

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA

TANISE GEMELLI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA B-ALANINA SOBRE AS HOMEOSTASIAS
REDOX E ENERGÉTICA EM CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO DE RATOS
WISTAR**

Porto Alegre

2017

TANISE GEMELLI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA B-ALANINA SOBRE AS HOMEOSTASIAS
REDOX E ENERGÉTICA EM CÓRTEX CEREBRAL E CEREBELO DE RATOS
WISTAR**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutora em
Bioquímica pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Gemelli, Tanise

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA B-ALANINA SOBRE AS
HOMEOSTASIAS REDOX E ENERGÉTICA EM CÓRTEX CEREBRAL E
CEREBELO DE RATOS WISTAR / Tanise Gemelli. -- 2017.
51 f.

Orientador: Clovis Milton Duval Wannmacher.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Erros Inatos do Metabolismo. 2. Estresse
Oxidativo. 3. Metabolismos energéticos. I. Milton
Duval Wannmacher, Clovis, orient. II. Título.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meu marido, Jader, e meu filho, Antônio; Marina, Sabine e Juliano, mãe e irmãos, e a meus queridos sobrinhos, Guilherme, Maria Luiza e Sofia.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Clóvis M. D. Wannmacher, pela oportunidade, orientação, paciência, pelo aprendizado e carinho em todos os momentos. Poderia não parecer, mas todos os seus conselhos foram escutados e hoje replicados aos meus alunos. Contigo não aprendi somente a Bioquímica, mas também como viver a vida. Muito obrigada!

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

Aos colegas do laboratório 34D, em especial à Priscila e ao Gabriel, pela ajuda e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

Aos queridos colegas do laboratório 34C, em especial à Denise e ao Rodrigo, que estiveram ao meu lado todos esses anos. Obrigada pelo auxílio fundamental durante a realização deste trabalho.

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

À minha mãe, Marina, aos meus irmãos, Juliano e Sabine, e aos meus sobrinhos maravilhosos, Guilherme, Maria Luiza e Sofia, meu alicerce, todos os agradecimentos possíveis. Amo muito vocês.

Ao meu marido, companheiro, parceiro e amor para toda vida, pelo carinho, pela paciência, pelo apoio e por acreditar sempre em mim. Minha gratidão eterna. À “vidinha” da mãe, Antônio, pelos sorrisos fartos e abundantes, principalmente nos dias difíceis. Vocês deram sentido para minha vida, amo vocês.

Aos meus sogros, Milton e Vera, e ao cunhado, Juliano, pelo cuidado com o Antônio e apoio na reta final, sem vocês tudo seria mais complicado, muito obrigada!

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	9
1.2 B-ALANINEMIA.....	10
1.3 B-AMINOÁCIDO	12
1.4 EFEITO METABÓLICO DA B-ALANINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	15
1.5 ESPÉCIES REATIVAS	17
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO	19
1.7 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	20
1.8 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
4 DISCUSSÃO.....	36
5 CONCLUSÕES.....	45
6 PERSPECTIVAS.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
LISTA DE TABELA	50
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	51

RESUMO

Altas concentrações de β -alanina podem causar desordens metabólicas e aumento na produção de espécies reativas, alterações na homeostasia redox e energética, bem como depleção dos níveis de taurina e excreção aumentada de GABA. Essas alterações levam a distúrbios no desenvolvimento neurológico, contribuindo para as manifestações clínicas. O quadro de acúmulo de β -alanina no plasma é conhecido como β -alaninemia. Neste trabalho, investigamos os efeitos crônico da sobrecarga de β -alanina em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar. Os animais receberam administração intraperitoneal de β -alanina (300 mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,85%) no mesmo volume (10 μ l/kg de peso corporal) duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas, durante 14 dias. Os resultados mostram que altas concentrações plasmáticas de β -alanina alteram o equilíbrio redox celular, observado no aumento de oxidação do diclorofluorescina em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar. Observamos o mesmo resultado na determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase e superóxido dismutase, onde houve uma inibição das atividades. Os níveis de tióis totais foram mensurados pela técnica de sulfidrilas, onde verificamos que cada tecido apresentou níveis diferenciados, elevação em córtex cerebral e diminuição em cerebelo. Investigamos também as atividades das enzimas da rede de fosforiltransferência. A atividade da hexoquinase foi aumentada em ambos os tecidos, diferentemente da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que se elevou em córtex cerebral e se inibiu em cerebelo. A inibição de atividade enzimática foi observada também na piruvato-cinase e lactato desidrogenase. Os complexos II, II-III, IV e a succinato desidrogenase foram mensurados a fim de melhor esclarecer as alterações metabólicas identificadas. No entanto, observamos um aumento do complexo IV e succinato desidrogenase e uma inalteração do complexo II-III em ambos os tecidos. Portanto, nossos resultados sugerem uma suscetibilidade dos tecidos quanto à alta carga de β -alanina, apresentando distúrbios na homeostasia redox e energética. Sendo assim, os achados podem contribuir, em parte, com as alterações neurológicas encontradas em pacientes com β -alaninemia.

ABSTRACT

High concentrations of β -alanine may cause metabolic disorders and increase the production of reactive species in the region of redox and energetic homeostasis, as well as depletion of taurine levels and increased excretion of GABA. These changes lead to neurodevelopmental disorders, contributing to clinical manifestations. The accumulation of plasma β -alanine is known as β -alaninemia. In this work, we investigated the chronic effects of β -alanine overload in the cortex cerebral and cerebellum of Wistar rats. The animals were given intraperitoneal administration of β -alanine (300 mg/kg) or saline (0.85% NaCl) in the same volume (10 μ l/kg body weight) twice a day at 12-hour intervals for 14 days. The results show that high plasma concentrations of β -alanine alters the cellular redox balance reflected by the increase of oxidation of dichlorofluorescein in cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats. We observed the same result in the determination of the activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase, where there was an inhibition of the activities. The levels of total thiols were measured by the sulfhydryl determination technique, where we verified that each tissue presented differentiated levels, elevation in cerebral cortex and decrease in cerebellum. We also investigate the activities of phosphoryl transfer network enzymes. The activity of hexokinase was increased in both tissues, unlike the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which was elevated in the cerebral cortex and inhibited in the cerebellum. Inhibition of enzymatic activity was also observed in pyruvate kinase and lactate dehydrogenase. Activities complexes II, II-III, IV and succinate dehydrogenase were measured in order to better clarify the identified metabolic aberrations. However, we observed an increase of the activity complex IV and succinate dehydrogenase and an unchanged II-III complex in both tissues. Therefore, our results suggest a susceptibility of tissues to the high β -alanine load, presenting disorders in redox and energetic homeostasis. Thus, the findings may contribute, in part, to the neurological findings found in patients with β -alaninemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

AK – Adenilato-cinase

BHE – Barreira hematoencefálica

CAT – Catalase

CK – Creatina-cinase

CTE – Cadeia Transportadora de Elétrons

CuZnSOD – Cobre-Zinco superóxido dismutase

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

ER – Espécies reativas

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GABA_A – Receptor GABAérgico ionotrópico A

GABA_B – Receptor GABAérgico metabotrópico B

GABA_C – Receptor GABAérgico ionotrópico C

GABA-T – GABA transaminase

GADPH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GAT – Transportador de GABA

GSH – Glutathiona reduzida

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MnSOD – Manganês superóxido dismutase

NO• – Óxido nítrico

O₂^{•-} – Ânion superóxido

O₂ – Oxigênio molecular

OH• – Radical hidroxila

ONOO⁻ – Peróxinitrito

PGK – 3-fosfoglicerato cinase

Pi – Fosfato inorgânico

PK – Piruvato-cinase

RL – Radical Livre

SDH – Succinato desidrogenase

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

UP – β-alanina sintase

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são classificados como distúrbios relacionados a alterações genéticas que envolvem o acúmulo de substâncias nos líquidos biológicos, derivado da síntese anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001). Em consequência desse bloqueio metabólico, pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com a formação de rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987).

Essas alterações têm por consequência defeitos no metabolismo energético celular e/ou intoxicações associadas à morte súbita do lactente. Estudos retrospectivos mostram que cerca de 0,9-6% de todos os casos de morte súbita de lactentes envolvem EIM (Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001; van Rijt et al., 2016). Esse fato pode ser atribuído a diversos fatores, entre os mais importantes estão a dificuldade no diagnóstico, associada ao desconhecimento de todos os tipos de EIM descritos na literatura, e o diagnóstico tardio, que compromete a eficácia das medidas de manejo dos afetados (van Rijt et al., 2016).

Até o momento, foram descritos 15 grupos de desordens metabólicas com mais de 500 tipos diferentes de EIM, em que muitos pertencem à mesma via bioquímica e apresentam características clínicas semelhantes. A maioria dos EIM envolve processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001). O processo de diagnóstico varia de

testes padrões básicos para todos os tipos e testes especiais para suspeitas clínicas relevantes.

Em 1990, foi desenvolvida a metodologia de análise por espectrometria de massa em *tandem* de manchas de sangue seco. Essa técnica realiza análise quantitativa simultânea de alto rendimento de diferentes metabolitos em pequenas quantidades em amostras biológicas. Contudo, pacientes com EIM tratáveis podem permanecer sem ser detectados por essa metodologia de triagem. Em algumas desordens, sintomas e sinais, incluindo a morte, ocorrem antes mesmo de os resultados dos testes se tornarem disponíveis ou até mesmo antes de o sangue ser coletado para o teste, devido à severidade do distúrbio (van Rijt et al., 2016).

1.2 B-ALANINEMIA

A β -alaninemia (OMIM 237400) é um EIM classificada como distúrbio do metabolismo das pirimidinas, sendo conhecida como uma desordem muito rara e com poucos casos reportados na literatura. Scriver et al. (1966; 2001) relatam dois casos específicos: em um dos casos, os pais da criança e seus três meios-irmãos eram saudáveis e não relacionados com a patologia. A criança sobreviveu até 4 horas após o nascimento e foi a óbito por problemas respiratórios. No outro caso relatado, a gravidez foi interrompida por um aborto espontâneo no quinto mês de gestação (Scriver; Pueschel; Davies, 1966; Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001).

As principais manifestações clínicas encontradas nos portadores da doença são encefalopatia, sonolência, hipotonia, hiporreflexia, letargia, retardo mental, obesidade e convulsões. Podem apresentar modificações cerebrais, tais como: cérebro edematoso e pequeno, os ventrículos cerebrais dilatados e alterações

microscópicas na substância branca. Esses achados clínicos são correlacionados com o aumento nos níveis de metabólitos, bem como da β -alanina (Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001).

O acúmulo de β -alanina é causado 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; Pueschel; Davies, 1966; Tiedje et al., 2010). 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; Kaufman; Eisensmith, 2001).

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 ácido γ -aminobutírico (GABA), carnosina e taurina na urina e aumento plasmático de GABA.

O diagnóstico inicial da β -alaninemia é feito pela avaliação dos níveis de β -alanina, que pode ser determinado em diferentes amostras biológicas, como urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) ou plasma. No entanto, o diagnóstico final é feito pela determinação dos níveis plasmáticos anormais do β -aminoácido e GABA (Tabela 1). Esses resultados podem ser acompanhados de hiperaminoacidúria (aumento de taurina, carnosina e GABA na urina) ou presença de algumas das manifestações clínicas citadas. O tratamento com piridoxina melhora os sintomas clínicos como convulsões e letargia. A dosagem administrada nos pacientes varia de acordo com a idade e o grau de deficiência das transaminases, podendo ser de 10 mg/dia até 100 mg/dia de piridoxina. Nenhuma das terapias anticonvulsivantes são eficazes no

tratamento dessa patologia (Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001; van Gennip et al., 1997).

Tabela 1. Concentrações (μM) dos principais metabólitos em plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR)

	Controle	β -alaninemia
β -alanina		
Plasma	< 14	20-51
LCR	<0,06	45
GABA		
Plasma	<0,50	1-7
LCR	<0,12	1-2

Fonte: a autora (2017), adaptado de Scriver, Kaufman e Eisensmith (2001).

