

**Carlos Eduardo Carvalho Martins**

**Papel da carnosina na progressão do diabetes: um estudo com ratos *knockout Carns1*<sup>-/-</sup>**

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

Programa de Ciências do Sistema  
Musculoesquelético.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original  
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2023**

**CARLOS EDUARDO CARVALHO MARTINS**

**Papel da carnosina na progressão do diabetes: um estudo com ratos *knockout* Carns1<sup>-/-</sup>**

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

*Programa de Pós-Graduação em Ciências do  
Sistema Musculoesquelético.*

*Orientador: Prof. Dr. Guilherme Giannini  
Artioli*

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original  
está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Carlos Eduardo Carvalho

Papel da carnosina na progressão do diabetes : um estudo com ratos knockout Carns1<sup>-/-</sup> / Carlos Eduardo Carvalho Martins. -- São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.  
Orientador: Guilherme Giannini Artioli

Descritores: 1.Carnosina 2.Músculo esquelético  
3.Músculo cardíaco 4.Diabetes mellitus 5.Hiperglicemia  
5.Experimentação animal

USP/FM/DBD-275/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Um homem pode ser destruído, mas não derrotado.*

**Ernest Hemingway**

## AGRADECIMENTO

Gostaria de expressar minha gratidão às instituições que tornaram possível a realização deste trabalho: a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Seu contínuo apoio por meio de bolsas de estudos e auxílio à pesquisa foi fundamental e inspirador. Agradeço por acreditarem em nosso trabalho e por prestigiá-lo.

Minha sincera gratidão se estende a todos os colegas de laboratório, tanto da EEFÉ-USP quanto da FM-USP, com destaque especial para Andressa e Livia, que depositaram sua confiança em meu trabalho e colaboraram de forma tão valiosa.

Agradeço também a todos os mentores que desempenharam um papel essencial em minha jornada científica, dedicando tempo e espaço para meu crescimento como pesquisador. Especialmente, quero expressar minha gratidão ao meu orientador de mestrado, o Prof. Dr. Julio Tirapegui, e ao meu atual orientador de doutorado, o Prof. Dr. Guilherme Artioli.

À Universidade de São Paulo, minha *alma mater*, dedico um profundo sentimento de respeito e gratidão, pois foi aqui que minha jornada científica tomou forma.

Minha família e amigos merecem minha gratidão pela paciência e amor incondicional, mesmo à distância.

Por fim, quero expressar minha profunda gratidão à minha mãe, Tereza Guedes. Seu incrível poder de força e sua fé inabalável foram o alicerce que tornou tudo isso possível. Serei eternamente grato por seus valiosos ensinamentos em todas as áreas da vida. Saudade eterna.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Delineamento experimental .....	30
4.2 Animais .....	30
4.3 Indução do diabetes mellitus.....	32
4.4 Avaliação clínica e laboratorial.....	33
4.5 Teste oral de tolerância à glicose (OGTT).....	33
4.6 Teste de tolerância à insulina (ITT) .....	34
4.7 Avaliação da função cardíaca por ecocardiografia .....	34
4.8 Determinação da função do músculo esquelético in situ por estimulação elétrica.....	35
4.9 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos.....	36
4.10 Determinação da função mitocondrial em extratos do coração .....	36
4.11 Determinação dos parâmetros séricos e teciduais.....	37
4.11.1 Concentrações séricas de glicose e insulina .....	37
4.11.2 Confirmação do genótipo .....	38
4.12 Análise estatística.....	38
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>

<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
---	-----------

## Lista de abreviaturas e siglas

<b>3-MH</b>	3-metil histidina
<b>‘Q’</b>	Débito cardíaco
<b>A`</b>	Onda obtida ao nível do anel mitral pelo Doppler tecidual durante a contração atrial
<b>ACR</b>	Acroleína
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AGE</b>	Produto final de glicação avançada
<b>Akt</b>	Proteína quinase B
<b>ALE</b>	Produto final de lipoxidação avançada
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATPGD1</b>	Proteína 1 contendo domínio ATP-grasp
<b>AUC</b>	Área sob a curva
<b>BPM</b>	Batimentos cardíacos por minuto
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íons de cálcio
<b>Carns1</b>	Carnosina sintase 1
<b>Cas9</b>	Proteína 9 associada ao CRISPR
<b>CN1</b>	Carnosinase sérica
<b>CN2</b>	Carnosinase tecidual
<b>CNDP1</b>	Carnosina dipeptidase 1
<b>CNDP2</b>	Carnosina dipeptidase 2
<b>CRISPR</b>	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas
<b>CTSB</b>	Catepsina B
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E`</b>	Onda obtida pelo Doppler tecidual ao nível do anel valvar mitral no início da diástole
<b>EDL</b>	Extensor longo dos dedos
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético



<b>EF%</b>	Fração de ejeção
<b>EGTA</b>	Ácido etileno glicol-bis(P-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
<b>ERO</b>	Espécie reativa ao oxigênio
<b>FAPESP</b>	Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo
<b>FCCP</b>	Carbonil cianeto-4-fenil-hidrazona
<b>FM</b>	Faculdade de Medicina
<b>FS%</b>	Fração de encurtamento
<b>Gad11</b>	Proteína semelhante a glutamato descarboxilase 1
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>Hb1Ac</b>	Hemoglobina glicada
<b>HCD</b>	Dipeptídeo da classe contendo histidina
<b>HEPES</b>	Ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico
<b>HHE</b>	4-hidroxi-2-hexenal
<b>HNE</b>	4-hidroxi-2-nonenal
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>ITT</b>	Teste de tolerância à insulina
<b>IVCT</b>	Tempo de contração
<b>IVRT</b>	Tempo de relaxamento
<b>IVS;d</b>	Espessura do septo interventricular na diástole
<b>IVS;s</b>	Espessura do septo interventricular na sístole
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kITT</b>	Taxa de decaimento de glicose
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>LV Vol;d</b>	Volume do ventrículo esquerdo na diástole
<b>LV Vol;s</b>	Volume ventricular esquerdo sistólico
<b>LVID;d</b>	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole
<b>LVID;s</b>	Diâmetro do ventrículo esquerdo
<b>LVPW;d</b>	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
<b>LVPW;s</b>	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio

<b>MV A</b>	Onda A
<b>MV Decel</b>	Desaceleração da onda E
<b>MV E - onda E</b>	Onda E
<b>MV ET</b>	Tempo de ejeção
<b>MV IVS E'</b>	Onda S'
<b>NaF</b>	Fluoreto de sódio
<b>NF-kB</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>OGTT</b>	Teste de tolerância oral à glicose
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PEPT</b>	Família de transportadores de oligopeptídeos acoplados a prótons
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PHT</b>	Família de transportadores de oligopeptídeos acoplados a prótons
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinase
<b>RAGE</b>	Receptor para AGE
<b>SERCA</b>	Retículo sarco/endoplasmático Ca <sup>2+</sup> — ATPase
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>TEI</b>	Índice de desempenho cardíaco
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>VE</b>	Ventrículo esquerdo
<b>WT</b>	Tipo selvagem

## Lista de figuras e tabelas

### Figuras

Figura 1 — Representação esquemática da síntese de carnosina a partir dos aminoácidos precursores $\beta$ -alanina e L-histidina.....	17
Figura 2 — Representação esquemática do metabolismo da carnosina.....	19
Figura 3 — Representação esquemática do mecanismo antioxidante da carnosina.....	25
Figura 4 — Desenvolvimento da linhagem de ratos <i>Wistar Carns1<sup>-/-</sup></i> .....	31
Figura 5 — Delineamento experimental.....	33
Figura 6 — Glicemia de jejum após 1 semana de indução da estreptozotocina.....	40
Figura 7 — Perfil glicêmico dos ratos após 4h de privação alimentar.....	41
Figura 8 — Dados do peso corporal em ratos no curso do experimento.....	42
Figura 9 — Consumo de ração entre os ratos no curso do experimento.....	43
Figura 10 — Ingestão de água entre os ratos no curso do experimento.....	44
Figura 11 — Teste oral de tolerância à glicose (OGTT).....	46
Figura 12 — Teste de tolerância à insulina (ITT).....	47
Figura 13 — Teste de insulina de jejum.....	47
Figura 14 — Função mitocondrial cardíaca .....	48
Figura 15 — Função do músculo esquelético por estimulação elétrica.....	50
Figura 16 — Ecocardiografia.....	52

### Tabelas

Tabela 1 — Resultados obtidos dos pesos dos tecidos dos animais.....	45
Tabela 2 — Resultados complementares obtidos da ecocardiografia.....	53

## Resumo

Martins CEC. *Papel da carnosina na progressão do diabetes: um estudo com ratos knockout Carns1<sup>-/-</sup>*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O dipeptídeo carnosina (beta-alanyl-L-histidina) apresenta algumas funções fisiológicas relevantes como tamponante intramuscular, ação antioxidante, capacidade de eliminação de produtos tóxicos da peroxidação lipídica, proteção contra glicação proteica, regulação do manejo e dos transientes de  $Ca^{2+}$  nos músculos estriados. Estudos em animais e em humanos, mostram efeitos positivos da suplementação de L-carnosina no diabetes mellitus, sugerindo uma promissora estratégia não farmacológica com propriedades antidiabéticas. Ainda assim, existe a premente necessidade de investigar se a ausência de carnosina endógena impacta as alterações metabólicas e tecidos em modelo animal de diabetes mellitus. Diante disso, esta tese apresenta um modelo com deleção do gene carnosina sintase 1 e animais induzidos por estreptozotocina (65 mg/kg). Quatro grupos compuseram o experimento: WT-Controle (n=8), KO-Controle (n=8), WT-diabético (n=7), e KO-diabético (n=7). Após oito semanas de experimentação, os animais foram avaliados em relação à glicemia e insulina de jejum, peso corporal, consumo de ração e ingestão de água, tolerância oral à glicose e à insulina, função cardíaca, função contrátil muscular e respiração mitocondrial nos cardiomiócitos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por *unpaired t test* e ANOVA *two-way* e *one-way*, seguido de teste de comparação múltipla de Tukey. Os animais diabéticos, independentes do fator genótipo, comparados aos animais do grupo controle, apresentaram hiperglicemia sustentada, intolerância à glicose, prejuízo no ganho de peso, aumento no consumo de ração e ingestão de água, hipoinsulinemia, menor força de contração muscular tetânica e comprometimento da função sistólica ventricular, porém sem alteração da respiração mitocondrial cardíaca. Animais ausentes de carnosina, independentes do fator diabetes mellitus, tiveram baixa resistência à fadiga comparados aos animais selvagens. Notavelmente, os animais diabéticos ausentes de carnosina apresentaram piora na redução glicêmica comparados aos animais diabéticos selvagens em resposta à dose exógena de insulina. Portanto, existe um efeito sinérgico da carnosina endógena com a dose externa de insulina, embora, a nível estrutural e funcional da musculatura estriada, a ausência de carnosina em animais diabéticos não demonstrou efeito adverso.

Palavras-chave: Carnosina; músculo esquelético; músculo cardíaco; diabetes mellitus; hiperglicemia; experimentação animal.

## Abstract

Martins CEC. *Role of carnosine in diabetes progression: a study with Carns1<sup>-/-</sup> knockout rats*. 2023. [thesis]. São Paulo. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

The carnosine dipeptide (beta-alanyl-L-histidine) presents relevant physiological roles, including intramuscular buffering, antioxidant action, ability to eliminate toxic products of lipid peroxidation, protection against protein glycation, and regulation Ca<sup>2+</sup> transients in striated muscles. Animal and human studies have shown positive effects of L-carnosine supplementation against diabetes mellitus, suggesting a promising non-pharmacological strategy with antidiabetic properties. Nevertheless, there is a demand in understanding whether the absence of endogenous carnosine impacts the metabolic changes and the tissue of animal models of diabetes mellitus. Therefore, this work presents a model with deletion of the carnosine synthase 1 gene and diabetes induction by streptozotocin (65 mg/kg). Four groups comprise the experiment: WT-Control (n=8), KO-Control (n=8), WT-Diabetic (n=7), and KO-Diabetic (n=7). After eight weeks of experiment, the animals were evaluated in terms of fasting glycemia and insulin, body weight, food and water intake, oral glucose and insulin tolerance, heart function, muscle contractile function, and mitochondrial respiration in cardiomyocytes. The outcome data were statistically analyzed by unpaired t-test, by two-way and one-way ANOVA, and by multiple comparison Tukey test. Diabetic animals, regardless of the genotype, compared to animals of the control group, showed constant hyperglycemia, glucose intolerance, impaired weight gain, increased food and water intake, hypoinsulinemia, lower tetanic muscle contraction strength, and impaired ventricular systolic function with no change of the mitochondrial cardiac respiration. Animals lacking carnosine, regardless of the diabetes mellitus factor, showed lower resistance to fatigue compared to wild animals. Noticeably, diabetic animals lacking carnosine showed worse glycemic reduction compared to wild-type diabetic animals in response to the exogenous dose of insulin. Therefore, there is a synergistic effect of endogenous carnosine with the external dose of insulin, although, at the structural and functional level of the striated muscle, the absence of carnosine in diabetic animals did not demonstrate an adverse effect.

Keywords: Carnosine; skeletal muscle; cardiac muscle; diabetes mellitus; hyperglycemia; animal experimentation.

## 1 INTRODUÇÃO

A Carnosina (beta-alanyl-L-histidina) é um dipeptídeo multifuncional que desempenha uma variedade de funções fisiológicas essenciais. Junto com seus análogos metilados, anserina e ofidina/balenina, a carnosina pertence à classe dos dipeptídeos que contêm histidina (HCDs). Sua síntese se dá por intermédio da enzima carnosina sintase (Carns1) a partir da beta-alanina e L-histidina através da conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato inorgânico pela proteína 1 contendo domínio ATP-grasp (ATPGD1) (Drozak et al., 2010).

A carnosina pode ser adquirida de forma exógena por meio da suplementação ou por alimentos de origem animal como carne, frango, porco, peru e peixe; sendo ausente em plantas (Sale et al., 2013). Sua síntese pode ser influenciada por vários fatores, incluindo idade, sexo, tipo de fibra muscular, atividade muscular e dieta (Harris et al., 2012). Encontrada em concentrações significativas nos músculos esqueléticos, músculos cardíacos e em algumas regiões do sistema nervoso, a carnosina desempenha um papel vital em uma série de funções biológicas, com concentrações variando de 10–40 mmol/kg de tecido seco em humanos e 5–20 mmol/kg em ratos (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). Além disso, pequenas quantidades (~0,1 mmol) podem ser encontradas em outros tecidos como rins (Kamal et al., 2009), fígado (Mong, Chao & Yin, 2011), retina (Pfister et al., 2011) e baço (Kamal et al., 2009).

As funções fisiológicas da carnosina são vastas e incluem sua atuação como tamponante intramuscular durante exercícios de alta intensidade (Artioli, Sale & Jones, 2010). Além disso, outras propriedades terapêuticas da carnosina já foram descritas na literatura, em destaque para sua ação antioxidante (Boldyrev, 2012), sua capacidade de eliminação de produtos tóxicos da peroxidação lipídica (da Silva Bispo, Di Mascio & Medeiros, 2014; Bispo et al., 2016; Carvalho et al., 2018), seu efeito protetor contra glicação proteica (Ghodsi & Kheirouri, 2018), e a regulação do manejo e dos transientes de  $Ca^{2+}$  no músculo esquelético (Lamont & Miller, 1992; Dutka & Lamb, 2004; Batrukova & Rubtsov, 1997) e cardíaco (Zaloga, Roberts & Nelson, 1996; Lamont & Miller, 1992).

Acredita-se que a carnosina possa desempenhar um papel importante em situações na qual há exacerbação da produção de espécies reativas, por exemplo, o diabetes mellitus (DM) (Cesak et al., 2023). Essa doença é caracterizada por hiperglicemia crônica que se associa com a formação de produto final de glicação avançada (AGE), produto final de lipoxidacão avançada (ALE), inflamação e geração de espécies reativas, culminando em um quadro de estresse

oxidativo, dano, disfunção e falha de diferentes órgãos; comprometendo principalmente, os sistemas cardiovascular, nervoso e renal (Fowler, 2008), culminando também em distúrbios endócrinos (Krysiak, Rudzki & Okopien, 2012; Martins et al., 2018) e musculares (D'Souza, Al-Sajee & Hawke, 2013; Martins et al., 2017).

Recentemente, a administração exógena de carnosina (em forma de suplementação) tem sido sugerida como uma promissora estratégia não farmacológica com propriedades antidiabéticas em diferentes modelos experimentais (Sauerhöfer et al., 2007; Albrecht et al., 2017; Peters, Zschocke & Schmitt, 2018; Artioli, Painelli & Gualano, 2019), devido, principalmente, ao seu papel antioxidante demonstrado em estudos utilizando modelo animal em quadros de estresse oxidativo (Ozel Turkzu et al., 2010; Kalaz et al., 2014; Xie et al., 2017). Com isso, cresce o interesse nas múltiplas funções biológicas da carnosina endógena criando modelos transgênicos de redução da concentração de carnosina (Sauerhöfer et al., 2007; Everaert et al., 2020; Qiu et al., 2020), redução da síntese de beta-alanina (Mahootchi et al., 2020) e de ausência de carnosina (Wang-Eckhardt et al., 2020; Gonçalves et al., 2021; Wang-Eckhardt et al., 2022).

Estudo realizado pelo nosso grupo mostra que em ratos *knockout* do gene *Carnsl* apresenta prejuízo da função cardíaca causado pela redução da liberação de  $Ca^{2+}$  e lentificação de recaptção de  $Ca^{2+}$ , sem aumento do estresse oxidativo no músculo cardíaco (Gonçalves et al., 2021). Paralelamente, *knockout* de carnosina em camundongos envelhecidos não acarreta prejuízo na contração muscular esquelética, nem no aumento do estresse oxidativo em tecidos conhecidos por elevadas concentrações de carnosina (i.e., músculo esquelético, coração e cérebro) (Wang-Eckhardt et al., 2020; Wang-Eckhardt et al., 2022). Em camundongos *knockout* do gene *Gad11* (glutamato decarboxilase semelhante 1; enzima responsável pela síntese de beta-alanina e posteriormente carnosina através do aspartato), mostram aumento do estresse oxidativo no cérebro através do aumento da glutatona redutase (Mahootchi et al., 2020). Em camundongos caracterizados por uma mutação do gene para nefropatia diabética progressiva (BTBR *Ob/Ob*), a redução de carnosina endógena induzida (superexpressão de carnosinase sérica [CN1]) agrava o desenvolvimento de lesão glomerular avançada e conseqüentemente piora o quadro de nefropatia diabética (Everaert et al., 2020; Qiu et al., 2020). Camundongos com mutação de gene para DM tipo 2 (*db/db*), a redução de carnosina induzida (via superexpressão de CN1) eleva a glicemia, a hemoglobina glicada (HbA1c) e causa perda de peso após 10 semanas de vida, sem afetar a doença renal diabética (Sauerhöfer et al., 2007).

Portanto, torna-se imperativo aprofundar nossa compreensão sobre o papel da carnosina nas complexas interações que regem a patogênese do DM. Nesse contexto, este estudo surge

como uma extensão essencial de uma promissora linha de pesquisa, oferecendo uma oportunidade única para investigar a influência direta da carnosina nas alterações metabólicas e na função da musculatura esquelética e cardíaca em condições de DM.

A singularidade deste estudo reside na utilização de uma linhagem de ratos geneticamente modificados, caracterizada pela ausência constitutiva de carnosina devido à deleção do gene *Carns1*. Essa abordagem experimental permite uma avaliação precisa e fisiologicamente relevante dos efeitos da carnosina em um cenário de DM. Acreditamos firmemente que este modelo constitui a plataforma ideal para testar a hipótese de que a ausência de carnosina agrava as manifestações metabólicas e funcionais nos músculos esqueléticos e cardíacos em presença do DM.

Ao conduzir esta pesquisa, preenchemos uma lacuna crítica no entendimento da carnosina endógena e seu potencial terapêutico, gerando achados sobre sua relevância no contexto do DM. Além disso, a pesquisa oferece informações valiosas para aprofundar nossa compreensão mais aprofundada das alterações metabólicas e da funcionalidade dos tecidos da musculatura estriada relacionadas ao DM. Portanto, a execução deste estudo representa um avanço significativo na busca por terapias inovadoras e na expansão do conhecimento científico no campo da carnosina e suas implicações na saúde metabólica e muscular.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Descoberta, síntese e metabolismo da carnosina

Em 1900, o bioquímico Vladimir Gulewitsch identificou carnosina no músculo esquelético de gado como um composto nitrogenado abundante, que não fazia parte das proteínas convencionais. Em homenagem à sua origem animal, ele a nomeou de "carnosina", derivando da palavra latina "carnis" que significa carne (Gulewitsch & Amiradžibi, 1900). Em 1918, foi caracterizada como um dipeptídeo composto por β-alanina e L-histidina, encontrado naturalmente em músculo esquelético, cérebro e coração. A carnosina é notável por possuir três grupos ionizáveis: o grupo carboxílico (pKa 2,77), o grupo amino da β-alanina (pKa 9,66) e o anel imidazol da histidina (pKa 6,83), com um pKa global da molécula de 8,25 (Tanokura, Tasumi & Miyazawa, 1976). A Figura 1 ilustra a síntese da carnosina a partir dos aminoácidos β-alanina e L-histidina.

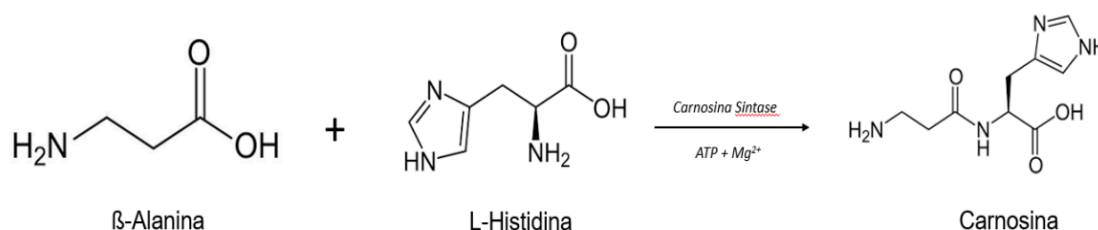


Figura 1 — Representação esquemática da síntese de carnosina a partir dos aminoácidos precursores β-alanina e L-histidina. Adaptado de Creighton et al. (2022).

Em relação ao teor total de carnosina no organismo, concentrações mais elevadas desse dipeptídeo são encontradas no músculo esquelético, cardíaco e no bulbo olfatório do cérebro. Em ratos, a concentração varia de 5 a 20 mmol/kg de músculo seco, enquanto em humanos que não fazem uso de suplementos de carnosina ou beta-alanina, observam-se médias de aproximadamente 17,5 mmol/kg em mulheres e 21,3 mmol/kg em homens (Drozak et al., 2010; Boldyrev et al., 2013). Isso implica que, por exemplo, uma mulher com 60 kg de peso e um homem com 70 kg podem armazenar cerca de 32 g e 45 g de carnosina, respectivamente. Isso sugere uma síntese média diária de aproximadamente 427 mg e 606 mg de carnosina para as mulheres e homens, respectivamente (Mannion et al., 1992; Spelnikov & Harris, 2019). A homeostase da carnosina no músculo esquelético é influenciada pela dieta, exercícios de alta intensidade e estímulos hormonais (Everaert et al., 2013a). Em casos específicos, fisiculturistas

podem apresentar concentrações ainda mais elevadas, chegando a 51 mmol/kg de peso seco, uma vez que a carnosina é mais prevalente em fibras musculares do tipo II, que são conhecidas por sua capacidade de contração rápida e desempenham um papel fundamental no contexto do fisiculturismo, esportes que enfatizam o desenvolvimento muscular através do treinamento de força. (Hill et al., 2007).

Durante muitos anos, a carnosina era amplamente associada apenas aos tecidos musculares esqueléticos, cerebrais e cardíacos (Aldini et al., 2004). No entanto, pesquisas mais recentes têm revelado a presença da carnosina em outros órgãos, como rins (Kamal et al., 2009), fígado (Mong, Chao & Yin, 2011), retina (Pfister et al., 2011) e baço (Kamal et al., 2009), embora em concentrações consideravelmente mais baixas em comparação com os tecidos anteriormente mencionados, aproximadamente na ordem de ~0,1 mmol.

