relação *sinal / ruído* (s/r) ≥ 6 . O limite de detecção foi aceito quando $s/r \geq 3$.*

Abaixo seguem cromatogramas representativos para os LD's e LQ's estabelecidos para cada composto:

Figura 29 – Cromatograma dos adutos de carnosina em seus respectivos limites de quantificação.

Com os resultados obtidos no estudo de validação podemos considerar que o método desenvolvido utilizando HPLC-MS/MS está de acordo com o objetivo proposto e demonstra confiabilidade analítica para análise de amostras biológicas. Os Quadros 11, 12 e 13 resumem os resultados obtidos nos experimentos de validação:

Quadro 11 – Resumo dos resultados obtidos no estudo de validação para CAR-HHE.

CAR-HHE		
OBJETIVO	CRITÉRIO	RESULTADO
<i>Seletividade</i>	Estabelecimento de transição e tempo de retenção específicos m/z = parental $\rightarrow$ filho	m/z = 341 $\rightarrow$ 224 RT = 5,8 min
<i>Avaliação do Efeito de Matriz</i>	Controle de pH Curvas de Calibração em Matriz	N/A
<i>Linearidade</i>	Faixa de Trabalho Linear	25 – 250 pmol
<i>Avaliação Precisão</i>	Repetitividade	%SD < 18,4 %
	Reprodutibilidade	%SD < 18,3 %
<i>Avaliação Recuperação</i>	Fortificação de Matriz	101,5 $\pm$ 9,4
<i>LQ e LD</i>	Relação sinal / ruído (s/r)	25 pmol

Quadro 12 – Resumo dos resultados obtidos no estudo de validação para CAR-HNE.

CAR-HNE		
OBJETIVO	CRITÉRIO	RESULTADO
<i>Seletividade</i>	Estabelecimento de transição e tempo de retenção específicos m/z = parental $\rightarrow$ filho	m/z = 366 $\rightarrow$ 266 RT = 11,2 min
<i>Avaliação do Efeito de Matriz</i>	Controle de pH Curvas de Calibração em Matriz	N/A
<i>Linearidade</i>	Faixa de Trabalho Linear	1 – 100 pmol
<i>Avaliação Precisão</i>	Repetitividade	%SD < 24,0 %
	Reprodutibilidade	%SD < 21,5 %
<i>Avaliação Recuperação</i>	Fortificação de Matriz	104,5 $\pm$ 13,0
<i>LQ e LD</i>	Relação sinal / ruído (s/r)	1 pmol

Quadro 13 – Resumo dos resultados obtidos no estudo de validação para CAR-ACR.

CAR-ACR		
OBJETIVO	CRITÉRIO	RESULTADO
<i>Seletividade</i>	Estabelecimento de transição e tempo de retenção específicos $m/z = \text{parental} \rightarrow \text{filho}$	$m/z = 303 \rightarrow 166$ RT = 6,1 min
<i>Avaliação do Efeito de Matriz</i>	Controle de pH Curvas de Calibração em Matriz	N/A
<i>Linearidade</i>	Faixa de Trabalho Linear	1– 100 pmol
<i>Avaliação Precisão</i>	Repetitividade	%SD < 25,0 %
	Reprodutibilidade	%SD < 25,5 %
<i>Avaliação Recuperação</i>	Fortificação de Matriz	97,9 ± 15,1
<i>LQ e LD</i>	Relação sinal / ruído (s/r)	1 pmol

4.2 Animais transgênicos ALS SOD^{G93A}.

Compostos carbonílicos insaturados como malonaldeído, acroleína e HNE são espécies eletrofílicas produzidas endogenamente. Diversos trabalhos nos últimos anos têm mostrado que essas espécies são capazes de reagir com biomoléculas como o DNA (Loureiro et al., 2000; Garcia et al., 2011), lipídeos (Salomon et al., 2011) e proteínas (Yamada et al., 2004; Orioli et al., 2007). Uma especial atenção tem sido dada ao fato de que os produtos da reação de tais espécies com componentes celulares, parecem estar aumentados em diversas doenças humanas e em especial, desordens neurodegenerativas (LoPachin et al., 2007; Yankner et al., 2008; LoPachin et al., 2008; Reed et al., 2011). Em esclerose lateral amiotrófica (ELA ou ALS em inglês) trabalhos têm demonstrado que a degeneração dos neurônios motores é resultado de mecanismos complexos envolvendo danos oxidativos, excitotoxicidade por glutamato, disfunção de proteínas e fatores genéticos (Cozzolino et al., 2008, Parakh et al., 2013). Seu diagnóstico é baseado em anamnese e sintomas clínicos seguidos de uma grande variedade de exames (Portaria SAS/MS nº 496 2009) o que exige grande perícia médica na identificação da doença.

A maior parte dos casos de ELA são tidos como idiopáticos (sem causa específica) e a uma minoria são atribuídos a causas genéticas (Kiernan et al., 2011; Krueger et al., 2013). A mutação no gene que codifica a enzima SOD1 foi a primeira a ser descrita, sendo hoje conhecida mais de 160 modificações possíveis nos 153 códons do gene *SOD*, (Rosen et al., 1993). Ratos transgênicos carregando o genes *SOD1h^{G93A}* e superexpressando essa enzima (Figura 30) reproduzem a maioria das características fenotípicas de pacientes, como perda seletiva de neurônio motor, inclusões hialinas, ubiquitinação e neuroinflamação (Howland et al., 2002). Tais animais foram o modelo de escolha para monitoramento dos adutos de carnosina bem como avaliação da progressão clínica/sobrevida após suplementação da dieta com carnosina.