1.3 B-AMINOÁCIDO

β -alanina é um isômero de posição da alanina sintetizada endogenamente a partir da pirimidina uracila e precursora do substrato oxidante acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Figura 1). É um β -aminoácido de maior ocorrência endógena nos seres humanos e mamíferos, sendo estruturalmente o β -aminoácido mais simples encontrado. A via de síntese direta da β -alanina ocorre a partir da reação catalisada pela enzima β -alanina sintase (UP, 3.5.1.6; também chamada de β -ureidopropionase) (Tiedje et al., 2010).

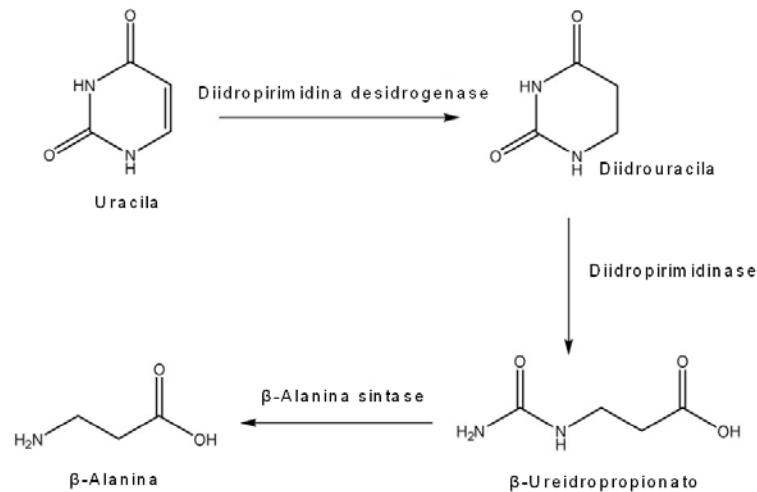


Figura 1. Via metabólica das pirimidinas utilizada para conversão de uracila em β -alanina
 Fonte: a autora (2017), adaptado de Tiedje et al. (2010).

No metabolismo endógeno, o β -aminoácido rapidamente após sintetizado é convertido no dipeptídeo β -alanil-L-histidina, mais comumente chamado de carnosina, pela ação da enzima carnosina sintetase (EC 6.3.2.11). Outra via existente para metabolização direta da β -alanina envolve duas diferentes enzimas específicas, a β -alanina- α -cetogluturato transaminase (EC 2.6.1.22) 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; Kaufman; Eisensmith, 2001) (Figura 2). O ácido malônico semialdeído pode ser novamente convertido à β -alanina pela enzima GABA-transaminase (GABA-T) (EC. 2.6.1.19) em uma reação de transaminação reversível (Kihara; Misu; Kubo, 1988).

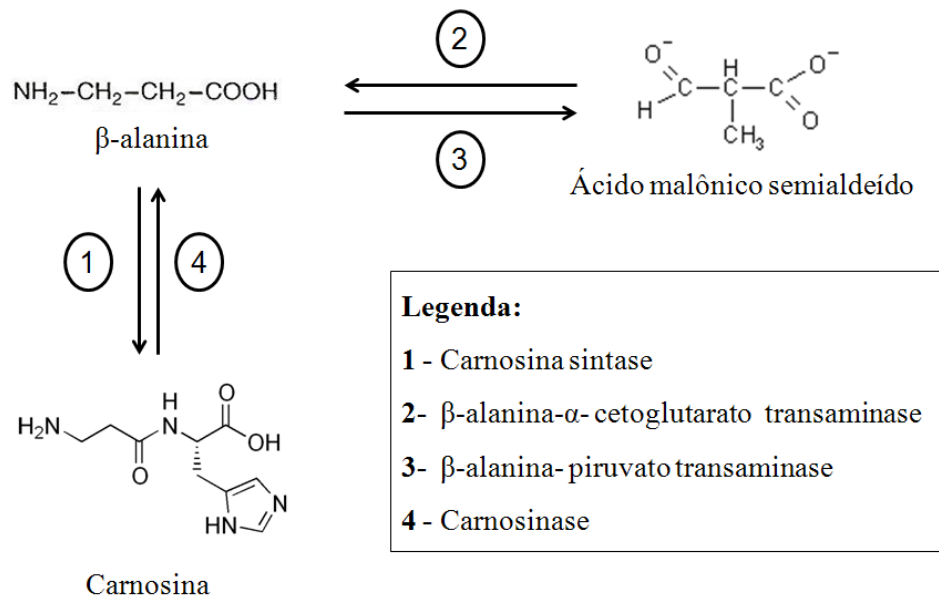


Figura 2. Principais vias de metabolização da β -alanina
 Fonte: a autora (2017), adaptado de Scriver et al. (2001).

A enzima GABA-T é classificada como enzima reguladora dos níveis cerebrais de β -alanina, uma vez que o β -aminoácido desloca competitivamente o GABA do sítio de ligação da enzima, estando a enzima condicionada ao seu metabolismo em situações de acúmulo (Hayaishi et al., 1961; Tiedje et al., 2010). 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).

Essas enzimas fazem parte do metabolismo e da regulação dos níveis de β -alanina no sistema nervoso central (SNC), uma vez que estão amplamente distribuídas em todo o cérebro (Berkman et al., 1998), sendo descritas no hipocampo, sistema límbico e neocórtex.

1.4 EFEITO METABÓLICO DA B-ALANINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A β -alanina é transportada para o SNC através da barreira hematoencefálica (BHE) por um transportador ativo de β -aminoácidos. Esses transportadores funcionam competitivamente pelos substratos, ou seja, quanto maior a concentração de β -alanina, maior a taxa de transporte pela BHE (Tiedje et al., 2010). No entanto, dentro do SNC, a β -alanina não possui transportadores nem receptores específicos para sua ação. Os principais transportadores que ela pode influenciar são os transportadores de GABA (GAT), dos quais 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) (Figura 3).

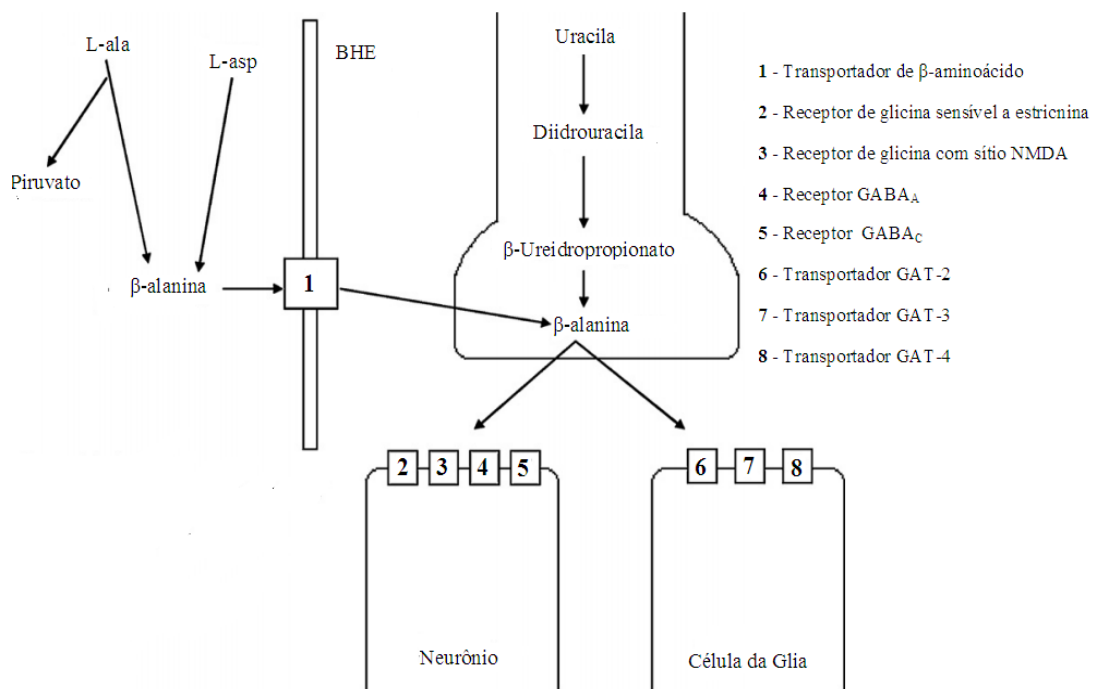


Figura 3. Receptores, transportadores e distribuição da β -alanina no SNC. L-ala: L-alanina, L-asp: L-aspartato, BHE: barreira hematoencefálica

Fonte: a autora (2017), adaptado de Tiedje et al. (2010).

Esses transportadores respondem com alta afinidade à ligação e ao transporte da β -alanina. O Km do GAT-3 e o do GAT-4 para captação de GABA e β -alanina são de 18 μ M e 28 μ M, respectivamente. Essa alta afinidade da β -alanina pelos transportadores pode atuar como reguladora dos níveis de GABA, onde o aumento dos níveis do β -aminoácido compete com GABA, alterando seu transporte e, conseqüentemente, seu efeito (Jursky; Nelson, 1999).

Essas características metabólicas levantam uma hipótese de que a β -alanina pode exercer um papel de neurotransmissor, podendo assim classificar sua atuação no SNC. No entanto, 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.

Acredita-se que em elevadas concentrações, a β -alanina no SNC assume um papel de neurotransmissor, pois as concentrações armazenadas são comparáveis às de outros neurotransmissores conhecidos, incluindo a acetilcolina, dopamina e noraepinefrina (Scriver; Kaufman; Eisensmith, 2001). Na comparação 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).

A β -alanina atua em quatro receptores reconhecidos e descritos, os receptores GABAérgicos ionotrópicos A (GABAA) e GABAérgicos ionotrópicos C (GABAC), receptor de glicina coagonista com sítios de NMDA (estricnina insensível) e receptores de glicina local (estricnina sensível) (Mori; Gähwiler; Gerber, 2002; Tiedje et al., 2010). O mecanismo proposto de atuação do β -aminoácido nesses receptores é o mesmo para os outros neurotransmissores convencionais, em que a β -alanina é liberada dos

neurônios para fenda sináptica por um processo dependente de Ca^{2+} . Após a sua liberação, ela se difunde pela fenda sináptica para posterior ligação aos receptores pós-sinápticos (Tiedje et al., 2010). 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; Kaufman; Eisensmith, 2001).

1.5 ESPÉCIES REATIVAS

“Espécies reativas” (ERs) é uma expressão usada para incluir não somente radicais formados pela redução do oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), mas também para alguns compostos não radicalares derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlet, sendo estes denominados como espécies reativas de oxigênio (EROs). Contudo, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e o peroxinitrito (ONOO^-) (Halliwell; Gutteridge, 2007).

As ERs podem conter um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos, caracterizando 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). Essas ERs 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 ERs são as organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias, que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Halliwell, 2011).

No metabolismo celular aeróbico, o consumo de O_2 é primordial em condições fisiológicas, em que sofrerá, através do citocromo oxidase mitocondrial, uma redução tetravalente (aceitação de quatro elétrons) com formação de água (H_2O). Contudo, uma pequena parte desse O_2 não é completamente reduzido à H_2O na cadeia respiratória mitocondrial, podendo ser convertido em intermediários reativos, como os $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e o H_2O_2 , processo este que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris, 1998; Navarro et al., 2009).

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; Anderson, 1997). As principais formas de EROs são $O_2^{\cdot-}$, 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 comparada com outras EROs (Valko et al., 2007); o OH^{\cdot} , que possui uma baixa capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares; e o H_2O_2 , que 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 específicas: a primeira é a reação de Fenton, em que 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 $O_2^{\cdot-}$ produzem OH^{\cdot} (Anderson, 1996).