A administração de doses elevadas de carnosina não representa risco significativo para os seres humanos, uma vez que não se acumula no organismo durante o uso prolongado, sendo prontamente degradada pela enzima carnosinase e excretada (Prokopieva et al., 2016). No entanto, é importante mencionar casos raros de hipercarnosinemia, um distúrbio metabólico autossômico recessivo, resultante de uma deficiência de carnosinase. Isso leva ao acúmulo excessivo de carnosina na urina, sangue e tecido nervoso, frequentemente associado a sérios distúrbios mentais e convulsões, como evidenciado em um estudo de caso envolvendo duas crianças (Perry et al., 1967).

Após a ingestão, a carnosina é submetida à hidrólise por duas enzimas diferentes, a carnosinase dipeptidase 1 (CN1), codificada pelo gene carnosina dipeptidase 1 (CNDP1) (Lenney, 1990), e a carnosinase dipeptidase 2 (CN2) presente em tecidos, codificada pelo gene carnosina dipeptidase 2 (CNDP2) (Lenney, 1985). Essa hidrólise converte a carnosina em seus aminoácidos constituintes, beta-alanina e L-histidina (Perry, Hansen & Love, 1968). No entanto, é importante observar que mesmo após esse processo, pequenas quantidades de carnosina ainda permanecem intactas e são liberadas na corrente sanguínea por meio de um transportador de peptídeo basolateral. Enquanto isso, a beta-alanina resultante da hidrólise entra na corrente sanguínea através de um transportador de aminoácidos basolateral, e qualquer carnosina remanescente é prontamente hidrolisada (Perry, Hansen & Love, 1968).

O sistema carnosina em humanos e roedores é amplamente semelhante, com uma exceção notável: nos roedores, a enzima carnosinase está presente nos rins, enquanto nos humanos, ela é encontrada na circulação sanguínea (Teufel et al., 2003). Conseqüentemente, em humanos, a suplementação de carnosina é prontamente degradada pela carnosinase no plasma, resultando em uma meia-vida sérica de carnosina inferior a 5 minutos (Boldyrev, Aldini

& Derave, 2013). Diante desse desafio, pesquisadores têm explorado compostos derivados resistentes à ação da CN1 como uma alternativa promissora. Uma abordagem em estudo envolve o uso de cisteína com uma interação alostérica que regula a posição Cis 102, tornando o dipeptídeo mais resistente à ação da CN1 (Peters et al., 2017; Peters et al., 2018).

No que se refere ao transporte da carnosina, várias proteínas desempenham um papel fundamental na facilitação desse transporte através das membranas celulares. Essas proteínas pertencem a uma família de transportadores de oligopeptídeos acoplados a prótons, que inclui membros como PEPT1, PEPT2, PHT1 e PHT2 (Daniel & Kottra, 2004). Uma distinção importante entre os PEPTs e os PHTs é a capacidade dos últimos de transportar não apenas carnosina, mas também L-histidina e outros peptídeos (Daniel & Kottra, 2004). A Figura 2 ilustra o metabolismo da carnosina.

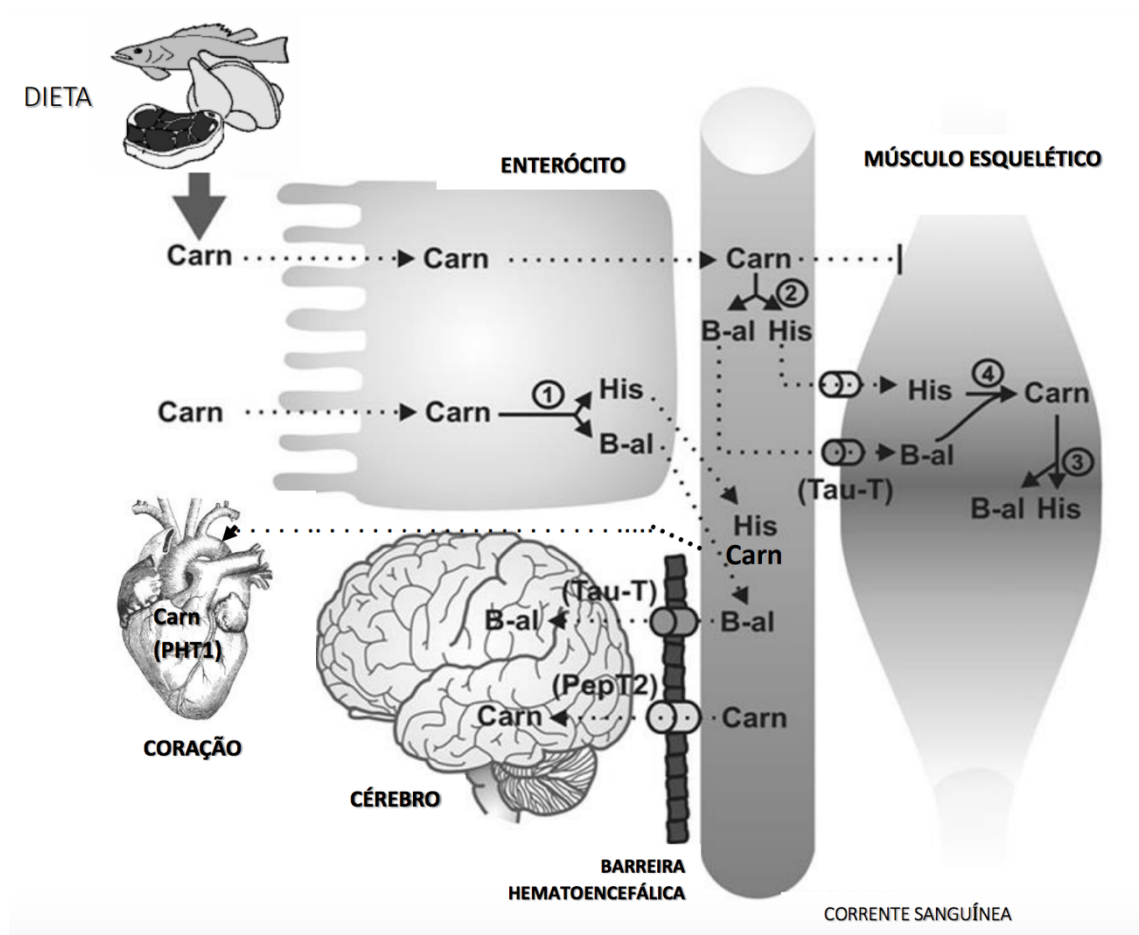


Figura 2 — Representação esquemática do metabolismo da carnosina. Retirada de Gonçalves (2019).

## *2.2 Propriedades fisiológicas da carnosina*

Em um estudo pioneiro na década de 1950, que utilizou preparações de músculos isolados de sapos em estado de fadiga profunda, foi demonstrado que a adição de carnosina é capaz de promover um aumento rápido e eficaz na força de contração muscular e na quantidade de trabalho muscular realizada (Severin, Kirzon & Kaftanova, 1953). Essa descoberta inicial levou muitos estudos a considerar o aumento da força e de trabalho muscular como o papel fisiológico primordial da carnosina no contexto musculoesquelético (Severin et al., 1953; Boldyrev & Petukhov, 1978; Stvolinskii et al., 1992; Kramarenko et al., 2001).

De fato, a carnosina demonstrou ser um tampão intracelular eficaz na prevenção da acidificação muscular (Stvolinskii et al., 1992). Além disso, ela regula o metabolismo energético muscular (Rubtsov, 2001) e tem mostrado melhorar significativamente a performance e a aptidão física (de Andrade Kratz et al., 2017). Esses achados evidenciam a importância da carnosina no contexto da função muscular e do desempenho físico.

A estratégia mais eficaz para aumentar os níveis de carnosina em seres humanos é através da suplementação com beta-alanina. Estudo conduzido por Culbertson et al. (2010), demonstra que doses diárias de 2 a 6 g desse composto podem resultar em aumentos significativos nas concentrações de carnosina no músculo esquelético, com incrementos que variam de 20% a 80%, dependendo da dose administrada. Mais especificamente, doses habituais de 3,2 e 6,4 g de beta-alanina por dia, ao longo de quatro semanas, têm o potencial de elevar as concentrações intramusculares de carnosina em 42% e 64%, respectivamente. Esses resultados ressaltam a eficácia da suplementação de beta-alanina como um meio confiável de aumentar os níveis de carnosina no músculo esquelético.

É importante ressaltar que a beta-alanina é um aminoácido não essencial fundamental da Carnosina, representando cerca de 39,4% de sua composição. Portanto, para alcançar um aumento aproximado de 66% nas concentrações de carnosina intramuscular, seria necessário consumir cerca de 16,2 gramas de L-carnosina, uma quantidade isomolar à ingestão de 6,4 g de beta-alanina, como indicado por Harris et al. (2006).

No estudo conduzido por Hobson et al. (2012), a suplementação de beta-alanina com o objetivo de elevar as concentrações de carnosina intramuscular demonstrou melhorar o desempenho esportivo em atividades de curta duração, entre 1 e 4 minutos, em que a acidose é um fator limitante para a manutenção do desempenho. Vale destacar que, de acordo com Dolan et al. (2019), a suplementação com doses únicas de 4 a 6 g/dia de beta-alanina não apresentou efeitos adversos significativos na saúde humana, sendo observada apenas a ocorrência de

parestesia, bem como um leve aumento na atividade da alanina aminotransferase. O fracionamento da dose se revela uma estratégia eficaz para evitar esse desconforto.

É relevante notar que a beta-alanina também pode ser adquirida por meio da alimentação, sendo encontrada em fontes como carne bovina, frango e peixes, conforme mencionado por Trexler et al. (2015).

Além disso, a carnosina demonstra melhorar o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo estriado, aprimorando a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o exercício físico. Experimentos realizados em ratos e seres humanos (Dutka & Lamb, 2004; Dutka et al., 2012) revelam que, para uma concentração dada de  $\text{Ca}^{2+}$  no sarcoplasma, a força contrátil é maior na presença de carnosina. Isso aponta para um aumento na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  no aparato contrátil, destacando o papel da carnosina na otimização do desempenho muscular durante a contração.

Embora a carnosina possa desempenhar funções em ambos os tecidos (esquelético e cardíaco), parece haver uma maior relevância para a homeostase do músculo cardíaco em condições normais, conforme evidenciado no estudo publicado por Gonçalves et al. (2021). Este estudo revela que a ausência de carnosina resulta em prejuízo da função sistólica, sem afetar as características morfológicas do músculo cardíaco, o peso do órgão ou a força contrátil do músculo esquelético. Além disso, a análise das mitocôndrias cardíacas não mostrou diferença estatisticamente significativa na produção de espécies reativas em comparação com os animais selvagens que apresentavam condições fisiológicas normais. Além disso, a ausência de carnosina nos animais não teve impacto em medidas clínicas, como os níveis de glicemia e o peso (Gonçalves et al., 2021).

Adicionalmente, estudos recentes com animais transgênicos reforçam a hipótese de que a carnosina pode desempenhar outros papéis em tecidos-alvo como evidenciado por Zhao et al. (2020). Neste estudo, o aumento das concentrações de carnosina no miocárdio de camundongos resulta na redução de adutos de proteína, proporcionando proteção contra lesões de isquemia-reperfusão. Em contrapartida, ratos com deficiência de beta-alanina apresentam diminuição nas concentrações de carnosina no bulbo olfatório e no músculo esquelético, o que resulta em um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, conforme demonstrado por Mahootchi et al. (2020). Mais recentemente, Hu et al. (2023) relatam que a suplementação de L-carnosina diminui o estresse oxidativo após a oclusão transitória da artéria cerebral média em camundongos. Esses estudos contribuem para um entendimento mais abrangente das funções da carnosina em diferentes contextos fisiológicos.

No que diz respeito as múltiplas funções da carnosina, estudos demonstram que a mesma é capaz de atenuar parte da produção exacerbada de radicais livres e desempenhar o papel de

um antioxidante natural como relatado por Chasovnikova et al. (1990) e Hipkiss (2009). A carnosina também possui propriedades anti-inflamatórias, oferece proteção neuroprotetora e exibe atividade quelante de metais pesados (Severin, Boldyrev & Dupin, 1984; Vistoli, Carini & Aldini, 2012), reduz a produção exacerbada de AGE e ALE (Reddy et al., 2005; Boldyrev et al., 2013), possui efeitos quimioprotetores contra a genotoxicidade induzida em células da medula óssea de camundongos (Naghshvar et al., 2012). Essa diversidade de funções destaca a relevância da carnosina em várias áreas da pesquisa biológica e médica.

Estudos conduzidos pelo grupo do Aldini et al. (2005) sobre os mecanismos moleculares de proteção sugerem que a carnosina desempenha um papel fundamental na proteção biomolecular contra o estresse oxidativo e a carbonilação (Aldini et al., 2005; Vistoli et al., 2009). O estresse oxidativo é um processo intrincado ligado ao desequilíbrio na homeostase e nos processos redox, afetando componentes essenciais, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (Prokopieva et al., 2016).

A peroxidação lipídica é um processo que envolve a ação de oxidantes como radicais livres, sobre os lipídios, resultando na produção de aldeídos reativos, incluindo o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), o 4-hidroxi-2-hexenal (HHE), a acroleína (ACR) e o malondialdeído (MDA). Esses aldeídos têm a capacidade de reagir com proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), causando lesões estruturais e danos às biomoléculas. Esses aldeídos são frequentemente considerados marcadores de estudos relacionados a doenças associadas ao estresse oxidativo, como o DM (Bispo et al., 2016).

Para combater os efeitos citotóxicos desses aldeídos, o organismo possui principais vias endógenas de detoxificação, incluindo a via da glutatona (GSH) e reações de redução ou oxidação catalisadas por enzimas como a álcool desidrogenase, aldo-ceto redutase e aldeído desidrogenase (Baba et al., 2013). Além disso, a carnosina desempenha um papel significativo na eliminação desses compostos, uma vez que pode reagir com aldeídos- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, incluindo HNE e ACR, formando adutos de aldeídos e, assim, contribuindo para a remoção eficaz dessas substâncias do organismo (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013).

Em experimentos com camundongos sujeitos a condições de envelhecimento celular acelerado, a inclusão de carnosina em suas dietas não resultou em um aumento significativo do tempo de vida máximo, mas aumentou para 70% a taxa de sobrevivência que era de 50%. Isso se deve ao fato de que a carnosina protege contra a glicação de proteínas em fibroblastos de cultura de células animais, permitindo que um maior número de animais alcance idades mais avançadas (Yuneva et al., 1990).

Além disso, em culturas de células humanas, a adição de carnosina demonstrou aumentar a longevidade das células. Isso foi observado pela redução no comprimento dos telômeros de cromossomos, que normalmente diminuem durante a duplicação celular, bem como pela diminuição na metilação do DNA. Essas descobertas sugerem que a carnosina pode ser uma ferramenta valiosa para melhorar a saúde geral de indivíduos expostos a condições de elevado estresse oxidativo (Artioli et al., 2019).

Também foi documentado que a carnosina tem a capacidade de atenuar os efeitos adversos das substâncias tóxicas associadas à hiper-homocisteinemia em estudos realizados com ratos. A homocisteína é reconhecida como um potente iniciador de estresse oxidativo em diversos tecidos. No entanto, o mecanismo molecular subjacente a essa proteção ainda não está completamente esclarecido. Uma teoria especula que a carnosina pode modular a afinidade dos receptores de glutamato para a homocisteína, impedindo assim o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ERO) no processo (Boldyrev, 2009). Essa descoberta ressalta ainda mais o papel multifuncional e versátil da carnosina na proteção contra os danos induzidos pelo estresse oxidativo em diferentes contextos.

### *2.3 Carnosina na condição diabetogênica*

O DM é o termo coletivo para distúrbios metabólicos heterogêneos cujo principal achado é a hiperglicemia crônica, que tem como causa a deficiência na secreção de insulina, sua ação ou ambos (American Diabetes Association, 2020). A persistência da hiperglicemia a longo prazo está fortemente associada a danos, disfunção e falha de diversos órgãos, resultando em complicações que incluem problemas macrovasculares, como doença arterial coronariana, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral, bem como complicações microvasculares, como nefropatia, neuropatia e retinopatia (Fowler, 2008). O DM também está relacionado a distúrbios endócrinos (Krysiak, Rudzki & Okopien, 2012) e musculares (Martins et al., 2017).

É alarmante observar que o número de indivíduos afetados pelo DM tem crescido significativamente ao longo das últimas décadas. De 1980 a 2014, houve um aumento de 108 milhões para 422 milhões de pessoas vivendo com DM. Esta condição representa uma das principais causas de deficiência visual, insuficiência renal, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e amputação de membros inferiores. Entre 2000 e 2019, a taxa de mortalidade relacionada ao DM aumentou em 3%. Em 2014, aproximadamente 8,5% dos adultos com 18 anos ou mais tinham DM (World Health Organization, 2023). Estima-se que quase meio bilhão

de pessoas em todo o mundo estejam convivendo com o DM, e esse número tende a aumentar em 25% até 2030 e 51% até 2045 (Saeedi et al., 2019).

A patogênese de muitas doenças, incluindo o DM, envolve o excesso da produção de radicais livres e distúrbio na funcionalidade do sistema antioxidante. Isso resulta em um acréscimo nas EROs e na instauração do estresse oxidativo. No contexto do DM, a hiperglicemia é diretamente associada à produção de EROs, que, por sua vez, desencadeiam um processo conhecido como glicação de proteínas, também referido como a reação de Maillard (Baynes & Thorpe, 1999). Esta reação ocorre quando açúcares redutores se ligam à porção amino-terminal dos aminoácidos, formando uma base de Schiff instável que, em seguida, pode sofrer rearranjos, resultando na formação de um produto de Amadori mais estável (Arsov et al., 2013). Caso esse composto seja oxidado pelas EROs, pode evoluir irreversivelmente para a formação de AGEs (Halliwell & Gutteridge, 2003).

Os AGEs podem ser originados tanto endogenamente quanto exogenamente (a partir da dieta), contribuindo para o acúmulo de AGEs circulantes (Glomb & Monnier, 1995). Além de sua capacidade de alterar a estrutura e função de proteínas, os AGEs podem interagir com os receptores de membrana e ativar vias de sinalização intracelular. Essas vias levam à geração de EROs e à produção de agentes pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6). Estes agentes pró-inflamatórios, por sua vez, aumentam a expressão do receptor para AGE (RAGE), o que inicia um ciclo vicioso de inflamação celular e tecidual (Xie et al., 2013; Tóbon-Velasco, Cuevas & Torres-Ramos, 2014; Vlassara & Strike, 2011). Além disso, os AGEs estão diretamente associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas, especialmente em situações de hiperglicemia como no DM (Nishizawa, Koyama & Inaba, 2012).

A ativação do sistema angiotensina também pode ser desencadeada pelo aumento da produção de AGEs (Steckelings et al., 2009), resultando em um aumento da pressão arterial sistêmica (Bierhaus et al., 1997). Vale ressaltar que a glicação proteica pode levar à inativação de enzimas, incluindo enzimas do sistema antioxidante (Rellier et al., 1999), causando um desequilíbrio adicional no estado redox, o que resulta em dano celular e tecidual.

A Figura 3 ilustra mecanismos antioxidantes diretos e indiretos da carnosina, destacando seu potencial para interferir positivamente nesse cenário complexo de estresse oxidativo e glicação proteica, com implicações importantes para o tratamento do DM e condições relacionadas.



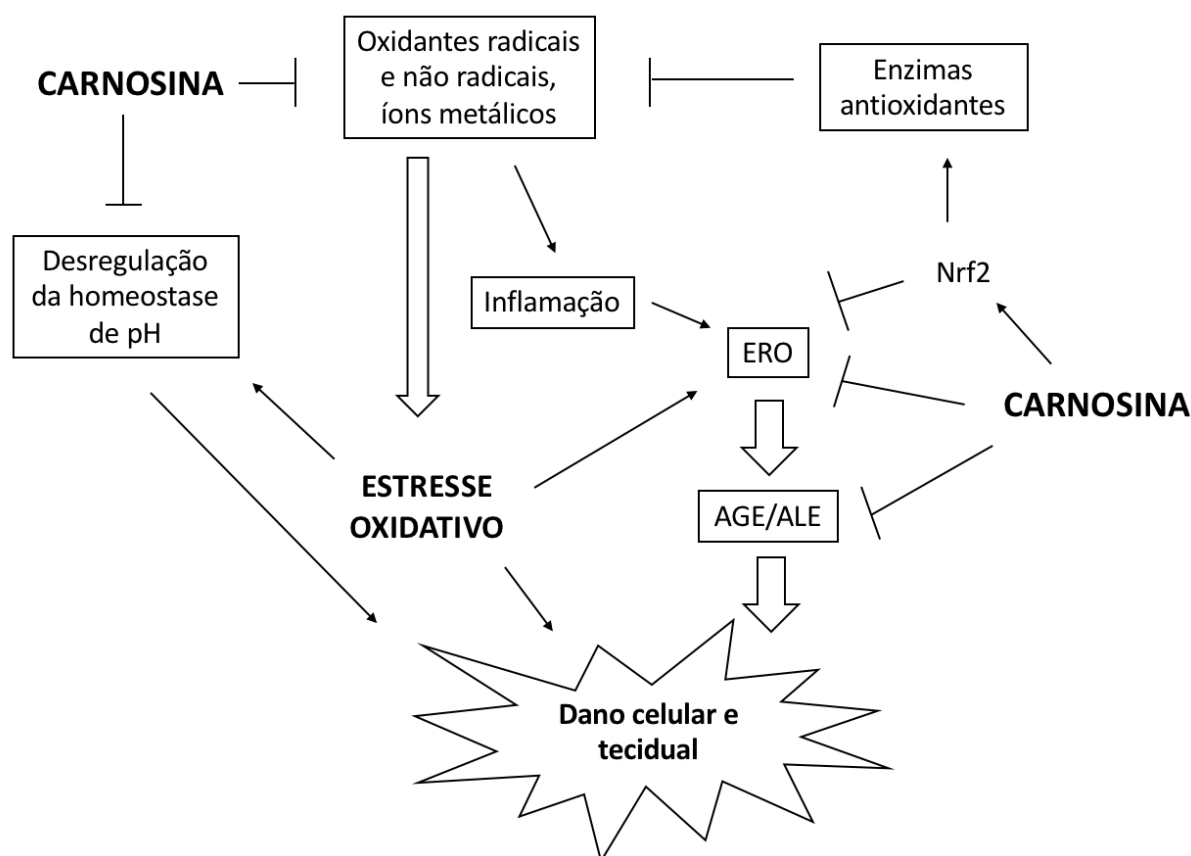


Figura 3 — Representação esquemática do mecanismo antioxidante da carnosina. Adaptado de Aldini et al. (2021) e Solana-Manrique et al. (2022).

No que diz respeito às alterações metabólicas desencadeadas pela hiperglicemia, estudos *in vivo* demonstram que a carnosina exibe propriedades hipoglicemiantes (Soliman, Mohamed & Metwally, 2007). Isso ocorre através da restauração da via da insulina e da supressão do glucagon (Lee et al., 2005). Além disso, estudos apontam que a carnosina pode regular os nervos autonômicos via receptor H3, contribuindo para essa restauração da homeostase glicêmica (Nagai et al., 2003). Em um estudo-piloto, com suplementação de 12 semanas de L-carnosina resultou em um aumento nos níveis de carnosina na urina, melhora na sensibilidade à insulina, secreção de insulina e normalização dos níveis de glicose, comparado a indivíduos com intolerância à glicose que receberam placebo (de Courten et al., 2016).

As melhorias no controle glicêmico, a redução dos níveis de cortisol e a diminuição do estresse oxidativo podem desempenhar um papel mediador nas melhorias do metabolismo lipídico como sugerido em estudos anteriores (Järvi et al., 1999; Soliman, Mohamed & Metwally, 2007). A relação entre carnosina, controle glicêmico e metabolismo lipídico já foi investigada em estudos que analisaram os efeitos da suplementação de L-carnosina sobre o perfil lipídico (Baye et al., 2017).

Além disso, evidências recentes indicam que a carnosina pode contribuir para um melhor controle da homeostase da glicose sanguínea através da sinalização nas células beta (Vahdatpour et al., 2019). Em estudos com animais, observou-se que a superexpressão do gene *CNDPI* pode estar relacionada ao início precoce do DM (Riedl et al., 2007). Essas evidências sugerem uma interconexão complexa entre o controle glicêmico, o metabolismo lipídico e a carnosina, que justifica uma investigação mais aprofundada em pesquisas futuras.