Os resultados obtidos e demonstrados na Figura 31 A indicam que a adição de carnosina na água oferecida aos animais não causou recusa e que a quantidade de carnosina consumida entre os grupos Cont+CAR e ALS+CAR foi praticamente a mesma, em torno de 35 ± 5 mg carnosina/animal/semana (Figura 31 B). Herculano et al., (2013) já haviam demonstrado que a suplementação da água de animais com carnosina não causava recusa nem diferença de peso em relação ao controle. O consumo de carnosina foi capaz de postergar a perda de peso ocasionada pelo início do aparecimento dos sintomas aos 110 ± 05 dias de vida (7 semanas de tratamento) nos animais ALS+CAR (Figura 31 C) em cerca de 5 dias. Importante destacar que os animais controle suplementados com carnosina não apresentaram diferença de peso em relação ao controle não-suplementado (Figura 31 C), o que demonstra que a melhora de peso nos animais ALS-tratados não se deve ao aumento calórico eventualmente causado pelo consumo de carnosina. Matsakura e Tanaka (2000) demonstraram que em animais 4,1 % da carnosina consumida da dieta é excretada pela urina, 38,8 % na exalação e apenas 13,3 % nas fezes (não absorvida). Trabalhos com humanos mostram que a suplementação com carnosina pode duplicar a concentração da mesma em músculo de atletas (Hill et al., 2007; Sale et al., 2010; Harris et al., 2012) bem como melhorar significativamente a capacidade física de idosos (Favero et al., 2012). A manutenção do peso observada nos animais tratados se refletiu na melhor da aparência dos mesmos – com postura corporal menos curvada e pelagem mais limpa (Figura 31 E e F) – e principalmente no aumento do tempo de sobrevida até o sacrifício (Figura 31 D). Os resultados btidos mostram que os animais tratados com CAR levaram em média 04 dias a mais para começar a manifestar os sintomas que os ALS não tratados e tiveram em média 05 dias a mais de sobrevida (perda de 20% do peso para eutanásia). Considerando-se que o período entre início dos sintomas e morte é de 15 dias, pode-se dizer que houve um aumento na sobrevida de cerca de 27

% e uma melhora geral de mais de 50 % entre o início dos sintomas e o sacrifício. Fazendo um paralelo com o tratamento humano, atualmente o único medicamento aprovado para tratamento pelos *US Food and Drug Administration* e demais órgãos reguladores é o riluzol (6-(trifluorometoxi) benzotiazol-2-amina), que aumenta a sobrevida em aproximadamente 3 meses (De Groot et al., 2007; Miller et al., 2012). Demais protocolos terapêuticos que preconizam tratamentos farmacológicos para aliviar os sintomas e suporte respiratório e nutricional em estágios avançados podem estender esse tempo para 2 – 5 anos (Krueger et al., 2013).

Figura 30 – Resultado do experimento PCR. A imagem é um representativo dos géis de agarose obtidos nos experimentos de genotipagem dos animais. As manchas claras apresentadas no gel com cerca de 200 pares de base (e indicadas pela seta) representam os animais portadores do gene *SOD1h^{G93A}*. Animais negativos não apresentam bandas no gel.

Figura 31 – Resultados da experimentação animal. **A** – Consumo hídrico ao longo do experimento (seta indica o início da oferta de carnosina aos animais); **B** – Média quantidade de carnosina (mg) ingerida por animal por semana; **C** – Peso dos animais aos 115 ± 05 dias de vida (7 semanas de tratamento); **D** – Percentual de sobrevivência dos animais ALS; **E** – Animais ALS aos 115 dias de vida (véspera da eutanásia); **F** – Animais ALS tratado com carnosina aos 115 dias de vida (09 dias antes da eutanásia).

a – diferença estatística para $p < 0,1$ em comparação ao grupo Controle.

b – diferença estatística para $p < 0,1$ em comparação ao grupo ALS.

Figura 32 – Quantificação dos adutos de carnosina em amostras de músculos de animais SOD^{G93A} . *diferença significativa ($p < 0,1$) em relação ao grupo Cont; **diferença significativa ($p < 0,1$) em relação ao grupo ALS;

Os mecanismos exatos envolvidos que levam os animais $SOD1^{G93A}$ a manifestarem os sintomas da esclerose lateral amiotrófica ainda não são totalmente conhecidos. Uma das hipóteses iniciais era de que a perda de atividade enzimática estivesse relacionada com ALS, mas logo foi demonstrado que animais sem SOD1 não apresentam doença de neurônio motor (Reaume et al., 1996). Entretanto, animais que expressam SOD1 humana modificada em presença da SOD1 endógena apresentam sintomas semelhantes aos de pacientes humanos. O mesmo não ocorre com

a forma “selvagem” da SOD1 humana (Gurney et al., 1994). Atualmente, propõe-se ganho de função tóxica das enzimas modificadas. Dessa forma, vias alternativas de detoxificação dos subprodutos tóxicos (em especial aldeídos α,β – insaturados) foram estudadas nesses animais. Diversos trabalhos têm demonstrado a participação de dipeptídeos de histidina nos mecanismos de detoxificação de aldeídos insaturados (Orioli et al., 2005 e 2007; Aldini et al., 2003; LoPachi 2007 e 2008). Esses peptídeos agiriam por mecanismos de “scavenger” formando produtos de Michael e/ou bases de Schiff com tais aldeídos impedindo lesões em biomoléculas como DNA e proteínas (Aldini et al, 2002, Carini et al, 2003).

Os resultados obtidos na quantificação dos adutos de carnosina nas amostras de músculos dos animais estão demonstrados na Figura 32. Percebe-se que não existe diferença significativa ($p < 0,1$) para os adutos de CAR-HHE entre os diversos grupos. Uma diminuição do aduto de CAR-ACR foi observada entre os animais ALS e ALS+CAR ($p < 0,1$) em relação ao controle. Redução semelhante também ocorreu para o aduto CAR-HNE no grupo ALS em relação ao controle, bem como uma recuperação ao nível do controle ocasionada pelo tratamento com carnosina no grupo ALS-CAR (aumento significativo em relação ao grupo ALS, $p < 0,1$). Considerando o tamanho reduzido do grupo experimental e a complexidade da desordem em questão, torna-se difícil estabelecer uma relação direta entre os resultados mensurados e o quadro clínico observado.

