



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-BIOQUÍMICA

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA β -ALANINA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO DE RATOS**

JOVENS

TANISE GEMELLI

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-BIOQUÍMICA

**EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA β -ALANINA SOBRE ALGUNS PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO DE RATOS**

JOVENS

ALUNA: TANISE GEMELLI

ORIENTADOR: PROF. DR. CLOVIS MILTON DUVAL WANNMACHER

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica

PORTO ALEGRE, 2012.

**Dedico este trabalho à minha família, pelo
incentivo constante e ao meu namorado Rodrigo pela
compreensão, apoio e amor.**

AGRADECIMENTOS

Ao querido Prof. Dr. Clóvis M. D. Wannmacher, pela oportunidade, orientação, paciência e carinho em todos os momentos.

Aos professores do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo, Moacir Wajner, Carlos Severo Dutra Filho e Ângela T. S. Wyse, que também contribuíram para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do laboratório 34D, em especial à Tarsila, Andréia, Caroline e Priscila, pela amizade, ajuda e colaboração constante para o desenvolvimento do trabalho.

Aos queridos amigos e colegas do laboratório 34C, em especial à Denise e ao Rodrigo que sempre estiveram ao meu lado todos esses anos e às bolsistas de iniciação científica Nariete e Aline, pelo auxílio fundamental durante a realização deste trabalho.

Ao meu pai e minha madrinha (*in memoriam*), pelo exemplo de caráter e honestidade. Aos amigos e familiares, em especial ao meu primo Luiz pelo apoio e incentivo.

À minha mãe Marina e aos meus irmãos Juliano e Sabrine, meu alicerce, todos os agradecimentos possíveis.

Ao Rodrigo, peça fundamental na minha vida, pelo seu companherismo e amor.

À Profa. Cláudia minha mentora e meu espelho, sem você nada disso seria possível.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica/UFRGS.

À CAPES, CNPq, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS e PRONEX, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
PARTE I.....	10
I.1 INTRODUÇÃO.....	11
I.1.1 β -aminoácido.....	11
I.1.2 Transporte de β -alanina.....	13
I.1.3 β -alanina como Neurotransmissor.....	13
I.1.4 β -Alaninemia.....	15
I.1.5 β -alanina e suplementação.....	16
I.1.6 Espécies reativas (ER).....	17
I.1.7 Estresse Oxidativo.....	20
I.1.8 Sistema de defesa antioxidante.....	21
I.1.9 Justificativa.....	23
I.2 OBJETIVOS.....	24
I.2.1 Objetivos gerais.....	24
I.2.2 Objetivos específicos.....	24
PARTE II.....	25
II Artigo Científico.....	26
PARTE III.....	56
III.3 DISCUSSÃO.....	57
III.4 CONCLUSÕES.....	62
III.5 PERSPECTIVAS.....	64
III.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

RESUMO

β -alanina é um β -aminoácido derivado da degradação da pirimidina uracila. Em altas concentrações desenvolve uma desordem muito rara da via de degradação das pirimidinas, conhecida como β -alaninemia. O acúmulo do β -aminoácido pode causar consequências bioquímicas como: depleção dos níveis de taurina, aumento de espécies reativas e excreção aumentada de GABA. Essas alterações levam a um distúrbio no desenvolvimento neurológico, contribuindo para a patologia da doença. A β -alanina também é utilizada como suplemento nutricional por atletas visando melhor desempenho físico. Em nosso estudo avaliamos o efeito *in vitro* e *in vivo* da β -alanina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar de 21 dias de idade. Os animais receberam três injeções subcutâneas de β -alanina (300 mg/Kg de peso corporal) e os controles receberam o mesmo volume de solução salina (NaCl 0.85%) em intervalos de três horas. Nos experimentos *in vitro* verificamos a influência de diferentes concentrações de β -alanina (0,5 e 1,0 mM), onde observamos que o β -aminoácido possui capacidade de alterar a homeostasia das enzimas antioxidantes CAT e SOD, pois em ambos tecidos estudados a atividades da CAT foi inibida e da SOD aumentada na concentração mais alta (1,0 mM). Verificamos que a β -alanina *in vitro* diminui a oxidação do DCFH em cerebelo e aumenta o conteúdo total de GSH em córtex cerebral, não alterando os outros parâmetros analisados, entretanto, não foi observado na administração aguda de β -alanina. Nos experimentos *in vivo* observamos que o DCFH juntamente com o conteúdo total de tióis aumentaram nos dois tecidos estudados. Não observamos diferença significativa quanto aos níveis de GSH e TBARS. O mecanismo de ação da β -alanina sobre a atividade das enzimas antioxidantes foi diferente nos dois experimentos, pois no modelo agudo a atividade da CAT aumentou, no entanto, a atividade da SOD foi inibida pela β -alanina em córtex cerebral e cerebelo. Portanto, observamos que a β -alanina altera a atividade das enzimas antioxidantes, aumentando com isso o conteúdo de espécies reativas e gerando possivelmente estresse oxidativo. Esses achados podem contribuir em partes com as alterações neurológicas encontrada em pacientes com β -alaninemia. Além disso, os possíveis efeitos secundários da suplementação nutricional de β -alanina necessitam de mais atenção.

ABSTRACT

β -alanine is an β -amino acid derived from the degradation of pyrimidine uracil. In high concentrations develops a very rare disorder of pyrimidine degradation pathway, known as β -alaninemia. The accumulation of β -amino acid can cause biochemical consequences such as: depletion of taurine levels, increase of reactive species and increased excretion of GABA. These conditions may cause neurological disturbances, contributing to the pathology of the disease. The β -alanine is also used as a nutritional supplement by athletes seeking to improve physical performance. In this study we evaluated the *in vitro* and *in vivo* effects of β -alanine on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of 21-day-old rats. The animals received three peritoneal injections of β -alanine (300 mg /Kg of body weight) and the controls received the same volume of saline solution (NaCl 0.85%) at 3 hours intervals. *In vitro* experiments verified the influence of different concentrations of β -alanine (0.5 and 1.0 mM), where we observe that the β -amino acid has the ability to alter the homeostasis of enzymes SOD and CAT antioxidant, since in both tissues studied was inhibited activities of CAT and SOD increased at the highest concentration (1.0 mM). We found that the *in vitro* β -alanine decreases the oxidation of DCFH in cerebellum and increases the total content of GSH in cerebral cortex, without altering other parameters, however, was not observed in the acute administration of β -alanine. *In vivo* experiments we observed that the DCFH along with the entire content of thiols increased in both tissues studied. No significant difference in the levels of GSH and TBARS. The mechanism of action of β -alanine on the activity of the antioxidant enzymes was different in the two experiments, in acute model of CAT activity increased, however, SOD activity was inhibited by β -alanine in cerebral cortex and cerebellum. Therefore, we found that β -alanine alters the activity of enzymes antioxidants, thus increasing the content of reactive species and possibly generating oxidative stress. These findings may in part contribute to the neurological alterations found in patients with β -alaninemia. Besides, possible side effects of the nutritional supplementation of β -alanine need more attention.

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

BHE – Barreira hematoencefálica

CAT – Catalase

CuZnSOD – Cobre-Zinco superóxido dismutase

DCF - 2',7'diclorofluorescência

DPD – Diidropirimidina desidrogenase

DHP – Diidropirimidinase

ER – Espécies reativas

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GABA-T – GABA transaminase

GABA_A – Receptor GABAérgico ionotrópico A

GABA_B – Receptor GABAérgico metabotrópico B

GABA_C – Receptor GABAérgico ionotrópico C

GAT – Transportador de GABA

GSH – Glutathiona reduzida

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MnSOD – Manganês superóxido dismutase

O₂ – Oxigênio molecular

O²⁻ – Ânion superóxido

OH• – Radical hidroxila

SNC – Sistema nervoso central

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UP – β-alanina sintase

PARTE I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 β -aminoácido

β -alanina é o β -aminoácido de maior ocorrência endógena nos seres humanos e mamíferos, sendo estruturalmente o β -aminoácido mais simples encontrado. β -alanina é um β -aminoácido derivado da degradação da pirimidina uracila e precursor do substrato oxidativo acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Scriver et al, 2001). Uracila e a timina são degradadas em quatro etapas, sendo que as três primeiras etapas, em ambas as vias, são controladas pelas mesmas enzimas. Essas enzimas incluem: diidropirimidina desidrogenase (DPD, 1.3.1.2), diidropirimidinase (DHP, 3.5.2.2) e β -alanina sintase (UP, 3.5.1.6; também chamada de β -ureidopropionase) (Tiedje et al, 2010) (Figura 1).

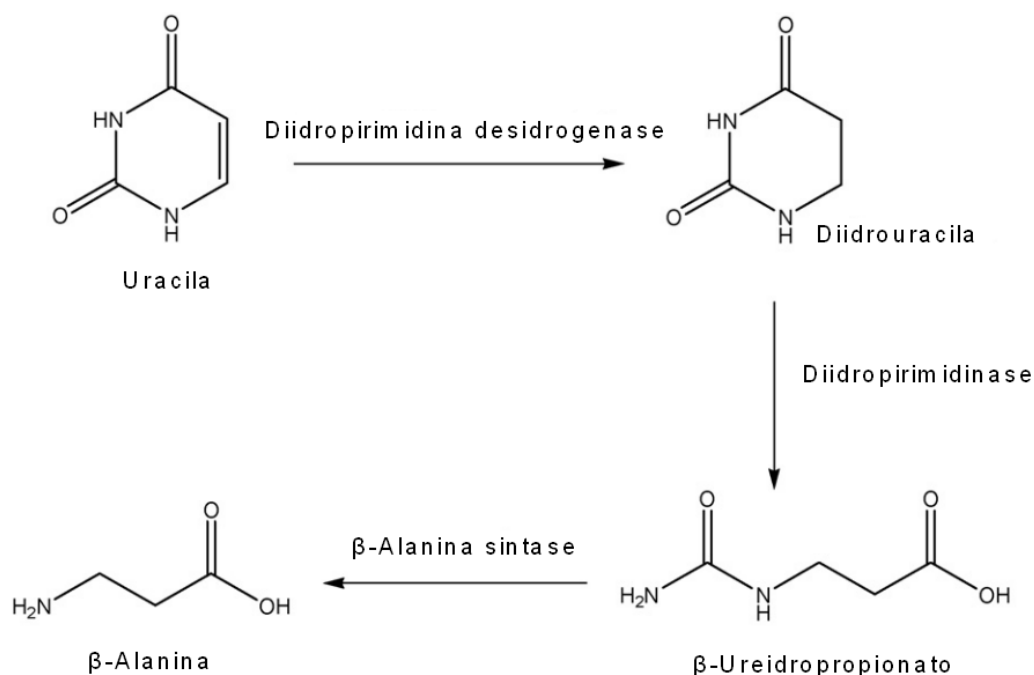


Figura 1: Via metabólica das pirimidinas utilizada para conversão de uracila em β -alanina. Adaptado de Tiedje et al, 2010.

Após a síntese, a β -alanina pode ser metabolizada por diferentes vias: a primeira e mais rápida é a formação de carnosina, em que β -alanina e histidina vão originar carnosina pela ação da enzima carnosina sintase. Outra via envolve duas diferentes enzimas, a β -alanina- α -cetoglutarato transaminase e β -alanina-piruvato transaminase (Van Gennip et al, 1997). As aminotransferases são usadas subsequentemente no metabolismo da β -alanina em ácido malônico semialdeído (Scriver et al, 2001) (Figura 2). O ácido malônico semialdeído pode ser novamente convertido à β -alanina pela enzima GABA-transaminase (GABA-T) em uma reação de transaminação reversível (Kihara et al, 1988).

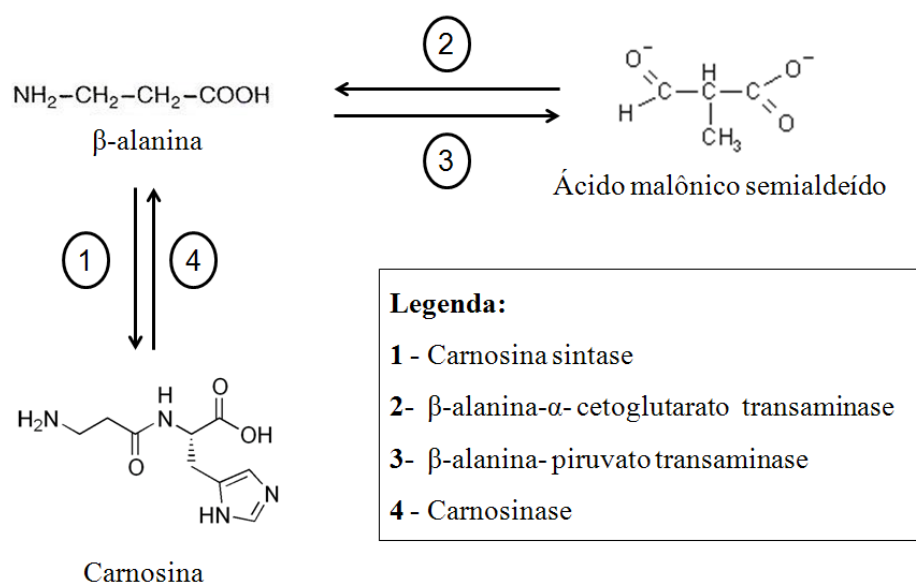


Figura 2: Principais vias de metabolização da β -alanina. Adaptado de Scriver et al, 2001.