Em concentrações fisiológicas, as EROs apresentam funções biológicas importantes, como sinalização celular, síntese e regulação de proteínas, bem como no processo de defesa do hospedeiro contra infecções. No entanto, altas concentrações de EROs podem ser importantes mediadoras de danos à estrutura celular, aos ácidos nucleicos, lipídeos e às proteínas. O OH^{\cdot} é a espécie mais reativa

a todos os componentes do DNA, reagindo com bases púricas e pirimídicas. Outros constituintes celulares extremamente sensíveis a esse radical são os ácidos graxos poli-insaturados, em que o $\text{OH}\cdot$ ataca os resíduos de fosfolipídeos, promovendo a lipoperoxidação (Halliwell, 2000). Além disso, podem oxidar proteínas, visto que os resíduos de cisteína e metionina são mais suscetíveis à ação das EROs e das ERNs. As oxidações nos resíduos de cisteína formam, reversivelmente, pontes de dissulfeto entre os grupos tiólicos das proteínas, diminuindo as concentrações moleculares de tióis, podendo ainda quebrar essas pontes de dissulfeto, inativando proteínas ativas (Valko et al., 2007). A concentração de grupos carbonilas é gerada por diferentes mecanismos e é um bom indicativo de presença de EROs.

1.6 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” (Halliwell, 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 ERs que causa danos à estrutura das biomoléculas, tais como DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares.

Estudos têm demonstrado que essas alterações podem estar envolvidas na fisiopatologia de vários EIM e de doenças neurodegenerativas devido ao desequilíbrio da homeostase redox. Acredita-se que esse fenômeno esteja associado com a progressão e as severidades desses distúrbios, visto que algumas dessas patologias apresentam alto nível de ER (Artuch et al., 2004; Obuobi et al., 2016; Tramutola et al., 2017).

1.7 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As defesas antioxidantes são caracterizadas como um sistema de controle e contenção da propagação dos efeitos deletérios causados pelo acúmulo de diversas ERs. Esse excesso no organismo de ER é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo, os endógenos, ou absorvidos da dieta, conhecidos como exógenos (Obuobi et al., 2016).

Os antioxidantes, estrategicamente, são distribuídos no organismo devido à sua capacidade protetora, pois atuam ativamente removendo ER e equilibrando o potencial redox. 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 glutaciona 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 glutaciona, ou riboflavina, necessária para a produção de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um cofator da glutaciona redutase) (Gutteridge; Halliwell, 2010).

Podemos classificar as defesas antioxidantes em duas classes: enzimática e não enzimáticas. As defesas enzimáticas são compostas por enzimas que catalisam a remoção de radicais livres (RL) e ER de acordo com sua especificidade de substrato. Nessa categoria, temos a CuZnSOD/MnSOD, CAT e GSH-Px. Na classe de defesas antioxidantes não enzimáticas, temos proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidante como o íon ferro, cobre e heme, conhecidas como transferrina, haptoglobulinas e hemopexina, bem como agentes específicos de proteção de

biomoléculas representados pela glutathiona, pelo ácido ascórbico e α -tocoferol (Halliwell, 2012).

1.8 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

O cérebro pode metabolizar aproximadamente 4×10^{21} molécula de glicose por minuto, sendo considerado o órgão mais metabolicamente ativo. O consumo de glicose é regular e constante, estimulando o consumo glicolítico e, conseqüentemente, toda a rede de transferência de fosfato. O funcionamento ideal do sistema bioenergético celular requer que fosfatos ricos em energia sejam produzidos e entregues aos locais de consumo de energia, assim como que os produtos de hidrólise sejam rapidamente removidos, a fim de evitar obstáculos cinéticos e termodinâmicos (Dzeja, 2003).

O mecanismo de comunicação entre o consumo de ATP intracelular e os processos de produção de ATP é altamente acoplado e catalisado por enzimas específicas. O fornecimento de ATP é facilitado através da atividade das enzimas creatina-cinase (CK), adenilato-cinase (AK) e o sistema glicolítico, que inclui hexoquinase, piruvato-cinase (PK) e 3-fosfoglicerato cinase (PGK). Contudo, as concentrações de ADP também podem ser removidas pelas enzimas CK e AK, e a transferência fosfato inorgânico (Pi) é catalisada pela lançadeira gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Dzeja, 2003; Dzeja et al., 1999; 2011).

O equilíbrio nesse sistema é importante e essencial, no entanto, se houver uma atividade reduzida de uma única enzima, é bem tolerado, uma vez que esses sistemas de transporte podem operar em paralelo. Contudo, uma diminuição na atividade de

várias enzimas poderia levar a uma deficiência cumulativa na comunicação entre ATP produzido e locais consumidores de ATP (Dzeja, 2003; Folmes et al., 2012).

2 OBJETIVOS

Os objetivos estão apresentados como objetivos geral e específico, descritos na sequência.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos da administração crônica intraperitoneal de β -alanina sobre a homeostase redox e energética em cérebro de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

O objetivo específico deste trabalho é avaliar o efeito da administração crônica (ratos Wistar dos 8 aos 21 dias de idade) de β -alanina em córtex cerebral e cerebelo sobre os seguintes parâmetros:

- *Parâmetros de estresse oxidativo:* sulfidrilas totais, atividade glutationala peroxidase, atividade superóxido dismutase e oxidação da diclorofluorescina.
- *Parâmetros do metabolismo energético:* atividade da hexoquinase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, piruvato-cinase, adenilato-cinase, creatina-cinase, lactato desidrogenase, complexo I, complexo II-III, complexo IV e succinato desidrogenase.
- *Perfil plasmático de aminoácidos.*

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Chronic Exposure to β -Alanine Generates Oxidative Stress and Alters Energy Metabolism in Cerebral Cortex and Cerebellum of Wistar Rats

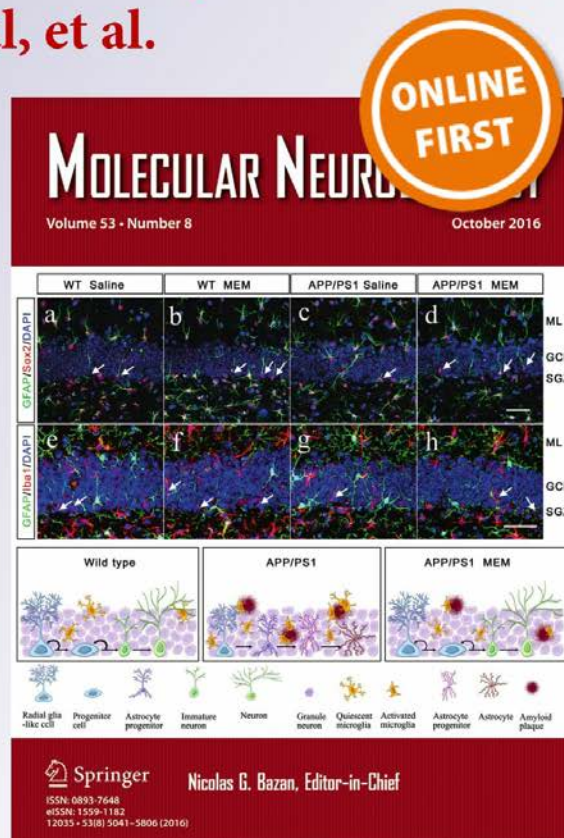
Tanise Gemelli, Rodrigo Binkowski de Andrade, Denise Bertin Rojas, Ângela Zanatta, Gabriel Henrique Schirmbeck, Cláudia Funchal, et al.

Molecular Neurobiology

ISSN 0893-7648

Mol Neurobiol

DOI 10.1007/s12035-017-0711-3



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Chronic Exposure to β -Alanine Generates Oxidative Stress and Alters Energy Metabolism in Cerebral Cortex and Cerebellum of Wistar Rats

Tanise Gemelli¹ · Rodrigo Binkowski de Andrade¹ · Denise Bertin Rojas¹ · Ângela Zanatta¹ · Gabriel Henrique Schirmbeck¹ · Cláudia Funchal² · Moacir Wajner¹ · Carlos Severo Dutra-Filho¹ · Clovis Milton Duval Wannmacher¹

Received: 15 February 2017 / Accepted: 7 August 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract β -Alanine occurs naturally in the human central nervous system and performs different functions. It can act as either a neurotransmitter or a neuromodulator, depletion of taurine levels and competitive antagonist of γ -aminobutyric acid (GABA). The β -amino acid accumulation exerts an important biological function as delay in brain development, oxidative stress and disturbances in energy metabolism, characterized as an inborn error of metabolism classified as β -alaninemia. We evaluated the effects of the chronic administration of β -alanine on some parameters of oxidative stress and enzymes of energy metabolism in cerebral cortex and cerebellum of 21-day-old Wistar rats. The animals received 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 0.9%), twice a day at 12-h interval, from the 7th to the 21st postpartum day. We observed that β -amino acid was able to increase the levels of reactive oxygen species (ROS) in the two tissues; however, only in cerebral cortex total content of sulfhydryl was increased. ROS are possibly acting on antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx) (cerebral cortex and cerebellum) and superoxide dismutase (SOD) (cerebellum) inhibiting their activities. We also evaluated the activities of enzymes of the phosphoryl transfer network, where we observed an increase in hexokinase and cytosolic creatine kinase (Cy-CK) activities; however, it decreased glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), pyruvate kinase

(PK) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, in both tissues. Besides, the β -alanine administration increased the activities of complex II, complex IV and succinate dehydrogenase (SDH). Those results suggest that the chronic administration of β -alanine causes cellular oxidative damage, significantly changing the energy metabolism.

Keywords β -alaninemia · β -alanine · Oxidative stress · Energy metabolism · Mitochondrial respiratory chain

Introduction

Inborn errors of β -alanine metabolism are assigned to β -alaninemia in which β -amino acid levels are highly elevated in tissues and physiological fluids of these patients. β -Alanine is a non-essential β -amino acid, one of only a few naturally occurring β -amino acids endogenous to humans and mammals, having different functions in different tissues [1]. The free amino acid in the brain can function as either a neurotransmitter or a neuromodulator [2]. When concentrations of not CNS β -alanine are high, it assumes a role of neurotransmitter, since stored concentrations are comparable to other known neurotransmitters, including acetylcholine, dopamine, and norepinephrine [3]. When compared to the GABA neurotransmitter, β -alanine has a similar potential, acting as an inhibitor and a depressor of neuronal activities with a rapid onset [4]. Kinetic data suggest that GABA, β -alanine, and glycine have the same family of vesicular transporters and inhibit each other competitively [3]. β -alanine acts in four recognized and described receptors, ionotropic GABAergic A (GABAA) and GABAergic ionotropic receptors C (GABAC), glycine receptor co-agonist with NMDA (strychnine-insensitive) sites and local glycine receptors (sensitive strychnine) [1, 5].

✉ Clovis Milton Duval Wannmacher
clovisdw@ufrgs.br

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

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

It also plays a role in the intermediate metabolism, forming several compounds from degradation. The enzymes involved in these processes are the β -alanine- α -ketoglutarate transaminase and β -alanine-pyruvate transaminase. The aminotransferase catalyzes the subsequent metabolism of β -alanine to produce acetyl-CoA malonate semialdehyde, which is used by the citric acid cycle [6].

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 [1]. Patients affected by β -alaninemia present neurological dysfunction with convulsions, coma, somnolence, lethargy, hypotonia, hyporeflexia, developmental delay, and mental retardation [7]. This effect may be related to metabolic disorders and disturbances in tissue redox state [8].

However, some neurotoxicity mechanism hypotheses are suggested as tissue damage caused by oxidative stress. Those damages are mediated by excessive production of free radicals, which evolve in a diversity of biological phenomena, including damage to proteins, lipids, and DNA [9]. ROS are abundantly produced in the brain; neurons consume a large amount of oxygen, neuronal mitochondria generate O_2^- , and the brain readily retains bioavailable irons. Moreover, the adverse consequences of oxidative stress have been implicated in a variety of central nervous system diseases, including inherited metabolic disorders [10–12].

Shetewy et al. [6] have suggested that the metabolic disturbances generated by β -alanine accumulation may be involved in toxicity mechanisms. Their group recently showed that the β -alanine was able to reduce contractile function in hearts of rats, an effect related at least in part to impaired mitochondrial energy metabolism [11]. The β -alanine treatment is associated with diminished ATP generation and energy metabolism, as well as elevated oxidative stress, factors that are capable of altering the contractile state of the failing heart [13–15]. Therefore, these results support the hypothesis that different β -alanine buildup can cause cell toxicity and neurotoxicity, thus contributing to the development of tissue dysfunction, including a change in muscle function and decreased hypotonia. The main objective of the present work was to investigate the effect of chronic β -alanine administration on some parameters of oxidative stress and energy metabolism in the cerebral cortex and in the cerebellum of 21-day-old rats, to contribute to the understanding of the mechanisms responsible for the neurological impairment observed in patients suffering from β -alaninemia.