Trabalhos anteriores já demonstraram que aldeídos insaturados, como HNE, podem ativar vias pro - inflamatórias como a $\text{Nf}\kappa\beta$ e IKK, bem como vias de sinalização de morte celular como a HS90 (Ullery e Marnett, 2013). Também tem sido demonstrado a implicação de diversos aldeídos insaturados (em especial HNE) em diversas desordens neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e demências (Reed, 2011). Em trabalho com camundongos transgênicos

3xTg-AD modelo para Alzheimer, Corona et al., (2011) mostraram que a suplementação dos animais com 10 mm de carnosina via oral por cerca de 12 meses diminui o déficit cognitivo e o acúmulo de placas β -amilóides no hipocampo, bem como promove a melhora da disfunção mitocondrial relacionada ao envelhecimento. Trabalhos com humanos já demonstraram que a suplementação de idosos com carnosina leva a uma melhora significativa da capacidade física (Favero et al., 2012). Em outro estudo Zambelli et al., (2014) demonstraram que os aldeídos têm papel importante na nocicepção de animais. Esses autores mostraram que roedores deficientes da enzima aldeído desidrogenase-2 (ALDH-2) são mais sensíveis a estímulos nociceptivo. A uma mutação semelhante presente em humanos do leste asiático é atribuída a diminuição da capacidade de metabolização de aldeídos e aumento da sensibilidade a dor Zambelli et al., (2014). Os resultados sugerem que as vias de metabolização de aldeídos podem ser vias potenciais para desenvolvimento de novos medicamentos contra dor.

Assim, o conjunto dos nossos dados e análise da literatura nos permite supor que a melhora clínica observada nos animais ALS tratados com carnosina (grupo ALS+CAR) pode estar, ao menos em parte, relacionada ao aumento da capacidade de metabolização do HNE e conseqüentemente da diminuição de seus efeitos deletérios.

Dessa forma, o monitoramento dos adutos de carnosina nos animais poderiam ser um importante marcador da progressão da doença e/ou alternativamente a suplementação com carnosina ou drogas baseadas em sua estrutura poderiam auxiliar patologias associadas ao estresse oxidativo como desordens neurodegenerativas, desordens associadas à musculatura esquelética e doenças cardiovasculares, especialmente em condições onde conjugados de carnosina poderiam estar auxiliando na detoxificação de aldeídos reativos (Baba et al., 2013).

4.3 Quantificação Simultânea de Adutos de Carnosina em Urina de Humanos

A carnosina ou β – alanil – histidina é um dipeptídeo abundante em tecidos de alta atividade metabólica como cérebro e músculo esquelético (Yeum et al., 2010). Apesar de sua alta concentração, que pode chegar a ser 10 vezes maior que a concentração citosólica de glutathione (GSH) (Zhou e Decker, 1999), nenhuma função celular específica lhe é atribuída, sendo aceita pela maioria dos autores como tamponante intracelular (Skulachev, 2000; Harris et al., 2012). Entretanto, especial atenção tem sido dada a sua capacidade em reagir com espécies como acroleína (Carini et al., 2003) e HNE (Aldini et al., 2005), sugerindo que possa estar envolvida na detoxificação celular desses compostos (Aldini et al., 2002). Em trabalho com ratos obesos Zucker, Orioli et al., (2007) demonstraram a presença de adutos de peptídeos contendo histidina com HNE na urina desses animais. Os resultados obtidos em amostras de músculo de animais SOD^{G93A} demonstraram que a carnosina parece ter um papel importante no metabolismo dos aldeídos desses animais.

Em amostras de urina humanas, nossos resultados mostraram que o produto de acroleína por nós identificado (3-metilpiridíneo carnosina) bem como os produtos CAR-HHE e CAR-HNE estão presentes em condições fisiológicas (Figura 34) nas seguintes concentrações: $3,6 \pm 1,4$; $2,3 \pm 1,5$ e $1,3 \pm 0,5$ nmol / mg de creatinina, respectivamente para CAR-ACR, CAR-HHE e CAR-HNE (Figura 33). Estudo de Baba et al., (2013) já havia mostrado a presença de vários produtos de histidina com aldeídos na urina de humanos e demonstrado que boa parte desses produtos sofre ação da enzima aldose redutase (AR) antes da excreção na urina. Esse mesmo trabalho sugere que cerca de 15 % de toda detoxificação da acroleína em humanos seja feita através de peptídeos contendo histidina. Contudo, importante destacar que o aduto de carnosina-acroleína (3 – metilpiridíneo carnosina) por aqui descrito não estava entre os produtos monitorados nesse

trabalho. Considerando as concentrações descritas por Baba et al., (2013) e comparando com as obtidas em nosso trabalho, podemos supor que o aduto 3 – metilpiridíneo carnosina (CAR-ACR) é o mais o abundante metabólito de acroleína na urina de humanos.

Esse achado pode ter uma importante significância biológica, uma vez que um produto semelhante descrito por Furuhashi et al., (2003) como produto da reação entre lisina e acroleína foi demonstrado ser um potente carcinogênico. Assim, em regiões de exposição à acroleína, como grandes centros urbanos, a avaliação da concentração do aduto de aldeído com carnosina na urina de humanos pode fornecer dados valiosos para monitoramento ambiental e da qualidade do ar respirado. Além disso, nossos resultados confirmam que peptídeos de histidina atuam na detoxificação de compostos carbonílicos como aldeídos e comprovam que a carnosina pode ser uma importante rota de metabolização de acroleína em humanos.