Além das outras enzimas, a GABA-T é igualmente ativa para β -alanina e ácido γ -aminobutírico (GABA), sendo a concentração endógena e síntese de β -alanina influenciável significativamente por GABA-T, indicando que essa enzima, juntamente com as outras enzimas, está envolvida na regulação dos níveis de β -alanina no sistema

nervoso central (SNC) (Tiedje et al, 2010; Baxter e Roberts, 1958; Hayaishi et al, 1961). Outra transaminase envolvida na homeostasia da β -alanina é a enzima β -alanina- α -alanina transaminase, a qual catalisa a transaminação da β -alanina e piruvato a ácido malônico semialdeído e L- α -alanina (Hayaishi et al, 1961).

A β -alanina é amplamente distribuída em todo cérebro (Berkman, et al, 1998). Ela foi identificada no hipocampo, sistema límbico e neocórtex. Também foi identificado um transporte ativo capaz de transportar β -alanina e análogos relacionados através da barreira hematoencefálica (BHE) por transportadores de β -aminoácidos para dentro do SNC (Tiedje et al, 2010).

I.1.2 Transporte de β -alanina

Existem no SNC vários transportadores importantes que a β -alanina pode utilizar e influenciar. Os principais são os transportadores de GABA (GAT), dos quais já foram caracterizados quatro tipos de GATs (GAT-1, GAT-2, GAT-3 e GAT-4), encontrados em membranas plasmáticas celulares e dependentes do gradiente Na^+/Cl^- (Borden et al, 1992, 1994, 1995; Clark et al, 1992). Ambos GAT-3 e GAT-4 são capazes de transportar com alta afinidade a β -alanina. O K_m do GAT-3 e do GAT-4 para captação de GABA e β -alanina são de 18 μM e 28 μM , respectivamente. Para o GAT-4 a afinidade da β -alanina é um pouco menor, pois possui um K_m mais alto de 99 μM quando comparado com o GAT-3 (Liu et al, 1993). O β -aminoácido pode ser transportado por esses transportadores em taxas elevadas no SNC, sendo que a presença de β -alanina pode controlar o transporte de GABA por competição. A β -alanina pode utilizar também o GAT-2 para seu transporte, e quando utilizado esse mecanismo, a β -alanina pode inibir em partes a absorção do GABA pelo GAT-2, tendo assim a

capacidade de regular as concentrações de GABA no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Jursky e Nelson, 1999).

I.1.3 β -alanina como Neurotransmissor

É amplamente aceito que GABA, glutamato e glicina possuem funções neurotransmissoras no SNC em mamíferos, mas o papel da β -alanina como um neurotransmissor é ainda um pouco controverso. Werman (1966) estabeleceu alguns critérios que têm sido utilizados para identificação e verificação de importantes neurotransmissores: localização pré-sináptica, liberação de Ca^{2+} , liberação sob estímulo específico neuronal e presença de receptores pós-sinápticos.

Quando as concentrações de β -alanina no SNC são altas, ela assume um papel de neurotransmissor, pois as concentrações armazenadas são comparáveis as de outros neurotransmissores conhecidos, incluindo a acetilcolina, dopamina e noraepinefrina (Scriver et al, 2001). Quando comparado com o neurotransmissor GABA, a β -alanina possui um potencial parecido, atua como um inibidor e depressor das atividades neuronais com um rápido início (Krnjevic, 1965). Dados cinéticos sugerem que GABA, β -alanina e glicina possuem a mesma família de transportadores vesiculares e que os três inibem uns aos outros competitivamente (Scriver et al, 2001). A β -alanina atua em quatro receptores reconhecidos e descritos, os receptores GABAérgicos ionotrópicos A (GABA_A) e GABAérgicos ionotrópicos C (GABA_C), receptor de glicina co-agonista com sítios de NMDA (estricnina insensível) e receptores de glicina local (estricnina sensível) (Mori et al, 2002; Tiedje et al, 2010). Para atuar nesses receptores o β -aminoácido é liberado dos neurônios para fenda sináptica por um processo dependente de Ca^{2+} , tal como os neurotransmissores convencionais; após a liberação ela se difunde

pela fenda sináptica para posterior ligação aos receptores pós-sinápticos (Sandberg e Corazzi, 1983; Tiedje et al, 2010) (Figura 3).

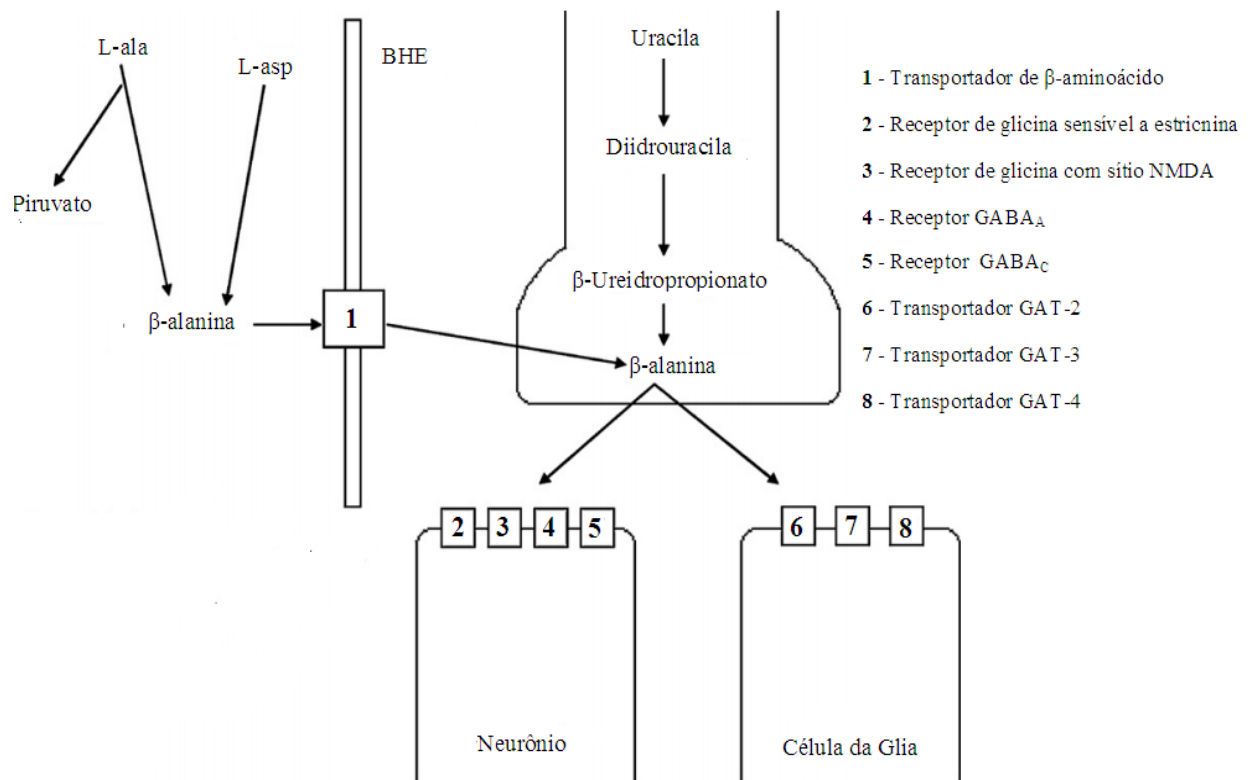


Figura 3: Receptores, transportadores e distribuição da β -alanina no SNC. L-ala: L-alanina, L-asp: L-aspartato, BHE: barreira hematoencefálica. Adaptado de Tiedje et al, 2010.

I.1.4 β -Alaninemia

É uma desordem muito rara do metabolismo das pirimidinas com apenas dois casos reportados na literatura (Scriver et al, 2001). A β -alaninemia é caracterizada pelo acúmulo de β -alanina, pela deficiência total ou parcial das transaminases β -alanina- α -cetoglutarato transaminase e β -alanina-piruvato transaminase, as quais metabolizam o β -aminoácido em ácido malônico semialdeído (Scriver et al, 2001). A deficiência das transaminases parece ser determinada por um gene recessivo incompleto além de outros

possíveis fatores familiares, mas seu modo de herança ainda não é completamente conhecido (Scriver e Gibson, 1995).

As concentrações encontradas nos pacientes afetados variam de 20 a 51 μ M de β -alanina no plasma, sendo as concentrações plasmáticas normais abaixo de 14 μ M. As principais manifestações bioquímicas, além do aumento de β -alanina no sangue e na urina, são excreção aumentada de GABA, carnosina e taurina na urina e aumento plasmático de GABA. Os portadores da doença apresentam encefalopatia, sonolência, hipotonia, hiporeflexia, letargia, retardo mental, obesidade e convulsões, causados pelos níveis aumentados de β -alanina (Scriver et al, 2001). Esses pacientes apresentam também o cérebro edematoso e pequeno, os ventrículos cerebrais dilatados e alterações microscópicas na substância branca (Scriver e Gibson, 1995).

O diagnóstico inicial da β -alaninemia é feito pela quantificação dos níveis plasmáticos de β -alanina e de GABA. Esses resultados podem ser acompanhados de hiper-aminoacidúria (aumento de taurina, carnosina e GABA na urina) ou presença de algumas das manifestações clínicas citadas. O tratamento com piridoxina melhora sintomas clínicos como convulsões e letargia. A dosagem administrada nos pacientes varia de acordo com a idade e o grau de deficiência das transaminase, podendo ser de 10mg/dia até 100mg/dia de piridoxina. Nenhuma das terapias anticonvulsivantes são eficazes no tratamento dessa patologia (Van Gennip et al, 1997; Scriver et al, 2001).

I.1.5 β -alanina e suplementação

A suplementação com β -alanina vem sendo muito utilizada com o objetivo de melhorar a performance do exercício e diminuir a fadiga muscular pós-treino. Esses benefícios observados com a suplementação de β -alanina não são diretamente causados

pela ação da β -alanina, mas principalmente por ela ser um intermediário da síntese de carnosina no tecido muscular (Stout et al, 2008). A suplementação de 4-6.4g/dia via oral de β -alanina aumenta significativamente o teor de carnosina intramuscular e que essa elevação está relacionada com a melhora no desempenho físico e da capacidade física no limiar de fadiga (Harris et al, 1990; Hill et al, 2007).

A diminuição do pH intramuscular induzido pelo exercício pode interferir no processo de acoplamento excitação-contração do músculo esquelético, podendo levar à diminuição da produção de compostos energéticos contribuindo para a fadiga muscular (Fitts e Holloszy, 1976). Portanto, a manutenção do pH intracelular durante o exercício é de extrema importância para a função muscular normal em atletas. A fim de manter a homeostase do pH, vários sistemas tampões estão envolvidos, incluindo a exportação ativa de H^+ do músculo. No entanto, a primeira linha de defesa continua sendo o tamponamento de H^+ por tampões intracelulares, principalmente compostos de fosfatos e carnosina (Harris et al, 2006). Com isso, o aumento dos níveis de carnosina no músculo esquelético, devido a suplementação com β -alanina, deve melhorar a capacidade intra-muscular de tamponamento, levando a um retardo no surgimento da fadiga em certos tipos de exercício (Stout et al, 2008).

Entretanto, altas concentrações de β -alanina podem não somente aumentar o conteúdo de carnosina, mas também diminuir os níveis de taurina, pois a β -alanina é um potente inibidor do transporte de taurina (Parildar-Karpuzoğlu et al, 2007). A taurina é um β -aminoácido essencial em diversos processos biológicos com no desenvolvimento do SNC e retina. É conhecida também por sua atividade hepatoprotetora, neuroprotetora e propriedades antioxidante. Sua deficiência está associada com diversos processos patológico, incluindo cardiomiopatia, degeneração da retina e retardo no crescimento (Dawson et al, 2002).

Portanto, o uso de β -alanina como suplemento nutricional em qualquer fase deve ser feito com atenção, pois altas concentrações do β -aminoácido pode acarretar não somente benefícios.

I.1.6 Espécies reativas (ER)

O termo espécies reativas (ER) de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são frequentemente usados para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-los altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (Valko et al, 2007).

As ER são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes das ER são as organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias, que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Shami e Moreira, 2004).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O_2), através do citocromo oxidase mitocondrial, sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O) (Bergendi et al, 1999). No entanto, aproximadamente 5% do O_2 utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não são reduzidos à H_2O , podendo ser convertidos em reativos intermediários (Boveris, 1998) (Figura 4).