Em seres humanos, estudos sugerem que a expressão aumentada de CN1 pode agravar a progressão do DM. Alguns pacientes podem apresentar um polimorfismo no gene *CNDPI*, associado a uma piora na nefropatia diabética. Assim, o aumento das concentrações de CN1 parece resultar em uma menor quantidade de carnosina disponível no organismo para desempenhar suas funções antiglicante e antioxidante. Em contrapartida, indivíduos que carregam outra variante do mesmo gene *CNDPI* (ou seja, a forma encurtada do gene em vez de sua forma mais longa) apresentam uma redução na atividade da CN1 e, por conseguinte, um menor risco de desenvolver nefropatia diabética (Janssen et al., 2005; Freedman et al., 2007). Além disso, alguns dos efeitos benéficos da carnosina podem ocorrer diretamente nos rins e podem ser independentes de sua ação no controle glicêmico, tanto no DM tipo 1 quanto no DM tipo 2 (Matthews et al., 2021).

Estudos com roedores diabéticos revelam uma redução nas concentrações de carnosina no plasma em comparação com roedores saudáveis (Nagai et al., 2003). O mesmo se aplica ao músculo cardíaco (Liu et al., 2016), retina, fígado e rins (Sauerhöfer et al., 2007). Essa diminuição pode ser explicada pelo estudo de Riedl et al. (2007), que postulou que o estado hiperglicêmico leva a um aumento no conteúdo e na atividade da enzima CN1 (Riedl et al., 2007).

De acordo com a teoria de limpeza (*scavenging theory*), acredita-se que as concentrações de carnosina nos tecidos de indivíduos diabéticos estão diminuídas, possivelmente devido ao consumo de carnosina por AGEs e espécies reativas, cuja produção é exacerbada no DM (Samjoo et al., 2013). Isso sugere um papel antioxidante importante da carnosina. No entanto, a literatura apresenta divergências quanto às concentrações de carnosina em pacientes diabéticos no músculo esquelético. Estudo com ratos diabéticos mostra uma redução nas concentrações de carnosina no músculo diafragma (Buse et al., 1980). Em um estudo conduzido por nosso grupo, foi observada uma diminuição no conteúdo muscular de carnosina em indivíduos com DM tipo 2 com cerca de 60 anos de idade (Gualano et al., 2012). No entanto, outro estudo indica que o conteúdo de carnosina muscular aumenta com o avançar da obesidade e intolerância à glicose em homens de aproximadamente 45 anos (Stegen et al.,

2015) e também em indivíduos com DM tipo 2 de 35 a 55 anos de idade (Srikanthan et al., 2012).

Existem evidências que sugerem que pessoas com DM podem desenvolver cardiomiopatia, um tipo de doença cardíaca não relacionada à doença arterial coronariana ou hipertensão arterial sistêmica. Várias hipóteses sobre a patogênese da cardiomiopatia diabética foram propostas, incluindo disfunção autonômica, distúrbios metabólicos, anormalidades na homeostase iônica, alterações nas proteínas estruturais e fibrose intersticial (Spector, 1998; Tziakas, Chalikias & Kaski, 2005). A hiperglicemia persistente também pode aumentar a glicação de proteínas intersticiais, resultando em rigidez miocárdica e comprometimento da função contrátil (Avendano et al., 1999; Berg et al., 1999). Os mecanismos envolvidos na diminuição da contratilidade miocárdica no diabetes incluem homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  prejudicada, regulação positiva do sistema renina-angiotensina, aumento do estresse oxidativo, bem como alterações no metabolismo do substrato e disfunção mitocondrial (Boudina & Abel, 2007).

O diabetes causa alterações funcionais e estruturais nas mitocôndrias, levando a prejuízos em sua função. Isso foi inicialmente relatado por Kuo et al. (1983), que mostrou uma redução no estado 3 da respiração mitocondrial (respiração ativada por adenosina difosfato [ADP]), um achado que posteriormente foi confirmado em outros estudos (Pierce & Dhalla, 1985; Tanaka, Konno & Kako, 1992). Em camundongos com DM tipo 1 por um período prolongado (18 semanas de DM), as mitocôndrias cardíacas demonstram redução no estado 3 e diminuição nos níveis de GSH, indicando função mitocondrial prejudicada e aumento do estresse oxidativo (Shen et al., 2004). Em camundongos geneticamente modificados para DM tipo 2, foram observados defeitos na função mitocondrial associados à redução na capacidade oxidativa, aumento do desacoplamento mitocondrial e redução na produção de ATP, o que contribui para a disfunção cardíaca (Boudina & Abel, 2007).

A disfunção mitocondrial cardíaca no DM também pode desempenhar um papel no desenvolvimento da cardiomiopatia diabética. Esses defeitos incluem a diminuição na captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tanaka, Konno & Kako, 1992), atribuída em parte a uma maior susceptibilidade à transição de permeabilidade cálcio-dependente (Oliveira et al., 2003). Corroborando com esses achados, a ausência de carnosina endógena também causa disfunção cardíaca, particularmente no ventrículo esquerdo, devido à redução da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e à redução da recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$ , sem aumento na produção de espécies reativas (Goncalves et al., 2021).

Em relação às doenças relacionadas ao músculo esquelético, a etiologia no DM é também multifatorial e pode resultar da hiperglicemia, acidose metabólica, disfunção das

células satélites, inflamação, aumento na produção de espécies reativas e falha na ação da insulina, um importante ativador do sistema ubiquitina proteassoma, levando à atrofia muscular esquelética (Wang et al., 2006; Khalil, 2018).

Nesse contexto, a importância da carnosina é atribuída ao seu papel fundamental na função contrátil muscular (Abe, 2000). Por exemplo, em ratos jovens adultos, a concentração de carnosina, aumentada pela suplementação com beta-alanina, resultou em uma maior força de contração sustentada e em uma diminuição na perda de força durante teste de fadiga (Kaczmarek et al., 2016). Embora estudos com ratos *knockout* de carnosina não tenham demonstrado alterações na função muscular esquelética (Goncalves et al., 2021; Wang-Eckhardt et al., 2020), ainda é necessário investigar se a ausência de carnosina pode afetar o controle da miopatia diabética.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Investigar os efeitos da ausência de carnosina nas condições metabólicas e na função muscular e cardíaca de ratos com diabetes mellitus.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- a) Avaliar o impacto da ausência de carnosina em parâmetros clínicos em modelo experimental de diabetes, avaliado pelas seguintes variáveis:  
Peso corporal, consumo de ração, ingestão de água.
- b) Avaliar o impacto da ausência de carnosina no metabolismo de glicose em modelo experimental de diabetes, avaliado pelas seguintes variáveis:  
Glicose de jejum, teste de tolerância oral a glicose (OGTT), teste de tolerância à insulina (ITT) e insulina de jejum.
- c) Avaliar o impacto da ausência de carnosina na função cardíaca em modelo experimental de diabetes, avaliado pela seguinte variável:  
Ecocardiografia.
- d) Avaliar o impacto da ausência de carnosina na função músculo esquelético em modelo experimental de diabetes, avaliado pela seguinte variável:  
Contratilidade muscular esquelética.
- e) Avaliar o impacto da ausência de carnosina na função mitocondrial cardíaca em modelo experimental de diabetes, avaliado pela seguinte variável:  
Função mitocondrial cardíaca.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

O propósito deste estudo consistiu em investigar o impacto da ausência de carnosina na progressão do diabetes durante um período de 8 semanas, com um enfoque direcionado para os tecidos do músculo esquelético e cardíaco. Além disso, avaliou-se marcadores sanguíneos associados ao controle glicêmico como indicadores do diabetes mellitus. No tocante aos tecidos, o estudo teve o propósito de examinar a função do músculo esquelético e cardíaco no contexto do desenvolvimento da condição diabética.

Foram empregados 30 ratos na pesquisa, dos quais 16 eram do grupo selvagem (WT) (*Carns1<sup>+/+</sup>*) e 14 pertenciam ao grupo *knockout* (KO) (*Carns1<sup>-/-</sup>*). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, após a confirmação de sua condição diabética e de acordo com seu genótipo: ratos selvagens não diabéticos (WT-Controle), ratos *knockout* não diabéticos (KO-Controle), ratos selvagens diabéticos (WT-Diabético) e ratos *knockout* diabéticos (KO-Diabético). A distribuição dos grupos foi realizada de maneira cega e aleatória por um indivíduo não envolvido na condução do experimento.

### 4.2 Animais

Foram selecionados ratos machos da linhagem *Wistar Hannover*, com peso corporal médio de aproximadamente 300 g e idade de 2 meses. Os ratos do grupo KO (*knockout*) foram obtidos a partir de uma colônia desenvolvida em um projeto Jovem Pesquisador financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/11948-8) e mantida no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

A caracterização dos ratos do grupo KO envolve uma deleção de aproximadamente 80 pares de bases no gene *Carns1*, responsável pela síntese endógena de carnosina. Essa mutação foi induzida por meio da técnica CRISPR-Cas9 (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas). O fenótipo resultante é a completa ausência de carnosina e seu análogo metilado, a anserina, nos tecidos musculares esqueléticos e cardíacos, conforme ilustrado na Figura 4.

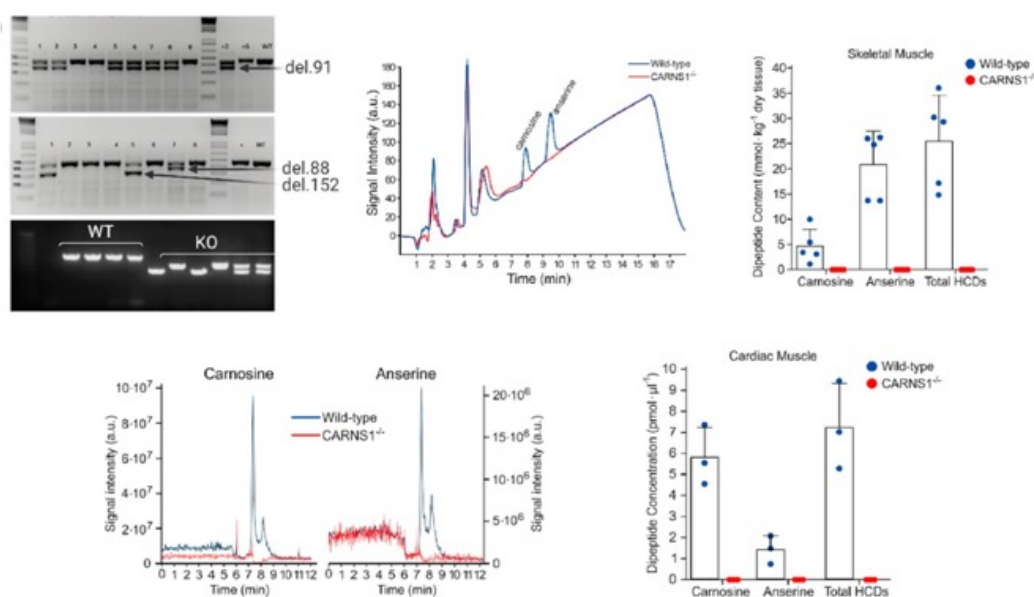


Figura 4 — Desenvolvimento da linhagem de ratos *Wistar Carns1<sup>-/-</sup>* em que não há síntese endógena de carnosina e anserina. A genotipagem por PCR (reação em cadeia da polimerase) confirmou os tamanhos do amplicon (imagens de gel superiores foram realizadas na Transposagen Inc.). A genotipagem interna de ratos criados para homozigose confirmou a transmissão de alelos mutados e ao lado direito da imagem a quantificação de carnosina e seu análogo anserina via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em amostras de músculo esquelético e cardíaco de ratos WT e *Carns1<sup>-/-</sup>*. Os sinais abaixo dos limites de detecção foram considerados zero (adaptado de Gonçalves et al., 2021).

Os animais foram devidamente distribuídos em seus grupos de forma aleatória, devidamente identificados e alojados em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha esterilizada, que foram trocadas diariamente para os animais diabéticos e 3 vezes por semana para os animais não diabéticos, mantendo-se a configuração de 2 animais por gaiola.

Os ratos tiveram acesso a uma dieta padrão e água *ad libitum* e foram mantidos em um ambiente controlado, com um sistema de ventilação adequado, temperatura constante de  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar em torno de  $55 \pm 10\%$ , e um ciclo de iluminação automático invertido claro/escuro de 12/12 horas, com o período escuro iniciando às 06h00.

É importante ressaltar que o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. A aprovação foi obtida tanto na Faculdade de Medicina (nº 1207/2019) quanto na Escola de Educação Física e Esporte (nº 2014/04), ambas da Universidade de São Paulo (USP).

### *4.3 Indução do diabetes mellitus*

O Diabetes Mellitus tipo 1 foi induzido nos ratos de acordo com o protocolo estabelecido por Furman (2015), através de uma única injeção intraperitoneal de STZ (65 mg/kg de peso corporal) (Sigma), após um período de jejum de 6 horas, a qual foi diluída em tampão citrato de sódio 10 mM com pH 4,5. Previamente à administração da substância, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano a 4%, por meio de nebulização. O grupo controle recebeu apenas a injeção do tampão citrato, mantendo todos os outros procedimentos inalterados, a fim de controlar de maneira mais eficaz o estresse em todos os grupos. Após a administração das substâncias, os animais foram reintegrados nas suas respectivas gaiolas, onde foram acompanhados ao longo de um período de 8 semanas, conforme ilustrado na Figura 5.

A inclusão dos animais nos grupos diabéticos foi determinada somente para aqueles que apresentaram glicemia de jejum superior a 150 mg/dl após 1 semana da indução, conforme descrito por Wu & Huan (2008). A análise laboratorial foi realizada mediante a avaliação da glicemia a partir de amostras de sangue capilar, sendo coletadas 20 µL de sangue da ponta da cauda dos animais através de tubos capilares não heparinizados. Posteriormente, as amostras foram dispensadas em microtubos contendo um volume equivalente de solução NaF 2% (fluoreto de sódio). As amostras foram então centrifugadas para a separação do plasma, seguida pela determinação da concentração plasmática de glicose utilizando o kit GLICOSE Liquiform da Labtest. Importante destacar que a análise da glicemia por meio de um sistema enzimático de fotometria (espectrofotômetro) apresenta um desempenho analítico superior e maior estabilidade em comparação com, por exemplo, o uso de glicosímetros. Esse procedimento foi aplicado em todas as análises de glicemia.



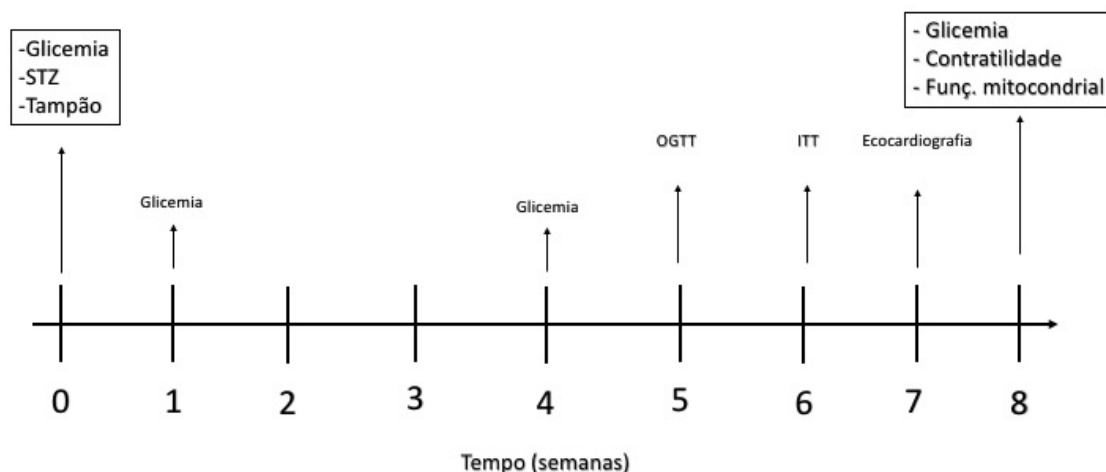


Figura 5 — Delineamento experimental. A partir da injeção de STZ ou tampão Citrato (veículo) até a eutanásia.

#### 4.4 Avaliação clínica e laboratorial

A coleta de dados, incluindo o peso corporal, consumo de ração, ingestão hídrica e glicemia de jejum, foi conduzida em todos os animais antes da indução de STZ, na quarta semana e na oitava semana do experimento.

#### 4.5 Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)

O teste de tolerância à glicose (OGTT) foi conduzido na quinta semana do experimento. Para determinar a curva glicêmica após uma sobrecarga oral de glicose, os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas e receberam uma dose de glicose de 2 g/kg do peso corporal, na forma de uma solução de 25%, administrada por gavagem. A glicemia capilar caudal foi medida por espectrofotometria em diferentes momentos: 0 (baseline), 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose.

O OGTT fornece uma visão abrangente da resposta fisiológica a mudanças na tolerância à glicose, embora não identifique os mecanismos subjacentes. Os resultados do OGTT podem ser expressos por meio de uma representação temporal das medições absolutas de glicose no sangue, bem como a área sob a curva (AUC), conforme descrito por Bowe et al. (2014).

#### *4.6 Teste de tolerância à insulina (ITT)*

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi conduzido na sexta semana do experimento, respeitando um período mínimo de 48 horas após o OGTT, com o objetivo de avaliar a sensibilidade à insulina. A sensibilidade à insulina foi determinada utilizando a constante de decaimento da glicose (kITT) em resposta ao estímulo com insulina, calculada por meio de uma regressão linear do logaritmo neperiano das concentrações de glicose obtidas ao longo do tempo e multiplicada por 100.

O ITT foi o primeiro método desenvolvido para avaliar a sensibilidade à insulina *in vivo*, conforme originalmente proposto por Norgaard & Thaysen (1929). Após um período de jejum de 6 horas, os animais receberam uma dose de insulina (0,75 U/kg do peso corporal) via injeção intraperitoneal. A glicemia capilar caudal foi medida por espectrofotometria nos seguintes intervalos de tempo: 0 (baseline), 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos após a administração de insulina, conforme descrito por Bowe et al. (2014).

#### *4.7 Avaliação da função cardíaca por ecocardiografia*

A avaliação da função cardíaca foi conduzida na sétima semana do experimento utilizando um sistema de ultrassom Vevo 2100 (Visual Sonics, Canadá), com a assistência de um especialista na área. A mensuração para avaliar o desempenho cardíaco envolveu a análise de diversos parâmetros, como geometria, contratilidade, capacidade, fração de ejeção, entre outros. Durante todo o procedimento, os animais permaneceram anestesiados com isoflurano (2%).

Os parâmetros estruturais do coração foram determinados por meio de imagens obtidas nos modos M e bidimensional (modo B). A espessura da parede e o diâmetro da câmara do ventrículo esquerdo foram calculados a partir de medidas lineares, enquanto a fração de ejeção (EF%) foi calculada utilizando o método de Teicholz, conforme descrito por Gao et al. (2011). Além disso, o Doppler tecidual foi utilizado para medir as velocidades sistólica e diastólica do miocárdio no anel da valva mitral, com a aquisição de imagens das quatro câmaras cardíacas (Gao et al., 2011).

#### 4.8 Determinação da função do músculo esquelético *in situ* por estimulação elétrica

As propriedades contráteis do músculo esquelético foram avaliadas no músculo tibial anterior da pata direita, uma escolha devido à predominância de fibras do tipo II e ao elevado teor de carnosina. Para realizar essa avaliação, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (20 mg/100g do peso corporal) por meio de uma injeção intraperitoneal.

A cirurgia consistiu na exposição do nervo ciático através de uma incisão lateral na coxa, ao qual um eletrodo foi conectado. Posteriormente, o tendão do músculo tibial anterior foi exposto e amarrado com sutura de algodão cirúrgica. Após a cirurgia, os ratos foram posicionados em uma plataforma acrílica, onde membros inferiores e superiores foram firmemente imobilizados. Uma sutura de algodão foi conectada a um transdutor de força previamente calibrado, acoplado a um computador, para coletar e analisar os dados de força gerados durante a contração muscular. Os músculos foram estimulados através de um estimulador de pulso quadrado S48 (Grass®) e os dados foram registrados por um sistema de aquisição de dados específico (Biopac Systems, EUA). A análise da força muscular foi conduzida com o software AcqKnowledge, versão 4.4 (Biopac Systems, EUA), e a tensão produzida foi expressa em milinewtons (mN).

No início do experimento, todos os músculos foram ajustados ao seu comprimento ótimo. Para garantir o recrutamento máximo das unidades motoras, foi empregado um protocolo de mínima voltagem, previamente determinado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, capaz de provocar a máxima tensão muscular.

O protocolo de estimulação consistiu em três etapas sucessivas separadas por intervalos de 60 s:

- 1) *Single twitch*: 5 pulsos a 4 V, 1 PPS de *stim rate* com 200 ms de duração.
- 2) *Maximum tetanic force*: 1 pulso a 4 V, 150 PPS de *stim rate*, 0,04 ms de *delay* com 0,1ms de duração.
- 3) Teste de fadiga: 1 pulso 4 V, 20 PPS de *stim rate*, 40 ms de *delay* com 10 ms de duração por 3 minutos.

Após a conclusão do protocolo de estimulação muscular, os animais foram submetidos à eutanásia, e seus órgãos foram imediatamente removidos, pesados, lavados com solução fisiológica e devidamente armazenados. No caso do coração, após sua retirada, o órgão foi

preparado para o ensaio de função mitocondrial, conforme será detalhado na seção 4.10 a seguir.

#### *4.9 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos*

A eutanásia dos animais ocorreu após um período de 4 horas de privação alimentar, enquanto estavam profundamente anestesiados, foi coletada uma amostra de aproximadamente 5 ml de sangue, a qual foi armazenada em um tubo contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para separação do plasma. O plasma foi obtido por meio de centrifugação a 1000 g, a uma temperatura de 4° C, por um período de 15 minutos, com o intuito de permitir análises subsequentes da insulina.

Para minimizar as variações no período de jejum entre os animais, a ordem de eutanásia dos animais foi rotativa, com um animal de cada grupo sendo eutanasiado sequencialmente. Após a excisão dos órgãos, nomeadamente o músculo tibial anterior, o músculo sóleo, o rim, o fígado e o coração, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a uma temperatura de -80 °C. Os músculos esqueléticos tibial anterior e sóleo foram selecionados devido à distinção em relação ao tipo de fibra muscular.

O peso dos tecidos foi apresentado em sua forma absoluta, e o peso relativo dos órgãos foi calculado em percentagem (por grama a cada 100g do peso corporal do animal), uma vez que é observado que os ratos diabéticos tendem a pesar menos.

#### *4.10 Determinação da função mitocondrial em extratos do coração*

Após a eutanásia dos animais, os corações foram removidos e os cardiomiócitos foram isolados seguindo o procedimento descrito por Cancherini, Queliconi & Kowaltowski (2007). Posteriormente, o consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) foi avaliado, conforme descrito por Ferreira et al. (2019).

O tecido cardíaco foi colocado em um tampão de isolamento contendo sacarose (300 mM), HEPES (10 mM), EGTA (2 mM), pH 7,2 e triturado na presença de 0,1 mg/mL de protease do tipo I (pâncreas bovino), a fim de liberar as mitocôndrias das fibras cardíacas. Após esse processo, a suspensão foi lavada no mesmo tampão, com adição de 0,1 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA), e homogeneizada em um moedor de tecido (potter) de 40 ml. O

sobrenadante resultante foi centrifugado a 9500 g por 5 minutos a uma temperatura de 4 °C e, em seguida, a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C, repetido duas vezes.

Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi posteriormente diluída em um tampão de KCl contendo sacarose (125 mM), KCl (65 mM), Hepes (10 mM), fosfato inorgânico (2 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), EGTA (100 mM) e BSA (0,01%), pH 7,2. Substratos exógenos que desempenham funções respiratórias fisiológicas no tecido cardíaco, como succinato, malato e glutamato (2 mM de cada), foram adicionados à amostra com agitação contínua a 37 °C.

O consumo de O<sub>2</sub> foi monitorado utilizando um eletrodo tipo Clark em conjunto com uma interface de computador (OROBOROS, Oxygraph-2k). A avaliação do consumo de O<sub>2</sub> incluiu a respiração mitocondrial no Estado 2 (na presença de substratos exógenos), a respiração máxima no Estado 3 (sob estimulação com ADP), o Estado 4 (sob estimulação de oligomicina) e a avaliação das mitocôndrias desacopladas (sob presença de FCCP).