Figura 33 – Quantificação dos adutos de carnosina em amostras de urina de humanos.

Figura 34 – Cromatograma dos adutos de carnosina na urina de humanos.

5 CONCLUSÃO

Aqui, realizamos a completa elucidação estrutural do composto $m/z = 303$ (3-metilpiridíneo carnosina) proveniente da reação entre CAR + acroleína. A estrutura elucidada é de um produto inédito, diferente do descrito anteriormente na literatura e um dos principais metabolitos de acroleína em humanos. Também desenvolvemos e validamos uma metodologia de alta sensibilidade para quantificação simultânea de adutos de carnosina. O método desenvolvido permite a detecção e quantificação sensível desses adutos em tecidos e fluidos biológicos apontando para a possível utilização desses adutos como biomarcadores de exposição a aldeídos endógenos e exógenos.

Nossos resultados demonstram que a carnosina participa da metabolização da acroleína, HHE e HNE formando CAR-ACR, CAR-HHE e CAR-HNE conjugados respectivamente e que tais produtos são encontrados na urina de humanos. Esses resultados apontam para um possível uso terapêutico da carnosina em patologias onde a produção de aldeídos reativos está aumentada, como no caso de indivíduos com deficiência de ALDH2 e em estresse redox produzido por isquemia cardíaca, por exemplo.

A suplementação de animais transgênicos ALS SOD^{G93A} com carnosina via oral resultou em retardo da perda de peso em consequência da atrofia muscular e aumento da sobrevida dos animais. Análise dos produtos sintetizados em amostras de tecido confirma que a carnosina participa da metabolização aldeídos α,β -insaturados e que a detoxificação desses compostos está comprometida animais ALS SOD^{G93A}. Resultados sugerem que a carnosina pode ser um importante suplemento para melhora dos sintomas relacionados à ALS.

6 REFERÊNCIAS

1. Aldini G., Carini M., Beretta G., Bradamante S., Facinoa R.M. (2002). **Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction?** Biochem. Bioph. Res. Com. v298, p.699–706.
2. Aldini G., Facino R.M., Beretta B., Carini M. (2005). **Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: From structural studies to therapeutic perspectives.** BioFactors, v24, p.77–87.
3. Asatoor A.M., Baudoh J.K., Lant A.F., Milne M.D., Navab F. (1970). **Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man.** Gut v11, p250–254.
4. Ash P.E.A., Zhang Y., Roberts C.M., Saldi T., Hutter H., Buratti E., Petrucelli L., Link C.D. (2010). **Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*.** Human Mol. Gen. v19 (16), p.3206-3218.
5. Baba S.P., Hoetker J.D., Merchant M., Klein J.B., Cai J., Barski O.A., Conklin D. J., Bhatnagar A. (2013). **Role of aldose reductase in the metabolism and detoxification of carnosine-acrolein conjugates.** Journal of Biological Chemistry, v288 (39), p.28163-28179.
6. Babizhayev M. A. (2012). **Biomarkers and special features of oxidative stress in the anterior segment of the eye linked to lens cataract and the trabecular meshwork injury in primary open-angle glaucoma: challenges of dual combination therapy with *N*-acetylcarnosine lubricant eye drops and oral formulation of nonhydrolyzed carnosine.** Fund. & Clin. Pharm. v26 (1), p. 86–117.

7. Bakardjiev A., Bauer W.J. (1994). **Transport of β -alanine and biosynthesis of carnosine by skeletal muscle cells in primary culture.** Eur. J. Biochem. v225, p.617–623.
8. Balion C.M., Benson C., Raina P.S., Papaioannou A., Patterson C., Ismail A. (2007). **Brain type carnosinase in dementia: a pilot study.** BMC Neurol. v38 (7).
9. Barber S.C., Shaw, P.J. (2010). **Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target.** Free Radic. Biol. Med., v48 (5), p.629-41.
10. Barbosa J.H.P., Oliveria S.L., Tojal e Seara L. (2008). **O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes.** Arq. Bras. Endocrinol. Metab. v52 (6), p.940-950.
11. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. (1995). **A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats.** J. Neurotrauma. v12 (1).
12. Bate-Smith E.C. (1938). **The buffering of muscle in rigour: protein, phosphate and carnosine.** J. Physiol. v92, p.336–343.
13. Bauer K. (2005). **Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain.** Neurochem. Res. v30 (10), p.1339-1345.
14. Bellingham M.C. (2011). **A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade?** CNS Neuroscience & Therapeutics v17 (1), p.4-31.
15. Bertinaria M., Rolando B., Giorgis M., Montanaro G., Guglielmo S., Buonsantini M.F., Carabelli V., Gavello D., Daniele P.G., Fruttero R., Gasco A. (2011). **Synthesis, physicochemical characterization and biological activities of a new carnosine**

- derivatives stable in human serum as potential neuroprotective agents.** J. Med. Chem. v54, p.611-621.
16. Blair I.A. (2010). **Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites.** Biomed. Chromatogr. v24, p.29-38.
17. Boldyrev A.A, Johnson P., Wei Y., Tan Y., Carpenter D.O. (1999). **Carnosine and taurin protect rat cerebellar granular cells from free radical damage.** Neurosc. Let. v263, p.169-172.
18. Boldyrev A.A. (2000). **Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine.** Biochem. (Moscow) v65, p.751–756.
19. Boldyrev A.A., Severin S.E. (1990). **The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance.** Adv. Enzyme Regul. v30, p.175–194.
20. Bradford M.M. (1957). **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Chem., v72, p.248-254.
21. Bradley M.A., Markesbery W.R., Lovell M.A. (2010). **Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer's disease (PCAD).** Free Radic. Biol. Med. v48 (12), p.1570–1576.
22. Bradley M.A., Xion-Fister S., Markesbery W.R., Lovell M.A. (2012). **Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression.** Neurobiol. Aging v33, p.1034-1044.

23. Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L. (2000). **El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis.** *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, v1 (5), p. 293-299.
24. Brownringg T., Theisen C.S., Fibuch E.E., Seidler N.W. (2011). **Carnosine protects against the neurotoxic effects of a serotonin-derived melanoid.** *Neurochem. Res.* v36, p.467-475.
25. Carini M., Aldini G., Beretta G., Arlandini E., Facino R.M. (2003). **Acrolein-sequestering ability of endogenous dipeptides: characterization of carnosine and homocarnosine/acrolein adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry* v38, p.996–1006.
26. Carlsen C.U., Møller J.K.S., Skibsted L.H. (2005). **Heme-iron in lipid oxidation.** *Coord. Chem. Rev.* v249, p.485–498.
27. Cheah B.C., Vucic S., Krishnan A.V., Kiernan M.C. (2010). **Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis.** *Curr. Med. Chem.* v17 (18), p.1942-1959.
28. Corona C., Frazzini V., Silvestri E., Lattanzio R., La Sorda R., et al. (2011). **Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice.** *PLoS ONE* 6(3).
29. Cozzolino M., Pesaresi M.G., Gerbino V., Grosskreutz J., Carri M.T. (2012). **Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention.** *Antiox. & Redox Signaling* v.17 (9), p.1277-1330.
30. Crush K.G. (1970). **Carnosine and related substances in animal tissues,** *Comp. Biochem. Physiol.* v34, p.3–30.

31. De Carvalho M., Dengler R., Eisen A., England J.D., Kaji R., Kimura J., Mills K., Mitsumoto H., Nodera H., Shefner J., Michael Swash M. (2008). **Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS.** Clin. Neuroph. v119 (3), p.497-503.
32. De Groot I.J.M., Post M.W.M, Heuveln T., Lideman E. (2007). **Cross-sectional and longitudinal correlations between disease progression and different health-related quality of life domains in persons with amyotrophic lateral sclerosis.** Amyotrophic Lateral Sclerosis, v8 (6), p.356-361.
33. Dutka T.L., Lamb G.D. (2004). **Effect of carnosine on excitation/contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle.** J. Muscle Res. Cell. Motil. v25, p.203–213.
34. Ekegren, T., Hanrieder, J., Bergquist, J. (2008). **Clinical perspectives of high-resolution mass spectrometry-based proteomics in neuroscience - Exemplified in amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery research.** J. Mass Spectrom. v43 (5), p.559-571.
35. Estes P.S. Boehringer A., Zwick R., Tang J., Grigsby B., Zarnescu D.C. (2011). **Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a Drosophila model of ALS.** Human Mol. Gen. v20 (12), p.2308-2321.
36. Esteves-Souza A., Echevarria A., Sant'Anna M.C.R., Nascimento M.G. (2004). **Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina.** Quím. Nova v27 (1), p.72-75.
37. Fallertti O., Cadet J., Favier A., Douki T. (2007). **Trapping of 4-hydroxynonenal by glutathione efficiently prevents formation of DNA adducts in human cells.** Free Radical Biology & Medicine, v42, p.1258-1269.

38. Favero S., Roschel H., Solis M.Y., Hayashi A.P., Artioli G.G., et al. (2012). **Beta-alanine (CarnosynTM) supplementation in elderly subjects (60–80 years): effects on muscle carnosine content and physical capacity.** Amino Acids v43, p.49–56.
39. Fitzmaurice P.S., Tong J., Yazdanpanah M., Liu P.P., Kalasinsky K.S., Kish S.J. (2006). **Levels of 4-hydroxynonenal and malonodialdehyde are increase in brain of human chronic users of methamphetamine.** J. Pharm. Exp. Therap. v319 (2), p. 703-709.
40. Furuhata A., Ishii T., Kumazawa S., Yamada T., Nakayama T., Uchida K. (2003). **N^ε-(3-methylpyridinium) lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein.** J. Biol. Chem. v. 278(49), p.48658–48665.
41. Garcia C.C.M., Freitas F.P., Di Mascio P., Medeiros M.H.G. (2010). **Ultrasensitive simultaneous quantification of 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine in DNA by an online liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay.** Chem. Res. Toxicol. v23, p.1245-1255.
42. Garcia C.C.M., Freitas F.P., Sanchez A.B., Di Mascio P., Medeiros M.H.G. (2013). **Elevated α -methyl- γ -hydroxy-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine levels in urinary samples from individuals exposed to urban air pollution.** Chem. Res. Toxicol. v26 (11), p.1602–1604.
43. Garcia C.C.M., Angeli J.P.F., Freitas F.P., Gomes O.F., Oliveira T.F., Loureiro A.P.M.; Di Mascio P., Medeiros M.H.G. (2011). **[¹³C₂]- Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1, N²-propano-2 -deoxyguanosine in human cells.** J. Am. Chem. Soc. v133, p.9140-9143.

44. Gurney M.E., Pu H., Chiu A.Y., Siddique T. (1994). **Motor-neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide-dismutase mutation.** Sci. v264 (5166), p.1772-1775.
45. Harris R.C., Tallon M.J., Dunnett M., Boobis L.H., Coakley J., Kim H.J., Fallowfield J.L., Hill C.A., Sale C., Wise J.A. (2006). **The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human *vastus lateralis*.** Amino Acids v30, p.279–289.
46. Harris R.C., Wise J.A., Price K.A., Kim H.J., Kim C.K., Sale C. (2012). **Determinants of muscle carnosine content.** Amino Acids, v43, p.5–12.
47. Harris R.C., Marlin D.J., Dunnett M., Snow D.H., Hultman E. (1990). **Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man.** Comp. Biochem. Physiol. v97 (2), p.249-51.
48. Herculano B., Tamura M., Ohba A., Shimatani M., Kutsuna N., Hisatsune T. (2013). **β -alanil-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.** J. Alzheim. Dis. v33, p.983-997.
49. Hill C.A., Harris R.C., Kim H.J., Harris B.D., Sale C., Boobis L.H., Kim C.K., Wise J.A. (2007). **Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity.** Amino Acids v32, p.225–233.
50. Hipkiss A.R. (2009). **On the enigma of carnosine's anti-ageing actions.** Experimental Gerontology v44, p.237–242.
51. Holliday R., McFarland G.A., (2000). **A role for carnosine in cellular maintenance.** Biochem. (Moscow). v65 (7), p. 911-997.