As EROs podem ser produzidas no citoplasma, nas mitocôndrias ou membranas celulares. O alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996; Yu e Anderson, 1997). Entre as principais formas de EROs estão: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que é decorrente de processos metabólicos ou ativação do oxigênio por irradiação, é teoricamente a primeira ERO formada e apresenta uma baixa capacidade de oxidação quando comparado com outras EROs (Valko et al, 2007). O radical hidroxila ($OH\cdot$) possui uma baixa capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares, enquanto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é capaz de atravessar a membrana nuclear e reagir com outros radicais induzindo danos a moléculas por meio de reações enzimáticas. O H_2O_2 pode participar de duas reações: a primeira é a reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com Fe^{2+} formando Fe^{3+} e $OH\cdot$, e a segunda é a reação de Haber-Weiss, em que o H_2O_2 mais o $O_2^{\cdot-}$ também produzem $OH\cdot$ (Anderson, 1996).

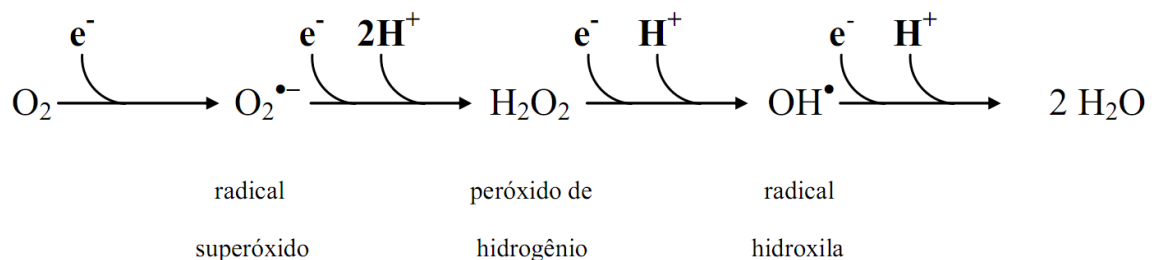


Figura 4: Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. Adaptado de Boveris, 1998.

Altas concentrações de EROs podem ser importantes mediadores de danos a estrutura celular, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. O $OH\cdot$ é a espécie mais reativa a todos componentes do DNA, reagindo com bases púricas e pirimídicas. Outros

constituíntes celulares extremamente sensíveis a esse radical são os ácidos graxos poliinsaturados, onde o $\text{OH}\cdot$ ataca os resíduos de fosfolipídeos (Halliwell, 2000).

Os mecanismos pelos quais as EROs oxidam proteínas está bem elucidado. A cadeia lateral dos aminoácidos de proteínas são os alvos de oxidação, em particular os resíduos de cisteína e metionina são mais suscetíveis à ação das EROs e ERNs. As oxidações nos resíduos de cisteína formam reversivelmente pontes de dissulfeto entre os grupos tiólicos das proteínas, diminuindo as concentrações moleculares de tióis, podem ainda quebrar essas pontes de dissulfeto inativando proteínas ativas (Valko et al, 2007). A concentração de grupos carbonilas é gerada por diferentes mecanismos e são bons indicativos de presença de EROs.

I.1.7 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi definido em 1991 como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial”, como mostra a figura 5 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

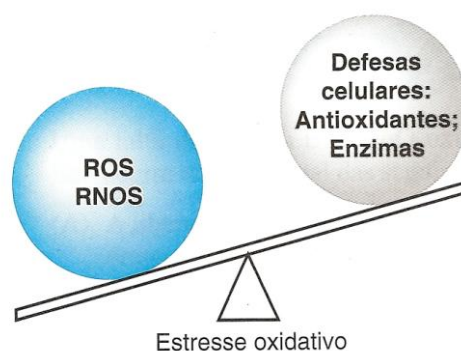


Figura 5: Estresse oxidativo x mecanismos de defesa. ROS: Espécies reativas de oxigênio, RNOS: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adaptado de Marks et al, 2007.

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de uma diminuição dos antioxidantes e/ou da produção aumentada de EROs e ERNs, gerando assim, um acúmulo das ER que causa danos à estrutura das biomoléculas, tais como DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. Estudos recentes tem demonstrados que essas alterações podem estar envolvidas na fisiopatologia de vários erros inatos do metabolismo e doenças neurodegenerativas, visto que algumas dessas patologias apresentam alto nível de ER (Artuch et al, 2004).

I.1.8 Sistema de defesa antioxidante

O organismo possui mecanismos de defesa contra a ação tóxica das EROs e ERNs, diminuindo ou eliminando as consequências negativas de seus efeitos no organismo (Marks et al, 2007).

O excesso de ER no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. A diminuição dos antioxidantes pode ser causada pela diminuição da atividade das enzimas de defesa antioxidante [cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), manganês superóxido dismutase (MnSOD), catalase (CAT) ou glutathione peroxidase (GSH-Px)] ou pela deficiência nutricional de antioxidantes e/ou outros constituintes dietéticos essenciais (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos contendo enxofre necessário para a síntese de glutathione, ou riboflavina, necessária para a produção de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um cofator da glutathione redutase) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O sistema de proteção que diminui a influência negativa de EROs/ERNs no organismo é constituído de defesas enzimáticas e não enzimáticas apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Defesas enzimáticas e não enzimáticas. Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 1999; Bergendi et al, 1999

SISTEMA DE PROTEÇÃO	EXEMPLOS
Enzimas que catalisam a remoção de radicais livres e outras ER	<ul style="list-style-type: none"> • superóxido dismutase • catalase • glutaciona peroxidase
Proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidante como íon ferro, cobre e heme	<ul style="list-style-type: none"> • transferrina • haptoglobulinas • hemopexina
Agentes que protegem biomoléculas contra danos e agentes de baixo peso molecular que removam ERO/ERN	<ul style="list-style-type: none"> • glutaciona • ácido ascórbico • α-tocoferol • antioxidantes-tióis-especificos

De acordo com Halliwell (2000), "Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo".

I.1.9 Justificativa

A β -alanina é um dos β -aminoácidos mais abundantes nos organismos vivos e sua síntese é derivada do metabolismo das pirimidinas. No entanto, pouco se conhece sobre a atuação da β -alanina no SNC em desenvolvimento. Sabe-se que altas concentrações de β -alanina inibe o transporte de taurina para o SNC (β -aminoácido essencial no desenvolvimento cerebral), diminui a recaptação do GABA, altera o metabolismo da glicina e aumenta os níveis celulares de carnosina (Dawson et al, 2002; Tiedje et al, 2010). Entretanto, não se sabe ainda os mecanismos moleculares pelos quais a β -alanina causa muitos desses efeitos e se ela como outros aminoácidos aumenta a produção de ER e consequentemente o estresse oxidativo.

Dessa forma, a sobrecarga de β -alanina pode ocorrer por um defeito genético enzimático conhecido como β -alaninemia, onde as principais enzimas do seu metabolismo estão defeituosas, ou ainda pela suplementação nutricional hoje muito utilizada por atletas (Hill et al, 2007; Scriver et al, 2001). Visto que, os mecanismos moleculares de ação da β -alanina no SNC são poucos estudados, o trabalho de pesquisa pretende contribuir para o melhor entendimento da atuação do β -aminoácido no SNC frente ao estresse oxidativo, podendo assim contribuir para seu melhor esclarecimento.

I.2 OBJETIVOS

I.2.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da β -alanina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos Wistar de 21 dias de idade.

I.2.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da β -alanina em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, tais como:

- Atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD;
- Determinação do conteúdo total de tióis;
- Mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Medida de ER pela oxidação do 2'7'diclorofluorescência (DCF);
- Quantificação do conteúdo de GSH.

PARTE II
ARTIGO CIENTÍFICO

**In vitro and in vivo effects of β -alanine on some parameters of oxidative stress in
cerebral cortex and cerebellum of rats**

Tanise Gemelli, Rodrigo Binkowski de Andrade, Denise Bertin Rojas, Aline Guimarães
Campos, Cláudia Funchal, Clovis Milton Duval Wannmacher

Periódico: Neurochemical Research

Status: Submetido

Dear Wannmacher:

I have received the reports from our advisors on your manuscript, "In vitro and in vivo effects of β-alanine on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of rats", which you submitted to Neurochemical Research.

Based on the advice received, I have decided that your manuscript could be reconsidered for publication should you be prepared to incorporate major revisions. When preparing your revised manuscript, you are asked to carefully consider the reviewer comments which are attached, and submit a list of the points raised and your responses, also specifying the changes made in the manuscript. Your list of responses should be uploaded as a file in addition to your revised manuscript.

Please note that such a thoroughly revised manuscript will be considered a new submission.

In order to submit your revised manuscript electronically, please access the following web site:

<http://nere.edmgr.com/>

Best regards,

Abel Lajtha

Editor-in-Chief

Neurochemical Research

In vitro and in vivo effects of β -alanine on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of rats

Tanise Gemelli¹, Rodrigo Binkowski de Andrade¹, Denise Bertin Rojas¹, Aline Guimarães Campos¹, Cláudia Funchal², Clovis Milton Duval Wannmacher¹

1 - Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, CEP 90.035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

2 - Centro Universitário Metodista IPA, Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80, CEP 90420-060 Porto Alegre, RS, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR: Clovis Milton Duval Wannmacher, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo - Porto Alegre – RS, Brasil, 90035-003. Tel: 555133085575; E-mail: clovisdw@ufrgs.br

Running title: β -alanine induces oxidative stress

Abstract

β -alanine has been used as nutritional supplement and accumulates in β -alaninemia, a rare disorder of pyrimidine degradation. Patients with β -alaninemia may develop neurological abnormalities whose mechanisms are far from being understood. In this study we evaluated the in vitro and in vivo effects of β -alanine on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of 21-day-old rats. For the in vivo (ex-vivo) studies, the animals received three peritoneal injections of β -alanine (300 mg /Kg of body weight) and the controls received the same volume (10 μ l/g of body weight) of saline solution (NaCl 0.85%) at 3 hours intervals. The results of β -alanine administration were similar in both tissues studied: reduction of superoxide dismutase (SOD) activity, increased oxidation of 2',7'-dihydrochlorofluorescein (DCFH), total content of sulfhydryl and catalase (CAT) activity. The contents of reduced glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS) were not changed. In the in vitro studies, the β -amino acid decreased oxidation of DCFH in the cerebellum, but did not change in the cerebral cortex. In contrast, β -alanine provoked increased levels of GSH in the cerebral cortex, but not in the cerebellum. Furthermore, the activity of the antioxidant enzyme CAT was reduced and the activity of SOD was increased in both tissues. The contents of total sulfhydryls and TBA-RS were not changed. These results suggest that β -alanine induced, directly and indirectly, oxidative stress. Therefore, in case the same occurs in patients with β -alaninemia, it is possible that oxidative stress may be one of the mechanisms responsible for brain damage. Besides, possible side effects of the nutritional supplementation of β -alanine need more attention.

Keywords: β -alanine; oxidative stress; cerebellum; β -alaninemia; cerebral cortex.

Introduction

β -alanine is a β -amino acid derivative from the degradation of the pyrimidine uracil and precursor of the oxidative substrate acetyl-coenzyme A [1]. β -alanine is one of only a few naturally endogenous occurring β -amino acids to humans and mammals. Structurally, β -alanine is the simplest β -amino acid, having no substituent on its central two-carbon bridge [2]. It is metabolized by two different pathways: the first is the formation of carnosine from β -alanine and histidine using the enzyme carnosine synthase [3] and the other involves two different enzymes, β -alanine- α -ketoglutarate transaminase and β -alanine-pyruvate transaminase. The aminotransferase is used for the subsequent metabolism of β -alanine to malonate semialdehyde [1]. The malonate semialdehyde can be converted back to β -alanine using GABA-transaminase (GABA-T) for the reverse transamination. Thus, this enzyme is involved in endogenous synthesis of β -alanine in central nervous system (CNS) [2].

Nutritional supplement of high β -alanine doses (4-6.4 g/day), approximately 100 mg/Kg of body weight, has been used by many people, especially by athletes, for long time to increase muscle carnosin content and to improve exercise performance [3-6], but studies about possible side effects in humans were not been made [7]. Besides, β -alanine, a inhibitor of taurine transport, has been used for causing taurine depletion, an important antioxidant, on animals and cell cultures [8,9].

Genetic defect in some of these pathways can lead to abnormal increase of β -alanine in CNS and other tissues, characterizing an inborn error of metabolism. In high concentration this β -amino acid inhibits GABA uptake by competing for transporters GAT-3 and GAT-4 [2]. The main biochemical events are high concentrations of β -alanine and GABA in urine of the patients suffering from this

disease. These patients may develop clinical pathologies such as neurological abnormalities, possibly associated to oxidative stress [2].