Materials and Methods

Animals

The rats were maintained in a controlled environment at 24 ± 1 °C, with a 12–12-h light–dark cycle and free access

to water and a standard commercial chow balanced (Supra, Porto Alegre, RS, Brazil). 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. A total of 42 animals of 8-day-old Wistar were used in the experiments in the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. For the group for analysis, enzyme assays of phosphoryl transfer network, respiratory chain complexes activities and parameters of oxidative stress measurements, were used $n = 14$ rats divided into two groups: saline ($n = 7$) and β -alanine ($n = 7$).

Chronic Administration of β -Alanine

β -Alanine was dissolved in saline solutions (0.9%), and the pH was adjusted to 7.4. Volumes of 10 μ l per gram of body weight were used for each substance administered. The rats received twice a day at 12-h interval, during 14 days (from 8th to the 21st day of life), intraperitoneal administration of β -alanine or saline. Doses used were 300 mg/kg of β -alanine per gram of body weight [8]. Mean plasma levels of β -alanine measured in a pool of three animals, 1 h after the last injection of saline or β -alanine were 16 and 80 μ M, respectively, five times greater than that of the controls. This increase is similar to the observed in the patients [7]. The rats were euthanized at 21 days of age, and the cerebral cortex and cerebellum homogenate were collected for evaluating of oxidative stress, energy metabolism parameters, and respiratory chain complexes activities.

Amino Acid Measurement

The concentration of free amino acid levels in deproteinized plasma was determined by HPLC according to Joseph and Marsden [16]. The analysis was performed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and fluorescent detection using orthophthaldialdehyde plus mercaptoethanol. The flow rate was 1.4 ml/min in a gradient of the mobile phase (methanol and phosphate buffer: buffer A, 20% methanol; buffer B, 80% methanol), and the duration of each analysis was 50 min. The amino acids were quantitatively determined by calculating its chromatographic peak area related to the obtained for a known standard mixture and to that of the internal standard homocysteic acid. Data were expressed as micromolar μ M.

Preparation of the Tissues

Twelve hours after the last administration (saline or β -alanine) the animals were decapitated without anesthesia, the brains were immediately removed, and the 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 specific solutions for each determination. The buffer solution phosphate-KCl (20/40 mM) pH used for the analysis of oxidative stress parameters, SET buffer (0.32 M sucrose/1 mM EGTA/10 mM Tris-HCl) pH 7.4 for energy metabolism parameters and SETH buffer (250 mM sucrose/2.0 mM EDTA/10 mM Trizma base/50 U.L. ml⁻¹ heparin) pH 7.4 for respiratory chain complexes activities [17]. The homogenate was centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C for evaluation of oxidative stress, respiratory chain complexes activities and AK activity, the pellet was discarded, and the supernatants were kept at -70 °C until the determinations were performed. Moreover, the supernatant of the second centrifugation centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4 °C, containing cytosol and other cellular components as endoplasmic reticulum, was collected for determination of PK and cytosolic CK activity (Change Cyt-CK for Cy-CK). The pellet, containing mitochondria, myelin, synaptosomes, and membrane fragments, was washed twice with the same Tris-sucrose isotonic buffer, resuspended in 100 mM MgSO₄ Trizma buffer, pH 7.5, for determination of Mit-CK activity. The supernatants were immediately frozen in liquid nitrogen and stored for no more than 1 week at -70 °C when the assay was not carried out immediately [18].

Parameters of Oxidative Stress Measurements

Total Sulphydryl Content

The sulphydryl assay was performed according to a previously published method [19], where the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, producing a yellow derivative (TNB) whose absorption was measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 120 μ l of cortex cerebral supernatants. This was followed by 30-min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The sulphydryl content may be inversely correlated to oxidative damage to proteins, but may also reflect GSH and others thiols levels. Results were calculated as nanomole of TNB per milligram of protein.

2',7'-Dihydrodichlorofluorescein Oxidation Assay

Oxygen and nitrogen reactive species production were measured according to LeBel and Ischiropoulos [20] by using reduced 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Samples were incubated for 30 min at 37 °C in the dark with 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 with 140 mM KCl and

100 μ M reduced 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) solution. H₂DCF-DA is cleaved by cellular esterases and H₂DCF formed is oxidized by reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) presenting in samples to DCF. The DCF fluorescence intensity parallels to the number of reactive species formed. Fluorescence was measured using excitation of 480 nm and emission of 535 nm wavelengths. A calibration curve was performed with standard DCF (0.25–10 μ M), and the levels of reactive species were expressed as nanomole of DCF formed per milligram of protein.

Superoxide Dismutase Activity Assay

Superoxide dismutase (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 [21]. This method is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide radical. The inhibition of autoxidation of pyrogallol 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 specific activity as SOD units per milligram of protein.

Glutathione Peroxidase Activity Assay

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by the method of Wendel [22] except for the concentration of reduced b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate NADPH, which was adjusted to 0.1 mM after previous tests had been performed in our laboratory. Tert-butyl hydroperoxide was used as the substrate. NADPH disappearance was continuously monitored with a spectrophotometer at 340 nm for 4 min. One GPx unit is defined as 1 mmol of NADPH consumed per minute, and specific activity is reported as units per milligram of protein.

Enzyme Activity Assays of Phosphoryl Transfer Network

Hexokinase

The activity of mitochondrial bound hexokinase was determined based on a previously described method with minor modifications [23]. Briefly, the activity of the enzyme was determined by NADH formation. The assay contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM Ap5A, 5 mM D-glucose, 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM NAD⁺, and 1 unit/ml Glc-6-P dehydrogenase and was performed at 37 °C.

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity was measured as described by Mazzola and Sirover [24]

with minor modifications. Reaction mixtures contained 2.2 mM glyceraldehyde-3-phosphate, 0.25 mM NAD⁺ and buffer medium, pH 8.9, (100 mM glycine, 100 mM potassium phosphate monobasic and 5 mM EDTA). The sample was mixed and preincubated for 15 min at room temperature before inclusion of glyceraldehyde-3-phosphate in the reaction mixture. The activity of GAPDH was determined by NADH formation following the absorbance at 340 nm. Assays were performed in triplicate.

Lactate Dehydrogenase

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined using a kit (Doles Reagents, Goiânia, Brazil). LDH catalyzes the conversion of pyruvate to lactate and parallel coenzyme NADH is oxidized to NAD⁺. Enzyme activity is calculated from the decrease in absorbance of NADH at 340 nm.

Pyruvate Kinase Activity Assay

Pyruvate kinase (PK) activity was assayed essentially as described by Leong et al. [25]. The incubation medium consisted of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 U of L-lactate dehydrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 ml of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 ml. After 0–90 min of preincubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 1.0 mM PEP. All assays were performed in duplicate at 25 °C. Results were expressed as micromole of pyruvate per min per milligram of protein.

Adenylate Kinase

Adenylate kinase (AK) activity was measured according to Dzeja et al. [26]. The reaction mixture contained 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM glucose, 2 mM NADP⁺, 1 mM EDTA, 4.5 U/ml of HK, 2 U/ml of G6PD, and 1 µg of protein homogenate. After 0–90 min of preincubation at 37 °C, the reaction was initiated by the addition of 2 mM ADP. The reduction of NADP⁺ was followed at 340 nm in a spectrophotometer (Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments, Rochester, NY, USA). ADP, NADP⁺, tyrosine, CSH, G6PD, and HK were dissolved in water. Reagent concentration and assay time (3 min) were chosen to assure the linearity of the reaction. GSH did not interfere with HK or G6PD activities or with spectrophotometric readings. The results were expressed in micromole of ATP formed per min per milligram of protein.

Creatine Kinase

Creatine kinase (CK) activity was assayed in the reaction mixture contained the following final concentrations: 65 mM

Tris-HCl buffer, pH 7.5, 7.0 mM phosphocreatine, 9.0 mM MgSO₄, and 1 µg of protein in a final volume of 0.1 ml. After 5 min of preincubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of 0.3 µmol of ADP. The reaction was stopped after 10 min by the addition of 1 µmol of p-hydroxymercuribenzoic acid. The reagent concentrations and the incubation time were chosen to assure linearity of the enzymatic reaction. Appropriate controls were carried out to measure chemical hydrolysis of phosphocreatine. The Cr formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes [27]. The color was developed by the addition of 0.1 ml 2% α -naphthol and 0.1 ml 0.05% diacetyl in a final volume of 1 ml and read after 20 min at 540 nm. None of the substances added to the assay medium interfered with the color development or spectrophotometer readings. Results were expressed as 1 mol of Cr formed per minute per milligram of protein.

Determination of the Respiratory Chain Complex Activities

The activities of the respiratory chain enzyme complexes succinate-2,6-dichlorophenolindophenol-oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complex II + CoQ + complex III) were determined in brain cortex homogenates. The activity of cytochrome *c* oxidase (complex IV) (COX) and succinate:phenazine methosulfate oxidoreductase (succinate dehydrogenase-SDH) was measured according to Rustin et al. [28]. The control group did not contain β -alanine in the incubation medium.

Briefly, the assays for measuring complex activities contained complex I + III—20 mM phosphate buffer, pH 8.0, 200 mM KCN, 1 mM NADH, 2 mM cytochrome *c*, 1 mM EDTA, 2 mM rotenone, and 5 µL of the homogenate in a final volume of 980 µL; complex II + III—62.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM cytochrome *c*, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, 250 mM sodium succinate, and 20 µL of the homogenate in a final volume of 602 µL; complex II and SDH—62.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, 250 mM sodium succinate, 0.5 mM DCIP, 24 mM phenazine methosulfate, and 20 µL of homogenate in a final volume of 577 µL for complex II and 602 µL for SDH assay; complex IV—10 mM phosphate buffer, pH 7, 125 mM dodecyl maltoside, 2 mM cytochrome *c*, and 1 µL of the homogenate in a final volume of 1021 µL. Assays were carried out at 25 °C. The complex II and SDH activities were determined by measuring DCIP reduction at 600 nm in a double beam spectrophotometer. Complex II + III activities were determined by measuring cytochrome *c* reduction at 600 nm and complex IV by measuring cytochrome *c* oxidation at 600 nm. Results of complex II and SDH activity are expressed as nanomole

Table 1 Effect of chronic administration of β -alanine on the oxidative stress parameters

Oxidative stress parameters	Cerebral cortex		Cerebellum	
	Control	β -alanine	Control	β -alanine
DCFH oxidation (nmol DCF/mg protein)	10.0 \pm 0.4	12.0 \pm 0.8*	14 \pm 2	16 \pm 0.5*
Total sulfhydryl content (nmol TNB/mg protein)	9.0 \pm 0.9	11.3 \pm 2.3*	10 \pm 0.9	8 \pm 0.7*
GPx activity (U/mg protein)	2.6 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2*	3 \pm 1	2 \pm 0.7*
SOD activity (U/mg protein)	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.8 \pm 0.7	0.5 \pm 0.2*

Data are mean \pm SD for 7 independent experiments performed in triplicate

DCFH 2',7'-dihydrodichlorofluorescein, GPx glutathione peroxidase, SOD superoxide dismutase

* $p < 0.05$ compared to the controls (Student's t test)

of DCIP (dichlorophenolindophenol) reduction per minute per milligram of protein, the results of complex II-III are expressed as nanomole of cytochrome c reduction per minute per milligram of protein, and the results of complex IV activity are expressed as nanomole of cytochrome c oxidation per minute per milligram of protein.

Protein Determination

Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. [29], using bovine serum albumin as the standard.

Statistical Analysis

Data from all experiments were analyzed by the independent Student's t test. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC compatible computer. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results

Initially, we evaluated the effect of chronic administration of β -alanine on the production of ROS in both tissues. This formation of reactive species was determined by DCFH oxidation. We observed that the DCFH oxidation was significantly enhanced by the chronic administration of β -alanine [$t(9) = 4.69$; $p < 0.01$] in the cerebral cortex and [$t(10) = 3.33$; $p < 0.05$] cerebellum homogenates, indicating an increase of reactive species in tissues. On the other hand, total thiol levels were elevated only in the cerebral cortex [$t(10) = 2.24$; $p < 0.05$] and decreased in the cerebellum [$t(10) = 3.32$; $p < 0.05$].