#### *4.11 Determinação dos parâmetros séricos e teciduais*

##### *4.11.1 Concentrações séricas de glicose e insulina*

A glicemia em jejum, após um período de 4 horas de privação alimentar, foi avaliada por meio da coleta de amostras de sangue. Para coletar as amostras, foram utilizados tubos capilares não heparinizados, dos quais foram retirados 20 µl de sangue da ponta da cauda dos animais. Estas amostras foram então imediatamente transferidas para microtubos contendo o mesmo volume de solução de NaF 2%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas para separar o plasma, o qual foi analisado por espectrofotometria para determinar a concentração plasmática de glicose. Esse procedimento foi conduzido utilizando o kit GLICOSE Liquiform da Labtest.

A concentração plasmática de insulina foi determinada através de um microensaio que utilizou um método enzimático-colorimétrico. Para esta análise, foi empregado o kit Rat INS (Insulin) ELISA Kit da FineTest.

#### 4.11.2 Confirmação do genótipo

Usando a técnica de *salting-out*, o DNA genômico foi isolado dos cliques de orelha dos animais e submetido a PCR (tampão 5x, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM dNTPmix, 10 μM Primer (direto e reverso), DNA 0,5 μL, *Go Taq* DNA Polimerase (5u/μL) e água ultrapura. Os seguintes parâmetros de ciclagem térmica foram usados: 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, seguidos de 59 °C por 45 se 72 °C por 1 min e 5 °C por 2 min. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose 2% e visualizados em transiluminador UV (Gonçalves et al., 2021).

#### 4.12 Análise estatística

Os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão (DP) e submetidos ao teste de normalidade da amostra (Shapiro-Wilk). Uma vez confirmada a normalidade dos dados, para avaliar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foram utilizados o *unpaired t test*, bem como a análise de variância (ANOVA) de um fator (*one-way*) e de dois fatores (*two-way*). Posteriormente, foi aplicado o teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas, especificamente entre os grupos WT-Controle x KO-Controle, WT-Controle x WT-Diabético, KO-Controle x KO-Diabético e WT-Diabético x KO-Diabético.

Para as variáveis que foram avaliadas em múltiplos momentos no tempo, foi empregada a análise de modelos mistos (*mixed-effects*). O nível de significância estatística adotado foi de  $P < 0,05$ . O software utilizado para análise estatística foi o Prisma 8.0, versão Windows.

## 5 RESULTADOS

Inicialmente foram 32 animais para compor os 4 grupos; um dos animais não desenvolveu hiperglicemia e outro veio a óbito durante a primeira semana da indução de STZ. Essas exclusões resultaram na continuidade do experimento com um total de 30 animais, que foram acompanhados ao longo de 8 semanas após a indução. Conforme a literatura de referência de Wang-Fischer & Garyantes (2018), sugere que a mortalidade esperada de um animal diabético seja de 3%, podendo chegar a 82,8% com tratamentos mais prolongados, por exemplo, após 12 semanas de indução.

Os 30 ratos remanescentes foram distribuídos em quatro grupos da seguinte maneira: 8 ratos no grupo WT-Controle, 8 no grupo KO-Controle, 7 no grupo WT-Diabético e 7 no grupo KO-Diabético. Para confirmar a ausência do gene *Carns1* nos animais dos grupos *knockout*, foi realizado um teste de genotipagem através de amostras de tecido obtidas das orelhas dos animais como detalhadamente descrito na seção 4.11.2 dos métodos. Os resultados confirmaram a ausência de carnosina nos animais *knockout* ( $Carns1^{-/-}$ ), permitindo assim a continuidade das análises de dados.

Na Figura 6 é possível ver a confirmação do estado hiperglicêmico dos animais DM comparado aos animais do grupo controle. A glicemia após 1 semana de indução e com 4 horas de privação alimentar mostrou-se 263,58% maior nos animais diabéticos ( $266,9 \text{ mg/dl} \pm 48,23$ ) comparado à glicemia dos animais controle ( $73,41 \text{ mg/dl} \pm 16,35$ ) ( $P < 0,0001$ ;  $ES = 0,89$ ;  $F[13, 15] = 8,70$ ; diferença de  $193,5 \text{ mg/dl}$  com IC 95% de 167,3 a 219,7) (Figura 6).

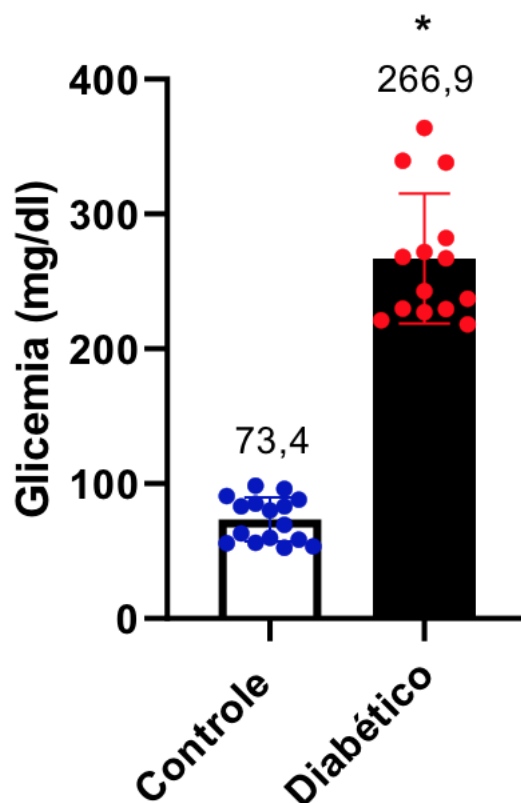


Figura 6 — Glicemia após 1 semana de indução da estreptozotocina. Os valores expressos como média  $\pm$  DP comparados por *Unpaired t test*. Os pontos representam valores individuais. Grupo Diabético (n=14) vs. grupo Controle (n=16). \*  $P < 0,0001$ .

Antes da administração de STZ, não havia diferença nas glicemias dos animais (Figura 7). Após a confirmação da hiperglicemia, a análise de modelos mistos confirmou um efeito significativo de tratamento nas glicemias dos animais diabéticos (efeito principal de tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [1, 26] = 510,9$ ), mostrando glicemia elevada e persistente ao longo do tempo (interação tempo\*tratamento ( $P < 0,0001$ ;  $F [3, 77] = 126,4$ ). Não houve efeito de genótipo ( $P = 0,802$ ;  $F [1, 26] = 0,06$ ), nem interação tempo x genótipo (interação tempo\*genótipo  $P = 0,832$ ;  $F [3, 77] = 0,29$ ) (Figura 7).

A glicemia final do grupo WT-Diabético foi de  $300,5 \pm 37,86$  mg/dl, ou seja, 311,64% maior que a glicemia final dos animais do grupo WT-Controle,  $73,0 \pm 12,29$  mg/dl ( $P < 0,0001$ ; diferença de 227,5 mg/dl com IC 95% de 155,5 a 299,7) (Figura 7).



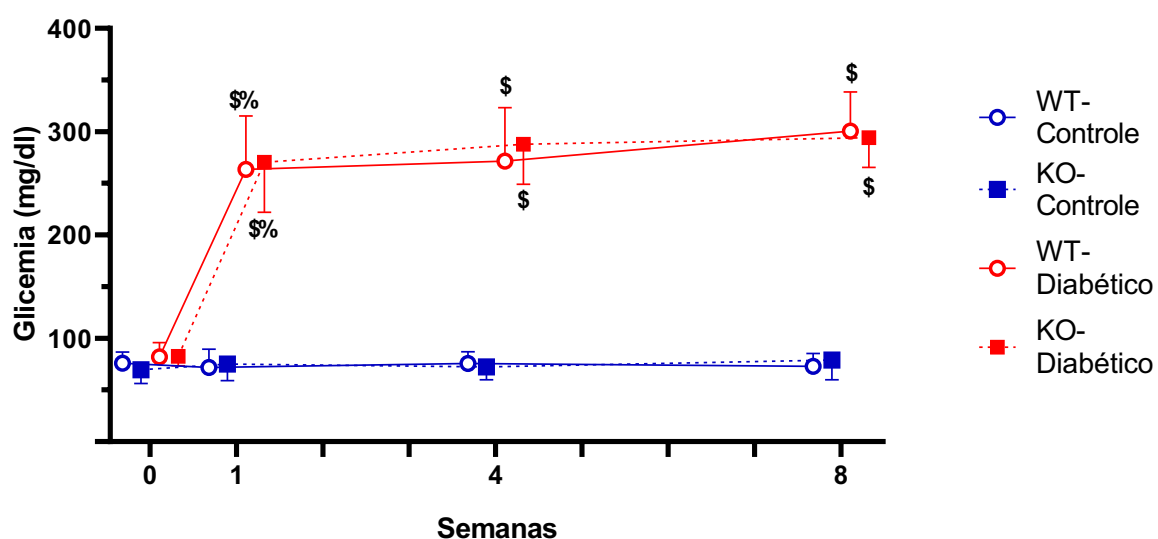


Figura 7 — Perfil glicêmico dos ratos após 4h de privação alimentar. Os valores expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 7-8$ ) comparados por *Mixed-effects* com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo e no mesmo ponto de tempo; %: diferente do tempo anterior do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

O peso corporal entre os grupos de ratos era similar antes da indução experimental de DM (Figura 8). A análise de modelos mistos mostrou menor ganho de peso nos animais diabéticos e *knockout* com relação às semanas (interação tempo\*tratamento\*genótipo  $P = 0,046$ ;  $F [2, 52] = 3,25$ ) (Figura 8). O ganho de peso foi menor nos animais diabéticos (efeito principal de tratamento  $P = 0,001$ ;  $F [1, 26] = 13$ ) e com interação tempo x tratamento (interação tempo\*tratamento ( $P < 0,0001$ ;  $F [2, 52] = 98,8$ ) (Figura 8).

Após o teste estatístico *post-hoc*, somente o grupo WT-Controle continuou a ganhar peso, comparado com tempo anterior, significativamente no curso do experimento. Ao final do experimento, o grupo KO-Controle apresentou o peso de  $397,0 \pm 44,47$  g, 34,43% maior que o grupo KO-Diabético,  $295,3 \pm 35,2$  g ( $P = 0,0094$ ; diferença de 101,7 g com IC 95% de 20,8 a 182,4) (Figura 8).

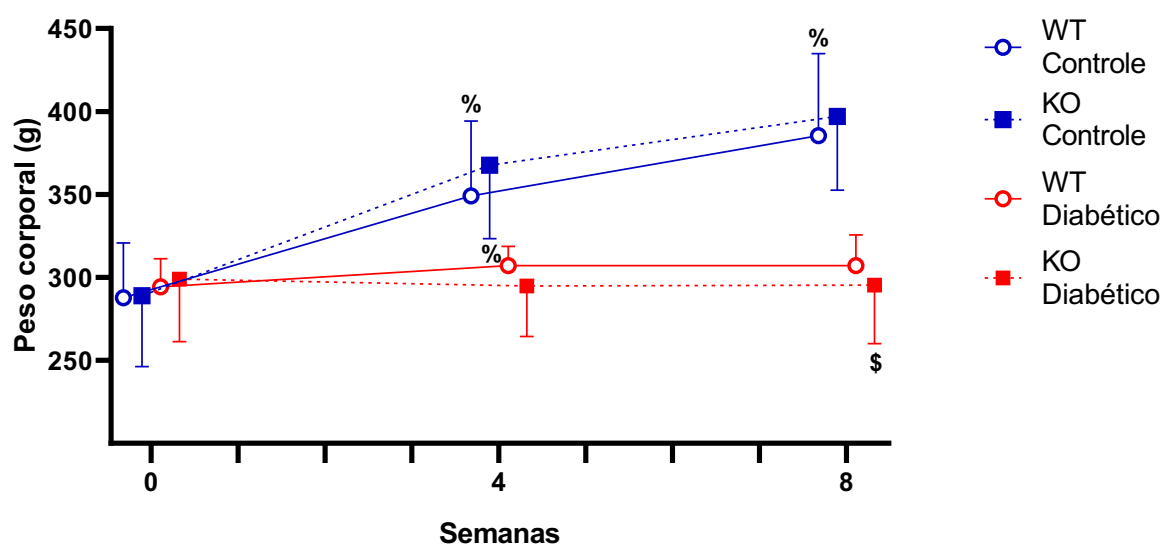


Figura 8 — Dados do peso corporal em ratos no curso do experimento. Barras representam média  $\pm$  DP ( $n = 7-8$  por grupo) comparados por *Mixed-effects* com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo e no mesmo ponto de tempo; %: diferente do tempo anterior do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

O consumo de ração entre os grupos de ratos era similar antes da indução experimental de DM (Figura 9). Houve um maior consumo de ração nos animais diabéticos (efeito principal de tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [1, 26] = 61,9$ ), efeito também com relação às semanas (interação tempo\*tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [2, 50] = 35,6$ ), e nos animais *knockout*, porém menos significativo [interação tempo\*genótipo ( $P = 0,012$ ;  $F [2, 50] = 4,75$ ) (Figura 9).

Apesar da hiperfagia observada nos animais diabéticos, este efeito não resultou no ganho de peso corporal como mostra o gráfico anterior (Figura 8). De acordo com teste estatístico *post-hoc*, no final do experimento, o grupo KO-Diabético teve um consumo de  $51,3 \pm 7,97$  g/dia, 14,50% maior que o consumo do grupo WT-Diabético,  $44,8 \pm 7,4$  g/dia, porém não estatisticamente significativo ( $P = 0,89$ ; diferença de 6,47 g com IC 95% de -9,93 a 22,8) (Figura 9).

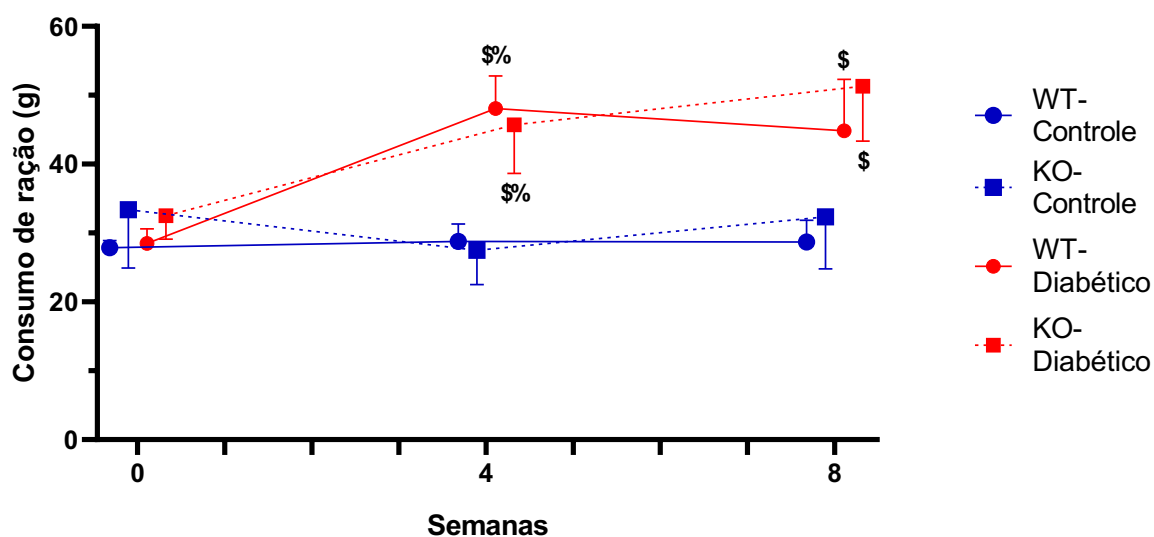


Figura 9 — Consumo de ração entre os ratos no curso do experimento. O consumo de ração foi considerado pela divisão de consumo em 24h em cada gaiola contendo de dois a quatro ratos de um mesmo grupo. Barras representam média  $\pm$  DP ( $n = 7-8$  por grupo) comparados por *Mixed-effects* com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo e no mesmo ponto de tempo; %: diferente do tempo anterior do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

A ingestão de água entre os grupos de ratos era similar antes da indução experimental de DM (Figura 10). De acordo com a análise de modelos mistos, os animais diabéticos e *knockout* apresentaram elevada ingestão de água (interação tratamento\*genótipo  $P = 0,020$ ;  $F [1, 78] = 5,59$ ). Houve maior ingestão de água em animais diabéticos com relação às semanas (interação tempo\*tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [2, 78] = 0,925$ ) e efeito principal de tratamento ( $P < 0,0001$ ;  $F [1, 78] = 1367$ ) (Figura 10).

Houve também maior ingestão de água em animais *knockout* (efeito principal de genótipo  $P = 0,035$ ;  $F [1, 78] = 4,57$ ), mas não associada a variável tempo (interação tempo\*genótipo  $P = 0,40$ ;  $F [2, 78] = 0,92$ ) (Figura 10).

De acordo com teste estatístico *post-hoc*, no final do experimento, o grupo KO-Diabético teve ingestão de água de  $192,2 \pm 22,18$  ml/dia, 11,93% maior que a ingestão do grupo WT-Diabético de  $171,7 \pm 21,99$  ml/dia, porém não estatisticamente significativa ( $P = 0,820$ ; diferença de 20,5 ml com IC 95% de -26,3 a 67,4) (Figura 10).

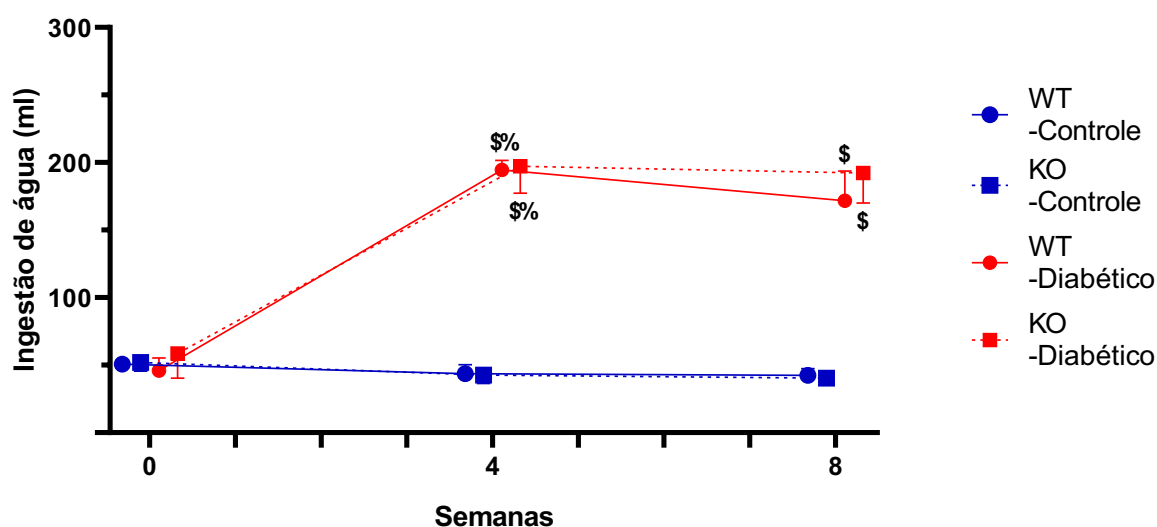


Figura 10 — Ingestão de água entre os ratos no curso do experimento. A ingestão de água foi considerada pela divisão de consumo em 24h em gaiola contendo de dois a quatro ratos de um mesmo grupo. Barras representam média  $\pm$  DP ( $n = 7-8$ ) comparados por *Mixed-effects* com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo e no mesmo ponto de tempo; %: diferente do tempo anterior do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

A Tabela 1 representa os valores médios dos pesos dos tecidos tibial anterior direito, sóleo direito, coração, fígado e rim direito. Através da análise por ANOVA *two-way*, comparado com os animais controle, os animais diabéticos apresentaram peso absoluto 31,06% menor (efeito principal de tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [1, 26]=46,13$ ) e peso relativo 9,04% menor (efeito principal de tratamento  $P=0,016$ ;  $F [1,26]=6,53$ ) do músculo tibial anterior direito. O peso absoluto do sóleo dos animais diabéticos foi 23,03% menor (efeito principal de tratamento  $P=0,001$ ;  $F [1,26]=12,58$ ), sem diferença estatística quando relativizado pelo peso corporal ( $P=0,723$ ;  $F [1, 26]=0,128$ ) (Tabela 1).

Ainda na Tabela 1, o peso relativo do coração foi 12,5% maior nos animais diabéticos (efeito principal de tratamento  $P < 0,026$ ;  $F [1, 25]=5,57$ ). O peso relativo do fígado foi 36,06% maior nos animais diabéticos (efeito principal de tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [1, 26]=101,4$ ). O peso absoluto (efeito principal de tratamento  $P=0,001$ ;  $F [1, 26]=13,16$ ) e relativo (efeito principal de tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [1, 26]=114,3$ ) do rim foi 17,78% e 55,09% maior nos animais diabéticos, respectivamente. Em suma, o tratamento (diabetes), unicamente, foi danoso, com relação ao peso de todos os tecidos analisados (Tabela 1). Análises do teste estatístico *post-hoc*, enfatizando o efeito de tratamento, são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 — Resultados obtidos dos pesos dos tecidos dos animais.

	WT- Controle	KO- Controle	WT- Diabético	KO- Diabético
Tibial anterior (g)	0,82±0,13	0,82±0,09	0,59±0,09\$	0,54±0,09\$
Tibial anterior (g/100g)	0,21±0,02	0,20±0,01	0,19±0,02	0,18±0,01
Sóleo (g)	0,17±0,03	0,20±0,04	0,14±0,01	0,15±0,03\$
Sóleo (g/100g)	0,04±0,007	0,05±0,009	0,04±0,008	0,05±0,005
Coração (g)	1,22±0,12	1,27±0,11	1,07±0,13	1,08±0,13\$
Coração (g/100g)	0,33±0,06	0,32±0,02	0,35±0,05	0,38±0,03
Fígado (g)	11,2±1,75	11,3±1,68	11,7±0,68	11,4±1,62
Fígado (g/100g)	2,9±0,35	2,8±0,17	3,8±0,25\$	3,9±0,30\$
Rim (g)	1,45±0,14	1,53±0,14	1,76±0,24\$	1,76±0,25
Rim (g/100g)	0,37±0,04	0,38±0,02	0,58±0,09\$	0,60±0,03\$

Valores expressos como média ± DP (n=7–8 por grupo) comparados por ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo (P<0,05).

A Figura 11 mostra a relação do teste de tolerância oral a glicose (OGTT). Os animais diabéticos mostraram pior habilidade do corpo em metabolizar glicose (efeito principal de tratamento P<0,0001 F [1, 26]=383,1). A glicemia aumentou ao longo do tempo de todos os grupos (efeito principal de tempo P<0,0001; F [2,82, 73,42]=49,43), no entanto, os animais diabéticos foram os mais afetados estatisticamente ao longo do tempo (interação tempo\*tratamento P<0,0001; F [6, 156]=29.89), sem diferença estatística com relação ao genótipo ao longo do tempo (interação tempo\*genótipo P=0,728; F [6, 156]=0,60) ou independente do tempo (efeito principal de genótipo P=0,849; F [1, 26]=0,03) (Figura 11).

Quando analisado a área sob a curva (AUC), pode-se ver claramente uma diferença estatística significativa com relação ao tratamento, no qual o grupo WT-Diabético teve, 315% maior concentração de glicose/min comparado ao grupo WT-Controle (P<0,0001; diferença de 33695 mg/dl/min com IC 95% de 31254 a 36136) (Figura 11).