Recent studies have shown the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of various inborn errors of metabolism and neurodegenerative disorders [10]. Free radicals are produced naturally in the organism, but the excess of these compounds caused by their overproduction and/or by diminished antioxidants defenses lead to disturbances in enzymatic systems, membrane transport and DNA function among others, as a result of protein, lipid and DNA oxidative damage [11].

Considering that the mechanisms underlying the neurological dysfunction in patients with β -alaninemia are poorly known and that the damaging consequences of oxidative stress have been implicated in a variety of CNS disorders [12], the main objective of the present study was to investigate the *in vitro* and *in vivo* effects of β -alanine on some parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of 21-day-old rats, in the hope to contribute to the understanding of the mechanisms responsible for the neurological impairment observed in patients suffering from β -alaninemia.

Materials and methods

Animals

Thirty twenty-one-day-old male Wistar rats bred in the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil were used in the experiments. The rats had free access to water and to a standard commercial chow (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil) containing 20.5% protein (predominantly soybean supplemented with methionine), 54% carbohydrate, 4.5% fiber, 4% lipids, 7% ash and 10% moisture. Temperature was maintained at 24 ± 1 °C, with a 12–12 h light–dark cycle. The

“Principles of Laboratory Animal Care” (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 80-23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>) were followed in all the experiments, and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee For Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Preparation of tissues

The animals were decapitated without anesthesia, the brains were immediately removed and cerebral cortex and cerebellum were rapidly excised on a Petri dish placed on ice. After dissection, the tissues were homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) in phosphate-KCl buffer (20 mM / 40 mM) pH 7.4, using a ground glass type Potter–Elvehjem homogenizer. The homogenates were centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C, the pellet was discarded, and the supernatants were kept at -70°C until the determinations were performed for no longer than one week. Controls performed in our laboratory indicate that the parameters of oxidative stress measured in the present work are not affected by keeping at -70°C for at least two weeks.

In vitro experiment

The supernatants of the homogenates of cerebral cortex and cerebellum were incubated at 37°C for 30 min with (test) or without (control) addition of 0.5 or 1 mM of β -alanine. These **supernatants** were used for the following tests: thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS), total sulfhydryls content, reduced glutathione (GSH), oxidation of reduced 2', 7' dichlorofluorescein (DCFH), and the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). β -alanine in the same concentrations (0.5-1 mM) did not affect commercial CAT or SOD activity.

In vivo experiment

β -alanine was dissolved in saline solution and the pH was adjusted to 7.4. The animals received three intraperitoneal injections, with three hours of intervals, of β -alanine (300 mg /Kg of body weight), equivalent to those used by other researchers [6], and the controls received the same volumes of saline solution (10 μ l/g of body weight of NaCl 0.85%) [1]. One hour after the last injection, the rats were killed and the brains were rapidly removed, cerebral cortex and cerebellum dissected, homogenized, centrifuged and the supernatants stored at -70°C until measurements were performed, for no longer than one week.

Parameters of oxidative stress measurements

Thiobarbituric acid reactive substances measurement (TBA-RS)

TBA-RS measures mainly malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyls free radicals. Hydroxyl free radicals are mainly formed from H₂O₂ by the iron-catalyzed Fenton reaction or by the Haber-Weiss reaction [13]. TBA-RS were measured, as described previously Ohkawa [14] with slight modifications. Briefly, to glass tubes samples and reagents were added in the following order: 500 μ L of tissue supernatant; 50 μ L of 8.1% SDS (sodium dodecylsulphate); 1500 μ L of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH 3.5; 1500 μ L of 0.8% thiobarbituric acid (TBA); and 700 μ L of distilled water. The mixture was mixed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. The mixture was allowed to cool on water for 5 min, and was centrifuged at 750 x g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS were determined spectrophotometrically at 532 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. TBA-RS were calculated as nmol of TBA-RS per mg of protein.

Total sulfhydryl content

Total sulfhydryl assay was performed according to a previously published method [15], where the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption was measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120 μ l of hippocampus supernatants. This was followed by 30-min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content may be inversely correlated to oxidative damage to proteins, but may also reflect GSH and others thiols levels. Results were calculated as nmol of TNB per mg of protein.

2',7'-dihydrodichlorofluorescein oxidation assay

Oxygen and nitrogen reactive species production was assessed according to LeBel et al [16], by using reduced 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Samples (30 μ L) were incubated for 30 min at 37 °C in the dark with 30 μ L of 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with 140 mM KCl and 240 μ L of 100 μ M reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2 DCF-DA) solution in a 96 wells plate. H_2 DCF-DA is cleaved by cellular esterases and H_2 DCF formed is oxidized to DCF by reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) present in the supermatant. The DCF fluorescence intensity parallels to the amount of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 nm and 535 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard DCF (0.25–10 μ M) and the levels of reactive species were expressed as nmol of DCF formed per mg of protein.

Glutathione levels (GSH)

Glutathione is a very important non-enzymatic antioxidant present in the cells. GSH reduces peroxides, mainly through GPx activity, scavengers superoxide and hydroxyl radicals, and regenerates oxidized C vitamin. GSH levels were measured according to Browne and Armstrong [17]. Two hundred μL of GSH buffer pH 8, one hundred and fifty μL of the samples were incubated with an equal volume of o-phthaldialdehyde (1 mg/ml of methanol) by 30 min at 37°C , centrifuged for 10 min at $7000 \times g$. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. Calibration curve was performed with standard GSH (1 mM), and the tissue supernatant concentrations of GSH were expressed as nmol of GSH per mg of protein.

Catalase (CAT) activity

CAT is responsible for transformation of H_2O_2 in H_2O . Hydrogen peroxide can react with thiol and methionyl groups of enzymes and other proteins, and form the high reactive hydroxyl radicals. CAT activity was assayed according to Aebi [18]. The reaction medium contained 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 10 μL of the supernatants. Consumption of H_2O_2 was followed by measuring the absorbance decrease at 240 nm. One CAT unit is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per min and the specific activity is calculated as CAT units per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD catalyzes the transformation of superoxide free radicals in hydrogen peroxide, a less reactive substance. The assay of SOD activity was carried out as described by Marklund [19]. This method is based on capacity of pyrogallol to

autoxidize, a process highly dependent on superoxide radical. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm. A calibration curve was performed with purified SOD as standard. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as one unit of SOD and the activity was expressed as SOD units per mg of protein.

Protein determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al [20], using serum bovine albumin as the standard.

Statistical analysis

Data from the in vivo studies were analyzed by Student's t-test for independent samples. Data from the in vitro studies were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test when the F values were significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

Initially, we studied the in vitro effect of two concentrations (0.5 and 1 mM) of β -alanine on DCFH oxidation (Fig. 1A) and TBA-RS (Fig. 1B). β -alanine significantly decreased the levels of DCF at 1 mM ($F_{(2,18)} = 7.20$; $P < 0.05$) in cerebellum and did not change in cerebral cortex ($F_{(2,18)} = 0.39$; $P > 0.05$). On the other hand, β -alanine did not alter TBA-RS in brain cortex ($F_{(2,18)} = 1.67$; $P > 0.05$) or in cerebellum ($F_{(2,18)} = 0.28$; $P > 0.05$). Next, we investigated the effect of this β -amino acid on total content of sulfhydryls (Fig 2A) and GSH (Fig 2B). GSH levels were increased in cerebral cortex at

1.0 mM ($F_{(2,18)} = 4.63$; $P < 0.05$), but not in cerebellum ($F_{(2,18)} = 1.55$; $P > 0.05$). Finally, we measured the activities of the antioxidant enzymes CAT (Fig. 3A) and SOD (Fig. 3B). We observed that β -alanine inhibited CAT activity in cerebral cortex (0.5 and 1 mM) ($F_{(2,18)} = 5.14$; $P < 0.05$) and in cerebellum (1 mM) ($F_{(2,18)} = 5.54$; $P < 0.05$). The β -amino acid increased the SOD activity in cerebral cortex (1.0 mM) ($F_{(2,18)} = 8.25$; $P < 0.01$) and in cerebellum (1 mM) ($F_{(2,18)} = 11.44$; $P < 0.01$).

In the next set of experiments, the effect of intraperitoneal administration of β -alanine was evaluated by the same parameters. First, we measured the generation of reactive species by DCFH oxidation (Fig. 4A) and TBA-RS (Fig. 4B). Then, we observed that β -alanine increased the levels of DCFH oxidation in cerebral cortex ($t_{(12)} = 2.48$; $P < 0.05$) and cerebellum ($t_{(12)} = 3.67$; $P < 0.05$), whereas TBA-RS was not changed in cerebral cortex ($t_{(12)} = 1.12$; $P > 0.05$) or in cerebellum ($t_{(12)} = 0.62$; $P > 0.05$). Next, we measured total sulfhydryl content (Fig 5A) and GSH content (Fig 5B). The results showed that the β -amino acid increased the total sulfhydryl content in cerebral cortex ($t_{(12)} = 5.48$; $P < 0.05$) and in cerebellum ($t_{(12)} = 4.03$; $P < 0.01$) and that GSH was not altered by the compound. Finally, CAT (Fig 6A) and SOD (Fig 6B) activities were measured. β -alanine increased CAT activity in cerebral cortex ($t_{(12)} = 5.05$; $P < 0.01$) and in cerebellum ($t_{(11)} = 5.01$; $P < 0.01$), and inhibited SOD activity in cerebral cortex ($t_{(12)} = 3.88$; $P < 0.05$) and in cerebellum ($t_{(12)} = 2.54$; $P < 0.05$).

Discussion

Patients affected by β -alaninemia present neurological dysfunction with convulsions, coma, somnolence, lethargy, hypotonia, hyporeflexia, developmental delay and mental retardation [1]. The exact mechanisms underlying brain damage in this disorder remain poorly known, but it is postulated that high concentrations of β -

alanine produce direct and/indirect effects [2]. Tissue damage caused by oxidative stress, mediated by excessive free radicals, is involved in a diversity of biological phenomena, including damage to proteins, lipids and DNA [19]. ROS are abundantly produced in the brain because neurons consume a large amount of oxygen, neuronal mitochondria generate superoxide anion, and the brain readily retains bio-available irons. Moreover, the adverse consequences of oxidative stress have been implicated in a variety of central nervous system diseases, including inherited metabolic disorders [12, 22, 23]. In this context the main objective of the present work was to evaluate the in vitro and in vivo effects of this amino acid, known to accumulate in β -alaninemia, on important parameters of oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum of young rats, in order to contribute to the understanding of the pathophysiology of β -alaninemia.

Animal models do not completely imitate human diseases in all its complexity. However, chemical animal models have been largely used because they have the advantage of isolate every substance known to accumulate in human disease and study against adequate control. Therefore, animal models are important in the investigation of pathophysiologic mechanisms of the diseases, especially in brain metabolism, helping to suggest preventive measures and new drugs for treatment [24, 25]

First, we observed that in vitro β -alanine at concentrations of 0.5 and 1 mM, did not significantly alter the levels of DCFH oxidation in brain cortex, but significantly decreased DCFH oxidation at 1 mM in the cerebellum, suggesting low levels of hydroxyls and superoxide free radicals in the tissues at the moment of the measurements. Previous findings from our laboratory showed that different α -amino acids increased the oxidation of DCFH, thus increasing the levels of reactive species production in the brain of young rats [25]. So, we measured total thiol levels and lipid peroxidation, and we observed that the two parameters have not changed significantly in

cerebral cortex and cerebellum. TBA-RS reflects mainly the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde resulting from lipid breakdown due to lipid peroxidation process. On the other hand, diminution of total sulfhydryl content is one of the most general and useful index of protein oxidation [26]. Therefore, these results suggest that different concentrations of the β -amino acid in the study in vitro were not able to induce reactions with lipids and proteins.

Regarding to the antioxidant defense system, β -alanine markedly increased the total content of GSH in homogenates of tissues, the main naturally occurring antioxidant in cerebral cortex and cerebellum of rats. It is well known that oxidative stress is the major factor to enhance GSH levels [27]. Two important factors rapidly triggered by oxidative stress that induce GSH synthesis are the content of cysteine (and cystine) and stabilization of the mRNA of the synthetic enzymes [27], two processes that can occur in cell-free supernatants. However, reduction of GSSG to GSH is another possibility, but GSSG was not measured because the techniques are unreliable. GSH, a known scavenger of reactive oxygen species (ROS) [13], can be a defense against the production of superoxide anion, since the antioxidant enzyme SOD was increased at 1 mM concentration of β -alanine. The same was observed by Feksa et al., [28], where the tryptophan in vitro was able to increase the content of GSH and increase the enzymatic activity of SOD. The antioxidant enzyme SOD catalyzes the transformation of superoxide free radicals in hydrogen peroxide, a less reactive substance [19]. So, it is possible that β -alanine in vitro might accelerate the rate of dismutation of superoxide anion to hydrogen peroxide and water, decreasing the effect of the free radicals in the brain tissue. Therefore, the in vitro results suggest that β -alanine induces free radicals formation, possibly superoxide anion, which enhances

GSH levels and SOD activity (and decreases CAT activity), scavenging superoxide anion and impairing lipoperoxidation and DCFH oxidation.