52. Horinishi H., Grillo M., Margolis F.L. (1978). **Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs.** J. Neurochem. v31, p.909–919.
53. Howland D.S., Liu J., She Y., Goad B., Maragakis N.J., Kim B., Erickson J., Rothstein J.D. (2002). **Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS).** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America v99 (3), p.1604-1609.
54. Hoz S., Gross Z. (1988). **Nucleophilic attacks on low LUMO compounds. Part 5. Radical-anionic nature of the transition state in the Michael addition reaction.** J. Am. Chem. Soc. v110 (22), p.7489–7493.
55. **ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).** International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. European Union, Japan and USA, 1996.
56. Jin C.L., Yang L.X., Wu X.H., Li Q., Ding M.P., Fan Y.Y., Zhang W.P., Luo J.H., Chena Z. (2005). **Effects of carnosine on amygdaloid-kindled seizures in Sprague–Dawley rats.** Neuroscience, v135, p.939–947.
57. Jin F. Li Y. (2009). **The effect of h2 on chichibabin condensation catalyzed by pure. ZSM-5 and PT/ZSM-5 for pyridine and 3-picoline synthesis.** Catal Lett., v131, p.545–551.
58. Kabashi E., Lin L., Tradewell M.L., Dion P.A., Bercier V., Drapeau P. (2010). **Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits *in vivo*.** Human Molecular Genetics v19 (4), p.671-683.

59. Karton A., O'Reilly R., Pattison D.I., Davies M.J., Radom L. (2012). **Computational design of effective, bioinspired HOCl antioxidants: the role of intramolecular Cl⁺ and H⁺ shifts.** J. Am. Chem. Soc. v134, p.19240-19245.
60. Kidd M.P. (1997). **Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage.** Alternative Medicine Review v02 (03), p.155-176.
61. Kiernan M.C. Vucic S, Cheah B.C., Turner M.R., Eisen A., Hardiman O., Burrell J.R., Zoing M.C. (2011). **Amyotrophic lateral sclerosis.** Lancet v377 (9769), p.942-955.
62. Kozan R., Sefil F., Bağırcı F. (2008). **Anticonvulsant effect of carnosine on penicillin-induced epileptiform activity in rats.** Brain Research, v1239, p.249-255.
63. Krimberg, R. (1906). **Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der muskeln.IV.Mutterlung. Uberdas vorkommen des carnosins, carnitins und methylguanidins im fleisch.** Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chem. v48, p.412.
64. Krueger, T. Lautenschläger J., Grosskreutz J., Rhode H. (2013). **Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery.** Proteom. Clin. App. v7 (1-2), p. 123-135.
65. Lamont C., Miller D.J. (1992). **Calcium sensitizing action of carnosina and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle.** J. Physiol. v454, p.421–434.
66. LoPachin R.M., Barber D.S., Gavin T. (2008). **Molecular mechanisms of the conjugated α,β -unsaturated carbonyl derivatives: relevance to neurotoxicity and neurodegenerative diseases.** Toxicol. Sci. v104 (2), p.235–249.

67. LoPachin R.M., Barber S.D., Geohagen B.C., Gavin T., He D., Das S. (2007). **Structure-toxicity analysis of type-2 alkenes: in vitro neurotoxicity.** Toxicol. Sci. v95 (1), p.136–146.
68. Loureiro A.P.M., Di Mascio P., Gomes O.F., Medeiros M.H.G. (2000). **trans,trans-2,4-Decadienal-induced 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation.** Chem. Res. Toxicol. v13, p.601-609.
69. Loureiro A.P.M., Marques S.A., Garcia C.C.M., Di Mascio P., Medeiros M.H.G. **Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA.** Chem. Res. Toxicol. 2002. v15, p. 1302-1308.
70. **Manual de garantia da qualidade analítica.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – MAPA/ACS, 2011.
71. Margolis F.L. (1974). **Carnosine in the primary olfactory pathway.** Science, v184, p.909-911.
72. Massari J., Tokikawa R., Zanolli L., Tavares M.F.M., Assunção N.A., Bechara E.J.H. (2010). **Acetyl radical production by the methylglyoxal-peroxynitrite system: a possible route for l-lysine acetylation.** Chem. Res. Toxicol. v23, p.1762–1770.
73. Matsukura T., Takahashi T., Nishimura Y., Ohtani T., Sawada M., Shibata, K. (1990). **Characterization of crystalline L-carnosine Zn(II) complex(Z-103), a novel anti-gastric ulcer agent: tautomeric change of imidazole moiety upon complexation.** Chem. Pharm. Bull. v38, p.3140-3146.
74. Matsukura T., Tanaka H. (2000). **Applicability of zinc complex of L-carnosine for medical use.** Biochemistry (Moscow), v65 (7), p.817-823.

