

EFEITO DA β -ALANINA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CEREBELO DE RATOS

Bruna Nitzke Minuzzi, Clovis Milton Duval Wannmacher

Introdução

A β -alaninemia é um erro inato do metabolismo do aminoácido β -alanina, o qual é um dos poucos β -aminoácidos que ocorrem naturalmente de forma endógena em mamíferos, diminui os níveis de taurina e é antagonista competitivo do ácido gama-aminobutírico (GABA). Nesta desordem, os níveis de β -alanina estão elevados nos tecidos e fluidos fisiológicos (Tiedje et al. 2010). Os mecanismos que ocorrem subjacentes ao dano neurológico nesta desordem permanecem desconhecidos, mas acredita-se que altas concentrações de β -alanina produzem efeitos diretos e indiretos. Os pacientes afetados apresentam disfunções neurológicas como convulsões, coma, sonolência, hipotonia, retardo mental e no desenvolvimento, podendo ser consequência de estresse oxidativo (Tiedje et al. 2010; Scriver et al. 2010). Acredita-se que estes efeitos podem ser relatados pelas desordens no metabolismo energético e distúrbios no estado redox dos tecidos, podendo envolver mecanismos tóxicos celulares e neurológicos (Gemelli et al. 2013; Halliwell, 2006).

O objetivo do trabalho é investigar o efeito da acumulação de β -alanina sobre os parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético, incluindo enzimas envolvidas na rede de fosforil transferência e na cadeia respiratória no cerebelo de ratos com 21 dias de vida, a fim de contribuir para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelos distúrbios neurológicos observados em pacientes β -alaninêmicos.

Resultados

Tabela 1. Efeito da administração crônica de β -alanina em parâmetros de estresse oxidativo no cerebelo de ratos.

Parâmetros de estresse oxidativo	Controle	β -alanina
Oxidação de DCFH (nmol DCF/mg proteína)	14,2 \pm 1,9	16,5 \pm 1,4*
Conteúdo total de Sulfidrilas (nmol TNB/mg proteína)	9,5 \pm 1,7	8,3 \pm 0,7*
Atividade GPx (U/mg proteína)	3,4 \pm 1,1	2,3 \pm 0,7*
Atividade SOD (U/mg proteína)	1,9 \pm 0,7	0,6 \pm 0,2*

DCFH: 2',7'-dihidrodiclorofluoresceína; GPx: glutatona peroxidase; SOD: superóxido dismutase. Dados expressos em média \pm desvio padrão. (n=7) *p<0.05 comparado ao controle (Teste t Student)

Tabela 2. Efeito da administração crônica de β -alanina na atividade das enzimas da rede de fosforil transferência no cerebelo de ratos.

Enzimas da rede de fosforil transferência	Controle	β -alanina
Hexocinase (μ mol NADH/mg proteína)	43,6 \pm 3,9	58,1 \pm 9,5*
GAPDH (μ mol NADH/mg proteína)	1,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2*
PK (μ mol piruvato/mg proteína)	2,7 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3*
AK (μ mol ATP/mg proteína)	1,6 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1*
CK-cit (μ mol creatina/mg proteína)	1,2 \pm 0,5	1,1 \pm 0,2
CK-mit (μ mol creatina/mg proteína)	2,3 \pm 0,7	3,7 \pm 0,6*
LDH (UI/L)	158 \pm 11	120 \pm 16*

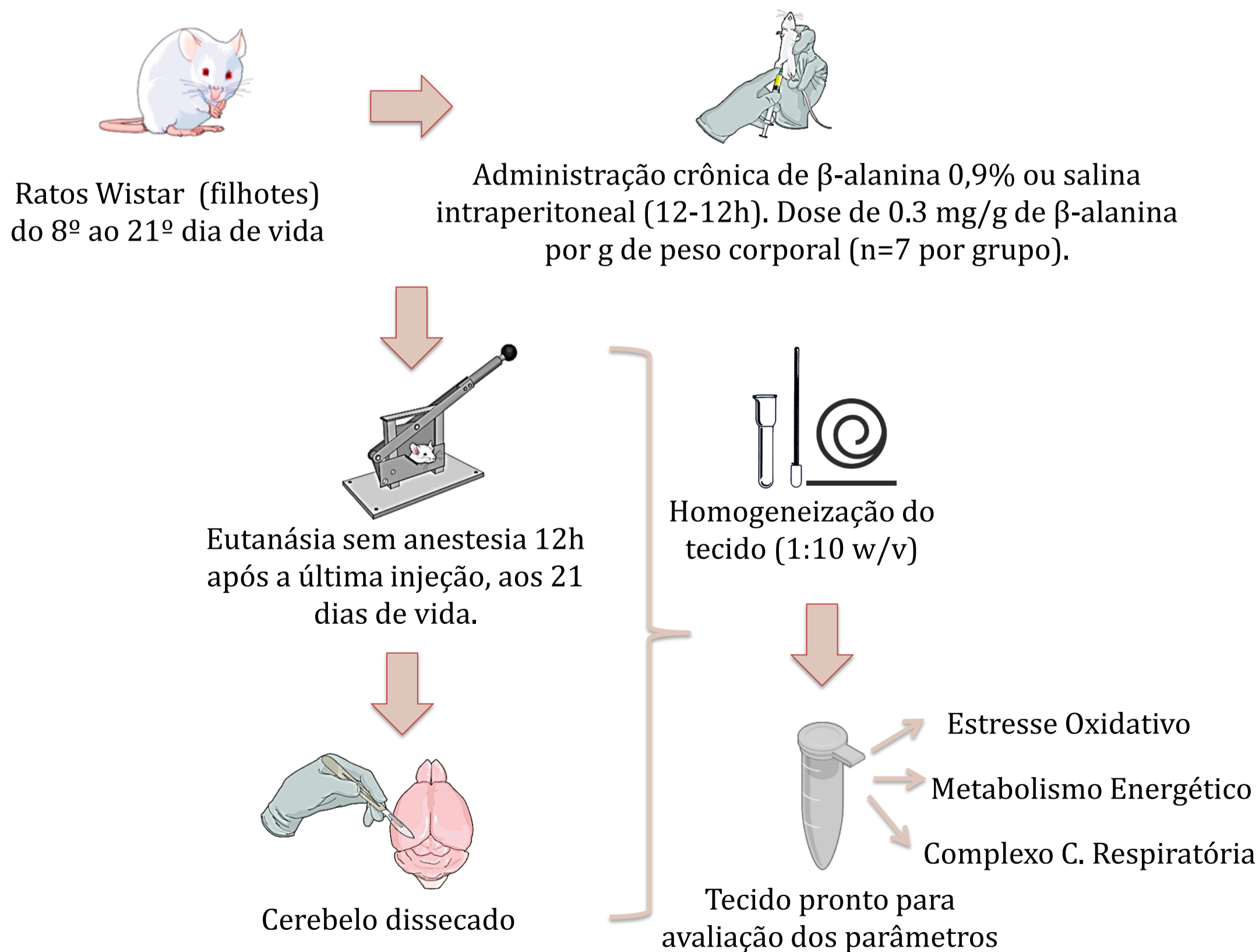
GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; PK= piruvato cinase; AK= adenilato cinase; CK-cit= creatina cinase citosólica; CK-mit= creatina cinase mitocondrial; LDH= lactato desidrogenase. Dados expressos em média \pm desvio padrão. (n=7) *p<0.05 comparado ao controle (Teste t Student).