Finally, the influence of different concentrations of β -amino acid on the activity of CAT in cerebral cortex and cerebellum was determined. CAT was inhibited in the presence of β -alanine at 0.5 and 1 mM in cerebral cortex and only at the highest concentration (1 mM) in the cerebellum. CAT is responsible for catalyze the decomposition of hydrogen peroxide into water and molecular oxygen, but when this enzyme activity is limited, for instance, when superoxide anion accumulates, may lead to an impairment of detoxification of this substrate [29]. One possible mechanism for inhibition of this enzyme would be the elevation of superoxide anion, which can act directly on the enzyme protein structure, or by overproduction of H_2O_2 . As the rate of CAT is relatively low in the CNS and the production of H_2O_2 is high, the ability of detoxification by this enzyme may be diminished [12].

Data obtained in the in vitro experiments may not be of physiological relevance. However, these results are valuable to detect direct effects of the tested substance, and help to interpret results obtained in the in vivo experiments, which include direct and indirect effects. Absence of direct in vitro effect suggests that the results obtained in vivo are indirect, dependent mainly in the metabolism of the substance and/or interaction with other compounds. Therefore, as an attempt to better understand the neurotoxicity of β -alanine, we investigated the influence of β -alanine administration on the same oxidative stress parameters.

The oxidation of DCFH was increased in both tissues, showing that β -alanine administration increased the reactive species production in rat brain. Moreover, β -alanine administration was able to increase total thiol levels in cerebral cortex and cerebellum. This augment can be explained by the increase of reactive species that react

with disulfide bonds (S-S) in proteins or to increase in GSH synthesis [30, 31]. However, reduced glutathione was not altered, suggesting increase of protein disulfide bonds cleavage. On the other hand, lipids were not affected by β -alanine administration, since TBA-RS was not changed in both tissues, agreeing to other authors [9].

Antioxidant enzymes such as CAT and SOD represent the first barrier against reactive species and are essential to cell survival, being CAT important for the clearance of H_2O_2 in high concentrations [21]. Hydrogen peroxide may interfere in many intercellular and intracellular signaling processes [11, 32]. CAT activity was increased in the two tissues after β -alanine administration, possibly as a consequence of increased production of H_2O_2 . On the other hand, SOD activity was inhibited in cerebral cortex and cerebellum, possibly due to H_2O_2 accumulation. H_2O_2 accumulation and SOD inhibition can favor the Fenton reaction with generation of hydroxyl radical, the most toxic in vivo reactive specie [33, 34].

The normal redox homeostasis is mainly maintained by mechanisms in which redox signaling regulates the expression of antioxidant enzymes and the increase in intracellular glutathione levels [35]. Sies [36] defined this term “oxidative stress” as a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former, leading to potential damage [12]. The brain has low cerebral antioxidant defenses compared with other tissues [11], a fact that makes this tissue more vulnerable to increased reactive species.

Considering that taurine may act as a buffer against oxidative stress [37] and is a potent scavenger of the hydroxyl radical [38], it is possible that the increase of β -alanine associated to taurine deficit could promote formation of this radical in long-term β -alanine administration as occurs in human supplementation of high doses of this amino acid. On the other hand, long-term β -alanine administration may increase carnosine, a

potent antioxidant, in several tissues [3-6], counteracting, at least in part, the diminished antioxidant effect of taurine depletion. In the present work, although taurine and carnosine were not measured in the brain, augment of brain carnosine and diminution of brain taurine content is improbable, because the rats were sacrificed 7 h after the first administration of β -alanine. Therefore, the alterations observed in the parameters of oxidative stress were possibly caused by direct and metabolic effects of β -alanine, inducing oxidative stress.

In summary, β -alanine induces *in vitro* and *in vivo* oxidative stress in brain cortex and cerebellum of Wistar rats, suggesting the involvement of oxidative damage in the pathophysiology of β -alaninemia. Besides, the continuous use of β -alanine in high doses as a nutritional supplement by athletes must be watched with caution and deserves more attention regarding possible side effects such as oxidative stress.

Acknowledgements

This work was supported by the research grants from Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociência.

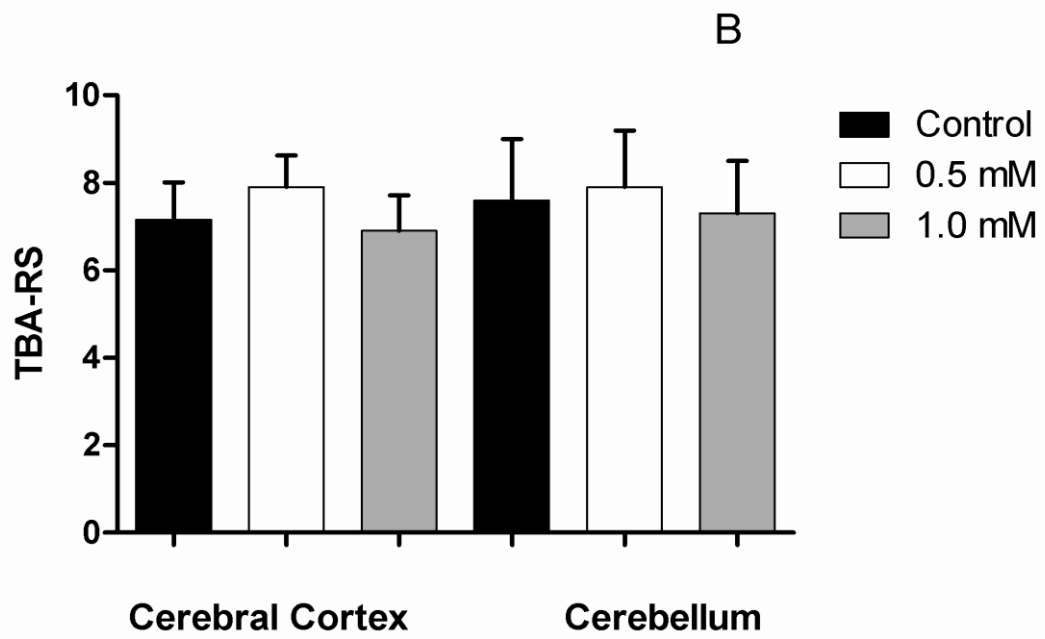
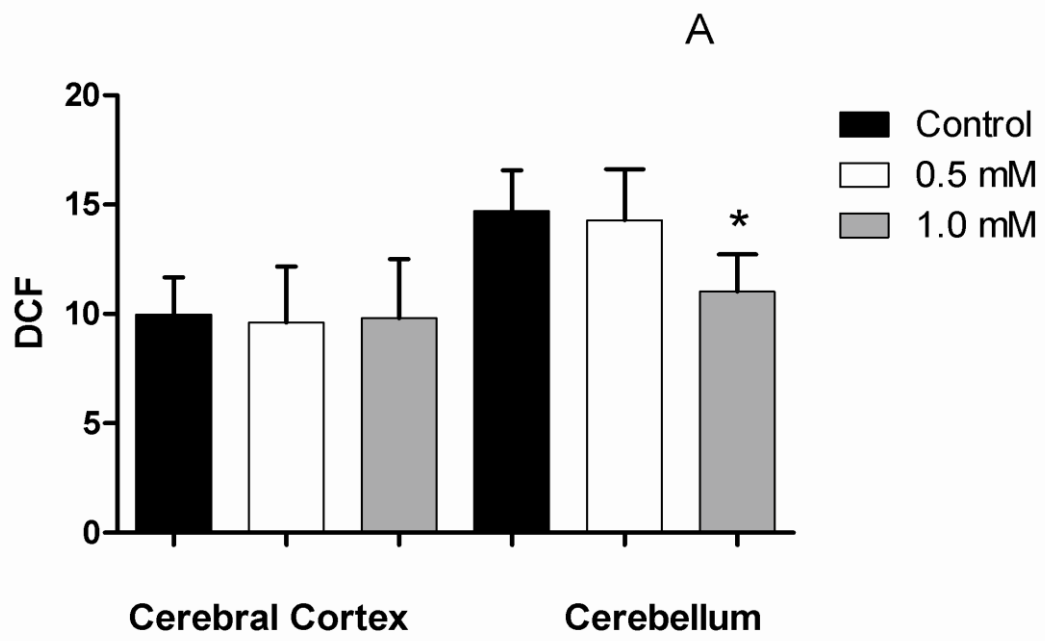
References

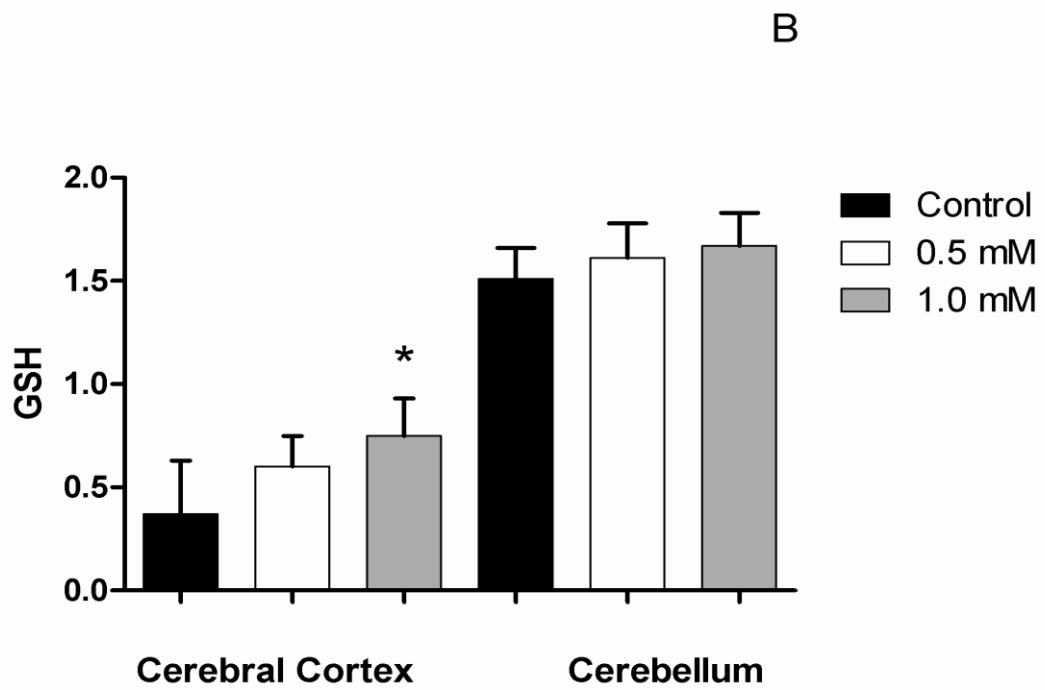
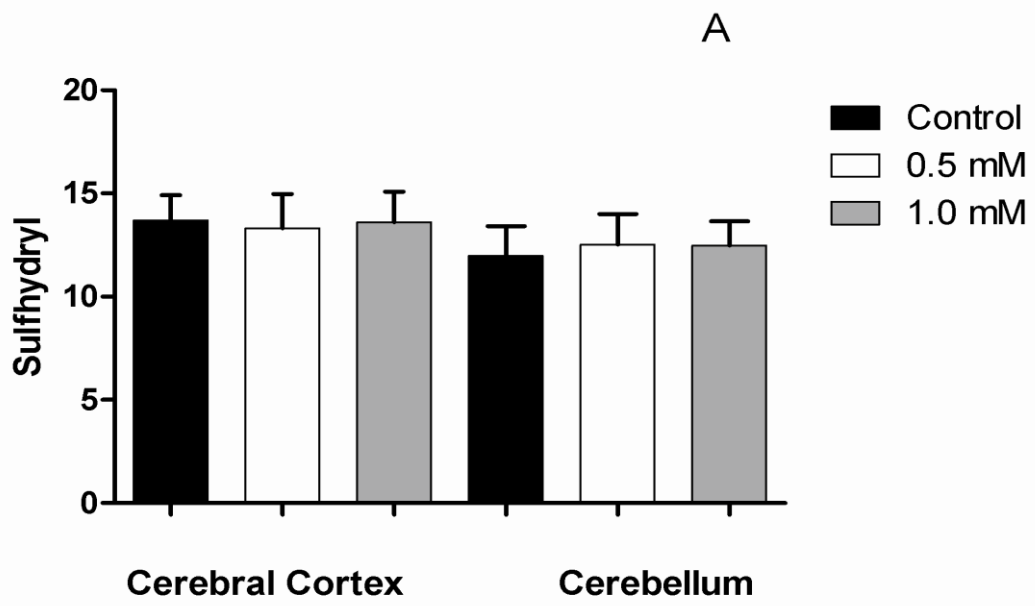
- 1- Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, Woo SLC (2001) Disorders of β - and γ -amino acids in free and peptide-linked forms. In: Gibson MK, Jakobs C (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8rd edn. McGraw Hill, New York, pp 2079-2105
- 2-Tiedje KE, Stevens K, Barnes S, Weaver DF (2010) β -Alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Intern* 57:177-188
- 3-Sale C, Saunders B, Harris RC (2010) Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosin concentrations and exercise performance. *Amino Acids* 39:321-33
- 4-Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha AH Jr (2010) Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosin and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc* 42:1162-73
- 5-Kern BD, Robinson TL (2011) Effects of β -alanine supplementation on performance and body composition in collegiate wrestlers and football players. *J Strength Cond Res* 25:1804-1815
- 6-Kendrick IP, Kim HJ, Harris RC, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, Bui TT, Wise JA (2009) The effect of 4 weeks beta-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. *Eur J Appl Physiol* 106:131-138.
- 7-Derave W, Everaert I, Beeckman S, Baguet A (2010) Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Med* 40:247-63
- 8-Dawson R Jr, Biasetti M, Messina S, Dominy J (2002) The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids* 22:309-24