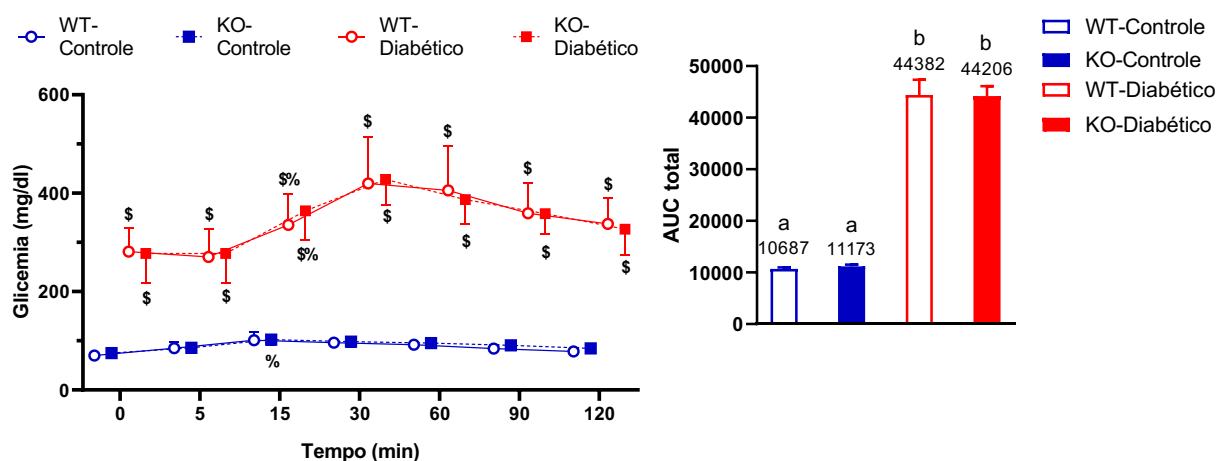


Figura 11 — Teste oral de tolerância à glicose (OGTT). Uma carga de glicose (2g/kg de peso corporal) foi injetada através de gavagem oral. O gráfico mostra a curva glicêmica e a inserção ao lado, a área sob a curva (AUC). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, ( $n = 6-8$  por grupo) comparados por *mixed-effects* quando houve tempo e *one-way* para AUC com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo e no mesmo ponto de tempo; %: diferente do tempo anterior do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,0001$ ).

A resposta à insulina exógena foi avaliada pelo teste de tolerância à insulina (ITT) (Figura 12), que demonstrou maior redução na glicemia x tempo nos animais diabéticos selvagens (interação tempo\*tratamento\*genótipo  $P = 0,0001$ ;  $F [6, 156] = 4,97$ ). O maior declínio da glicemia ao longo do tempo foi nos animais diabéticos (interação tempo\*tratamento  $P < 0,0001$ ;  $F [6, 156] = 21,99$ ) e, com efeito principal de tratamento ( $P < 0,0001$ ;  $F [1, 26] = 69,33$ ) (Figura 12).

Os animais selvagens também apresentaram declínio com relação ao tempo (interação tempo\*genótipo  $P = 0,0003$ ;  $F [6, 156] = 4,45$ ), sem efeito principal de genótipo ( $P = 0,822$ ;  $F [1, 26] = 0,051$ ) (Figura 12).

Quando avaliados pela taxa de decaimento de glicose (kITT) pelo teste estatístico *post-hoc*, a taxa do grupo WT-Diabético foi de 51,6% maior comparado ao grupo KO-Diabético ( $P = 0,018$ ; diferença de 0,34%/min com IC 95% de 0,04 a 0,65), isto é, os ratos diabéticos ausentes de carnosina (KO-Diabético) apresentaram piora na redução glicêmica que os animais diabéticos selvagens (WT-Diabético). A saber, esses dados sugerem que a carnosina endógena (presente nos ratos do grupo WT-Diabético) pode ter aumentado a sensibilidade à ação da insulina (Figura 12).

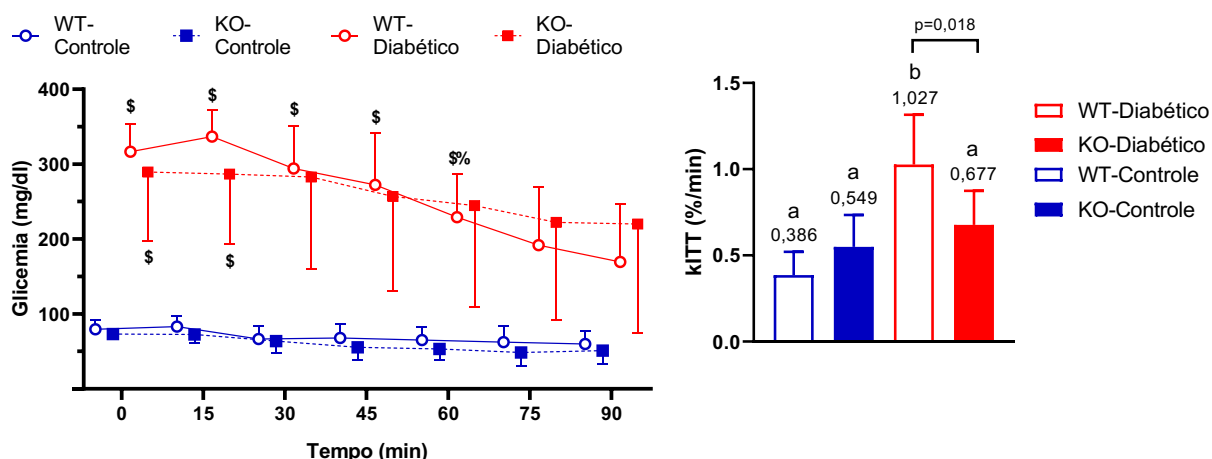


Figura 12 — Teste de tolerância à insulina (ITT). Uma dose de insulina (0,75U/kg de peso corporal) foi injetado por via intraperitoneal. O gráfico mostra a curva glicêmica e a inserção ao lado, a taxa de decaimento de glicose (kITT). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, (n = 6–8 por grupo) comparados por *mixed-effects* quando houve tempo e *one-way* para kITT com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo e no mesmo ponto de tempo; %: diferente do tempo anterior do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ). Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao conteúdo de insulina no plasma, mostrado na Figura 13, os animais diabéticos apresentaram concentrações de insulina discretamente menores, 15,85% menor quando comparado aos animais controle (efeito principal de tratamento  $P = 0,039$ ;  $F [1, 24] = 4,76$ ), caracterizando o modelo de DM tipo 1. Sem diferença estatística quando analisado os grupos pelo teste estatístico *post-hoc*.

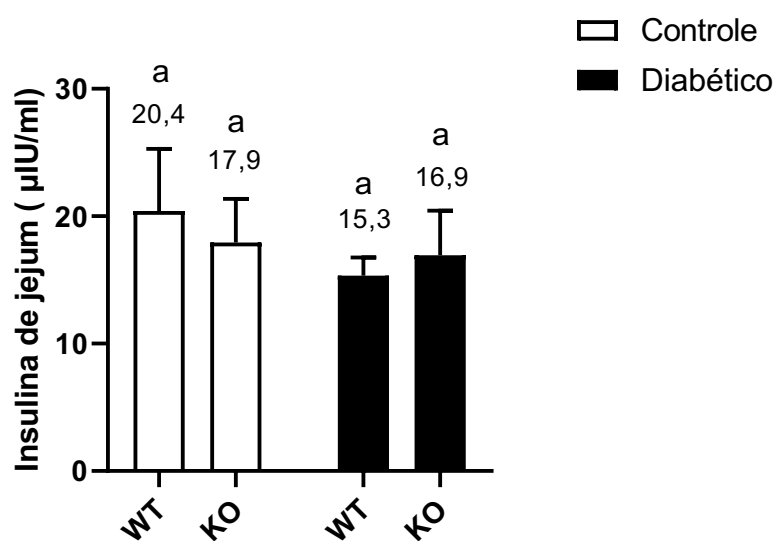


Figura 13 — Teste de insulina de jejum. Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, (n = 6–8 por grupo) comparados por ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey: médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

A Figura 14 mostra a análise da função mitocondrial cardíaca com objetivo de melhor quantificar os parâmetros funcionais da organela através do consumo de O<sub>2</sub>. A princípio, a funcionalidade da organela tendeu a se mostrar alterada nos animais diabéticos, embora não estatisticamente significativa e, como pode-se observar, claramente a carnosina não mostrou alteração na funcionalidade mitocondrial cardíaca.

No estado 2 (Figura 14A), os animais diabéticos apresentaram 13,44% menor respiração mitocondrial na presença de substratos exógenos (efeito principal de tratamento P=0,10; F [1, 19]=2,92). No estado 3 (Figura 14B), os animais diabéticos apresentaram 19,49% menor respiração na presença de ADP (efeito principal de tratamento P=0,074; F [1, 26]=3,46). O estado 4 (Figura 14C) mostra, que os animais diabéticos tiveram 22,20% menor respiração na presença de oligomicina (P=0,083; F [1, 26]=3,25). E nas mitocôndrias desacopladas (Figura 14D) dos animais diabéticos, tiveram 20,68% menor respiração na presença de FCCP (P=0,089; F [1, 26]=3,12). Sem diferença estatística quando analisado os grupos pelo teste estatístico *post-hoc*.

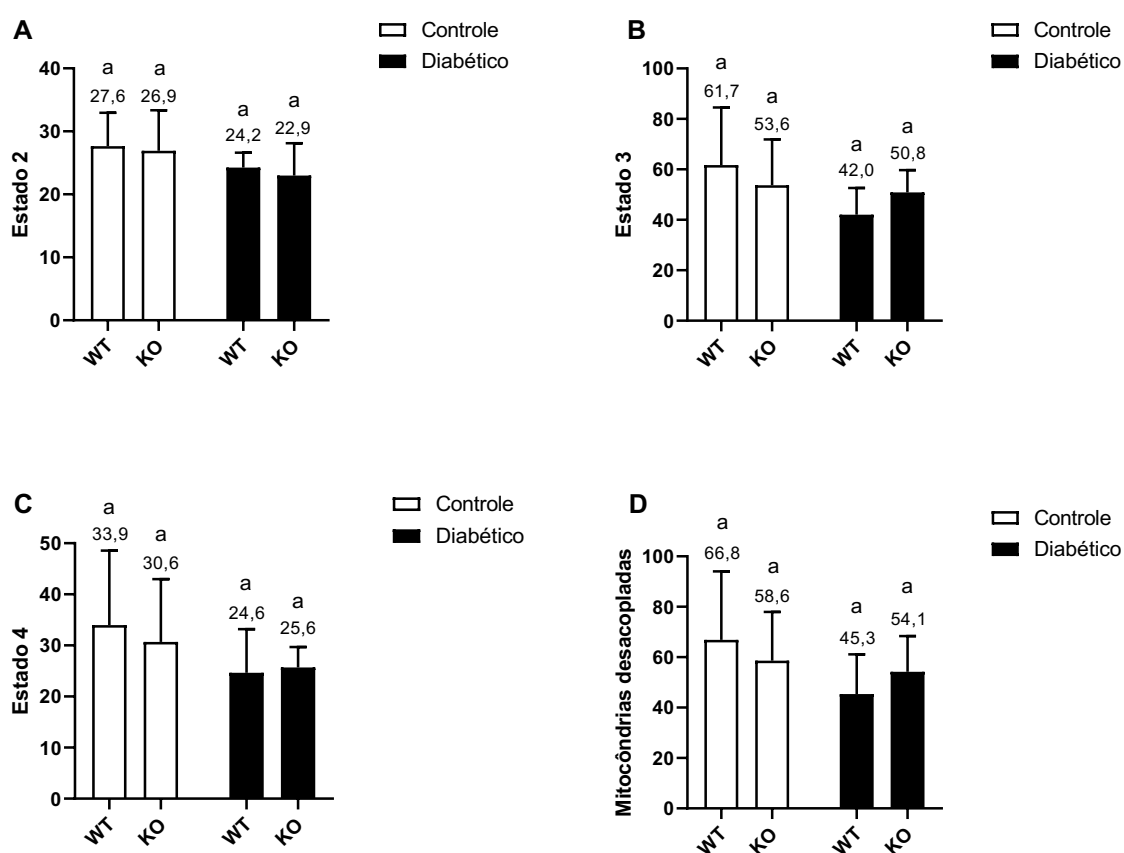


Figura 14 — Função mitocondrial cardíaca. (A): respiração mitocondrial no Estado 2; (B): respiração máxima no Estado 3 (na presença de ADP); (C): respiração máxima no Estado 4 (na presença de



oligomicina); (D): respiração nas mitocôndrias desacopladas (na presença de FCCP). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, (n = 6–8 por grupo) comparados por ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey: médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

A Figura 15 mostra o teste de eletroestimulação que avalia a funcionalidade do músculo esquelético por meio da análise de força (Figura 15A e C), do tempo até o pico de força (Figura 15B e D), do  $\frac{1}{2}$  tempo de relaxamento em contração (Figura 15E e F) e do teste de fadiga (Figura 15G).

Os dados de contração isolada (pico de força isolada — *single twitch*) mostraram que os ratos diabéticos tendem a apresentar, embora não estatisticamente significante, 19,3% menor pico de força (efeito principal de tratamento  $P=0,11$ ;  $F [1, 26]=2,64$ ) e os animais do grupo *knockout* 24,8% menor pico de força (efeito principal de genótipo  $P=0,10$ ;  $F [1, 26]=2,81$ ) (Figura 15A); sem diferença do tempo até o pico (Figura 15B).

A contração tetânica (pico de força sustentada — *tetanic*) mostrou que os animais diabéticos resultaram em 28% menor pico de força (efeito principal de tratamento  $P=0,029$ ;  $F [1, 26]=5,31$ ) e 12% menor pico de força para os animais *knockout*, embora não estatisticamente significante (efeito principal de genótipo  $P=0,37$ ;  $F [1, 26]=0,82$ ) (Figura 15C); e interessante, os animais *knockout* atingiram o pico em um tempo de 111% maior (efeito principal de genótipo  $P=0,022$ ;  $F [1, 24]=5,93$ ) (Figura 15D). Os dados de  $\frac{1}{2}$  tempo de relaxamento, tanto para contração única como para contração tetânica, não mostraram diferença estatística significativa (Figura 15E e F). Nenhuma diferença estatística, pelo teste estatístico *post-hoc*, é vista como mostra a Figura 15A ao 15F.

A Figura 15 G mostra a análise de modelos mistos para o teste de fadiga, que revelou redução de força no avançar dos segundos para todos os grupos (efeito principal de tempo  $P < 0,0001$ ;  $F [1,27, 31,44]= 42,57$ ), com os animais *knockout* apresentando baixa resistência à fadiga (efeito principal de genótipo  $P=0,021$ ;  $F [1, 25]=5,99$ ); e a medida que os animais iam perdendo força ao longo dos minutos, os animais *knockout*, independente da condição diabética (efeito principal de tratamento  $P=0,6$ ;  $F [1, 25]=0,24$ ), apresentavam baixa resistência à fadiga (interação tempo\*genótipo  $P=0,030$ ;  $F [5, 123]=2,56$ ).

Quando analisado a área sob a curva (AUC), visualiza-se diferença estatística significativa com relação ao genótipo, no qual o grupo KO-Diabético teve 41,2% menor produção de força (mN)/seg comparado ao grupo WT-Diabético ( $P < 0,0001$ ; diferença de 11912 mN/seg com IC 95% de 5946 a 17878), demonstrando que os animais ausentes de carnosina endógena realizaram menos trabalho muscular. (Figura 15G).

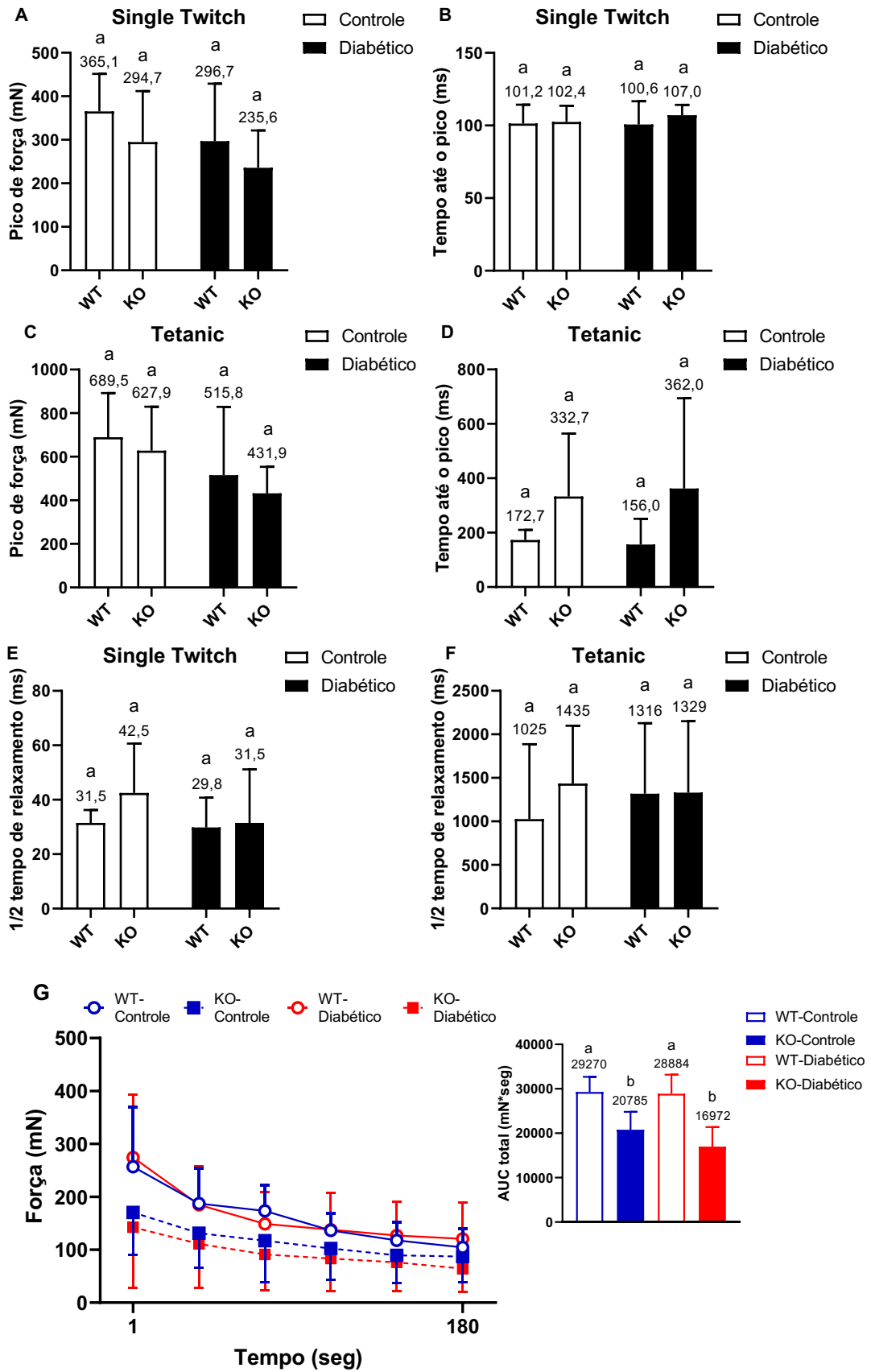


Figura 15 — Função do músculo esquelético por estimulação elétrica. (A): Pico de força na contração única; (B): Tempo até o pico de força na contração única; (C) Pico de força na contração tetânica; (D): Tempo até o pico de força na contração tetânica; (E): ½ tempo de relaxamento na contração única; (F): ½ meio tempo de relaxamento na contração tetânica; (G): Força estimulada para protocolo de fadiga de 3 minutos e a inserção ao lado, a área sob a curva (AUC). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, (n = 6–8 por grupo) comparados por *one* e *two-way* e *mixed-effects* quando houve tempo com *post-hoc* de Tukey: médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ )

O teste de ecocardiografia na Figura 16, mostrou que os ratos diabéticos tiveram alterações estaticamente significantes na função sistólica ventricular e, embora não estatisticamente significante, os ratos *knockout* também tenderam à essas alterações. No entanto, a descritiva foi considerada ao efeito de tratamento (diabetes) comparado aos animais controle como demonstrado a seguir.

As Figuras 16A e B mostram 45,79% e 29,99% de maior tempo de contração (IVCT) e relaxamento (IVRT) (efeito principal de tratamento  $P=0,005$ ;  $F [1, 26]=9,19$  e  $P=0,0007$ ;  $F [1, 26]=14,7$ ; respectivamente), 24,16% maior no tempo de ejeção (MV ET; Figura 16C) (efeito principal de tratamento  $P=0,0001$ ;  $F [1, 26]=20,3$ ), bem como 11,41% menor na porcentagem de fração de ejeção (EF%; Figura 16D) (efeito principal de tratamento  $P=0,006$ ;  $F [1, 26]=8,85$ ), 13,95% menor na porcentagem de fração de encurtamento (FS%; Figura 16E) (efeito principal de tratamento  $P=0,007$ ;  $F [1,26]=8,48$ ) e 9,00% maior no diâmetro do ventrículo esquerdo (VE) [LVID;s; Figura 16F) (efeito principal de tratamento  $P=0,002$ ;  $F [1, 26]=11,41$ ).

Esses achados demonstram um comprometimento da função sistólica ventricular nos animais diabéticos, que se traduz em maior dificuldade do VE em bombear o sangue para fora do coração, aumentando assim o volume ventricular esquerdo sistólico como demonstra o valor significativo (22,13% maior) na Figura 16G (LV Vol;s; efeito principal de tratamento  $P=0,002$ ;  $F [1, 26]=11,76$ ).

Apesar da redução da função sistólica do ventrículo esquerdo, não houve diferença estatisticamente significante dos batimentos cardíacos por minuto em repouso (BPM), nem para o débito cardíaco em repouso ('Q'), nem para o índice de desempenho cardíaco (TEI) (todos na Tabela 2). Mais dados complementares (sem diferença estatisticamente significante) da ecocardiografia se encontram na Tabela 2. Análises pelo teste estatístico *post-hoc* são demonstrados na Figura 16.

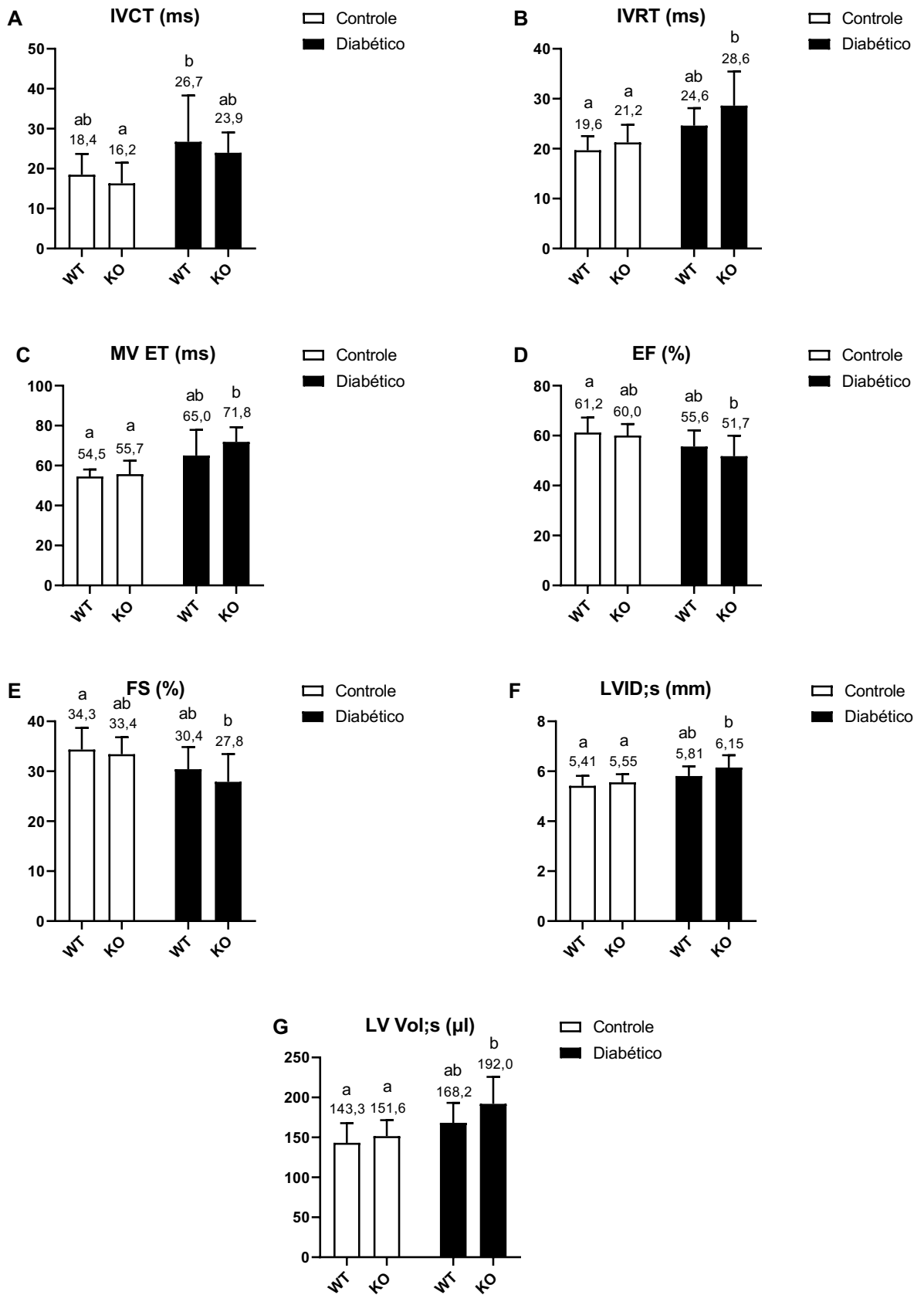


Figura 16 — Ecocardiografia. (A): Tempo de contração isovolumétrico (IVCT); (B): Tempo de relaxamento isovolumétrico (IVRT); (C): Tempo de ejeção (MV ET); (D): Fração de ejeção (EF); (E): Fração de encurtamento (FS); (F): Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (LVID;s); (G): Volume do ventrículo esquerdo durante a sístole (LV Vol;s). Os valores são expressos em média  $\pm$  DP, (n = 6–8 por grupo) comparados por ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey: médias com letras diferentes são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2 — Resultados complementares obtidos da ecocardiografia.