Next, we evaluated the activities of the enzymes SOD and GPx. β -Alanine administration decreased the GPx activity in the cerebral cortex [$t(10) = 2.62$; $p < 0.05$] and cerebellum [$t(10) = 2.60$; $p < 0.05$], and the activity of the enzyme SOD [$t(10) = 4.00$; $p < 0.05$] decreased only in the cerebellum. On the other hand, the β -alanine administration did not alter SOD activity in the cerebral cortex of rats. These results suggest an alteration of the redox state, which may affect enzymes activities and protein functions of the brain tissue (Table 1).

Table 2 Effect of chronic administration of β -alanine on the activities of the enzymes of phosphoryl transfer network

Enzymes	Cerebral cortex		Cerebellum	
	Control	β -alanine	Control	β -alanine
Hexokinase (nmol NADH/mg protein)	50 \pm 10	60 \pm 10*	40 \pm 3	50 \pm 1*
GAPDH (μ mol NADH/mg protein)	0.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1*	1.2 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2*
PK (μ mol pyruvate/mg protein)	2.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3*	2 \pm 0.5	1 \pm 0.3*
AK (μ mol ADP/mg protein)	2.4 \pm 0.6	3.0 \pm 0.9	1 \pm 0.4	1 \pm 0.2
Cy-CK (μ mol creatine/min/mg protein)	4.0 \pm 0.7	6.0 \pm 1*	2 \pm 0.7	3 \pm 0.6
Mit-CK (μ mol creatine/min/mg protein)	4.0 \pm 1.0	4.3 \pm 1.1	2 \pm 0.7	3 \pm 0.6
LDH (U/L)	128 \pm 33	118 \pm 11*	158 \pm 11	120 \pm 16*

Data are mean \pm SD for 7 independent experiments performed in triplicate

GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, PK pyruvate kinase, AK adenylate kinase, Cy-CK cytosolic creatine kinase, Mit-CK mitochondrial creatine kinase, LDH lactate dehydrogenase

* $p < 0.05$ compared to the controls (Student's t test)

We then examined β -alanine effects on the enzyme activities of the phosphoryl transfer network. The activity of hexokinase was enhanced significantly in both tissues treated with β -alanine, cerebral cortex [$t(10) = 2.50$; $p < 0.05$] and cerebellum [$t(10) = 3.45$; $p < 0.05$]; on the other hand, GAPDH [$t(10) = 2.34$; $p < 0.05$] has decreased their activity in cerebellum, but enhanced in cerebral cortex [$t(10) = 3.10$; $p < 0.05$]. The activities of enzymes PK and LDH were decreased by chronic administration of β -alanine in cerebral cortex (PK: [$t(11) = 4.30$; $p < 0.001$]) and cerebellum (PK: [$t(11) = 4.03$; $p < 0.05$]; LDH [$t(10) = 4.49$; $p < 0.001$]). In respect to AK and mitochondrial CK (Mit-CK), the overhead of β -alanine did not alter their activity. Though the Cy-CK [$t(11) = 3.22$; $p < 0.05$] activity has increased in the rats cerebral cortex (Table 2).

We investigated the effect of β -alanine chronic administration on the respiratory chain enzyme activities in an attempt to elucidate whether the respiratory chain activity could be altered by β -alaninemia. We found that complex II-III was not altered by the treatment. However, β -alanine significantly increased the activities of complex II [$t(10) = 2.37$; $p < 0.05$] only cerebellum, complex IV in cerebral cortex [$t(10) = 2.65$; $p < 0.05$] and cerebellum [$t(10) = 2.52$; $p < 0.05$] and succinate dehydrogenase (SDH) in cerebral cortex [$t(10) = 2.43$; $p < 0.05$] and cerebellum [$t(10) = 2.25$; $p < 0.05$] (Table 3).

Finally, we observed the effect of β -alanine on some amino acids profile in plasma. Chronic exposure of β -alanine increased plasma concentration of glutamate [$t(4) = 4.78$; $p < 0.05$], serine [$t(4) = 3.55$; $p < 0.05$], and glycine [$t(4) = 2.59$; $p < 0.05$], but did not alter histidine, tyrosine, and phenylalanine levels (Table 4).

Discussion

Some authors suggest that β -alanine works as a neuromodulator and a neurotransmitter naturally in the human central nervous system (CNS). A genetic defect in β -alanine metabolism may increase its concentration to abnormal levels in CNS and other tissues, characterizing an inborn error of

Table 4 Effect of chronic administration of β -alanine on some plasma amino acids profile of young Wistar rats

Amino acids (μ M)	Control	β -alanine
Glutamate	102 \pm 13	177 \pm 23*
Serine	328 \pm 70	536 \pm 73*
Histidine	195 \pm 7	257 \pm 45
Glycine	573 \pm 22	829 \pm 169*
Tyrosine	41.6 \pm 9.6	63.1 \pm 23.9
Phenylalanine	15.4 \pm 5.1	24.7 \pm 8.5

Data are mean \pm SD for 5 independent experiments

* $p < 0.05$ compared to the controls (Student's t test)

metabolism. 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. In high concentration, this β -amino acid inhibits GABA uptake by competing for GABA transporters 3 (GAT-3) and GABA transporters 4 (GAT-4) [1]. The main biochemical events are high concentrations of β -alanine and GABA in urine in the patients suffering from this disease. Tiedje et al. [1] report that in the brain the amplitude of the β -alanine response at the level of the GABA_A receptor is similar to that elicited by GABA, suggesting that β -alanine can change the membrane potential of neurons in the CNS when released and applied to synaptic receptors.

These modular alterations may be accompanied by important cellular disorders. Previous studies have reported that both in vitro and in vivo acute, β -alanine can change the cellular redox potential, significantly increasing the oxidative stress in brain tissue. In this context, the main objective of this study was to investigate the effects of this amino acid accumulating in β -alaninemia on some parameters of oxidative stress, activities of critical enzymes of the phosphoryl transfer network and the respiratory chain enzyme activities in cerebral cortex and cerebellum of young rats to improve mechanistic insight for β -alaninemia.

We observed that β -alanine administration might be increasing the reactive species production in rat brains,

Table 3 Effect of chronic administration of β -alanine on the respiratory chain enzyme activities

Respiratory chain complex	Cerebral cortex		Cerebellum	
	Control	β -alanine	Control	β -alanine
Complex II (nmol DCIP/mg protein)	3.8 \pm 0.4	3.8 \pm 0.9	4.8 \pm 0.9	6.2 \pm 1.0*
Complex II-III (nmol cytochrome c/mg protein)	23.4 \pm 2.0	24.7 \pm 5.2	19.3 \pm 4.8	21.1 \pm 2.6
Complex IV (nmol cytochrome c/mg protein)	13.8 \pm 2.1	18.3 \pm 3.6*	20.3 \pm 5.8	31.5 \pm 9.3*
SDH (nmol DCIP/mg protein)	8.3 \pm 1.1	13.2 \pm 4.8*	12.5 \pm 1.1	15.94 \pm 3.5*

Data are mean \pm SD for 7 independent experiments performed in triplicate

DCIP dichlorophenolindophenol, SDH succinate dehydrogenase

* $p < 0.05$ compared to the controls (Student's t test)

determined the investigation of the oxidation of DCFH in rat brain. Since the use of the DCFH technique may not represent the actual value of reactive species in the tissue, the results should be analyzed with caution, since there are other methods more reliable for measurement [30]. However, along with other findings of the work, we can assume that the high production of reactive species is contributing to the oxidative imbalance.

We noticed that an increase in the concentration of reactive species might act as some oxidant system proteins, since the thiol groups (SH) are highly susceptible to such oxidation. This hypothesis is supported by the decrease in the total content of thiol observed in the cerebellum. The reactive species can react with SH forming disulfide bonds (S–S) in proteins once the analysis determines free SH in the sample [31]. On the other hand, we observed the increases the content of total thiol in the cerebral cortex. This result corroborates with the findings by our research group, showing that acute administration of β -alanine increases the content of total thiol, related with increase in tripeptide glutathione (GSH) synthesis [32]. Although the brain has defenses against reactive species, there is considerable evidence that oxidative damage directly or indirectly, due to free radical production and reactive oxygen species, can lead to brain injury. There are several control systems and containment of production RL and ROS in this context including antioxidant enzymes such as GPx, SOD, CAT, and dietary free radical scavengers (ascorbate, α -tocopherol), as well as the endogenous GSH.

The same was observed in the activity of the antioxidant enzymes SOD and GPx. These enzymes are the first barrier against reactive species and are essential to cell survival, keeping the cellular redox homeostasis [33]. GPx and SOD activity decreased in the brain possibly as a consequence of a production increase of hydrogen peroxide (H_2O_2) or superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) favored by the enzyme inhibition. The cytotoxic effect of ROS can be caused by hydroxyl radical (OH^{\bullet}) generated from catalyzed reactions with Fe^{2+} , in a system called of Fenton reaction. The GPx and SOD are important for the clearance in high concentrations of H_2O_2 and $O_2^{\bullet-}$, respectively, but increased levels of OH^{\bullet} can directly or indirectly inhibit the activity of antioxidant enzymes [14]. The finding is in agreement with some results from our group, where we observe that the accumulation of lysine, phenylalanine, and leucine also inhibits the activity of antioxidant enzymes [10, 34, 35]. SOD activity was not altered by β -alanine administration in the cerebral cortex.

It was observed in previous studies that acute exposure to β -alanine alters the redox homeostasis cerebellar, confirming the same changes observed in this work [8]. The brain tissue is particularly sensitive to oxidative stress, and oxygen consumption is one of the main causes of the high production of ROS. Furthermore, previous findings have also shown cerebellar involvement in the stress response [36]. Oxidative stress

is now considered an inducer of neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Oxidative stress induces excitotoxicity, neuronal loss, and axonal damage [37].

This increase in ROS production is accompanied by increased consumption and metabolism of cellular glucose, once the brain can metabolize up to $\sim 4 \times 10^{21}$ molecules of glucose per minute. The glycolytic metabolism stimulates the activity of phosphoryl transfer network, being responsible for communication between intracellular ATP consumption and ATP production processes, catalyzed by specific enzymes as hexokinase, GAPDH, CK, AK, PK, and LDH [26, 38, 39].

The results demonstrate that chronic exposure of β -amino acid increases the activity of the glycolytic enzyme hexokinase. In human brain development, the equilibrium of energy balance is essential for the proper functioning and maintenance of energy homeostasis, where hexokinase is a key enzyme in energy signal. Moreover, the enzyme's activity increase may be related to the need for ATP in the cerebral tissue, since tissue presents oxidative changes.

However, the tissues responded differently in some parameters analyzed. In the cerebral cortex, the activity of GAPDH and CK enzymes was increased, differently from that observed in the cerebellum where the activity was inhibited. The GAPDH an important enzyme of the glycolysis pathway, where glyceraldehyde-3-P is oxidized to 1,3-bisphosphoglycerate, a compound of the glycolysis pathway involved in neuronal apoptosis [40]. The change in GAPDH activity is involved in a variety of neoplastic and neurodegenerative disorders such as prostate cancer, Alzheimer, Huntington, chorea, and Parkinson diseases. Increased expression of GAPDH has been found in certain tumors as well as in proliferating and differentiating cells [41].

According to this hypothesis, we observed that in both tissues, the β -alanine administration decreases the activity of glycolytic enzymes PK and LDH. These changes demonstrate an inhibition of aerobic and anaerobic glycolysis, featuring a low energy tissue, leading to apoptosis. Recently, Bobba et al. [42] classified apoptosis in phases mediated by increased oxidative stress. The researchers described the apoptosis in two stages: In the early phase of apoptosis, glycolysis speeds up, due to hexokinase binding in mitochondria and the oxidative stress operate at low capacity. In the late phase of apoptosis, glucose 6-phosphate level increases through the activity of restoration in hexokinase. Mitochondria work at full capacity, oxidative stress grows up, and cell irreversibly proceeds to death [43].