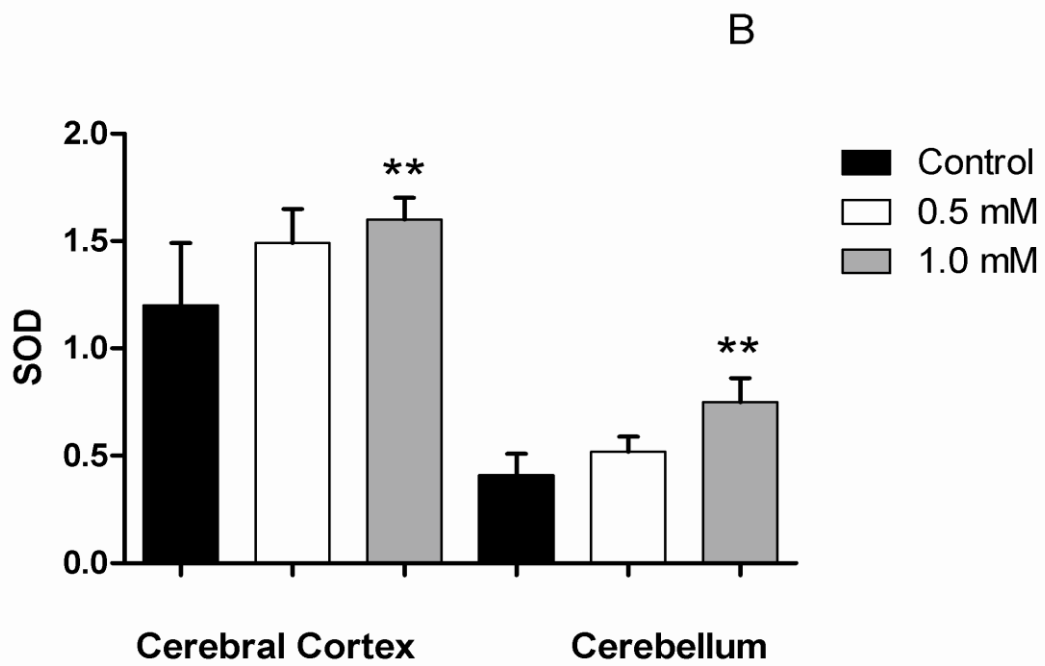
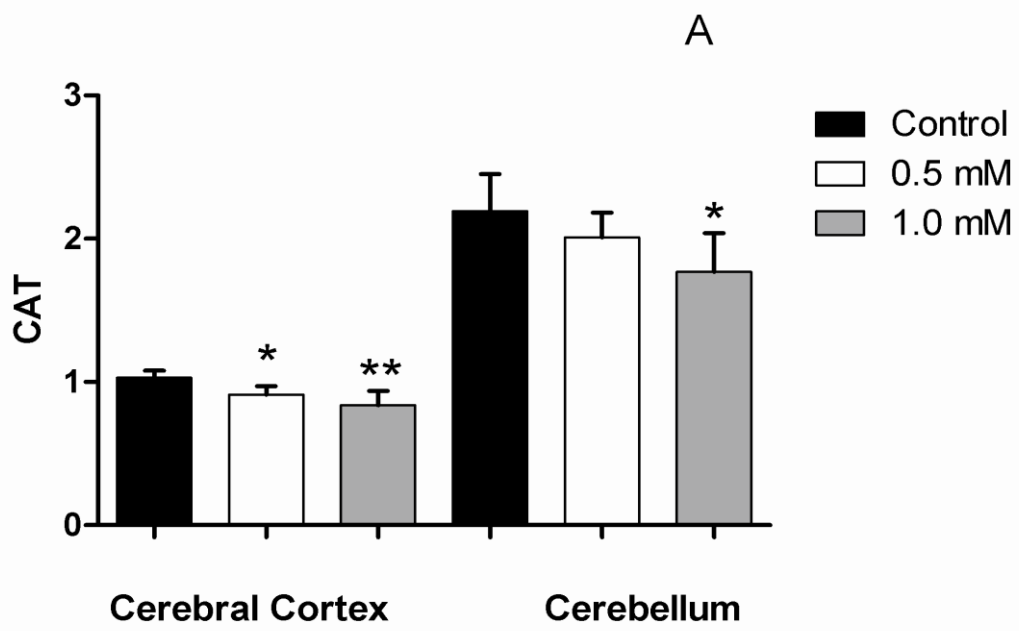
- 9-Parildar-Karpuzoğlu H, Doğru-Abbasoğlu S, Balkan J Aykaç-Toker G, Uysal M (2007) Decreases in taurine levels induced by beta-alanine treatment did not affect the susceptibility of tissues to lipid peroxidation. *Amino Acids* 32:115-9
- 10-Artuch R, Colomé C, Sierra C, Brandi N, Lambruschini J, Urgate D et al (2004) A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clin Biochem* 37:198–203
- 11-Halliwel B, Gutteridge JMC (2007) Measurement of reactive species. In: Halliwel B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edn. Oxford University Press, Oxford, pp 268–340
- 12-Halliwel B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1658
- 13-Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50
- 14-Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358
- 15-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 Letters* 302:141-145
- 16-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* 5:227–231
- 17-Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–352
- 18-Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126

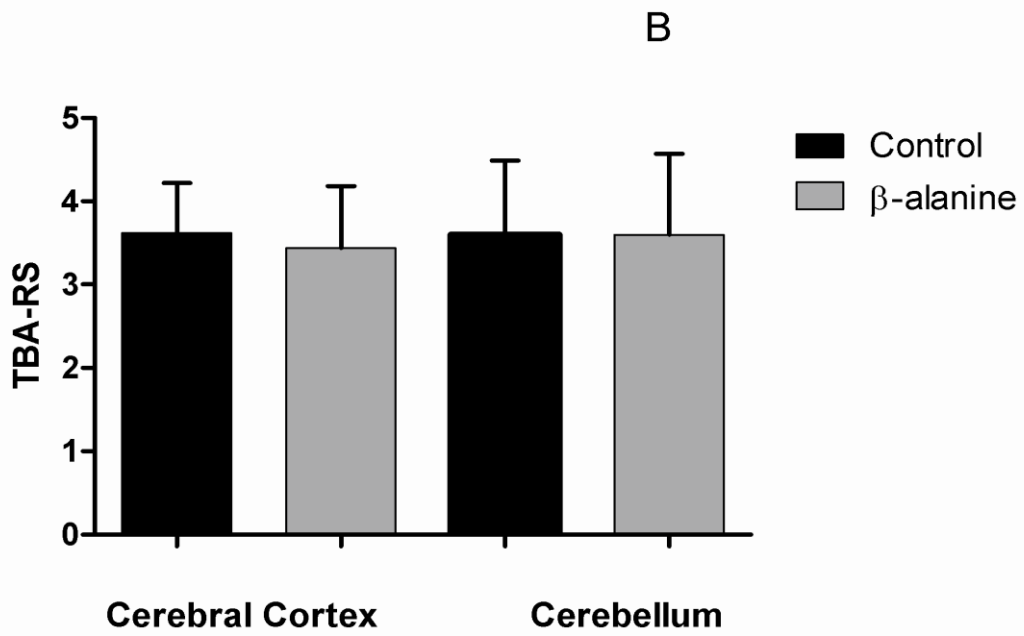
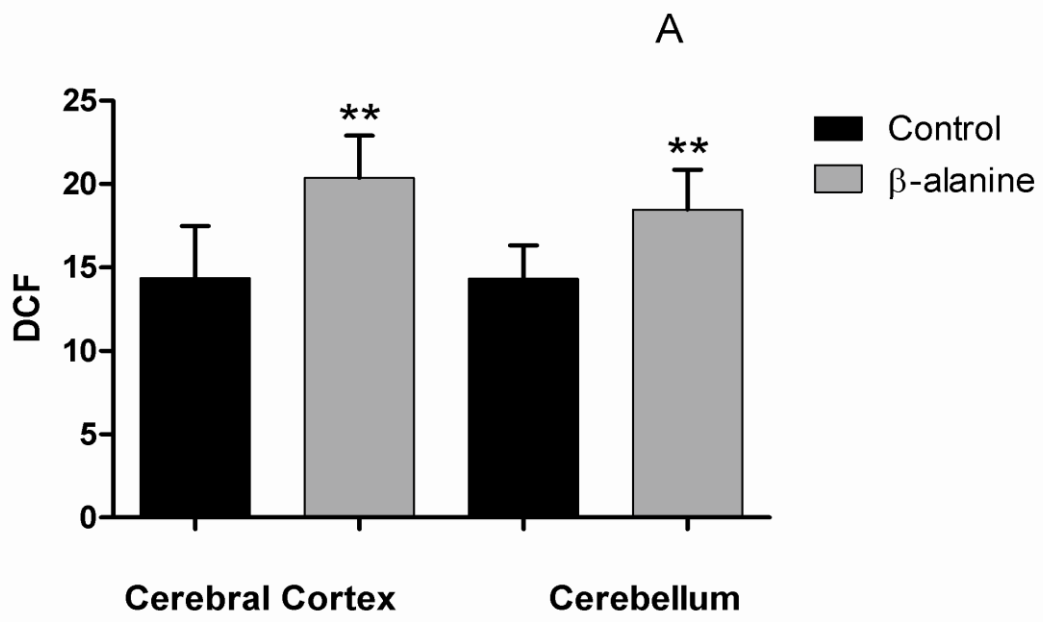
- 19-Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (ed) Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press Inc, pp 243–7
- 20-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–267
- 21-Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685–716
- 22-Wajner M, Latini A, Wyse AT, Dutra-Filho CS (2004) The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J Inher Metab Dis* 27:427–448
- 23-Hayashi M (2009) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology* 29: 1–8
- 24-Skvorak KJ. (2009). Animal models of maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis* 32:229-46
- 25-Moraes TB, Zanin F, da Rosa A, de Oliveira A, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutra-Filho CS (2010) Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *J Neurol Sci* 292: 89–95
- 26-Stadtman ER, Levine RL (2003) Free-radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218
- 27-Lu, SC (2000) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30: 42–59
- 28-Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GBD, Amaral MFA, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CMD (2008). Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23:221–233
- 29-Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751–5754