75. Mattos M.C., Mazoni L. (1999). **Aspectos mecanísticos da adição de Michael**. Quím. Nova v22 (5), p.710 – 714.
76. Meade S.J., Miller A.G., Gerrard J.A. (2003). **The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study**. Bioorg. Med. Chem. v11(6), p.853-62.
77. Meade S.J., Miller A.G., Gerrard J.A.. (2003). **The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study**. Bioorg Med Chem. v11 (6), p.853-62.
78. Miller R.G., Mitchell J.D., Moore D.H. (2012). **Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)**. Cochrane Database of Systematic Reviews v3.
79. Mitchell, J.D., Borasio, G.D. (2007). **Amyotrophic lateral sclerosis**. Lancet, v.369 (9578), p.2031-2041.
80. Mitne-Neto M., Machado-Costa M., Marchetto M.C.N., Bengtson M.H. (2011). **Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients**. Human Mol. Gen. v20 (18), p.3642-3652.
81. Miyamoto Y., Nakamura H., Hoshi T., Ganapathy V., Leibach F.H. (1990). **Uphill transport of β -alanine in intestinal brush-border membrane vesicles**. Am. J. Physiol. v259, p372–379.
82. Morgan B., Ezerina D., Amoako T.N.E., Riemer J., Seedorf M., Dick T.P. (2013). **Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis**. Nature Chem. Biolog. v9, p.119-127.

83. Ng R.H., Marshall F.D. (1978). **Regional and subcellular distribution of homocarnosine-carnosine synthetase in the central nervous system of rats.** J. Neurochem. v30, p187–190.
84. Oare D.A., Heathcock C.H. (1989). **Stereochemistry of the base-promoted Michael addition reaction.** Top. Stereochem. v19, p.227–407.
85. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOC-CGCRE-008.** INMETRO, Revisão 04 – jul 2011.
86. Orioli M., Aldini G., Benfatto M.C., Facino R.M., Carini M. (2007). **HNE Michael adducts to histamine and histamine-containing peptides as biomarkers of lipid-derived carbonyl stress in urines: LC-MS/MS profiling in Zucker obese rats.** Anal. Chem. v79 (23), p.9174-9184.
87. Orioli M., Aldini G., Beretta G., Facino R.M., Carini M. (2005). **LC–ESI-MS/MS determination of 4-hydroxy-trans-2-nonenal Michael adducts with cysteine and histidine-containing peptides as early markers of oxidative stress in excitable tissues.** J. Chromatog. B v827, p.109–118.
88. Parakh S. (2013). **Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity v2013, p.12.
89. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Portaria: Esclerose Lateral Amiotrófica.** SAS/MS nº 496, de 23 de dezembro de 2009.
90. Qin W., Long S., Panunzio M., Biondi S. (2013). **Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool.** Molecules v18, p.12265 – 12289.

91. Ramamoorthy S., Leibach F.H., Mahesh V.B., Han H., Yang-Feng T., Blakely R.D., Ganapathy V. (1994). **Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta.** Biochem. J. v300, p.893–900.
92. Reaume A.G., Elliott J.L., Hoffman E.K, Snider W.D. (1996). **Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury.** Nature Gen. v13 (1), p.43-47.
93. Rebrin I., Bayne A., Mockett R.J., Orr W.C., Sohal R.S. (2004). **Free aminothiols, glutathione redox state and protein mixed disulphides in aging *Drosophila melanogaster*.** Biochem. J. v382, p. 131-136.
94. Reed T.T. (2011). **Lipid peroxidation and neurodegenerative disease.** Free Rad. Biolog. Med. v51, p.1302–1319.
95. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Brown Jr R.H. (1993). **Mutations in Cu/Zn superoxide-dismutase gene are associated with familial amyotrophic-lateral-sclerosis.** Nature v362 (6415), p.59-62.
96. Sale C., Saunders B., Harris R.C. (2010). **Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance.** Amino Acids, v 39, p.321–333.
97. Salomon R.G., Gu X. (2011). **Critical insights into cardiovascular disease from basic research on the oxidation of phospholipids: the γ -hydroxyalkenal phospholipid hypothesis.** Chem. Res. Toxicol. v24, p.1791-1802.
98. Sartori A., Garay-Malpartida H.M., Forni M.F., Schumacher R.I., Dutra F., Sogayar M.C., Bechara E.J.H. (2008). **Aminoacetone, a putative endogenous source of**

- methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells.** Chem. Res. Toxicol. v21, p.1841–1850.
99. Sayre L.M., Arora P.K., Iyer R.S., Salomon R.G. (1993). **Pyrrole formation from 4-hydroxynonenal and primary amines.** Chem. Res. Toxicol. v6, p.19-22.
 100. Severin S.E., Kirzon M.V., Kaftanova T.M. (1953). **Effect of carnosina and anserine on action of isolated frog muscles.** Dokl Akad Nauk SSSR v91, p.691–701.
 101. Skulachev V.P. (2000). **Biological role of carnosine in the functioning of excitable tissues.** Biochem. (Moscow) v65 (7), p 749-750.
 102. Son D.O., Satsu H., Totsuka M., Shimizu M. (2008). **Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 in intestinal epithelial cells through translational regulation.** Cytok. v43, p.265-276.
 103. Stvolinsky S.L., Kukley M.L., Dobrota D., Matejovicova M., Tkac I., Boldyrev A.A. (1999). **Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain.** Cell. Molec. Neurobiol. v19 (1), p. 45-56.
 104. Turkcu U.O., Bilgihan A., Biberoglu G., Caglar O.M. (2010). **Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress.** Mol. Cell. Biochem. v339, p.55-61.
 105. Ullery J.C., Marnett L.C. (2012). **Protein modification by oxidized phospholipids and hydrolytically released lipid electrophiles: investigating cellular responses.** Biochem. Biophys Acta. v1818 (10), p.2424–2435.
 106. Xie Z., Baba S.P., Sweeney B.R., Barski O.A. (2013). **Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: From chemistry to clinical implications.** Chemico-Biological Interactions v202 (1–3), p.288–297.