Mitochondria play a key role in cellular function, as a major site of ATP production, regulating energy expenditure, apoptosis signaling, and producing reactive oxygen species. The altered mitochondrial function is known to be a key underlying mechanism of many pathological states [44]. Citrate synthase is a matrix enzyme marker, while cytochrome c

oxidase and succinate dehydrogenase are representative enzymes from the inner mitochondrial membrane [45]. The ATP synthesis rates may be normalized by using a denominator that allows comparison between groups. For example, expressing rates per wet weight tissue is ideal for assessing oxidative capacity per unit tissue mass, regardless of eventual differences in mitochondrial content. Normalizing to mitochondrial protein content, citrate synthase activity, or mitochondrial DNA accounts for differences in mitochondrial content and provides an index of the inherent mitochondrial properties, independent of differences in tissue mitochondrial content. In the present work, only the protein content was used for normalizing the activities of the complexes. Besides, it could be interesting to evaluate at which extend the differences observed could be due to variations in the mitochondrial mass of the analyzed tissues or to the expression levels of the given enzymes rather than changes in the activity of the MRC complexes.

Mitochondrial respiratory complex II-III activity was not altered by the β -alanine administration, whereas SDH, complex II, and complex IV activities were enhanced by approximately 30–50%. It is known that complex III is the main source of H^+ transport in the mitochondria for ATP synthesis. The increase of SDH activity may provide electrons for II and III complexes activities. The increase of complex IV activity is a way of drain half of the produced H^+ to synthesize water instead of ATP. These results, together with the normal activity of mitochondrial CK, and the diminished pyruvate synthesis caused by reduced PK activity, suggest that the mitochondrial synthesis of ATP may be reduced. Besides, the increase of cytosolic CK is possibly a tentative to maintain the energy homeostasis, since the increased enzymatic activity can be a compensatory low ATP level in the tissue.

Furthermore, it is important in the study the ability of β -alanine in high concentration significantly reduces the expression of mitochondrial proteins [46] and inhibit taurine, GABA, and glycine uptake by competing with specific transporters [1]. These changes are in agreement with our findings, since we observed an increase of plasma glycine and glutamate. In this context, increased levels of glutamate can be evidenced as compensation for high levels of GABA in plasma [47]. Taurine exerts many functions, like detoxification, membrane stabilization, osmoregulation, and modulation of cellular calcium levels. Taurine, with glutamate uptake and release, may represent one form of communication between neurons and glial cells [46]. Data from several works suggest that taurine may act as a buffer against oxidative stress [48–50]. Considering that taurine is a potent scavenger of the hydroxyl radical, it is possible that the increase of β -alanine associated to taurine deficit promoted the formation of this radical in the cerebral tissue [50].

Thus, we can assume that the β -alanine administered chronically cause cellular oxidative damage, generating

significant energy disturbance. Also, the β -amino acid exerts an important role in the metabolism of GABA and taurine, two important elements for brain neurogenesis. Therefore, the possible clinical consequences presented by patients as convulsions, coma, somnolence, lethargy, hypotonia, hyporeflexia, developmental delay, and mental retardation may result from cellular oxidative stress in brain development.

An antioxidant is any substance that delays, prevents, or removes oxidative damage to a target molecule [49]. Several antioxidants have been used to prevent oxidative stress in animal models of inborn errors of metabolism, like ascorbate and lipoic acid. The most promisors are the natural substances that associate the properties of antioxidants with energy enhancers, like L-carnitine, creatine, and pyruvate [51]. The neuroprotective activity of creatine is a consequence of the simultaneous occurrence of multiple mechanisms conferring on creatine a pleiotropic nature, an effect due to the converging action of direct/indirect antioxidant and ergogenic activities [52–54]. Pyruvate is an antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective agent [55, 56] and readily scavenges hydrogen peroxide in cultured cells [57].

In animal experiments, L-carnitine [58], creatine, and pyruvate [18, 59–62] have been used with beneficial effects. However, in general, dietary antioxidants are almost ineffective for modulate the redox balance in humans. This may explain why, although oxidative damage contributes to the development and pathology of several human diseases, dietary antioxidant supplements have limited efficacy in disease prevention or treatment [63–65]. Therefore, it will be necessary more investigation before supplement dietary antioxidants may be prescribed to the patients affected by β -alaninemia and others inborn errors of metabolism.

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) number 306928/2014-0, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Compliance with Ethical Standards 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.

References

1. Tiedje KE, Stevens K, Barnes S, Weaver DF (2010) Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Int* 57:177–188. doi:10.1016/j.neuint.2010.06.001
2. Sale C, Saunders B, Harris RC (2010) Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise

- performance. *Amino Acids* 39:321–333. doi:10.1007/s00726-009-0443-4
3. Scriver CR, Puschel S, Davies E (1966) Hyper-beta-alaninemia associated with beta-aminoaciduria and gamma-aminobutyricaciduria, somnolence and seizures. *N Engl J Med* 274:635–643. doi:10.1056/NEJM196603242741201
 4. Krnjevic K (1965) Actions of drugs on single neurones in the cerebral cortex. *Br Med Bull* 21:10–14
 5. Mori M, Gähwiler BH, Gerber U (2002) Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 539:191–200. doi:10.1013/jphysiol.2001.013147
 6. Shetewy A, Shimada-Takaura K, Warner D et al (2016) Mitochondrial defects associated with b-alanine toxicity: relevance to hyper-beta-alaninemia. doi: 10.1007/s11010-016-2688-z
 7. Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith R (2001) Disorders of β - and γ - amino acids in free and peptide-linked forms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw Hill, New York, pp. 2079–2105
 8. 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* 380:161–170. doi:10.1007/s11010-013-1669-8
 9. Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776
 10. Seminotti B, da Rosa MS, Fernandes CG et al (2012) Induction of oxidative stress in brain of glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice by acute lysine administration. *Mol Genet Metab* 106:31–38. doi:10.1016/j.ymgme.2012.03.002
 11. Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
 12. Hayashi M (2009) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology* 29:1–8. doi:10.1111/j.1440-1789.2008.00888.x
 13. Halliwell B (2011) Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 32:125–130. doi:10.1016/j.tips.2010.12.002
 14. Halliwell B (2000) Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 72:1082–1087
 15. Halliwell B (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 70:257–265. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x
 16. Joseph MH (1986) Amino acids and small peptides. In: *HPLC small Pept*. Oxford, Oxford, pp. 13–27
 17. Ritter L, Kleemann D, Hermes F et al (2015) Biochimica et Biophysica Acta Disturbance of energy and redox homeostasis and reduction of Na^+ , K^+ -ATPase activity provoked by in vivo intracerebral administration of ethylmalonic acid to young rats. 1852:759–767.
 18. de Andrade RB, Gemelli T, Rojas DB et al (2014) Creatine and pyruvate prevent the alterations caused by tyrosine on parameters of oxidative stress and enzyme activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex of Wistar rats. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-014-8791-9
 19. 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. doi:10.1016/S0304-3940(01)01636-6
 20. LeBel CP, Isehropoulos 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
 21. Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handb. Methods Oxyg. Radic. Res.* pp 243–7
 22. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325–333
 23. 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* 279:39846–39855. doi:10.1074/jbc.M403835200
 24. Mazzola JL, Sirover MA (2005) Aging of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is dependent on its subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* 1722:168–174. doi:10.1016/j.bbagen.2004.12.010
 25. Leong SF, Lai JC, Lim L, Clark JB (1981) Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 36:1548–1556
 26. Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM et al (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137–1143
 27. Hugues BP (1962) A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase. *Clin Chim Acta* 7: 597–603
 28. Rustin P, Chretien D, Bourgeon T et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51
 29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–267
 30. Jay H, Augusto O, Brigelius-flohe R et al (2015) Free Radical Biology and Medicine Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology 78:233–235.
 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. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.008
 32. Gemelli T, 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* 380:161–170. doi:10.1007/s11010-013-1669-8
 33. Alirezaci M (2015) Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats. *Iran J Basic Med Sci* 18:950–957
 34. de Franceschi ID, Rieger E, Vargas AP et al (2013) Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 38:632–643. doi:10.1007/s11064-012-0961-4
 35. Sitta A, Barschak AG, Deon M et al (2009) Effect of short- and long-term exposition to high phenylalanine blood levels on oxidative damage in phenylketonuric patients. *Int J Dev Neurosci* 27: 243–247. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.01.001
 36. Shao W, Chen J, Fan S et al (2015) Combined metabolomics and proteomics analysis of major depression in an animal model: perturbed energy metabolism in the chronic mild stressed rat cerebellum. *OMICS* 19:383–392. doi:10.1089/omi.2014.0164
 37. Chirchù V, Orlacchio A, Maccarrone M (2016) Review Article Is modulation of oxidative stress an answer? The state of the art of redox therapeutic actions in neurodegenerative diseases *Oxid Med Cell Longev* doi: 10.1155/2016/7909380
 38. Dzeja PP (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206:2039–2047. doi:10.1242/jeb.00426
 39. Dzeja PP, Bortolon R, Perez-Terzic C et al (2002) Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by

- catalyzed phosphotransfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10156–10161. doi:10.1073/pnas.152259999
40. Zahid S, Oellerich M, Asif AR, Ahmed N (2014) Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res* 39:208–215. doi:10.1007/s11064-013-1210-1
 41. Perrotta I, Aquila S, Mazzulla S (2014) Expression profile and subcellular localization of GAPDH in the smooth muscle cells of human atherosclerotic plaque: an immunohistochemical and ultrastructural study with biological therapeutic perspectives. *Microsc Microanal* 20:1145–1157. doi:10.1017/S1431927614001020
 42. Bobba A, Amadoro G, La Piana G et al (2015) Glucose-6-phosphate tips the balance in modulating apoptosis in cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 589:651–658. doi:10.1016/j.febslet.2015.01.031
 43. Bobba A, Amadoro G, Piana G La et al (2015) Glucose-6-phosphate tips the balance in modulating apoptosis in cerebellar granule cells. 589:651–658.
 44. Lanza IR, Nair KS (2009) Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol* 457:349–372. doi:10.1016/S0076-6879(09)05020-4
 45. Wiegand G, Remington SJ (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Chem* 15:97–117. doi:10.1146/annurev.bb.15.060186.000525
 46. Jong CJ, Ito T, Mozaffari M et al (2010) Effect of beta-alanine treatment on mitochondrial taurine level and 5-taurinomethyluridine content. *J Biomed Sci* 17(Suppl 1):S25. doi:10.1186/1423-0127-17-S1-S25
 47. Budczies J, Brockmüller SF, Müller BM et al (2013) Comparative metabolomics of estrogen receptor positive and estrogen receptor negative breast cancer: alterations in glutamine and beta-alanine metabolism. *J Proteome* 94:279–288. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.002
 48. Heller-stilb B, van Roeyen C, Rascher K et al (2001) Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. doi: 10.1096/fje.01-0691fje
 49. Ahmad MK, Khan AA, Mahmood R (2013) Taurine ameliorates potassium bromate-induced kidney damage in rats. *Amino Acids* 45:1109–1121. doi:10.1007/s00726-013-1563-4
 50. Ahmad MK, Mahmood R (2014) Protective effect of taurine against potassium bromate-induced hemoglobin oxidation, oxidative stress, and impairment of antioxidant defense system in blood. *Wiley Online Library* 304–313. doi: 10.1002/tox
 51. Owen L, Sunram-Lea SI (2011) Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: a review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine. *Nutrients* 3(8):735–755. doi:10.3390/nu3080735
 52. Sestili P, Ambrogini P, Barbieri E, Sartini S, Fimognari C, Calcabrini C, Diaz AR, Guescini M et al (2016) New insights into the trophic and cytoprotective effects of creatine in vitro and in vivo models of cell maturation. *Amino Acids* 48:1897–1911. doi:10.1007/s00726-015-2161-4
 53. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S (2002) Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290(47–52):35. doi:10.1006/bbrc.2001.6164
 54. Sartini S, Sestili P, Colombo E, Martinelli C, Bartolini F, Ciuffoli S, Lattanzi D, Sisti D et al (2012) Creatine affects in vitro electrophysiological maturation of neuroblasts and protects them from oxidative stress. *J Neurosci Res* 90:435–446. doi:10.1002/jnr.22762
 55. Jagtap JC, Chande A, Chopde BA, Shastry P (2003) Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *J Chem Neuroanat* 26:109–118. doi:10.1016/S0891-0618(03)00037-1
 56. Das UN (2006) Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monit* 12:RA79–RA84
 57. Desagher S, Glowinski J, Premont J (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17:9060–9067
 58. Mescka CP, Rosa AP, Schirmbeck G, da Rosa TH, Catarino F, de Souza LO, Guerreiro G, Sitta A et al (2016) L-carnitine prevents oxidative stress in the brains of rats subjected to a chemically induced chronic model of MSUD. *Mol Neurobiol* 53:6007–6017. doi:10.1007/s12035-015-9500-z
 59. Berti SL, Nasi GM, Garcia C, Castro FL, Nunes ML, Rojas DB, Moraes TB, Dutra-Filho CS et al (2012) Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metab Brain Dis* 27:79–89. doi:10.1007/s11011-011-9271-9
 60. Andrade VS, Rojas DB, Oliveira L, Nunes ML, de Castro FL, Garcia C, Gemelli T, de Andrade RB et al (2012) Creatine and pyruvate prevent behavioral and oxidative stress alterations caused by hypertryptophanemia in rats. *Mol Cell Biochem* 362:225–232. doi:10.1007/s11010-011-1147-0
 61. Bortoluzzi VT, de Franceschi ID, Rieger E, Wannmacher CM (2014) Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res* 39:1594–1602. doi:10.1007/s11064-014-1353-8
 62. Rieger E, de Franceschi ID, Preissler T, Wannmacher CMD. (2017) Neuroprotective effect of creatine and pyruvate on enzyme activities of phosphoryl transfer network and oxidative stress alterations caused by leucine administration in Wistar rats. *Neurotox Res* doi: 10.1007/s12640-017-9762-5. [Epub ahead of print]
 63. Halliwell B. (2011) Free radicals and antioxidants—quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 32:125–130. doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002. *Biochem Biophys Res Commun* 393:561–564. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071.
 64. Wyss JM (2009) Perinatal taurine depletion increases susceptibility to adult sugar-induced hypertension in rats. *Adv Exp Med Biol* 643:123–133. doi:10.1007/978-0-387-75681-3
 65. Gutteridge JM, Halliwell B (2010) Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393:561–564. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.071