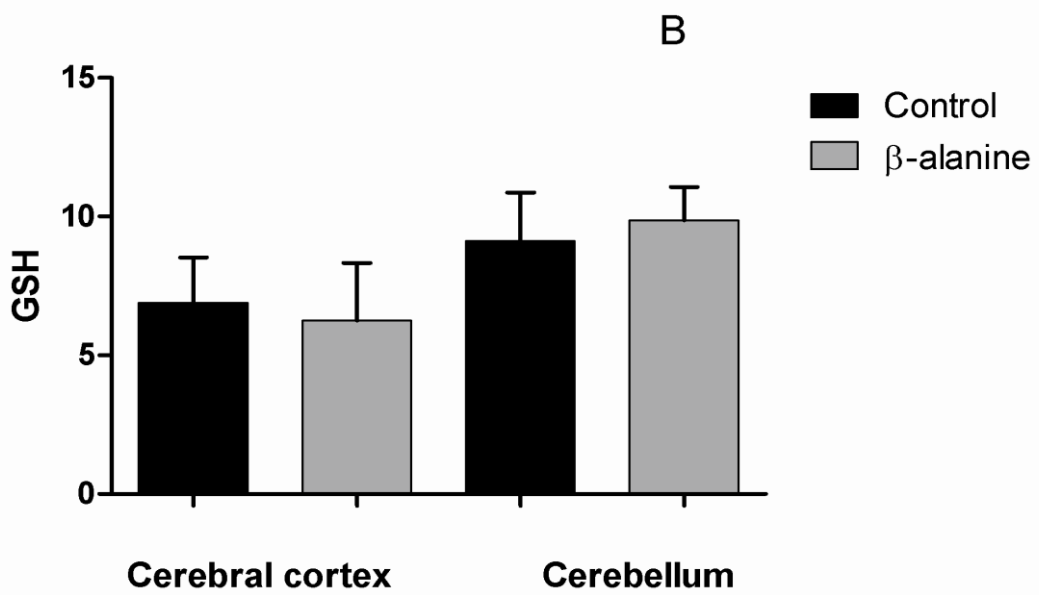
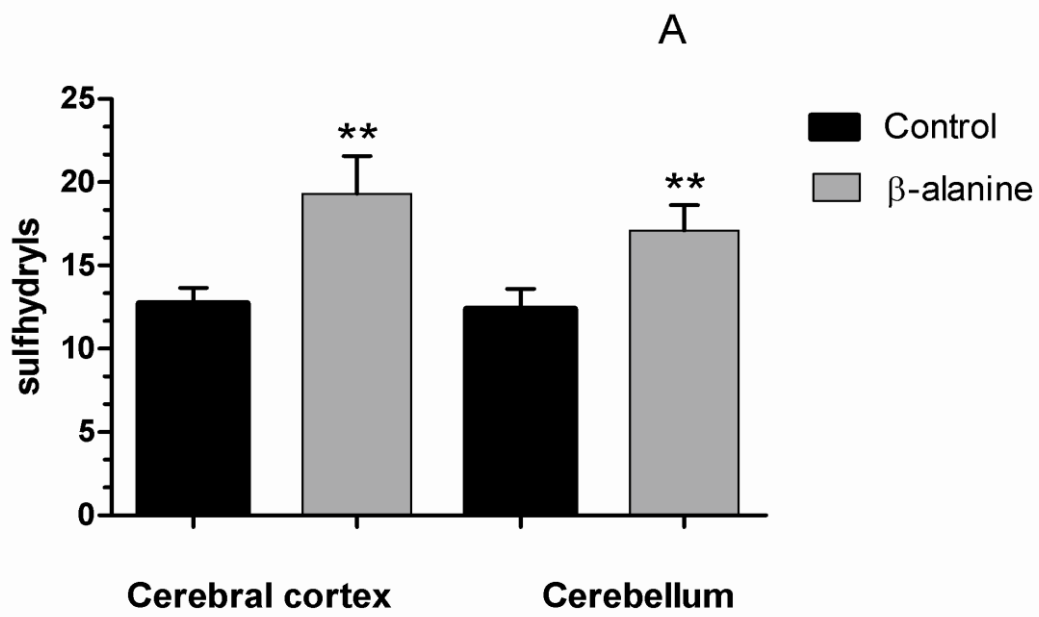
- 30-Jones D P (2006) Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 10:865-1879
- 31-Kemp M, Go YM, Jones DP (2008) Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 44:921–937
- 32-Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38:1543–1552
- 33-Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527–605
- 34- Gutteridge JM (1985) Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role. *FEBS Lett.* 185:19-23
- 35-Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
- 36-Sies H (1997) Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants . *Exp Physiol* 82:291-5
- 37-Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ (1995) The *in vivo* and *in vitro* protective properties of taurine. *Gen Pharmacol* 26:453–462
- 38-Huxtable RJ (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*72:101–163

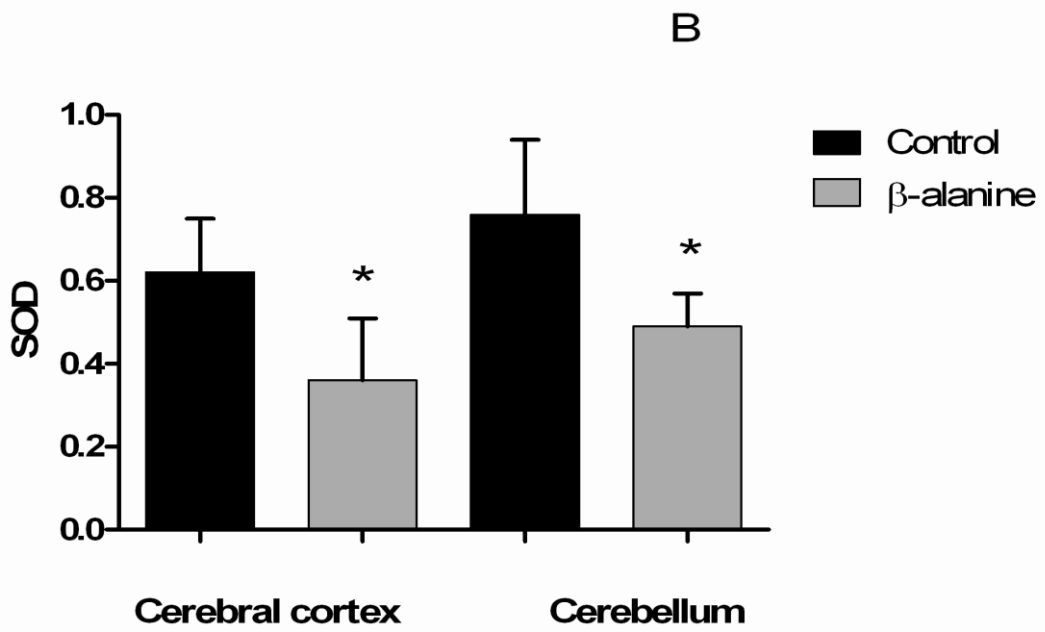
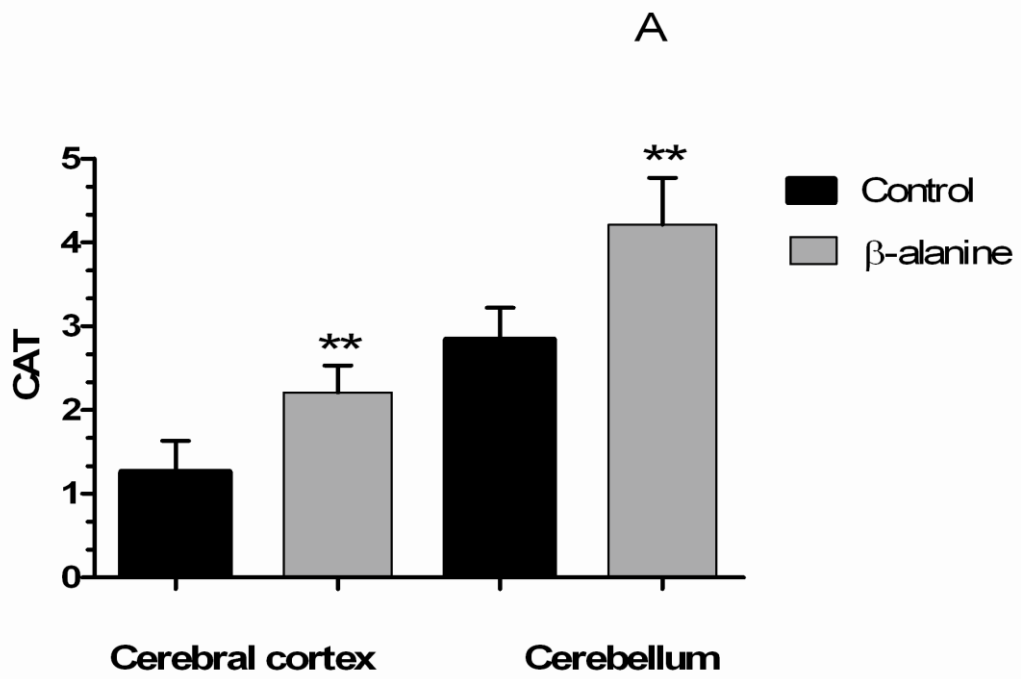












Legendas

Fig. 1 In vitro effect of β -alanine on oxidation of DCFH (A) and production of thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) (B) in cerebral cortex and cerebellum of 21-day old Wistar rats. Results are expressed as nmol of DCF (A) and nmol of TBA-RS per mg of protein (B). Data are means \pm SD for 6-8 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the controls (Tukey test).

Fig. 2 In vitro effect of β -alanine on the content of total sulfhydryls (A) and reduced glutathione (B) in cerebral cortex and cerebellum of 21-day old Wistar rats. Results are expressed as nmol of sulfhydryls (A) and nmol of GSH (B) per mg of protein (B). Data are means \pm SD for 6-8 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the controls (Tukey test).

Fig. 3 In vitro effect of β -alanine on catalase (CAT) (A) and superoxide dismutase (SOD) (B) in cerebral cortex and cerebellum of 21-day old Wistar rats. Results are expressed as CAT units (A) and SOD units (B) per min per mg of protein. Data are expressed as mean \pm SD for 6-8 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the controls (Tukey test).

Fig. 4 Effect of β -alanine administration on the oxidation of DCFH (A) and production of thiobarbituric acid-reactive species (TBA-RS) (B) in cerebral cortex and cerebellum of 21-day old Wistar rats. Results are expressed as nmol of DCF (A) and nmol of TBA-RS (B) per mg of protein (B). Data are means \pm SD for 6-8 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the controls (Student t-test).

Fig. 5 Effect of β -alanine administration on the content of total sulfhydryls (A) and reduced glutathione (B) in cerebral cortex and cerebellum of 21-day old Wistar rats. Results are expressed as nmol of sulfhydryls (A) and nmol of GSH (B) per mg of protein (B). Data are means \pm SD for 6-8 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the controls (Student t-test).

Fig. 6 Effect of β -alanine administration on catalase (CAT) (A) and superoxide dismutase (SOD) (B) in cerebral cortex and cerebellum of 21-day old Wistar rats. Results are expressed as CAT units (A) and SOD units (B) per min per mg of protein. Data are expressed as mean \pm SD for 6-8 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the controls (Student t-test).

PARTE III
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

III.3 DISCUSSÃO

A toxicidade causada pela β -alanina na produção de radicais livres e/ou na redução de antioxidantes no SNC ainda é muito pouco conhecido. Muitos trabalhos vêm descrevendo o envolvimento do estresse oxidativo em doenças do erro inatos do metabolismo (Wajner et al, 2004; Feksa et al, 2008). Pacientes com β -alaninemia podem desenvolver diversas alterações neurológicas e bioquímicas, como excreção aumentada de β -alanina, GABA e taurina na urina. No entanto, os reais mecanismos patológicos estão longe de serem compreendidos. Entretanto, sabe-se que altas concentrações deste β -aminoácido inibem a captação de GABA competindo pelos seus transportadores GAT-3 e GAT-4 (Tiedje et al, 2010), podendo ser esse um possível mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas nos pacientes.

A β -alanina também é usada como um suplemento alimentar e essa utilização descontrolada pode gerar um acúmulo indevido do β -aminoácido. Outra consequência proeminente do acúmulo de β -alanina é a inibição do transporte de taurina. Essa inibição provoca uma excreção aumentada de taurina na urina e conseqüentemente uma diminuição dos seus níveis na maioria dos tecidos (Dawson et al, 2002; Parildar-Karpuzoğlu et al, 2007). A taurina é extremamente importante no desenvolvimento de mamíferos, em especial no SNC e muscular (Sturman, 1988). Ela é considerada como um potente antioxidante endógeno, possuindo a capacidade de proteger o tecido contra ação de ER e prevenir o estresse oxidativo (Huxtable, 1992).

Este trabalho foi realizado para investigar os possíveis efeitos tóxicos da β -alanina quanto ao estado redox em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar, com objetivo de melhor elucidar a ação do β -aminoácido no SNC em um modelo de sobrecarga.

Primeiramente, investigamos uma possível ação direta da β -alanina no modelo *in vitro*. Observamos a influência da β -alanina, nas concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM, em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar de 21 dias de idade. O primeiro parâmetro analisado foi a quantificação dos níveis de oxidação de DCFH que representa um índice inespecífico de produção de ER nas amostras. Verificamos que na concentração de 1,0 mM os níveis de oxidação de DCFH diminuíram no cerebelo. Juntamente com essa diminuição da oxidação do DCFH observamos que a β -alanina *in vitro* não foi capaz de alterar significativamente os níveis de tióis totais e de TBARS. Esses resultados sugerem que a β -alanina não atua diretamente oxidando proteínas e lipídeos e que a formação de ER, se ocorreu, foi suprimida por alguns mecanismos antioxidantes presente na amostra.

Um desses mecanismos antioxidantes poderia ser a alta taxa de conversão de β -alanina em carnosina, sendo a concentração de carnosina controlada pela concentração de β -alanina (Tiedje et al, 2010). A carnosina é um dipeptídeo endógeno amplamente distribuído e abundante nos tecidos muscular e nervoso de várias espécies de animais. Muitas funções têm sido propostas para este composto por causa de suas propriedades antioxidante e quelante de íon metálico (Bellia et al, 2011). No entanto, considerando o pouco tempo para aumentar a síntese de carnosina é mais provável que o efeito antioxidante se deva ao aumento de GSH, observado em córtex cerebral na concentração de 1,0 mM de β -alanina.