	WT- Controle	KO- Controle	WT- Diabético	KO- Diabético
Massa do VE (mg)	532,4 $\pm$ 94,4	553,3 $\pm$ 104,6	498,4 $\pm$ 45,4	527,1 $\pm$ 63,6
Massa do VE corrigida (mg)	425,9 $\pm$ 75,5	442,6 $\pm$ 83,7	398,7 $\pm$ 36,3	421,7 $\pm$ 50,8
LV Vol;d ( $\mu$ l)	370 $\pm$ 29,9	381,3 $\pm$ 50,3	379,6 $\pm$ 20,8	400 $\pm$ 46,8
IVS;d (mm)	0,961 $\pm$ 0,17	0,988 $\pm$ 0,20	0,883 $\pm$ 0,11	0,912 $\pm$ 0,13
IVS;s (mm)	1,86 $\pm$ 0,31	1,82 $\pm$ 0,24	1,64 $\pm$ 0,18	1,58 $\pm$ 0,26
LVID;d (mm)	8,25 $\pm$ 0,30	8,35 $\pm$ 0,49	8,35 $\pm$ 0,20	8,54 $\pm$ 0,46
LVPW;d (mm)	0,99 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,16	0,94 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,16
LVPW;s (mm)	1,83 $\pm$ 0,36	1,83 $\pm$ 0,33	1,52 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,18
BPM	370,7 $\pm$ 52,80	364,6 $\pm$ 43,02	341,4 $\pm$ 36,32	332,6 $\pm$ 50,47
A` (mm/s)	57,88 $\pm$ 7,54	61,49 $\pm$ 14,04	57,73 $\pm$ 15,93	48,63 $\pm$ 9,30
E` (mm/s)	71,40 $\pm$ 12,60	57,80 $\pm$ 20,03	61,65 $\pm$ 17,14	53,99 $\pm$ 17,56
MV A (mm/s)	495,9 $\pm$ 64,2	511,9 $\pm$ 84,7	552,8 $\pm$ 95,6	624,9 $\pm$ 150,8
MV Decel (ms)	16,73 $\pm$ 3,25	22,08 $\pm$ 9,80	18,62 $\pm$ 4,53	20,55 $\pm$ 7,12
MV E (mm/s)	658,3 $\pm$ 468,1	732,01 $\pm$ 275,2	957,7 $\pm$ 134,1	891,08 $\pm$ 227,4
MV IVS E` (mm/s)	53,06 $\pm$ 6,40	51,74 $\pm$ 5,83	44,91 $\pm$ 4,79	45,29 $\pm$ 7,84
A`/E`	0,82 $\pm$ 0,24	1,21 $\pm$ 0,65	0,97 $\pm$ 0,32	0,97 $\pm$ 0,37
E`/A`	1,27 $\pm$ 0,28	1,16 $\pm$ 0,58	1,10 $\pm$ 0,28	1,12 $\pm$ 0,33
MV E/A	2,10 $\pm$ 0,30	1,70 $\pm$ 0,39	1,78 $\pm$ 0,47	1,50 $\pm$ 0,56
MV E/E`	14,74 $\pm$ 2,39	15,65 $\pm$ 5,81	16,42 $\pm$ 4,05	18,03 $\pm$ 7,07
‘Q’ (ml/min)	52,98 $\pm$ 11,3	55,72 $\pm$ 11,4	57,58 $\pm$ 11,0	63,0 $\pm$ 10,3
TEI	0,70 $\pm$ 0,13	0,69 $\pm$ 0,20	0,83 $\pm$ 0,33	0,73 $\pm$ 0,10

Valores expressos como média  $\pm$  DP (n=7–8 por grupo) comparados por ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey: \$: diferente do grupo controle do mesmo genótipo (P<0,05).

LV Vol;d: volume do ventrículo esquerdo na diástole; IVS;d: espessura do septo interventricular na diástole; IVS;s: espessura do septo interventricular na sístole; LVID;d: diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole; LVPW;d: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; LVPW;s: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole; BPM: batimentos por minuto; A` : onda obtida ao nível do anel mitral pelo Doppler tecidual durante a contração atrial; E` : onda obtida pelo Doppler tecidual ao nível do anel valvar mitral no início da diástole; MV A: onda A; MV Decel: desaceleração da onda E; MV E: onda E; MV IVS E` : onda S` ; 'Q': débito cardíaco; TEI: índice de desempenho cardíaco.

## 6 DISCUSSÃO

Nas últimas três décadas, houve uma extensa pesquisa que explorou o potencial terapêutico da carnosina no tratamento de diversas condições patológicas, incluindo diabetes, doenças neurodegenerativas e o processo de envelhecimento (Creighton et al., 2022; Cesak et al., 2023). Além disso, seu papel tem sido objeto de estudo crescente no contexto de doenças crônicas (Feehan et al., 2022). Diversos estudos têm demonstrado efeitos benéficos da suplementação com L-carnosina no DM, tanto em modelos experimentais (Nagai et al., 2003; Soliman, Mohamed & Metwally, 2007; Sauerhofer et al., 2007) quanto em ensaios clínicos envolvendo seres humanos (Karkabounas et al., 2018; Houjehani et al., 2018; Peng et al., 2020).

É relevante destacar que essas pesquisas ressaltam o papel crucial desempenhado pela carnosina como um agente antioxidante que atua na redução da produção excessiva de espécies reativas, que desempenham um papel fundamental na patogênese do DM (Giacco & Brownlee, 2010; Cripps et al., 2017). A condição hiperglicêmica inerente ao DM, por si só, contribui para o aumento na geração de espécies reativas e o subsequente estresse oxidativo, o que representa uma via significativa para a degradação celular (Li, Chong & Maiese, 2006; Maiese, Morhan & Chong, 2007). Portanto, o estudo da carnosina oferece perspectivas promissoras no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam mitigar as consequências debilitantes dessas condições patológicas.

Não é claro se os efeitos benéficos da suplementação com L-carnosina no DM refletem a função fisiológica do dipeptídeo sintetizado endogenamente. Portanto, neste trabalho, pôde-se explorar os efeitos fisiológicos da carnosina endógena nas alterações metabólicas e em tecidos com maior concentração natural do dipeptídeo (i.e., músculo esquelético e cardíaco) em modelo animal de DM tipo 1.

Prosseguindo com os resultados deste estudo, observamos uma redução e estatisticamente significativa nos níveis de insulina plasmática em animais diabéticos. No entanto, essa redução não foi observada nos animais *knockout*. Além disso, identificou-se uma relação entre a concentração de insulina plasmática em animais diabéticos e a dose de STZ administrada. Estudos anteriores com doses semelhantes de STZ como os conduzidos por Kaikini et al. (2020) e Belkacemi et al. (2012), que utilizaram 65 mg/kg, corroboram nossas descobertas em relação à insulinemia. No entanto, protocolos que empregaram doses substancialmente maiores, superiores a 100 mg/kg de STZ, resultam em concentrações de

insulina extremamente baixas, praticamente indetectáveis como evidenciado nos estudos de Zhang et al. (2018), que utilizaram 150 mg/kg de STZ, e Ribeiro et al. (2018), que administraram 120 mg/kg de STZ.

Em um modelo experimental de estresse metabólico com concentrações endógenas reduzidas ou ausentes de carnosina, observa-se que a insulinemia permanece inalterada, de acordo com os estudos de Qiu et al. (2020) e Wang-Eckhardt et al. (2022). Esses achados estão em consonância com os resultados obtidos neste estudo. No entanto, o estudo de Sauerhöfer et al. (2007) demonstrou que a redução das concentrações séricas de carnosina se correlaciona com a diminuição da insulinemia em camundongos transgênicos que servem como modelo de DM tipo 2. Dados adicionais desse estudo sugerem que a secreção de insulina é preservada devido ao aumento da massa das células beta como resultado do aumento dos níveis séricos de carnosina, conforme evidenciado no grupo suplementado com L-carnosina (Sauerhöfer et al., 2007). Além disso, a suplementação com L-carnosina foi mostrada como um fator que aumenta a secreção de insulina, como evidenciado no estudo de Albrecht et al. (2017), que utilizou um modelo mais robusto de camundongos transgênicos com nefropatia diabética.

A fim de relacionar os níveis de insulinemia com a eficácia da ação da insulina, realizamos o ITT. Os resultados deste teste revelaram que os ratos diabéticos ausentes de carnosina (grupo KO-Diabético) exibiram uma menor responsividade à ação da insulina exógena em comparação com os ratos diabéticos selvagens (WT-Diabético). Embora não tenhamos observado uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de insulina plasmática entre esses dois grupos, podemos especular sobre um possível efeito sinérgico entre a carnosina endógena e a insulina exógena no que diz respeito à captação periférica de glicose.

Esse efeito sinérgico provavelmente é mediado pela cascata de sinalização da insulina, via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt), bem como pela atuação da Nrf2 na redução da produção de espécies reativas. Os estudos de Zhao et al. (2019) e Cripps et al. (2017) fornecem evidências acerca do impacto da carnosina na sinalização da via da insulina e na redução do estresse oxidativo, contribuindo para o aprimoramento das condições glicêmicas frente ao DM.

Em suma, esses resultados revelaram uma correlação direta entre as concentrações de carnosina endógena e a sensibilidade à insulina exógena em ratos diabéticos, enquanto os níveis do hormônio no plasma permaneceram inalterados. Essas descobertas destacam a complexa interação entre a carnosina e a homeostase da insulina, lançando luz sobre possíveis alvos terapêuticos no tratamento do diabetes e de condições metabólicas relacionadas. A



compreensão mais profunda dessa relação pode abrir caminho para intervenções terapêuticas mais eficazes no manejo de distúrbios metabólicos e endócrinos.

Para caracterizar o DM nos ratos dos grupos WT-Diabético e KO-Diabético, induzidos pela administração de STZ, observou-se um quadro típico de DM tipo 1, conforme descrito por Bond, Failla & Unger (1983). O DM tipo 1 é conhecido por ser caracterizado pela hiperglicemia crônica, hipoinsulinemia, ganho de peso reduzido, sinais de polifagia, polidipsia e, embora não tenhamos avaliado, sintomas de poliúria (Wu & Huan, 2008; Belotto et al., 2010). Os animais deste estudo apresentaram todos esses sintomas, o que confirma a adequação do modelo de indução de DM com STZ para estudos experimentais relacionados ao DM tipo 1, especialmente em relação à hiperglicemia crônica (Wu & Huan, 2007).

Após a indução com STZ, observou-se que os níveis glicêmicos permaneceram constantemente elevados, em linha com o estudo de Peters et al. (2014). Essa elevação na glicose sanguínea se assemelha ao quadro de DM tipo 1 não controlado em humanos, uma vez que o STZ possui uma ação beta-citotóxica (Tancrede, Rousseau-Mignerón & Nadeau, 1983). A dose de 65 mg/kg de STZ utilizada neste estudo manteve a glicemia dos animais diabéticos em níveis elevados e constantes.

No que se refere à influência da carnosina sobre a glicemia, a literatura apresenta resultados conflitantes. Alguns estudos indicam que a suplementação com L-carnosina não atenua a glicemia em animais diabéticos (Pfister et al., 2011; Riedl et al., 2011), enquanto outros sugerem melhorias significativas (Soliman, Mohamed & Metwally, 2007; Lee et al., 2005). Em estudos com seres humanos, a meta-análise conduzida por Peng et al. (2020) não forneceu conclusões definitivas sobre os efeitos da suplementação com L-carnosina na glicemia.

Entretanto, meta-análises mais recentes oferecem percepções interessantes. Uma delas sugere que a suplementação com L-carnosina ou beta-alanina reduz a glicemia de jejum em roedores e humanos (Matthews et al., 2021). Outra meta-análise de estudos randomizados confirma efeitos positivos da suplementação com L-carnosina em relação à glicemia de jejum e a HbA1c (Sureshkumar et al., 2023). É relevante mencionar que o mesmo grupo de pesquisadores identificou possíveis vieses que podem dificultar a conclusão dos resultados dessas pesquisas (Matthews et al., 2023).

Em células musculares primárias de pacientes com DM tipo 2, a carnosina demonstrou aumentar a captação de glicose estimulada pela insulina, possivelmente devido à sua capacidade de atenuar o aumento na produção de metilglicoxal, uma espécie reativa envolvida na patogênese do DM, que interfere na sinalização da insulina e na captação periférica de glicose, além de ser um precursor de AGE (Riboulet-Chavey et al., 2006).

No presente estudo, a ausência de carnosina não agravou a hiperglicemia em comparação com os ratos diabéticos selvagens, sugerindo que a carnosina endógena não desempenha um papel significativo no controle glicêmico. No entanto, é importante destacar que mais estudos são necessários para uma compreensão abrangente dos mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos da suplementação com L-carnosina na cascata de sinalização da insulina. Isso pode ser alcançado por meio da avaliação da expressão gênica e da fosforilação de proteínas envolvidas no transporte de glicose e na eliminação de espécies reativas em tecidos específicos como o músculo esquelético.

Além disso, a curva glicêmica, particularmente observada no teste de OGTT, revelou que os animais do grupo controle apresentaram menor elevação da glicemia e uma resposta mais rápida na supressão da glicose no sangue. Por outro lado, os ratos diabéticos demonstraram elevação seguida de uma falta de redução glicêmica, o que é indicativo de intolerância à glicose. A AUC do OGTT, calculada a partir das concentrações de glicose no sangue usando a regra trapezoidal, foi significativamente maior nos ratos diabéticos em comparação com os ratos do grupo controle, um resultado consistente com estudos anteriores envolvendo animais diabéticos (Rafiq et al., 2009; Elberry et al., 2015; Morakinyo, Awobajo & Adegoke, 2013). Esse resultado corrobora ainda mais a caracterização do modelo de DM tipo 1 estabelecido neste estudo.

Os animais diabéticos apresentaram uma menor taxa de ganho de peso corporal em comparação com o grupo controle, o que está de acordo com achados em estudos anteriores que também utilizaram doses semelhantes de STZ (Kullmann et al., 2014; Shi et al., 2009; Najafi et al., 2017; Pinna, Morazzoni & Sala, 2017). Mousavi et al. (2017) e Ahshin-Majd et al. (2016) demonstraram que ratos diabéticos submetidos a testes de aprendizado e memória, com doses semelhantes de STZ, apresentaram perda de peso corporal, a qual foi revertida pela suplementação com L-carnosina. No entanto, neste presente estudo, a ausência de carnosina endógena não exacerbou a perda de peso corporal em animais diabéticos.

Os animais diabéticos também demonstraram um aumento significativo no consumo de ração e ingestão de água em comparação com o grupo controle. Essas alterações metabólicas são caracterizadas pela polifagia e polidipsia, sintomas frequentemente associados ao diabetes, e estão em consonância com os achados de Belkacemi et al. (2012), Shi et al. (2009), e Wang-Fischer & Garyantes (2018), que também utilizaram doses semelhantes de STZ em ratos.

Além das mudanças no peso corporal e nos hábitos alimentares e de hidratação, o diabetes provoca uma série de alterações bioquímicas e estruturais que afetam negativamente a musculatura esquelética. A hiperglicemia e a hipoinsulinemia são fatores cruciais nesse contexto. Nesse estudo, observou-se que os pesos dos músculos esqueléticos como o tibial

anterior e o sóleo, foram menores nos animais diabéticos. Essa redução pode ser atribuída a uma diminuição no conteúdo de glicogênio, alterações no fluxo sanguíneo, redução nos níveis de óxido nítrico e perda de sarcômeros contráteis devido à atrofia ou fibrose muscular como discutido por Russel et al. (2009). Além disso, a administração de STZ é capaz de estimular processos proteolíticos, o que pode explicar a diminuição do peso da musculatura esquelética observada um dia após a sua indução, mencionado por Pepato et al. (1996).

No que diz respeito ao coração, observou-se que os ratos diabéticos apresentaram um aumento no peso cardíaco. Essa hipertrofia cardíaca pode ser interpretada como uma resposta compensatória à disfunção do ventrículo esquerdo, a qual foi identificada posteriormente por meio da ecocardiografia. De acordo com Chatterjee (2005), essa resposta compensatória a longo prazo pode contribuir para uma disfunção ventricular e, por conseguinte, aumentar o consumo de oxigênio pelo miocárdio.

O aumento de peso observado nos rins e no fígado dos animais diabéticos é uma manifestação comum da hiperglicemia crônica, que resulta em problemas morfológicos e funcionais permanentes nesses órgãos (Dabros, Kajda & Kordowiak, 2002; Mifsud et al., 2001; Obineche et al., 2001).

Em relação ao fígado, um estudo realizado por Kume et al. (1994) em camundongos diabéticos demonstrou progressivas alterações morfológicas agudas. Essas alterações incluíram hipertrofia dos hepatócitos, hiperplasia do ducto biliar e aumento do número de pastilhas acidófilas intracitoplasmáticas. Essas mudanças iniciais evoluem ao longo do tempo, culminando na degeneração gordurosa microvesicular focal com vacuolização das células hepáticas. Em fases mais avançadas da doença, como na 14ª semana, essas lesões iniciais se estendem progressivamente para o restante do parênquima hepático, resultando em uma degeneração gordurosa macrovesicular difusa. Essa condição pode ser complementada por infiltrados inflamatórios mononucleares intersticiais, o que caracteriza a esteato-hepatite não alcoólica, além de indícios de fibrose periportal (Bilal et al., 2016).

No que diz respeito ao rim, o aumento de peso proporcional ao peso corporal dos animais diabéticos está associado à hipertrofia glomerular, conforme indicado pelo índice de hipertrofia renal (Kanchan et al., 2016). A hipertrofia glomerular é uma característica precoce na progressão da doença renal causada pelo DM (Malatiali, Francis & Barac-Nieto, 2008). Embora o mecanismo exato subjacente à hipertrofia renal não seja totalmente compreendido, as evidências sugerem que alterações locais na produção de fatores de crescimento e/ou em seus receptores desempenham um papel crucial nesse processo. Sharma & Ziyadeh (1995) propuseram que a superexpressão do fator de crescimento transformante (TGF) — beta 1 está

associada ao desenvolvimento da hipertrofia renal no DM tipo 1. Por outro lado, Flyvbjerg et al. (1995) relatam que a hipertrofia renal é resultado da ação do hormônio de crescimento (GH) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF).

Por outro lado, no presente estudo, observou-se que a ausência de carnosina não influenciou significativamente o peso dos tecidos nos ratos diabéticos, incluindo o tibial anterior direito, sóleo direito, coração, fígado e rim direito.

Quanto à função sistólica do VE, notou-se um acentuado comprometimento nos animais diabéticos, embora os ratos *knockout* também tenham apresentado uma tendência em direção a diferença estatisticamente significativa. É importante observar que a ausência de carnosina contribuiu para uma leve piora nos parâmetros que caracterizam a disfunção sistólica do VE nos ratos diabéticos, conforme evidenciado pelo grupo KO-Diabético. No entanto, é possível que a ausência de significância estatística seja devido à alta variabilidade das amostras em relação à média e a um poder estatístico ligeiramente subdimensionado para essa análise específica (Suresh & Chandrashekhara, 2012).

A falta de reprodutibilidade do resultado estatisticamente significativo obtido por Gonçalves et al. (2021), que utilizaram a mesma linhagem de ratos *knockout*, pode ser atribuída, em parte, à variabilidade natural que é inerente a estudos biológicos. A variação aleatória por si só pode levar a grandes disparidades nos valores de P e nos intervalos de confiança. Por exemplo, mesmo que os pesquisadores conduzam dois estudos de replicação perfeita de um efeito genuíno, cada um com 80% de poder (chance) de atingir  $P < 0,05$ , não seria surpreendente que um deles resultasse em  $P < 0,01$  e o outro em  $P > 0,30$  (Amrhein, Greenland & McShane, 2019).

Essas discrepâncias ressaltam a complexidade da pesquisa científica e a importância de considerar uma variedade de fatores que podem influenciar os resultados, incluindo a variabilidade natural, o tamanho da amostra e o poder estatístico. Além disso, enfatizam a necessidade de replicação de estudos em diferentes contextos para obter conclusões robustas sobre os efeitos de intervenções ou condições experimentais em modelos biológicos.

No contexto das doenças cardiovasculares associadas ao DM, as disfunções cardíacas são uma característica tanto do DM tipo 1 quanto do tipo 2 em modelos animais (Mansor et al., 2013; Trost et al., 2002; Kajstura et al., 2001; Marsh, Dell'italia & Chatham, 2009). Várias hipóteses foram propostas para explicar a disfunção cardíaca no DM, incluindo o aumento da oxidação de ácidos graxos devido à deficiência na utilização da glicose sanguínea, expansão do tecido conjuntivo, estresse oxidativo, mau uso do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e redução na expressão do

retículo sarco/endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$  — ATPase (SERCA) (Boudina & Abel, 2010; Trost et al., 2002).

A extensa pesquisa sobre as anormalidades funcionais e/ou morfológicas do VE em animais diabéticos sugere que o DM, por si só, induz a disfunção sistólica do VE (Hoit et al., 1999; Takeda et al., 1988). Manifestações que incluem a diminuição da fração de ejeção e das dimensões na sístole do VE podem ser detectadas após 5 semanas de indução com STZ, enquanto alterações na diástole surgem após 12 semanas de indução (Akula et al., 2003; Mihm et al., 2001), o que está de acordo com os resultados deste estudo.

É amplamente reconhecido que a cardiomiopatia diabética é fortemente influenciada pelo estresse oxidativo. A ativação do estresse oxidativo, devido ao aumento na produção de espécies reativas na mitocôndria e à subsequente apoptose mitocondrial, causada pela hiperglicemia, são consideradas as principais causas da cardiomiopatia associada ao DM (Giacco & Brownlee, 2010; Watanabe et al., 2010).

Por outro lado, em relação à carnosina, Gonçalves et al. (2021) apontou que as alterações na função cardíaca estão relacionadas aos efeitos da carnosina nos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como também documentado por Zaloga et al. (1997), que mostrou que as mudanças no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular contribuem significativamente para a patologia do miocárdio. No entanto, o mecanismo fisiológico exato ainda é pouco compreendido, e o papel de vários metabólitos está sendo investigado, uma vez que a carnosina endógena não parece ser essencial para o estresse oxidativo em células cardíacas de animais saudáveis como evidenciado pela ausência de alterações na respiração mitocondrial e na produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), conforme demonstrado por Gonçalves et al. (2021). Em seres humanos, os efeitos positivos da suplementação com L-carnosina no sistema cardiovascular não foram confirmados (Sureshkumar et al., 2023).

Os resultados deste estudo indicaram que o consumo de oxigênio mitocondrial nos cardiomiócitos de animais diabéticos tendeu a ser menor, embora não tenha atingido significância estatística. Curiosamente, um estudo realizado por Marciniak et al. (2014) procurou investigar se a respiração mitocondrial cardíaca está relacionada à disfunção cardíaca em diferentes modelos de indução de DM. Os resultados revelaram que apenas os animais que tiveram a indução de DM associada à dieta rica em lipídios como no modelo de DM tipo 2, apresentaram correlação entre cardiomiopatia e piora na respiração mitocondrial estatisticamente significativa. Interessantemente, o mesmo estudo não encontrou correlação entre a somente indução de STZ (DM tipo 1) e defeitos na respiração mitocondrial, apesar da

evidente disfunção cardíaca, sugerindo que os defeitos na respiração mitocondrial cardíaca não são a causa primária (Marciniak et al., 2014).