4 DISCUSSÃO

Os principais sintomas clínicos apresentados pelos portadores de β -alaninemia consistem em disfunção neurológica, como convulsões, coma, sonolência, letargia, hipotonia, hiporreflexia, atraso no desenvolvimento e retardo mental. Alterações bioquímicas como excreção aumentada de β -alanina, GABA e taurina na urina também fazem parte do fenótipo da doença (Scriver; Pueschel; Davies, 1966). Acredita-se que os transtornos cerebrais apresentados pelos portadores da patologia estejam ligados aos efeitos direto e/ou indireto do acúmulo de β -alanina no sangue, como também ao distúrbio no metabolismo dos seus metabólitos (Tiedje et al., 2010). Ela exerce diversas funções em distintas áreas cerebrais, gerando alterações seletivas em diferentes regiões do cérebro, sendo o padrão heterogêneo de resposta um reflexo da sua atuação e distribuição.

Entre as descobertas mais recentes dos efeitos *in vitro* e do acúmulo do β -aminoácido estão a capacidade de alteração do sistema redox celular, que gera alterações específicas no estado oxidativo cerebral, e a alteração na comunicação da rede de fosforiltransferência. Esses achados reforçam a hipótese de que o dano celular provocado pela β -alanina tem grande impacto na neurogênese cerebral e pode ser um dos pontos-chave da fisiopatologia da doença (Gemelli et al., 2013). Com isso, buscamos avaliar os efeitos do impacto da sobrecarga crônica da β -alanina em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar.

A β -alanina foi administrada durante um período importante de desenvolvimento cerebral (oitavo ao vigésimo primeiro dia de vida), em que a proliferação neuronal, mielogênese e sinaptogênese estão em fase intensa de evolução (Clark et al., 1993). Nessa fase, podemos observar o impacto da alta

concentração de β -alanina e seus metabólitos no desenvolvimento cerebral e dimensionar os possíveis efeitos tóxicos desse β -aminoácido na β -alaninemia (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo, das enzimas do metabolismo intermediário e dos complexos respiratórios

	Córtex Cerebral	Cerebelo
Oxidação diclorofluorescina	↑	↑
Sulfidrilas	↑	↓
Glutathiona peroxidase	↓	↓
Superóxido dismutase	---	↓
Hexoquinase	↑	↑
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	↑	↓
Piruvato-cinase	↓	↓
Creatina-cinase citosólica	↑	---
Creatina-cinase mitocondrial	---	---
Lactato desidrogenase	↓	↓
Complexo II	---	↑
Complexo II-III	---	---
Complexo IV	↑	↑
Succinato desidrogenase	↑	↑

Legenda: ↑ = Aumento do conteúdo/atividade; ↓ = inibição do conteúdo/atividade; --- = sem alteração

Avaliamos o estado redox celular do córtex cerebral e cerebelo após a exposição crônica de β -alanina diante de alguns parâmetros de estresse oxidativo. Observamos que os níveis de ER estavam elevados em ambos os tecidos estudados, corroborando os achados do grupo (Gemelli et al., 2013). A técnica utilizada na

determinação das ERs não é específica, no entanto, é válida como um método de triagem e avaliação do teor de ER nos tecidos estudados (Forman et al., 2015). Portanto, podemos assumir que a alta concentração de ER encontrada nos tecidos esteja impactando no desequilíbrio oxidativo, uma vez que outros achados do trabalho reforçam a presença de alteração redox.

Essa elevação das ERs no tecido representa um importante alerta celular. Observamos que em ambos os tecidos houve uma alteração nos níveis do conteúdo de tióis totais possivelmente em função da resposta tecidual ao aumento dos níveis de ER. Verificamos que, no córtex cerebral, os níveis dos tióis foram aumentados. Relacionamos essa elevação ao possível aumento na síntese de GSH, uma vez que é um importante antioxidante endógeno responsável pela detoxificação do H_2O_2 no tecido cerebral (Halliwell, 2012). Infelizmente, não podemos determinar especificamente a concentração de GSH nos tecidos, pois a β -alanina interfere diretamente na determinação, visto que possui estrutura química muito similar ao GSH, produzindo um falso positivo no momento da leitura.

No entanto, no cerebelo, os níveis de tióis foram diminuídos, o que pode representar uma suscetibilidade maior do cerebelo ao dano oxidativo. As ERs estão atuando diretamente nos resíduos de SH de proteínas metabólicas importantes e oxidando-as a dissulfetos (S-S). Isso demonstra uma resposta mais lenta e menos eficiente perante as ERs presentes no tecido quando comparado ao córtex cerebral.

Avaliamos também a resposta antioxidante enzimática nos tecidos em relação a esse aumento de ER. A atividade da GPx em ambos os tecidos foi diminuída, juntamente com a capacidade detoxificadora da enzima SOD. Esses achados não surpreendem, pois em estudo *in vitro*, realizado pelo grupo de pesquisa, observamos que a β -alanina foi capaz de inibir a atividade antioxidante da SOD (Gemelli et al.,

2013). Essas alterações reforçam a presença de dano oxidativo proveniente do descontrole na propagação de reações de síntese de novas ERs. Com os principais sistemas de defesa antioxidante celular bloqueados (GPx e SOD), essas ERs podem se desviar para reações específicas, como a reação de Fenton e Haber-Weiss, e potencializar a síntese de RL, como o radical $\text{OH}\cdot$. Este, por sua vez, pode atuar direta ou indiretamente, inibindo essas enzimas antioxidantes.

A produção de ERO no tecido cerebral é fisiológico e natural (Shao et al., 2015), pois é proveniente do consumo de oxigênio nos processos metabólicos. Contudo, a perda de regulação e contenção da produção dessas espécies leva o tecido a um estado de estresse oxidativo, gerando um prejuízo celular muitas vezes irreversível. Essa alteração oxidativa é hoje associada como indutora de distúrbios neurodegenerativos, bem caracterizada nas doenças de Alzheimer e Parkinson (Chiurchiù; Orlacchio; Maccarrone, 2016). Naturalmente, o tecido cerebral é sensível ao estresse oxidativo, pois facilmente induz excitotoxicidade, perda neuronal e dano axonal. Corroborando a dependência do consumo de glicose como substrato energético, avaliamos a capacidade desses tecidos em manter a homeostasia energética em uma situação de desequilíbrio oxidativo.

A rede de fosforiltransferência é uma rede articulada com envolvimento de enzimas específicas do metabolismo energético. A primeira enzima que avaliamos foi a hexoquinase, enzima iniciadora da via glicolítica e responsável por fosforilar a molécula de glicose (Dzeja, 2003). Observamos que a atividade da enzima está elevada nos dois tecidos estudados. Essa alteração pode representar duas hipóteses: 1- no desenvolvimento cerebral a necessidade energética é alta para a manutenção de todos os processos biológicos, justificando sua ativação; 2- a lesão celular causada pela ação das ERs demanda maior necessidade energética, visto que todos os

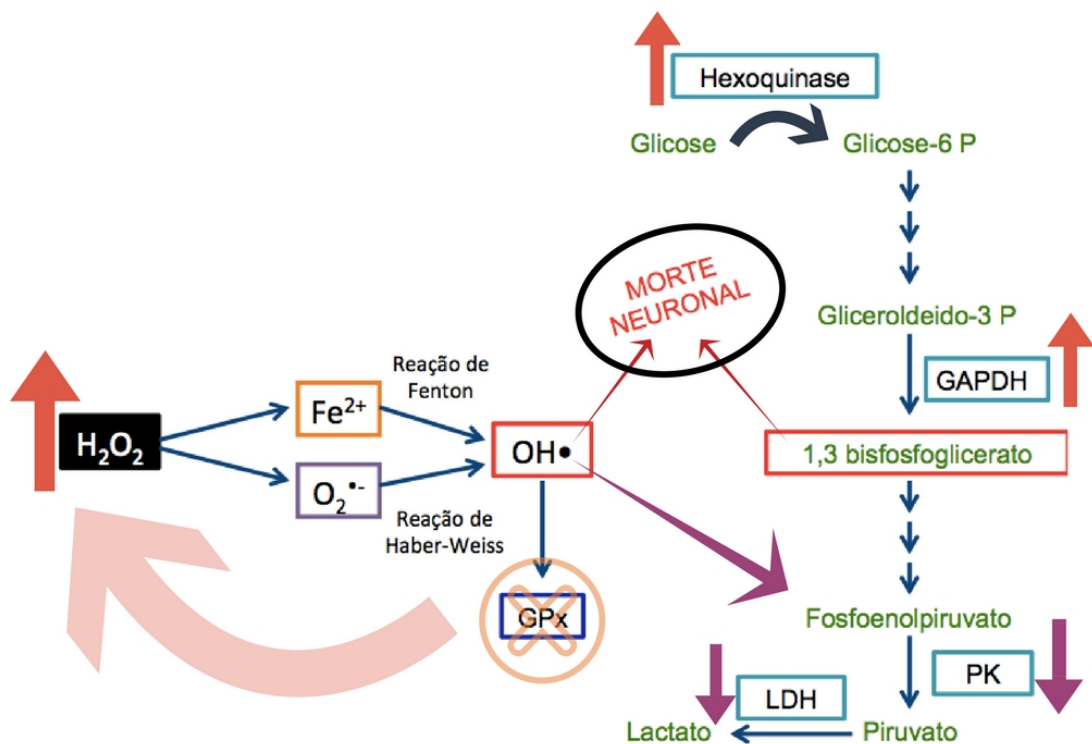
processos em desequilíbrio geram uma deficiência no aporte de ATP. Com isso, entendemos que o aumento na atividade da hexoquinase pode ser em decorrência desses dois fatores presentes nos tecidos.