No SNC a GSH é importante para a manutenção dos grupos sulfidríla reduzidos em proteínas, para remoção de H_2O_2 e reparo dos lipídeos peroxidados por O_2^- e OH^\bullet (Newsholme e Leech, 1995). Entretanto, é sabido que o estresse oxidativo é o principal fator para aumentar os níveis de GSH. Existem alguns fatores importantes

desencadeados pelo estresse oxidativo que podem induzir a síntese de GSH, entre eles estão o conteúdo aumentado de cisteína (cistina) e a estabilização do RNA mensageiro das enzimas sintéticas (Lu, 2000). Portanto, podemos supor que esse aumento seja realmente mediado pelo estresse oxidativo, pois a atividade da enzima antioxidante SOD aumentou na concentração de 1,0 mM de β -alanina em córtex cerebral e cerebelo.

A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, sendo chamada de defesa primária contra o estresse oxidativo, visto que o O_2^- é um forte iniciador de reações em cadeia (Marklund, 1985). O O_2^- é formado sob condições normais e é bastante reativo. Quando a atividade da SOD aumenta, mas é insuficiente para lidar com o superóxido formado, o excesso desse radical pode oxidar biomoléculas ou reagir com óxido nítrico, gerando peroxinitrito (Ceriello, 2002). Essa atividade aumentada da SOD também aumenta a formação de outra espécie reativa muito importante, o H_2O_2 . O H_2O_2 formado é menos reativo que o radical superóxido e é degradado posteriormente por outras enzimas, como a CAT e GSH-Px (Anderson, 1996).

Esse possível aumento do O_2^- e H_2O_2 pode estar envolvido na inibição da atividade da CAT. A CAT catalisa a decomposição do H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio e é extremamente sensível ao ataque de ER (Aebi, 1984). Observamos a diminuição da atividade enzimática da CAT na concentração de 1,0 mM de β -alanina nos dois tecidos estudados e nas duas concentrações de β -alanina estudadas no córtex cerebral, o qual é considerado um tecido mais sensível à ação das EROs. Essa diminuição da atividade da CAT pode ser explicada por uma elevação do O_2^- , o qual pode atuar diretamente sobre a estrutura protéica de enzima, ou ainda pelo excesso de H_2O_2 . Outro fator importante nessa inibição enzimática é a alta taxa de formação de

H₂O₂ no SNC, corroborada pelo aumento da atividade da SOD, podendo saturar a atividade da CAT, pois a concentração de CAT no SNC é relativamente baixa quando comparada com outras enzimas antioxidante, como a GSH-Px (Halliwell, 2006).

Contudo, observamos nos experimentos *in vitro* que possivelmente os mecanismos neurotóxicos da β-alanina ocorram por uma ação indireta em um sistema completo, dependente principalmente do metabolismo da substância e/ou interação com outros compostos. Portanto, para melhor elucidar os efeitos neurotóxicos da β-alanina, nós investigamos o efeito *in vivo* da β-alanina sobre os mesmos parâmetros de estresse oxidativo.

Inicialmente observamos a formação de espécies reativas nos tecidos tratados com β-alanina pela técnica de oxidação do DCFH (LeBel, 1992). Em ambos tecidos tratados a oxidação do DCFH aumentou, demonstrando que a administração aguda de β-alanina aumenta a produção de ER em córtex cerebral e cerebelo de ratos.

Invesigamos também o efeito da administração de β-alanina sobre o conteúdo total de tióis. Os resultados mostraram que a β-alanina foi capaz de aumentar o conteúdo total de tióis em ambos tecidos estudados. Esse aumento pode ser explicado pela ação das ER nas ligações de dissulfeto (S-S) de proteínas, uma vez que essas ER podem romper essas ligação e liberar o grupamento tiol (-SH) (Jones, 2006). Outro possível mecanismo capaz de explicar esse resultado seria o aumento da síntese de GSH, mas não houve aumento dos níveis de GSH. Por outro lado, a medida de TBARS indicou que os lipídeos não sofreram oxidação quando a β-alanina foi administrada.

Finalmente, investigamos a atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD, responsáveis pela defesa primária dos tecidos contra ação de EROs e ERNs. A CAT é

encontrada na maioria das células humanas, principalmente nos peroxissomas (Chance et al, 1979). Alguns órgãos como o coração, o músculo esquelético e o cérebro, contêm baixa atividade de CAT, o que os tornam mais vulneráveis à ação das EROs e ERNs (Halliwell e Gutteridge, 2007). No tratamento agudo com β -alanina a atividade da CAT aumentou no córtex cerebral e no cerebelo dos ratos. Esse aumento possivelmente ocorreu como consequência do aumento da produção de H_2O_2 nos tecidos tratados.

O acúmulo de H_2O_2 no córtex cerebral e no cerebelo pode contribuir para a inibição observada da atividade da SOD. Com a atividade da SOD inibida, todo o sistema de dismutação do O_2^- fica comprometido, ocasionando o acúmulo dessas ER , favorecendo a reação de Fenton e de Haber-Weiss (Anderson, 1996). Essas reações dão origem ao $OH\cdot$ que reage com DNA, carboidratos, proteínas e lipídios, danificando-os. Quando o $OH\cdot$ é produzido próximo ao DNA, podem ocorrer modificações em bases nitrogenadas e resíduos de carboidratos, levando à inativação ou mutação do DNA (Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, o $OH\cdot$ tanto compromete a atividade biológica das proteínas ao oxidá-las (Dean et al., 1997), quanto induz a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Concluindo, a β -alanina tanto *in vitro* como *in vivo* altera os mecanismos de manutenção do estado redox e consequentemente a homeostasia redox celular. O sistema de defesa antioxidante enzimático foi alterando juntamente com o aumento de ER. Portanto, o dano oxidativo pode ser um mecanismo fisiopatológico na β -alaninemia. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar outros processos e mecanismos envolvidos nas disfunções neurológicas apresentadas por esses pacientes.

III.4 CONCLUSÕES

- 1) A β -alanina *in vitro*, na concentração de 1,0 mM, diminuiu significativamente a oxidação do DFCH em cerebelo de ratos Wistar de 21 dias, mas não alterou no córtex cerebral.
- 2) Não houve alteração significativa quanto a TBARS e Sulfidrilas em ambos os tecidos estudados no experimento *in vitro*.
- 3) A β -alanina *in vitro*, na concentração de 1,0 mM, aumentou significativamente os níveis de GSH em córtex cerebral de ratos Wistar de 21 dias, mas não alterou no cerebelo.
- 4) A atividade da CAT no experimento *in vitro* foi inibida nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM de β -alanina em córtex cerebral. Porém, apenas na concentração de 1,0 mM no cerebelo.
- 5) A atividade da SOD no experimento *in vitro* aumentou na concentração de 1,0 mM de β -alanina em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar de 21 dias.
- 6) Os animais submetidos à administração aguda de β -alanina apresentaram um aumento significativo na oxidação do DCFH e no conteúdo total de tióis em córtex cerebral e cerebelo de ratos wistar de 21 dias.
- 7) Não houve alteração significativa quanto a TBARS e GSH em ambos os tecidos estudados no tratamento agudo.
- 8) Os animais submetidos à administração aguda de β -alanina apresentaram um aumento significativo na atividade da CAT e uma diminuição significativa na atividade da SOD em ambos tecido estudados.

Como conclusão final, os resultados obtidos em nosso trabalho sugerem que o estresse oxidativo possa ser um dos mecanismos envolvidos nas alterações cerebrais observadas em pacientes com β -alaninemia, pois esses pacientes estão expostos a altas concentrações de β -alanina e deve-se também ter atenção quanto as concentrações utilizadas do β -aminoácido nas suplementações nutricionais.

III.5 PERSPECTIVAS

Nossos resultados abrem a perspectiva de continuarmos nossa investigação

com os seguintes objetivos:

- 1) Investigar o efeito da administração crônica de β -alanina sobre parâmetros enzimáticos do metabolismo energético e de parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar a partir do oitavo dia de vida;
- 2) Investigar o efeito da administração crônica de β -alanina sobre o metabolismo do GABA em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar de 21 dias de idade;
- 3) Investigar o efeito da infusão de β -alanina, por cirurgia estereotáxica, na região CA1 do hipocampo dorsal sobre parâmetros comportamentais de ratos.

III.6 REFERÊNCIAS ADICIONAIS

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res.*, 350(1):103-108, 1996.

BAXTER, C., ROBERTS, E. The γ -aminobutyric acid- α -ketoglutaric acid transaminase of beef brain. *J. Biol. Chem.*, 233:1135–1139, 1958.

BERKMAN, M.Z., PALAOGUE, S., ERBENGI, T., ERBENGI, A. Neurotransmitter and amino acid analysis and ultrastructural observations of fetal brain cortex transplantation to adult rat brain under the effect of dexamethasone. *Neurosurgery*, 42(5):1992–1998, 1998.

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences*, 65:1865-1874, 1999.

BORDEN, L.A., DHAR, T.G.M., SMITH, K.E., BRANCHEK, T.A., GLUSHOWSKIC, C., WEINSHANK, R.L. Cloning of the human homologue of the GABA transporter GAT-3 and identification of a novel inhibitor with selectivity for this site. *Receptors Channels*, 2(3):207-213, 1994.

BORDEN, L.A., SMITH, K.E., GUSTAFSON, E.L., BRANCHEK, T.A., WEINSHANK, R.L. Cloning and expression of a beatine/GABA transporter from human brain. *J. Neurochem.* 64:977-984, 1995.

BORDEN, L.A., SMITH, K.E., HARTIG, P.R., BRANCHEK, T.A., WEINSHANK, R.L. Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transporter system. *J. Biol. Chem.* 267:21098-21104, 1992.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)*, 58(4):350-356, 1998.

CERIELLO, A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int J Clin Pract Suppl [S.I.]*, 129:51-58, 2002.

FITTS, R.H., HOLLOSZY, J.O. Lactate and contractile force in frog muscle during development of fatigue and recovery. *Am J Physiol.* , 231(2):430-433, 1976.

HALLIWELL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr.* , 75(5):1082-1087, 2000.

HARRIS, R.C., MARLIN, D.J., DUNNETT, M., SNOW, D.H., HULTMAN, E. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thorough bred horse, greyhound dog and man. *Comp Biochem Physiol A*, 97(2):249-251, 1990.

HAYAISHI, O., NISHIZUKA, Y., TATIBANA, M., TAKESHITA, M., KUNO, S. Enzymatic studies on the metabolism of β -alanine. *J. Biol. Chem.*, 236:781-790, 1961.

JURSKY, F., NELSON, N. Developmental expression of the neurotransmitter transporter GAT3. *J Neurosci Res.*, 55:394-399, 1999.

KIHARA, M., MISU, Y., KUBO, T., GABA transaminase inhibitors enhance the release of endogenous GABA but decrease the release of β -alanine evoked by electrical stimulation of slices of the rat medulla oblongata. *Life Sci.*, 42:1817-1824, 1988.

KRNJEVIC, K. Actions of drugs on single neurons in the cerebral cortex. *Br. Med. Bull*, 21:10-14, 1965.

LIU, Q.R., LOPEZ-CORCUERA, B., MANDIYAN, S., NELSON, H., NELSON, N. Molecular characterization of four pharmacologically distinct α -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J. Biol. Chem.*, 268:2106–2112, 1993.

MARKS, A.D., SMITH, C., LIEBERMAN, M. *Bioquímica médica de Marks*, Porto Alegre, Artmed, 2^oed, 439-456, 2007.

MARSHALL, W.J., BANGERT, S.K. *Clinical Chemistry*. Fifth edition, 1995.

MORI, M. GÄHWILER, H.B. GERBER, U. β -Alanine en taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *J Physiol.*, 539(1):191-200. 2002.

NEWSHOLME, E.A., LEECH, A.R. *Biochemistry for the Medical Science*. John Wiley & Sons. Toronto, 1995.

SANDBERG, M., CORAZZI, L. Release of endogenous amino acids from superior colliculus of the rabbit: in vitro studies after retinal ablation. *J. Neurochem.* 40:917–921, 1983.

SHAMI, N.J.I.E., MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agenteantioxidante. *Nutrition.*, 17:227-36, 2004.

STOUT, J.R., GRAVES, B.S., SMITH, A.E., HARTMAN, M.J., CRAMER, J.T., BECK, T.W., HARRIS, R.C. The effect of beta-alanine supplementation on neuromuscular fatigue in elderly (55-92 Years): a double-blind randomized study. *J Int oc Sports Nutr.*, 7:5-21, 2008.

VAN GENNIP, A.H., ABELING, N.G., VREKEN, P., VAN KUILENBURG, A.B. Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J. Inherit. Metabol. Dis.*, .20:203–213, 1997.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M.,
TELSER, J. Free radicals and antioxidante in normal physiological functions and
human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 39(1):44-84. 2007.

WERMAN, R. Criteria for the identification of a central nervous system transmitter.
Comp. Biochem. Physiol., 18:745–766, 1966.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its
modification: a chemical investigation. *Mutat Res.*, 379(2):201-210, 1997.