Além disso, a resistência à insulina presente no DM tipo 2 está diretamente associada à disfunção mitocondrial (Boudina et al., 2009; Belke et al., 2002). Essa constatação foi corroborada por estudos semelhantes conduzidos por Moreira et al. (2006) e Lashin & Romani (2004) em ratos com DM tipo 1, induzidos com doses semelhantes de STZ, que também avaliaram a respiração mitocondrial. No entanto, é importante notar que variações individuais na absorção, depuração e metabolismo da STZ podem ocorrer entre os animais, afetando a avaliação da respiração mitocondrial cardíaca (Lashin & Romani, 2004). Animais que experimentam um maior dano devido à indução de STZ estão mais propensos à condição de cetoacidose diabética, o que, por sua vez, pode levar a alterações na respiração mitocondrial cardíaca (Lashin & Romani, 2004). Adicionalmente, concentrações mais baixas de insulina plasmática estão associadas a animais em estado de cetoacidose diabética (Sivitz & Yorek, 2010), e os animais deste presente estudo apresentaram uma diminuição discreta nos níveis de insulina em comparação com animais que recebem doses mais robustas de STZ. Portanto, esses resultados sugerem que o modelo de indução de diabetes, a intensidade da condição diabética e a concentração de insulina podem desempenhar papéis importantes na interpretação dos achados relacionados à respiração mitocondrial cardíaca.

A presente pesquisa também se dedicou à avaliação da função motora, com foco na contratilidade muscular esquelética. Observou-se uma tendência em ambos os animais diabéticos e *knockout*, com uma notável diminuição no pico de força muscular isolada.

Porém, é importante notar que, ao analisar a força sustentada, os animais diabéticos demonstraram um pico de força ainda menor, o que nos leva a estabelecer uma interessante conexão com estudos anteriores como o de Spaas et al. (2021), que relatam observações semelhantes em modelos de ratos com esclerose múltipla.

Um ponto de destaque é a análise de força sustentada, que, de acordo com Cameron, Cotter & Robertson (1990), é considerada o método mais robusto na avaliação da representação da força, devido ao tempo prolongado de contração sob alto potencial de tensão. Este é um aspecto crucial a ser considerado ao interpretar os resultados do presente estudo, uma vez que a força sustentada pode ser mais representativa da capacidade real do músculo em situações do cotidiano, no qual a manutenção prolongada da força é necessária.

A presença de baixo poder estatístico ou a falta de diferença estatística em nossos resultados de contratilidade pode ser atribuída a diversas causas. Uma hipótese relevante envolve a escolha do tipo de fibra muscular analisada, já que o retículo sarcoplasmático, por

exemplo, é mais proeminente em fibras musculares de contração rápida, como o extensor longo dos dedos (EDL) e o tibial anterior. Em virtude dessa especificidade, o retículo sarcoplasmático pode não estar suficientemente comprometido para afetar a força muscular e o tempo de relaxamento de maneira significativa, o que pode explicar a ausência de diferença estatisticamente significativa em nossos resultados.

A especificidade do tipo de fibra muscular se torna um aspecto crucial em nossa análise, uma vez que a composição das fibras musculares influencia significativamente o desempenho e a resposta a diferentes condições. De acordo com estudos anteriores, o tibial anterior de ratos é composto predominantemente por fibras de contração rápida (tipo IIA, IIB e IIX), representando cerca de 95,7% dessas fibras (Tasić et al., 2011). Em contraste, o músculo sóleo é composto principalmente por fibras de contração lenta (tipo I), totalizando cerca de 84,9% de sua composição (Staron et al., 1999).

Um ponto notável é que, em ratos diabéticos, o músculo esquelético com fibras de contração rápida não parece apresentar reduções significativas no conteúdo de ATP, fosfocreatina, citrato sintase e citocromo oxidase (Fewell & Moerland, 1995). Isso pode sugerir que as alterações metabólicas relacionadas ao DM podem afetar de maneira diferenciada os músculos com diferentes composições de fibras. Tal distinção é fundamental para compreender as complexas respostas do sistema muscular em contextos de doenças metabólicas como o DM.

Além disso, a ausência de uma maior fadiga muscular em animais diabéticos com fibras de contração rápida, neste experimento, destaca ainda mais a importância de examinar essas diferenças entre tipos de fibras. Isso contrasta com descobertas em relação à fadiga em fibras musculares de contração lenta em animais diabéticos como demonstrado no estudo de Copray et al. (2000). Essa disparidade pode indicar que as fibras de contração rápida possuem adaptações metabólicas ou estruturais que as tornam menos suscetíveis à fadiga em contextos diabéticos, mas essa hipótese requer investigações adicionais.

Vale destacar que, em um estudo anterior conduzido em camundongos (Everaert et al., 2013b), a suplementação com beta-alanina demonstrou reduzir a fadiga no músculo sóleo durante contrações musculares prolongadas de 8 minutos. Essa constatação suscita a hipótese de que o aprimoramento do desempenho muscular em contextos diabéticos pode ser influenciado pelo tipo de fibra muscular, exigindo uma avaliação específica e direcionada.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado achados diferentes no teste de contratilidade de animais diabéticos, tais como, diminuição na força (Fahim, el-Sabban & Davidson, 1998; Lesniewski, Miller & Armstrong, 2003), aumento na força (McGuire et al., 2001; Krause et al., 2009) e similaridade ao grupo controle (Cotter et al., 1989; Stephenson, O'Callaghan &

Stephenson, 1994). Esta variabilidade de resultado envolve a duração do diabetes, ampla gama de protocolos de testes de contratilidade empregados, tipo de fibra muscular utilizado, vias de administração e dose da droga de indução do diabetes. Outra influência na variabilidade é a temperatura do músculo a ser contraído, podendo reduzir até 60% da força muscular à medida que a temperatura muscular diminui (Cullingham, Lind & Morton, 1960, Bennett, 1984). Portanto, é visto uma grande probabilidade de alto índice de dispersão das amostras em relação à média devido à variabilidade natural dos animais, constatado pelos valores do desvio padrão das médias.

Wang-Eckhardt et al. (2020) não demonstrou diferença na contração muscular esquelética e nem alteração no tamponamento de pH em camundongos envelhecidos *knockout* de carnosina. No entanto, Wu, Egusa & Nishimura (2022), sugerem que a ausência de carnosina em ratos *knockout* compromete 20 – 50% a força muscular através do teste de força de preensão (*grip strength meter*), porém os dados não foram publicados.

Com relação à ausência de carnosina, os animais *knockout* atingiram o pico de força sustentada em maior tempo e tiveram menor resistência à fadiga, especulado pelo fato de que a carnosina endógena é liberada durante o exercício físico (Horii et al., 2015). Dessa forma, afetando o fluxo sanguíneo por meio de uma mudança na atividade nervosa simpática muscular e isso pode ter auxiliado na contração muscular dos ratos selvagens. Como já descrito anteriormente que a suplementação com L-carnosina apresenta função antifadiga (Boldyrev & Severin, 1990) e atualmente um estudo com camundongos ausentes de carnosina (*Carns1<sup>-/-</sup>*), reportou que a capacidade de exercício dos animais *knockout* foi significativamente inferior comparado com animais controle (dados não publicados) (Sakano et al., 2022).

A explicação provável que suporta o benefício da carnosina na resistência a fadiga é através do tamponamento do pH intramiocelular e pelo aumento a sensibilidade do  $\text{Ca}^{2+}$  miofibrilar, particularmente em fibras de contração rápida (Derave et al., 2007; Hobson et al., 2012). Os primeiros estudos realizados com células de músculo esquelético, mostram que a carnosina aumenta a sensibilidade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (Batrukova & Rubtsov, 1997; Lamont & Miller, 1992), posteriormente sugeridos por Dutka et al. (2012) e Blancquaert, Everaert & Derave (2015). Outra explicação é pela alteração na cinética do ciclo das pontes cruzadas (miosina-actina), no qual a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à troponina aumenta o poder de contração muscular (Ochala et al., 2011). Outras possíveis alterações intracelulares podem estar por trás da perda da capacidade de geração de força, por exemplo, o aumento na acidose, no acúmulo de fosfato e na exacerbação na produção de espécies reativas (Allen, Lamb & Westerblad, 2008).



Em modelo de camundongos *knockout* de carnosina, verificou-se que após o exercício de natação, os ratos ausentes de carnosina apresentaram menor 3-metil histidina (3-MH), um aminoácido livre, presente na actina e miosina, considerado um marcador de proteólise muscular. Apresentaram também menor peso do músculo gastrocnêmio (10% menor), sem alteração no músculo sóleo. O mesmo estudo mostrou também supressão do IGF-1 e catepsina B (CTSB), ambas proteínas relacionadas a síntese e degradação, respectivamente. Concluindo que a ausência de carnosina prejudica um correto metabolismo muscular esquelético (Wu, Egusa & Nishimura, 2022).

Em suma, é necessário investigar a nível celular o papel da carnosina endógena no sistema antioxidante enfraquecido pelo estado diabético, sendo um passo crucial para compreender os mecanismos subjacentes a essas complexas interações. Como sugerido, é sabido que as concentrações de carnosina estão elevadas no músculo esquelético de jovens diabéticos, e essa elevação pode ser vista como um mecanismo compensatório para lidar com o estresse oxidativo. No entanto, a hipótese de que, a longo prazo, esse mecanismo compensatório seja exaurido, resultando na diminuição da carnosina e na perda de sua função, é uma questão importante que merece investigação detalhada.

Além disso, como mencionado, o uso de doses maiores de STZ em modelos de animais diabéticos pode ser benéfico para entender o DM a longo prazo. O acompanhamento a longo prazo é crucial para captar as mudanças que ocorrem ao longo do tempo, bem como para avaliar os efeitos crônicos do DM não apenas em parâmetros metabólicos, mas também em termos de função muscular, incluindo músculos esqueléticos e cardíacos.

Essa abordagem mais abrangente, que envolve estudos longitudinais e experimentos em nível celular, ajudariam a esclarecer não apenas o papel da carnosina, mas também outras adaptações que ocorrem em resposta ao DM e suas implicações em condições de longo prazo. O entendimento mais profundo desses mecanismos é fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes para distúrbios relacionados ao DM, bem como para identificar possíveis alvos terapêuticos para restaurar a função muscular e metabólica em pacientes diabéticos.

Portanto, é imperativo que futuros trabalhos de pesquisa explorem essas áreas em detalhes, explorando as principais técnicas e abordagens para obter uma compreensão mais completa das complexas interações envolvidas nas alterações metabólicas e musculares associadas ao DM e ao papel da carnosina nesse contexto.

## 7 CONCLUSÃO

Do ponto de vista estrutural e funcional da musculatura estriada, a ausência de carnosina no modelo experimental de diabetes tipo 1, induzido pela administração de 65 mg/kg de estreptozotocina, não apresentou impactos adversos evidentes. Em condições de ausência de carnosina, observou-se que a hiperglicemia em ratos diabéticos não foi atenuada em resposta à administração de insulina exógena. Isso sugere a existência de uma interação sinérgica entre a carnosina endógena e a insulina administrada externamente, resultando em uma maior eficácia na redução dos níveis de glicose. Essas descobertas proporcionam uma nova perspectiva sobre o papel potencialmente benéfico da carnosina no contexto do diabetes mellitus tipo 1, destacando sua contribuição para a regulação glicêmica, que merece uma investigação mais aprofundada em estudos futuros.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahshin-Majd S, Zamani S, Kiamari T, Kiasalari Z, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Carnosine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats: Possible involved mechanisms. *Peptides*. 2016;86:102–111.

Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, Kalagara M, Kalagara S, Veeravalli KK, Gomedhikam JP. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2003;48(5):429–35.

Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu, J, Rodriguez A, Pastene DO, Krämer BK, Köppel H, Baelde H, de Heer E, Anna Altomare A, Regazzoni L, Denisi A, Aldini G, Yard BA, Hauske SJ. Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1–16.

Aldini G, Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, Altomare A, D'Amato A, Vistoli G, Carini M. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms, *Free Radical Research*. 2021;55:4:321–330.

Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors*. 2005;24(1-4):77–87.

Aldini G, Orioli M, Carini M, Maffei Facino R. Profiling histidine-containing dipeptides in rat tissues by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2004;39(12):1417-28.

Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*. 2008;88(1):287–332.

American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*. 2020;43:S14–S31.

Amrhein V, Greenland S, McShane B. Scientists rise up against statistical significance. *Nature*. 2019;567(7748):305–307.

Arsov S, Graaff R, Van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, Smit AJ. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med*. 2013;4:1–10.

Artioli GG, Painelli VS, Gualano B. **Suplementação de  $\beta$ -alanina: Fundamentos fisiológicos e aplicações para o exercício, esporte e saúde**. São Paulo: Editora Clannad, 2019.

Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. *Eur J Sport Sci*. 2018;4:1–10.

Avendano GF, Agarwal RK, Bashey RI, Lyons MM, Soni BJ, Jyothirmayi GN, Regan TJ. Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes*. 1999;48(7):1443–7.

Baba SP, Hoetker JD, Merchant M, Klein JB, Cai J, Barski OA, Conklin DJ, Bhatnagar A. Role of aldose reductase in the metabolism and detoxification of carnosine-acrolein conjugates. *J Biol Chem*. 2013;288(39):28163–79.

Batrukova MA, Rubtsov AM. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1324:142–50.

Baye E, Ukropec J, de Courten MP, Vallova S, Krumpolec P, Kurdiova T, Aldini G, Ukropcova B, de Courten B. Effect of carnosine supplementation on the plasma lipidome in overweight and obese adults: a pilot randomised controlled trial. *Sci Rep*. 2017;12;7(1):17458.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48(1):1–9.

Belkacemi L, Selselet-Attou G, Hupkens E, Nguidjoe E, Louchami K, Sener A, Malaisse WJ. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:962012.

Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeier H, Severson D, Kahn CR, Abel ED. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest.* 2002;109(5):629–39.

Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG, Vinolo MA, Curi R, Pithon-Curi TC, Hatanaka E. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(2):237–43.

Bennett AF. Thermal dependence of muscle function. *Am J Physiol.* 1984;247(2 Pt 2):R217–29.

Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22(7):1186–90.

Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Müller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes.* 1997;46(9):1481–90.

Bilal HM, Riaz F, Munir K, Saqib A, Sarwar MR. Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Medicine.* 2016;3:1

Bispo VS, de Arruda Campos IP, Di Mascio P, Medeiros MH. Structural Elucidation of a Carnosine-Acrolein Adduct and its Quantification in Human Urine Samples. *Sci Rep.* 2016 Jan 19;6:19348.

Blancquaert L, Everaert I, Derave W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(1):63–70.

Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1803–45.

Boldyrev AA, Petukhov VB. Localization of carnosine effect on the fatigued muscle preparation. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1978;9(1):17–20.

Boldyrev AA, Severin SE. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Regul*. 1990;30:175–94.

Boldyrev AA. Carnosine – *Unraveled Mystery of Nature*, IKAR, Moscow, Russia, 2009 (Russian).

Boldyrev AA. Carnosine: New concept for the function of an old molecule. *Biochemistry*. 2012;77(4):313–26.

Bond JS, Failla ML, Unger DF. Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Chem*. 1983;258(13):8004–9.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007;26;115(25):3213–23.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(1):31–9.

Boudina S, Bugger H, Sena S, O'Neill BT, Zaha VG, Ilkun O, Wright JJ, Mazumder PK, Palfreyman E, Tidwell TJ, Theobald H, Khalimonchuk O, Wayment B, Sheng X, Rodnick KJ, Centini R, Chen D, Litwin SE, Weimer BE, Abel ED. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation*. 2009;119(9):1272–83.

Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol.* 2014;222(3):G13–25.

Brownlee M. Pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615–25.

Buse MG, Weigand DA, Peeler D, Hedden MP. The effect of diabetes and the redox potential on amino acid content and release by isolated rat hemidiaphragms. *Metabolism.* 1980;29(7):605–16.

Cameron NE, Cotter MA, Robertson S. Changes in skeletal muscle contractile properties in streptozocin-induced diabetic rats and role of polyol pathway and hypoinsulinemia. *Diabetes.* 1990;39(4):460–5.

Cancherini DV, Queliconi BB, Kowaltowski AJ. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channel activity in isolated heart mitochondria. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):720–8.

Carvalho VH, Oliveira AHS, de Oliveira LF, da Silva RP, Di Mascio P, Gualano B, Artioli GG, Medeiros MHG. Exercise and  $\beta$ -alanine supplementation on carnosine-acrolein adduct in skeletal muscle. *Redox Biol.* 2018 Sep;18:222–228.

Cesak O, Vostalova J, Vidlar A, Bastlova P, Student V Jr. Carnosine and Beta-Alanine Supplementation in Human Medicine: Narrative Review and Critical Assessment. *Nutrients.* 2023;5;15(7):1770.

Chasovnikova LV, Formazyuk VE, Sergienko VI, Boldyrev AA, Severin SE. The antioxidative properties of carnosine and other drugs. *Biochem Int.* 1990;20(6):1097–103.

Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *Am J Cardiol.* 2005;95:8B–13B.

Copray S, Liem R, Brouwer N, Greenhaff P, Habens F, Fernyhough P. Contraction-induced muscle fiber damage is increased in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats and is associated with elevated expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in muscle fibers and activated satellite cells. *Exp Neurol*. 2000;161(2):597–608.

Cotter M, Cameron NE, Lean DR, Robertson S. Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. *Q J Exp Physiol*. 1989;74(1):65–74.

Creighton JV, de Souza Gonçalves L, Artioli GG, Tan D, Elliott-Sale KJ, Turner MD, Doig CL, Sale C. Physiological Roles of Carnosine in Myocardial Function and Health. *Adv Nutr*. 2022;13(5):1914–1929.

Cripps MJ, Hanna K, Lavilla C Jr, Sayers SR, Caton PW, Sims C, De Girolamo L, Sale C, Turner MD. Carnosine scavenging of glucolipotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake. *Sci Rep*. 2017;7(1):13313.

Culbertson JY, Kreider RB, Greenwood M, Cooke M. Effects of beta-alanine on muscle carnosine and exercise performance: a review of the current literature. *Nutrients*. 2010;2(1):75–98.

Cunningham PJ, Lind AR, Morton RJ. The maximal isometric tetanic tensions developed by mammalian muscle, in situ, at different temperatures. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1960;45:142–56.

D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front Physiol*. 2013;20;4:379.

da Silva Bispo V, Di Mascio P, Medeiros M. Quantification of Carnosine-Aldehyde Adducts in Human Urine. *Free Radic Biol Med*. 2014;75:1:S27.

Dabroś W, Kajda B, Kordowiak AM. Control and STZ-diabetic rat liver Golgi complexes under the influence of bis(2,2'-bipyridine)oxovanadium(IV) sulphate. The morphological investigation. *Pol J Pathol*. 2002;53(3):123–8.



Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):610–8.

de Andrade Kratz C, de Salles Painelli V, de Andrade Nemezio KM, da Silva RP, Franchini E, Zagatto AM, Gualano B, Artioli GG. Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in highly-trained athletes. *J Sci Med Sport*. 2017;20(4):403–408.

de Courten B, Jakubova M, de Courten MP, Kukurova IJ, Vallova S, Krumpolec P, Valkovic L, Kurdiova T, Garzon D, Barbaresi S, Teede HJ, Derave W, Krssak M, Aldini G, Ukropec J, Ukropcova B. Effects of carnosine supplementation on glucose metabolism: Pilot clinical trial. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(5):1027–34.

Derave W, Ozdemir MS, Harris RC, Pottier A, Reyngoudt H, Koppo K, Wise JA, Achten E. Beta-alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;103(5):1736–43.

Dolan E, Swinton PA, Painelli VS, Stephens Hemingway B, Mazzolani B, Infante Smaira F, Saunders B, Artioli GG, Gualano B. A Systematic Risk Assessment and Meta-Analysis on the Use of Oral  $\beta$ -Alanine Supplementation. *Adv Nutr*. 2019;10(3):452–463.

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

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

Dutka TL, Lambolley CR, McKenna MJ, Murphy RM, Lamb GD. Effects of carnosine on contractile apparatus  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release in human skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol*. 2012;112(5):728–36.

Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Gabr SA. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Diabetes Mellit.* 2015;3:37–44.

Everaert I, De Naeyer H, Taes Y, Derave W. Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2013a;113:1169–1179.

Everaert I, He J, Hanssens M, Stautemas J, Bakker K, Albrecht T, Zhang S, Van der Stede T, Vanhove K, Hoetker D, Howsam M, Tessier FJ, Yard B, Baba SP, Baelde HJ, Derave W. Carnosinase-1 overexpression, but not aerobic exercise training, affects the development of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020;318(4):F1030–F1040.

Everaert I, Stegen S, Vanheel B, Taes Y, Derave W. Effect of beta-alanine and carnosine supplementation on muscle contractility in mice. *Med Sci Sports Exerc.* 2013b;45(1):43–51.

Fahim MA, el-Sabban F, Davidson N. Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. *Anat Rec.* 1998;251(2):240–4.

Feehan J, Hariharan R, Buckenham T, Handley C, Bhatnagar A, Baba SP, de Courten B. Carnosine as a potential therapeutic for the management of peripheral vascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2022;32(10):2289–2296.

Ferreira JC, Campos JC, Qvit N, Qi X, Bozi LH, Bechara, LR, Lima VM, Queliconi BB, Disatnik M, Dourado PM, Kowaltowski AJ. A selective inhibitor of mitofusin 1- $\beta$ IIPKC association improves heart failure outcome in rats. *Nature Communications.* 2019;10(1)329.

Fewell JG, Moerland TS. Responses of mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: myosin isoenzymes and phosphorous metabolites. *Mol Cell Biochem.* 1995;148(2):147–54.

Flyvbjerg A, Landau D, Domene H, Hernandez L, Grønbaek H, LeRoith D. The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism*. 1995;44(10 Suppl 4):67–71.

Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26(2):77–82.

Freedman BI, Hicks PJ, Sale MM, Pierson ED, Langefeld CD, Rich SS, Xu J, McDonough C, Janssen B, Yard BA, van der Woude FJ, Bowden DW. A leucine repeat in the carnosinase gene CNBP1 is associated with diabetic end-stage renal disease in European Americans. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(4):1131–5.

Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;70:5.47.1–5.47.20.

Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2011;1:71–83.

Ghodsi R, Kheirouri S. Carnosine and advanced glycation end products: a systematic review. *Amino Acids*. 2018;50(9):1177–1186.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058–70.

Glomb MA, Monnier VM. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem*. 1995;28;270(17):10017–26.

Gonçalves LS, Sales LP, Saito TR, Campos JC, Fernandes AL, Natali J, Jensen L, Arnold A, Ramalho L, Bechara LRG, Esteca MV, Correa I, Sant'Anna D, Ceroni A, Michelini LC, Gualano B, Teodoro W, Carvalho VH, Vargas BS, Medeiros MHG, Baptista IL, Irigoyen MC, Sale C, Ferreira JCB, Artioli GG. Histidine dipeptides are key regulators of excitation-contraction coupling in cardiac muscle: Evidence from a novel CARNS1 knockout rat model. *Redox Biol*. 2021;44:102016.

Gonçalves, LS. *Ação da insulina na captação de beta-alanina pelo músculo esquelético: efeito sobre o conteúdo de beta-alanina muscular e mecanismos envolvidos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Gualano B, Everaert I, Stegen S, Artioli GG, Taes Y, Roschel H, Achten E, Otaduy MC, Junior AH, Harris R, Derave W. Reduced muscle carnosine content in type 2, but not in type 1 diabetic patients. *Amino Acids*. 2012;43(1):21–4.

Gulewitsch W, Amiradžibi S. Ueber das carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. *Eur J Inorg Chem*. 1900;33:1902–1903.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford Science Publications; 2003.

Harris R, Tallon M, Dunnett M, Boobis L, Coakley J, Kim HJ, Fallowfield JL, Hill CA, Sale C, Wise JA. The absorption of orally supplied  $\beta$ -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*. 2006;30:279–289.

Harris RC, Wise JA, Price KA, Kim HJ, Kim CK, Sale C. Determinants of muscle carnosine content. *Amino Acids*. 2012;43(1):5–12.

Hill CA, Harris RC, Kim HJ, Harris BD, Sale C, Boobis LH, Kim CK, Wise JA. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*. 2007;32(2):225–33.

Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res*. 2009;57:87–154.

Hobson RM, Saunders B, Ball G, Harris RC, Sale C. Effects of beta-alanine supplementation on exercise performance: a meta-analysis. *Amino Acids*. 2012;43:25–37.

Hoit BD, Castro C, Bultron G, Knight S, Matlib MA. Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Card Fail*. 1999;5(4):324–33.

Holliday R, McFarland GA. A role for carnosine in cellular maintenance. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(7):843–8.