107. Yamada S, Funada T., Shibata N., Kobayashi M., Tatsuda S., Furuhata A., Uchida K. (2004). **Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids.** J. Lipid Res. v45, p.626-634.
108. Yamawaki H., Hara Y. (2008) **Glyoxal causes inflammatory injury in human vascular endothelial cells.** Biochem. Bioph. Res. Com. v369, p.1155–1159.
109. Yankner B.A., Lu T., Loerch P. (2008). **The aging brain.** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v3, p.41-66.
110. Yeum K., Orioli M., Regazzoni L., Carini M., Rasmussen H., Russell R. M., Aldini G. (2010). **Profiling histidine dipeptides in plasma and urine after ingesting beef, chicken or chicken broth in humans.** Amino Acids, v38, p.847–858.
111. Zambelli V.O., Gross E.R., Chen C., Gutierrez V.P., Cury Y., Mochly-Rosen D. (2014). **Aldehyde dehydrogenase-2 regulates nociception in rodent models of acute inflammatory pain.** Sci. Transl. Med. v6, p.251ra118.
112. Zapp J.A., Wilson D.W. (1938). **Quantitative studies of carnosine and anserine in mammalian muscle: II. The distribution of carnosine and anserine in various muscles of different species,** J. Biol. Chem. v126, p.19–27.
113. Zhou S., Decker E.A. (1999). **Ability of carnosine and other skeletal muscle components to quench unsaturated aldehydic lipid oxidation products.** J. Agric. Food Chem., v47, p.51-55.
114. Zhu X., Hayashi M., Subramanian R. (2012). **Enhanced detection and characterization of glutathione-trapped reactive metabolites by pseudo-MS³ transition using a linear Ion Trap mass spectrometry.** Chem. Res. Toxicol. v25, p.1839-1841.

7 APÊNDICES

7.1 Anexo 01 – Parecer 891/CEP (Comissão de Ética de Pesquisa com Seres Humanos, ICB/USP) para o projeto “Estudo de biomarcadores de estresse redox em sangue e urina de humanos”

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cap. 05509-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (08) (11) 3091.7733 telefax : (08) (11) 2091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de maio de 2009.

PARECER 891/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 95ª reunião realizada em 22.05.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: “*Estudo de biomarcadores de estresse redox em urina e sangue humano*”.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **22 de maio de 2010**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.
PROFA. DRA. MARISA HELENA GENNARI DE MEDEIROS
Departamento de Bioquímica
Instituto de Química - USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada
pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

7.2 Anexo 02 – Parecer CECUA-IQ USP (Comissão de Ética em Cuidado e Uso Animal do Instituto de Química – USP) 25/02/2008 para o projeto “Esclerose Lateral Amiotrófica: Investigação de possíveis biomarcadores e novas estratégias antioxidantes em ratos transgênicos SOD^{G93A}”

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Esclerose Lateral Amiotrófica: Investigação de possíveis biomarcadores e novas estratégias antioxidantes em ratos transgênicos SOD^{G93A}”, desenvolvido sob a responsabilidade da Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP em 25/02/2008.

We attest that the project entitled “Esclerose Lateral Amiotrófica: Investigação de possíveis biomarcadores e novas estratégias antioxidantes em ratos transgênicos SOD^{G93A}”, developed under the responsibility of Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 2/25/2008.

São Paulo, 25 de fevereiro de 2008

Maria Júlia Manso Alves
Coordenador CECUA

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Vanderson da Silva Bispo

Local e data de nascimento: Aracaju, 10/05/1988

EDUCAÇÃO

Colégio Unificado, Aracaju-SE, 2003 - 2005.

Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão - SE, 2006 - 2011.

Graduação em Farmácia

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Iniciação Científica – Jan, 2007 a Dez, 2010. Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Fisiologia, Laboratório de Estresse. Bolsista Voluntário CNPq.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, FAPESP, 2011 – 2014.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

1. Silva Bispo, Vanderson; Di Mascio, Paolo; Medeiros, Marisa Helena Gennari. **Synthesis, Characterization and simultaneous determination of carnosine-aldehyde adducts by electrospray tandem mass spectrometry assay**. Free Radical Biology & Medicine, v. 65, p. S139-S140, 2013.
2. Santos, João L.A.; Bispo, Vanderson S.; C. Filho, Adriano B.; Pinto, ISABELLA F.D.; Dantas, Lucas S.; Vasconcelos, Daiane F.; Abreu, Fabíula F.; Melo, Danilo A.; Matos, Isaac A. ; Freitas, Florêncio P. ; Gomes, Osmar F. ; Medeiros, Marisa H.G. ; Matos, Humberto R. **Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of coconut water (*Cocos nucifera* L.) and caffeic acid in cell culture**. Anais da Academia Brasileira De Ciências (Impresso), v. 85, p. 1235-1246, 2013.
3. Robinson M. Maia; Carlos W. N. Moura; Bispo, V. S.; Santos, JLA; Rafael S. Santana; Matos, H.R. **Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da**

alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso), v. 20, p. 489-493, 2010.

4. Participação e apresentação de banner no European Society for Free Radical Research Europe Meeting (SFRBM 2014 – Paris, França).
5. Participação e apresentação de banner no American Society for Free Radical Biology and Medicine's Annual Meeting (SFRBM 2013) em San Antonio (Texas, EUA).
6. Participação e apresentação de banner no South American Society for Free Radical Biology and Medicine's Meeting (SFRBM 2011) em Águas de São Pedro (São Paulo, Brasil).

FICHA DE ALUNOS EGRESSOS

Nome: Vanderson da Silva Bispo

Telefone: 11 98598-3596

Endereço: Rua Argentina 359, Bairro Jd. Porto Alegre, Toledo – PR

E-mail: bispovs@gmail.com.....

Home Page:

Twitter:

Blog:

Facebook:

Msn: vanderson-sb@hotmail.com.....

Observações e sugestões para CPG:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....