Tabela 3. Efeito da administração crônica de β -alanina na atividade da cadeia respiratória no cerebelo de ratos.

Atividade do complexo da cadeia respiratória	Controle	β -alanina
Complexo II (nmol DCIP/mg proteína)	4,8 \pm 0,9	6,2 \pm 1,1*
Complexo II-III (nmol citocromo c/mg proteína)	19,3 \pm 4,8	21,0 \pm 2,6
Complexo IV (nmol citocromo c/mg proteína)	19,1 \pm 5,8	34,2 \pm 7,4*
SDH (nmol DCIP/mg proteína)	12,4 \pm 1,1	16,1 \pm 3,5*

DCIP= diclorofenolindofenol; SDH: succinato desidrogenase. Dados expressos em média \pm desvio padrão. (n=7) *p<0.05 comparado ao controle (Teste t Student).

Metodologia



Discussão

Nós observamos que a administração de β -alanina aumentou a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) no cérebro de ratos. Há evidências de que a produção de EROs e radicais livres (RL) levem à lesões cerebrais, mesmo com enzimas antioxidantes como CAT, GSH, GPx e SOD, das quais as duas últimas mantêm a homeostase do estado redox (Alirezai, 2015), e tiveram uma significativa diminuição, provavelmente como consequência do aumento da produção de peróxido de hidrogênio e superóxido, que inibem as mesmas quando em alta concentração (Halliwell, 2000). Este aumento na produção de EROs é acompanhado pelo aumento do consumo e metabolismo glicolítico celular, que estimula a rede de fosforil transferência, catalisada pelas enzimas HK, GPDH, CK, AK, PK e LDH (Dzeja et al. 1999, 2002, 2003).

O complexo respiratório II e III não foi alterado, corroborando com a hipótese do aumento da atividade mitocondrial aumentar também o O_2 de escape favorecendo o estresse oxidativo. O aumento da atividade da CK-mit pode ser uma tentativa de manter o tecido em homeostase energética (Shetewy et al. 2016).

Além disso, a β -alanina é capaz de comprometer o metabolismo do GABA e da Taurina, importantes para a neurogênese cerebelar. Em resumo, a β -alanina administrada cronicamente causa danos oxidativos celulares gerando perturbações energéticas significativas.

Bibliografia

- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145.
- Alirezai M (2015) Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats. *Iran J Basic Med Sci* 18:950-957
- da Silva WS, Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT et al (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem* 279:39846-55. d
- Dzeja PP (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039-2047.
- Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C et al (2002) Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10156-61.
- Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM et al (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137-43
- Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, et al (2013) Effects of β -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell Biochem* 380:161-70.
- Halliwell B (2000) Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 72:1082-7
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-58.
- Hugues BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase. *Clin Chim Acta* 7:597-603
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-31.
- Leong SF, Lai JC, Lim L, Clark JB (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 36:1548-56.
- Lowry OH, Rosebrough NJ et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.
- Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, pp 243-7
- Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC (2001) Disorders of β - and γ - amino acids in free and peptide-linked forms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (ed) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw Hill, New York, NY, pp 2079-2105
- Shetewy A, Danielle KS (2016) Mitochondrial defects associated with β -alanine toxicity: relevance to hyper-beta-alaninemia. *Mol Cell Biochem* 416:11-22.
- Tiedje KE, Stevens K, Barnes S, Weaver DF (2010) Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Int* 57:177-88.
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-33