Horii Y, Fujisaki Y, Fuyuki R, Nagai K. L-Carnosine's dose-dependent effects on muscle sympathetic nerves and blood flow. *Neurosci Lett*. 2015;591:144–148.

Houjehani S, Kheirouri S, Faraji E, Jafarabadi MA. L-Carnosine supplementation attenuated fasting glucose, triglycerides, advanced glycation end products, and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with type 2 diabetes: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Nutr Res*. 2018;49:96–106.

Hu X, Fukui Y, Feng T, Bian Z, Yu H, Morihara R, Hu X, Bian Y, Sun H, Takemoto M, Nakano Y, Yunoki T, Abe K, Yamashita T. Neuroprotective effects of carnosine in a mice stroke model concerning oxidative stress and inflammatory response. *J Neurol Sci*. 2023;15;447:120608.

Janssen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P, Peters V, Rind N, Fischer C, Rychlik I, Cerna M, Romzova M, de Heer E, Baelde H, Bakker SJ, Zirie M, Rondeau E, Mathieson P, Saleem MA, Meyer J, Köppel H, Sauerhoefer S, Bartram CR, Nawroth P, Hammes HP, Yard BA, Zschocke J, van der Woude FJ. Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: association with a leucine repeat of the carnosinase gene CNBP1. *Diabetes*. 2005;54(8):2320–7.

Järvi AE, Karlström BE, Granfeldt YE, Björck IE, Asp NG, Vessby BO. Improved glycaemic control and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycaemic index diet in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 1999;22(1):10–8.

Kaczmarek D, Łochyński D, Everaert I, Pawlak M, Derave W, Celichowski J. Role of histidyl dipeptides in contractile function of fast and slow motor units in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2016;121(1):164–72.

Kaikini AA, Dhodi D, Muke S, Peshattiwar V, Bagle S, Korde A, Sarnaik J, Kadwad V, Sachdev S, Sathaye S. Standardization of type 1 and type 2 diabetic nephropathy models in rats: Assessment and characterization of metabolic features and renal injury. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020;12(3):295–307.

Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, Limana F, Nadal-Ginard B, Leri A, Anversa P. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes*. 2001;50(6):1414–24.

Kalaz EB, Çoban J, Aydın AF, Doğan-Ekici I, Doğru-Abbasoğlu S, Öztezcan S, Uysal M. Carnosine and taurine treatments decreased oxidative stress and tissue damage induced by D-galactose in rat liver. *J Physiol Biochem*. 2014;70:15–25.

Kamal MA, Jiang H, Hu Y, Keep RF, Smith DE. Influence of genetic knockout of Pept2 on the in vivo disposition of endogenous and exogenous carnosine in wild-type and Pept2 null mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(4):R986–91.

Kanchan DM, Somani GS, Peshattiwar VV, Kaikini AA, Sathaye S. Renoprotective effect of diosgenin in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2016;68(2):370–7.

Karkabounas S, Papadopoulos N, Anastasiadou C, Gubili C, Peschos D, Daskalou T, Fikioris N, Simos YV, Kontargiris E, Gianakopoulos X, Ragos V, Chatzidimitriou M. Effects of  $\alpha$ -Lipoic Acid, Carnosine, and Thiamine Supplementation in Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Double-Blind Study. *J Med Food*. 2018;21(12):1197–1203.

Khalil R. Ubiquitin-Proteasome Pathway and Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1088:235–248.

Kramarenko GG, Markova ED, Ivanova-Smolenskaya IA, Boldyrev AA. Peculiarities of carnosine metabolism in a patient with pronounced homocarnosinemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2001;(4):996–999.

Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita<sup>+/-</sup> and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;106(5):1650–9.

Krysiak R, Rudzki H, Okopień B. Diabetes and prediabetes in endocrine disorders. *Wiad Lek*. 2012;65(3):187–98.

Kullmann FA, Wells GI, McKenna D, Thor KB. Excitatory effects of bombesin receptors in urinary tract of normal and diabetic rats in vivo. *Life Sci.* 2014;100(1):35–44.

Kume E, Ohmachi Y, Itagaki S, Tamura K, Doi K. Hepatic changes of mice in the subacute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes. *Exp Toxicol Pathol.* 1994;46(4–5):368–74.

Kuo TH, Moore KH, Giacomelli F, Wiener J. Defective oxidative metabolism of heart mitochondria from genetically diabetic mice. *Diabetes.* 1983;32(9):781–7.

Lamont C, Miller DJ. Calcium Sensitizing Action of Carnosine and other Endogenous Imidazoles in Chemically Skinned Striated Muscle. *J Physiol.* 1992;454:421–34.

Lashin O, Romani A. Hyperglycemia does not alter state 3 respiration in cardiac mitochondria from type-I diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2004;267(1-2):31–7.

Lee YT, Hsu CC, Lin MH, Liu KS, Yin MC. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol.* 2005;513(1-2):145–50.

Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM, George RP. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J.* 1985;228(3):653–60.

Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 2003;28(4):493–500.

Li F, Chong ZZ, Maiese K. Cell Life versus cell longevity: the mysteries surrounding the NAD<sup>+</sup> precursor nicotinamide. *Curr Med Chem.* 2006;13(8):883–95.

Liu Y, Su D, Zhang L, Wei S, Liu K, Peng M, Li H, Song Y. Endogenous L-Carnosine Level in Diabetes Rat Cardiac Muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2016;7.

Mahootchi E, Cannon Homaei S, Kleppe R, Winge I, Hegvik TA, Megias-Perez R, Totland C, Mogavero F, Baumann A, Glennon JC, Miletic H, Kursula P, Haavik J. GADL1 is a multifunctional decarboxylase with tissue-specific roles in  $\beta$ -alanine and carnosine production. *Sci Adv.* 2020;6:eabb3713.

Maiese K, Morhan SD, Chong ZZ. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res.* 2007;4(1):63–71.

Malatiali S, Francis I, Barac-Nieto M. Phlorizin prevents glomerular hyperfiltration but not hypertrophy in diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2008;305403.

Mannion AF, Jakeman PM, Dunnett M, Harris RC, Willan PL. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1992;64(1):47–50.

Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, Tyler DJ, Beeson JH, Clarke K, Carr CA, Heather LC. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:136.

Marciniak C, Marechal X, Montaigne D, Neviere R, Lancel S. Cardiac contractile function and mitochondrial respiration in diabetes-related mouse models. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:118.

Marsh SA, Dell'italia LJ, Chatham JC. Interaction of diet and diabetes on cardiovascular function in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(2):H282–92.

Martins CEC, Vanessa BSL, Ribeiro HQT, Tirapegui, J. Resistance training alone or combined with leucine supplementation improves the serum lipid profile of diabetic rats, whereas leucine alone does not. *Endocrine Regulations.* 2018;52(3):146–151.

Martins CEC, Vanessa BSL, Schoenfeld BJ, Tirapegui, J. Effects of leucine supplementation and resistance training on myopathy of diabetic rats. *Physiol Rep.* 2017;5(10):e13273.



Matthews JJ, Dolan E, Swinton PA, Santos L, Artioli GG, Turner MD, Elliott-Sale KJ, Sale C. Effect of Carnosine or  $\beta$ -Alanine Supplementation on Markers of Glycemic Control and Insulin Resistance in Humans and Animals: A Systematic Review and Meta-analysis. *Adv Nutr.* 2021;12(6):2216–2231.

Matthews JJ, Turner MD, Santos L, Elliott-Sale KJ, Sale C. Carnosine increases insulin-stimulated glucose uptake and reduces methylglyoxal-modified proteins in type-2 diabetic human skeletal muscle cells. *Amino Acids.* 2023;55(3):413–420.

McGuire M, Dumbleton M, MacDermott M, Bradford A. Contractile and electrical properties of sternohyoid muscle in streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(3):184–7.

Mifsud SA, Allen TJ, Bertram JF, Hulthen UL, Kelly DJ, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE. Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia.* 2001;44(7):878–82.

Mihm MJ, Seifert JL, Coyle CM, Bauer JA. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Sci.* 2001;69(5):527–42.

Mong MC, Chao CY, Yin MC. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet. *Eur J Pharmacol.* 2011;653(1-3):82–8.

Morakinyo AO, Awobajo FO, Adegoke OA. Effects of alpha lipoic acid on blood lipids, renal indices, antioxidant enzymes, insulin and glucose level in streptozotocin-diabetic rats. *Biology and Medicine.* 2013;5:26–33.

Moreira PI, Rolo AP, Sena C, Seiça R, Oliveira CR, Santos MS. Insulin attenuates diabetes-related mitochondrial alterations: a comparative study. *Med Chem.* 2006;2(3):299–308.

Mousavi F, Rohani HA, Khalili M, Roghani M. L-carnosine Improves Short-Term Spatial Recognition Memory and Passive Avoidance Learning and Memory in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology.* 2017;5(2):35–40.

Nagai K, Nijjima A, Yamano T, Otani H, Okumra N, Tsuruoka N, Nakai M, Kiso Y. Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(10):1138–45.

Naghshvar F, Abianeh SM, Ahmadashrafi S, Hosseinimehr SJ. Chemoprotective effects of carnosine against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(7):569–73.

Najafi R, Hosseini A, Ghaznavi H, Mehrzadi S, Sharifi AM. Neuroprotective effect of cerium oxide nanoparticles in a rat model of experimental diabetic neuropathy. *Brain Res Bull*. 2017;131:117–122.

Nishizawa Y, Koyama H, Inaba M. AGEs and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. *J Ren Nutr*. 2012;22(1):128–33.

Norgaard A, Thaysen TEH. Clinical Investigations Into the Effect of Intravenous Injection of Insulin.1. *Acta Medica Scandinavica*. 1929;72(1):492–510.

Obineche EN, Mensah-Brown E, Chandranath SI, Ahmed I, Naseer O, Adem A. Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2001;109(3):241–5.

Ochala J, Lehtokari VL, Iwamoto H, Li M, Feng HZ, Jin JP, Yagi N, Wallgren-Pettersson C, Péniisson-Besnier I, Larsson L. Disrupted myosin cross-bridge cycling kinetics triggers muscle weakness in nebulin-related myopathy. *FASEB J*. 2011;25(6):1903–13.

Oliveira PJ, Seïça R, Coxito PM, Rolo AP, Palmeira CM, Santos MS, Moreno AJ. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. *FEBS Lett*. 2003;554(3):511–4.

Peng W, Mao P, Liu L, Chen K, Zhong Y, Xia W, Guo Q, Tan SC, Rahmani J, Kord Varkaneh H, He P. Effect of carnosine supplementation on lipid profile, fasting blood glucose, HbA1C and insulin resistance: A systematic review and meta-analysis of long-term randomized controlled trials. *Complement Ther Med*. 2020;48:102241.

Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, Kettelhut IC. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol.* 1996;271:E340–7.

Perry TL, Hansen S, Love DL. Serum-carnosine deficiency in carnosinaemia. *Lancet.* 1968;1:1229–1230.

Perry TL, Hansen S, Tischler B, Bunting R, Berry K. Carnosinemia. A new metabolic disorder associated with neurologic disease and mental defect. *N Engl J Med.* 1967; 277(23):1219–27.

Peters V, Riedl E, Braunagel M, Höger S, Hauske S, Pfister F, Zschocke J, Lanthaler B, Benck U, Hammes HP, Krämer BK, Schmitt CP, Yard BA, Köppel H. Carnosine treatment in combination with ACE inhibition in diabetic rats. *Regul Pept.* 2014;194–195:36–40.

Peters V, Schmitt CP, Weigand T, Klingbeil K, Thiel C, van den Berg A, Calabrese V, Nawroth P, Fleming T, Forsberg E, Wagner AH, Hecker M, Vistoli G. Allosteric inhibition of carnosinase (CN1) by inducing a conformational shift. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017; 32(1):1102–1110.

Peters V, Zschocke J, Schmitt CP. Carnosinase, diabetes mellitus and the potential relevance of carnosinase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2018;41(1):39–47.

Pfister F, Riedl E, Wang Q, vom Hagen F, Deinzer M, Harmsen M, C, Molema G, Yard B, Feng Y, Hammes H, -P: Oral Carnosine Supplementation Prevents Vascular Damage in Experimental Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:125–136.

Pierce GN, Dhalla NS. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol.* 1985;(1):48–54.

Pinna C, Morazzoni P, Sala A. Proanthocyanidins from *Vitis vinifera* inhibit oxidative stress-induced vascular impairment in pulmonary arteries from diabetic rats. *Phytomedicine.* 2017;25:39–44.

Prokopieva VD, Yarygina EG, Bokhan NA, Ivanova SA. Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2939087.

Qiu J, Albrecht T, Zhang S, Hauske SJ, Rodriguez-Niño A, Zhang X, Nosan D, Pastene DO, Sticht C, Delatorre C, van Goor H, Porubsky S, Krämer BK, Yard BA. Human carnosinase 1 overexpression aggravates diabetes and renal impairment in BTBR Ob/Ob mice. *J Mol Med (Berl)*. 2020;98(9):1333–1346.

Rafiq K, Shamshad J, Sherajee, Nishiyama A, Sufiun MA, Mostofa M. Effects of indigenous medicinal plants of Bangladesh on blood glucose level and neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009;3(12):636–642.

Reddy VP, Garrett MR, Perry G, Smith MA. Carnosine: a versatile antioxidant and antiglycating agent. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2005;2005(18):pe12.

Rellier N, Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci*. 1999;64(17):1571–83.

Ribeiro HQT, Coqueiro AY, Lima VBS, Martins CEC, Tirapegui J. Leucine and resistance training improve hyperglycemia, white adipose tissue loss, and inflammatory parameters in an experimental model of type 1 diabetes. *Nutr Health*. 2018;24(1):19–27.

Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes*. 2006;55(5):1289–99.

Riedl E, Koepfel H, Brinkkoetter P, Sternik P, Steinbeisser H, Sauerhöfer S, Janssen B, van der Woude FJ, Yard BA. A CTG polymorphism in the CNDP1 gene determines the secretion of serum carnosinase in Cos-7 transfected cells. *Diabetes* 2007;56:2410–3.

Riedl E, Pfister F, Braunagel M, Brinkkötter P, Sternik P, Deinzer M, Bakker SJ, Henning RH, van den Born J, Krämer BK, Navis G, Hammes HP, Yard B, Koepfel H. Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(2):279–88.

Rubtsov AM. Molecular mechanisms of regulation of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels (ryanodine receptors), muscle fatigue, and Severin's phenomenon. *Biochemistry (Mosc.)*. 2001;66(10):1132–1143.

Russell ST, Rajani S, Dhadda RS, Tisdale MJ. Mechanism of induction of muscle protein loss by hyperglycaemia. *Exp Cell Res*. 2009;315(1):16–25.

Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107843.

Sakano T, Egusa AS, Kawauchi Y, Wu J, Nishimura T, Nakao N, Kuramoto A, Kawashima T, Shiotani S, Okada Y, Sato K, Yanai N. Pharmacokinetics and tissue distribution of orally administered imidazole dipeptides in carnosine synthase gene knockout mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2022;86(9):1276–1285.

Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM, Harris RC. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids*. 2013; 44(6):1477–91.

Samjoo IA, Safdar A, Hamadeh MJ, Raha S, Tarnopolsky MA. The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. *Nutr Diabetes*. 2013;16;3(9):e88.

Sauerhöfer S, Yuan G, Braun GS, Deinzer M, Neumaier M, Gretz N, Floege J, Kriz W, van der Woude F, Moeller MJ. L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes*. 2007;56(10):2425–32.

Severin CE, Boldyrev AA, Dupin AM. Biologicheskaya rol' gistidinovykh dipeptidov v vozбудimyykh tkaniakh [Biological role of histidine dipeptides in excitable tissues]. *Vopr Med Khim*. 1984;30(3):32–6.

Severin SE, Kirzon MV, Kaftanova TM. Vliianie karnozina i anserina na rabotu izolirovannoi myshtsy liagushki [Effect of carnosine and anserine on action of isolated frog muscles]. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1953;91(3):691–4.

Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes*. 1995 Oct;44(10):1139–46.

Shen X, Zheng S, Thongboonkerd V, Xu M, Pierce WM Jr, Klein JB, Epstein PN. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(5):E896–905.

Shi Q, Yan H, Li MY, Harding JJ. Effect of a combination of carnosine and aspirin eye drops on streptozotocin - induced diabetic cataract in rats. *Mol Vis*. 2009;15:2129–38.

Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(4):537–77.

Solana-Manrique C, Sanz FJ, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Carnosine: Therapeutic Implications in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2022;26;11(5):848.

Soliman KM, Mohamed AM, Metwally NS. Attenuation of Some Metabolic Deteriorations Induced by Diabetes Mellitus Using Carnosine. *Journal of Applied Sciences*. 2007;7(16):2252–2260.

Spaas J, Van Noten P, Keytsman C, Nieste I, Blancquaert L, Derave W, Eijnde BO. Carnosine and skeletal muscle dysfunction in a rodent multiple sclerosis model. *Amino Acids*. 2021;53(11):1749–1761.

Spector KS. Diabetic cardiomyopathy. *Clinical Cardiology*. 1998;21(12):885–887.

Spelnikov D, Harris RC. A kinetic model of carnosine synthesis in human skeletal muscle. *Amino Acids*. 2019;51(1):115–121.

Srikanthan P, Singhal A, Lee CC, Nagarajan R, Wilson N, Roberts CK, Hahn TJ, Thomas MA. Characterization of Intra-myocellular Lipids using 2D Localized Correlated Spectroscopy and Abdominal Fat using MRI in Type 2 Diabetes. *Magn Reson Insights*. 2012;15;5:29–36.

Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol*. 1999;111(2):117–23.

Steckelings, UM, Rompe F, Kashina E, Unger T. The evolving story of RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2009;23(6):693–703.

Stegen S, Everaert I, Deldicque L, Vallova S, de Courten B, Ukropcova B, Ukropec J, Derave W. Muscle histidine-containing dipeptides are elevated by glucose intolerance in both rodents and men. *PLoS One*. 2015;24;10(3):e0121062.

Stephenson GM, O'Callaghan A, Stephenson DG. Single-fiber study of contractile and biochemical properties of skeletal muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1994;43(5):622–8.

Stvolinskii SL, Dobrota D, Mezeshova V, Liptai T, Pronaiova N, Zalibera L, Boldyrev AA. Carnosine and anserine in working muscles-study using proton NMR spectroscopy. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*. 1992;57(9):1317–1323.

Suresh K, Chandrashekara S. Sample size estimation and power analysis for clinical research studies. *J Hum Reprod Sci*. 2012;5(1):7–13.

Sureshkumar K, Durairaj M, Srinivasan K, Goh KW, Undela K, Mahalingam VT, Ardianto C, Ming LC, Ganesan RM. Effect of L-Carnosine in Patients with Age-Related Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023;28(1):18.

Takeda N, Nakamura I, Hatanaka T, Ohkubo T, Nagano M. Myocardial mechanical and myosin isoenzyme alterations in streptozotocin-diabetic rats. *Jpn Heart J*. 1988;29(4):455–63.

Tallon MJ, Harris RC, Boobis LH, Fallowfield JL, Wise JA. The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. *J Strength Cond Res.* 2005;19(4):725–9.

Tanaka Y, Konno N, Kako KJ. Mitochondrial dysfunction observed in situ in cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. *Cardiovasc Res.* 1992;26(4):409–14.

Tancrède G, Rousseau-Mignerot S, Nadeau A. Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats. *Br J Exp Pathol.* 1983;64(2):117–23.

Tanokura M, Tasumi M, Miyazawa T. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance studies of histidine-containing di- and tripeptides. Estimation of the effects of charged groups on the pK<sub>a</sub> value of the imidazole ring. *Biopolymers.* 1976;15(2):393–401.

Tasić D, Dimov I, Petrović V, Savić T, Dimov D. Fiber Type Composition and Size of Fibers in the Rat Tibialis Anterior Muscle. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš.* 2011;28(3):161–168.

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

Tóbon-Velasco JC, Cuevas E, Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-κB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13(9):1615–26.

Trexler ET, Smith-Ryan AE, Stout JR, Hoffman JR, Wilborn CD, Sale C, Kreider RB, Jäger R, Earnest CP, Bannock L, Campbell B, Kalman D, Ziegenfuss TN, Antonio J. International society of sports nutrition position stand: Beta-Alanine. *J Int Soc Sports Nutr.* 2015;15:12–30.

Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2002;51(4):1166–71.



Tziakas DN, Chalikias GK, Kaski JC. Epidemiology of the diabetic heart. *Coronary Artery Disease*. 2005;16:pS3–S10.

Vahdatpour T, Nokhodchi A, Zakeri-Milani P, Mesgari-Abbasi M, Ahmadi-Asl N, Valizadeh H. Leucine-glycine and carnosine dipeptides prevent diabetes induced by multiple low-doses of streptozotocin in an experimental model of adult mice. *J Diabetes Investig*. 2019;10(5):1177–1188.

Vistoli G, Carini M, Aldini G. Transforming dietary peptides in promising lead compounds: the case of bioavailable carnosine analogs. *Amino Acids*. 2012;43(1):111–26.

Vistoli G, Orioli M, Pedretti A, Regazzoni L, Canevotti R, Negrisoni G, Carini M, Aldini G. Design, synthesis, and evaluation of carnosine derivatives as selective and efficient sequestering agents of cytotoxic reactive carbonyl species. *ChemMedChem*. 2009;4(6):967–75.

Vlassara H, Strike GE. Age restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(9):526–39.

Wang X, Hu Z, Hu J, Du J, Mitch WE. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006;147(9):4160–8.

Wang-Eckhardt L, Bastian A, Bruegmann T, Sasse P, Eckhardt M. Carnosine synthase deficiency is compatible with normal skeletal muscle and olfactory function but causes reduced olfactory sensitivity in aging mice. *J Biol Chem*. 2020;295:17100–17113.

Wang-Eckhardt L, Becker I, Wang Y, Yuan J, Eckhardt M. Absence of endogenous carnosine synthesis does not increase protein carbonylation and advanced lipoxidation end products in brain, kidney or muscle. *Amino Acids*. 2022;54(7):1013–1023.

Wang-Fischer Y, Garyantes T. Improving the Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model. *J Diabetes Res*. 2018;2018:8054073.

Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Sari FR, Gurusamy N, Veeraveedu PT, Mito S, Arozal W, Sukumaran V, Laksmanan AP, Soetikno V, Kodama M, Aizawa Y. Role of differential signaling pathways and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev.* 2010;6(4):280–90.

World Health Organization, “*Diabetes report*” 2023, [https:// www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes).

Wu J, Egusa A, Nishimura T. Carnosine synthase deficiency in mice affects protein metabolism in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;612:22–29.

Wu KK, Huan Y. Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis.* 2007;191(2):241–9.

Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2008;5:5.47.

Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V, Aguilar-Hernández MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal.* 2013;25(11):2185–97.

Xie RX, Li DW, Liu XC, Yang MF, Fang J, Sun BL, Zhang ZY, Yang XY. Carnosine attenuates brain oxidative stress and apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurochem Res.* 2017;42:541–551.

Yuneva MO, Bulygina ER, Gallant SC, Kramarenko GG, Stvolinsky SL, Semyonova ML, Boldyrev AA. Effect of Carnosine on Age-Induced Changes in Senescence-Accelerated Mice. *Journal of Anti-Aging Medicine.* 1999;337–342.

Zaloga GP, P. R. Roberts, T. E. Nelson, Carnosine: a novel peptide regulator of intracellular calcium and contractility in cardiac muscle. *New horizons.* 1996;4:26–35.

Zaloga GP, Roberts PR, Black KW, Lin M, Zapata-Sudo G, Sudo RT, Nelson TE. Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *Am J Physiol.* 1997;272:H462–8.

Zhang Y, Thai K, Jin T, Woo M, Gilbert RE. SIRT1 activation attenuates  $\alpha$  cell hyperplasia, hyperglucagonaemia and hyperglycaemia in STZ-diabetic mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):13972.

Zhao J, Conklin DJ, Guo Y, Zhang X, Obal D, Guo L, Jagatheesan G, Katragadda K, He L, Yin X. Cardiospecific overexpression of ATPGD1 (carnosine synthase) increases histidine dipeptide levels and prevents myocardial ischemia reperfusion injury. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(12):e015222.

Zhao K, Li Y, Wang Z, Han N, Wang Y. Carnosine Protects Mouse Podocytes from High Glucose Induced Apoptosis through PI3K/AKT and Nrf2 Pathways. *Biomed Res Int.* 2019;2019:4348973.