Seguindo a lógica de que um aumento da atividade da hexoquinase representa uma ativação da via glicolítica, avaliamos a atividade da GAPDH. No entanto, somente no córtex cerebral encontramos um aumento da atividade da enzima, o que reforça novamente a hipótese de resposta tecido específica, em que a β -alanina exerce funções diferentes nos tecidos. O produto metabólico da GAPDH, o 1,3-bisfosfoglicerato, está envolvido na apoptose neuronal e em diversos processos patológicos neoplásicos e neurodegenerativo (Zahid et al., 2014).

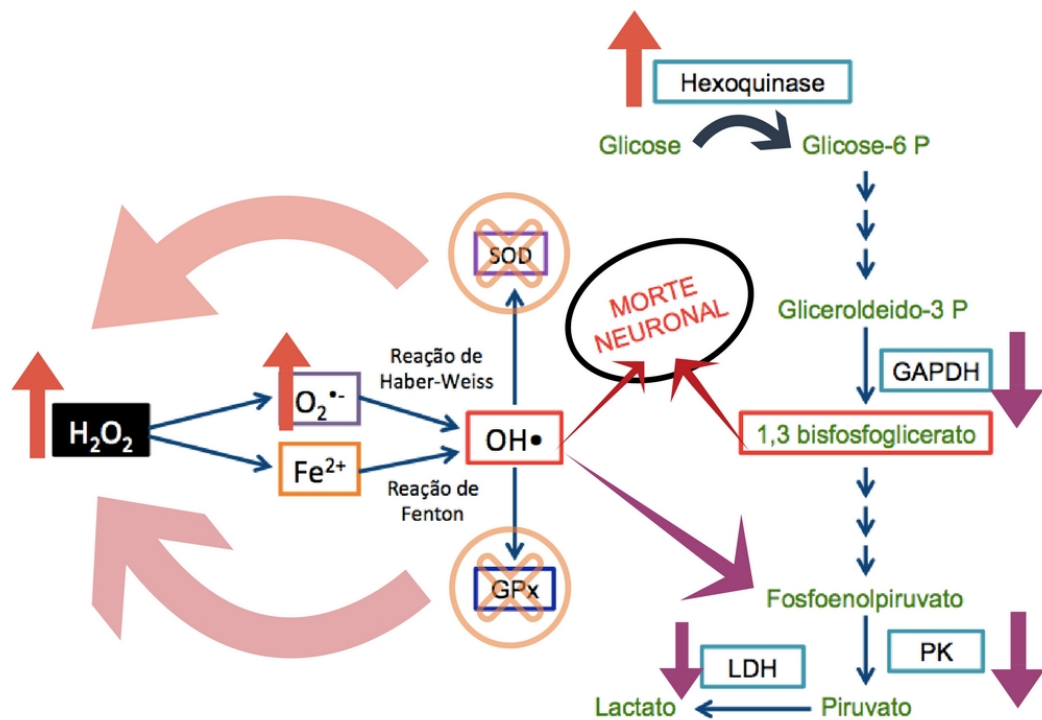
Além da GAPDH, outra enzima que difere na forma de resposta é a PK, em que houve um aumento significativo somente no córtex. Pensando na resposta individual de cada tecido, houve uma coerência entre os achados, pois nos mostram que no córtex a via glicolítica está ativa em resposta a uma mudança da homeostasia redox desse tecido. Em contraponto no cerebelo, temos um dano celular maior, em que, além do dano oxidativo, tem a deficiência na manutenção energética devido à baixa na atividade da via glicolítica, ocasionando uma maior suscetibilidade a um dano celular irreversível.

Por fim, observamos uma diminuição da atividade da LDH em córtex cerebral e cerebelo. Essa alteração produz uma inibição da glicólise anaeróbia, diminuindo o estímulo do consumo de glicose celular, função importante no momento crítico de baixa energética, podendo levar à apoptose. O sistema de morte programada pode ser dividido em duas etapas. Na etapa precoce da apoptose, a glicólise acelera, devido à ligação da hexoquinase nas mitocôndrias, e o estresse oxidativo opera em baixa capacidade. Na etapa tardia da apoptose, o nível de glicose-6-fosfato aumenta através

da atividade de restauração em hexoquinase (Bobba et al., 2015). A função das mitocôndrias em plena capacidade aumenta juntamente com o estresse oxidativo, gerando um dano irreversível. Portanto, a apoptose se torna consequência do desequilíbrio redox e energético em ambos os tecidos, porém cada tecido em tempo e fase diferentes (Esquemas 1 e 2).



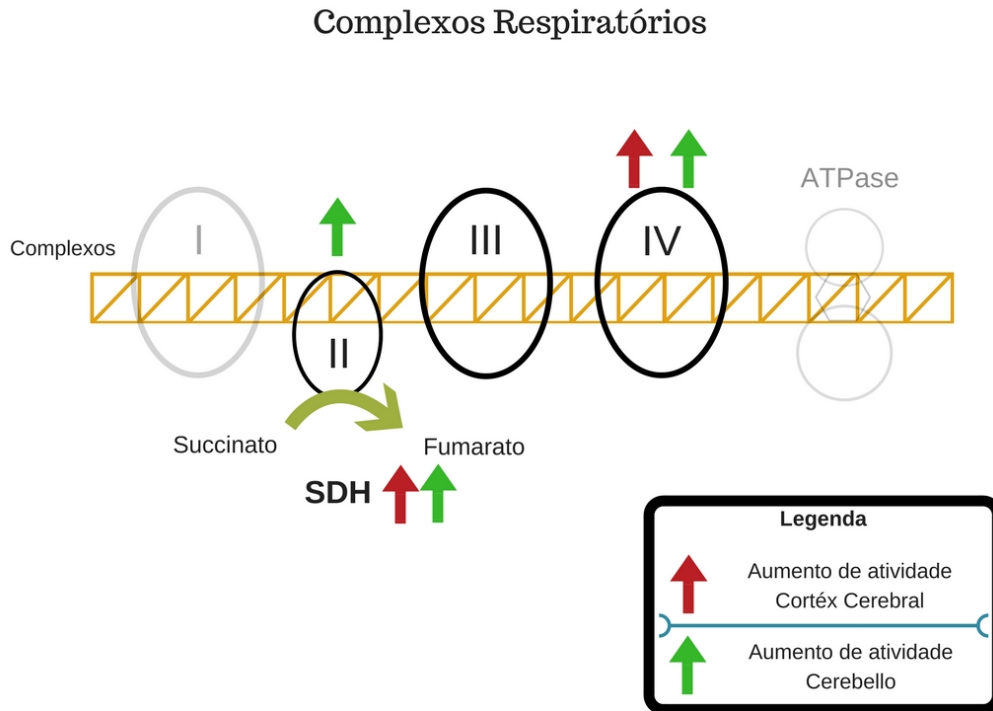
Esquema 1. Alterações observadas no córtex cerebral após sobrecarga de β -alanina sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético
Fonte: a autora (2017).



Esquema 2. Alterações observadas no cérebro após sobrecarga de β -alanina sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético.
Fonte: a autora (2017).

Colaborando na elucidação da hipótese descrita acima, avaliamos a atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE) após a exposição crônica da β -alanina. Observamos que o complexo mitocondrial II-III não foi alterado, enquanto que as atividades do complexo II, IV e SDH foram elevadas. Sabe-se que CTE é responsável pelo bombeamento de H^+ para o espaço intermembrana das mitocôndrias, formando um gradiente eletroquímico necessário para a síntese de ATP (Dzeja et al., 2002). Contudo, o aumento da atividade do complexo IV pode ser uma alternativa para eliminar o excesso de H^+ produzido, uma vez que a síntese de ATP não ocorre normalmente. Essa hipótese corrobora outros achados do trabalho, em que verificamos que a atividade da CK mitocondrial está normal, e a síntese de piruvato diminuída, e em consequência está a baixa atividade da PK. Os dados reforçam a

ideia de uma baixa taxa de produção de ATP nos tecidos, gerando um estado de sofrimento celular em decorrência da baixa energética.



Esquema 3. Alterações observadas no córtex cerebral e cerebelo após sobrecarga de β -alanina em relação à atividade dos complexos respiratórios
Fonte: a autora (2017).

Além disso, identificamos a capacidade da β -alanina em alterar o perfil plasmático de aminoácidos, em que obtivemos uma elevação nos níveis de glutamato, serina e glicina. Fisiologicamente, a β -alanina inibe a captação de taurina, GABA e glicina, pois compete pelos mesmos transportadores específicos desses aminoácidos (Tiedje et al., 2010). Os níveis elevados de glutamato podem ser uma compensação em relação aos níveis elevados de GABA no plasma, uma tentativa de equilíbrio dos níveis plasmáticos. Já a elevação de glicina se dá em decorrência da inibição competitiva da β -alanina pelos transportadores na Barreira Hematoencefálica (BHE).

Contudo, o aumento plasmático da serina pode ser explicado por ela ser um precursor metabólico da síntese de cisteína, um importante aminoácido

proteínogênico, mas também por sua função de precursor de biomoleculares essenciais, tal como a GSH. Podemos relacionar indiretamente os níveis elevados de serina com a necessidade e síntese de GSH como antioxidante proteico no SNC, mais especificamente no córtex cerebral e cerebelo, em demanda das alterações na homeostasia redox e energética.

5 CONCLUSÕES

Identificamos que a forma de resposta dos tecidos diante de elevadas taxas de β -alanina é diferente, pois observa-se que o córtex cerebral possui uma resistência maior ao dano quando comparado ao cerebelo, uma vez que em alguns momentos se percebe uma tentativa de proteção e controle do dano. No entanto, observamos que independentemente das ações de defesa e do tempo de resposta, ambos os tecidos acabam sofrendo com a presença crônica da β -alanina.

6 PERSPECTIVAS

Os achados abrem grandes questionamentos para novos estudos, tais como:

- Investigar as alterações comportamentais ao longo do desenvolvimento cerebral.
- Testar um possível protetor celular como piruvato, mediante as alterações redox e energética.
- Elucidar a ordem de inibição enzimática: inibição da atividade ou inibição de síntese proteica.

REFERÊNCIAS¹

- Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*. 1996;350(1):103-8.
- Artuch R, et al. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. *Clinical Biochemistry*. 2004;37(3):198-203. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.10.017.
- Berkman MZ, et al. Neurotransmitter and amino acid analysis and ultrastructural observations of fetal brain cortex transplantation to adult rat brain under the effect of dexamethasone. *Neurosurgery*. 1998;42(5):1126-33.
- Bickel H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme*. 1987;38(1-4):14-26.
- Bobba A, et al. Glucose-6-phosphate tips the balance in modulating apoptosis in cerebellar granule cells. *FEBS Letters*. 2015;589(5):651-8. doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.031.
- Borden LA, et al. Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *Journal of Neurochemistry*. 1995;64(3):977-84.
- Borden LA, et al. Cloning of the human homologue of the GABA transporter GAT-3 and identification of a novel inhibitor with selectivity for this site. *Receptors & Channels*. 1994;2(3):207-13.
- Borden LA, et al. Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(29):21098-104.
- Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina*. 1998;58(4):350-6.
- Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016. doi: 10.1155/2016/7909380.
- Clark JA, et al. Functional expression and CNS distribution of a beta-alanine-sensitive neuronal GABA transporter. *Neuron*. 1992;9(2):337-48.
- Clark JB, et al. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. *Developmental Neuroscience*. 1993;15(3-5):174-80.
- Dzeja PP, et al. Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency Non-technical Summary. *The Journal of Physiology*. 2011;589(Pt 21):5193-5211. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212829.
- Dzeja PP. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *Journal of Experimental Biology*. 2003;206(12):2039-47.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Dzeja PP, et al. Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(15):10156-61. doi: 10.1073/pnas.152259999.

Dzeja PP, et al. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circulation Research*. 1999;84(10):1137-43.

Folmes CD, et al. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2012;11(5):596-606. doi: 10.1016/j.stem.2012.10.002.

Forman HJ, et al. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;78:233-5. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504>.

Gemelli T, et al. Effects of β -alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2013;380(1-2):161-70. doi: 10.1007/s11010-013-1669-8.

Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;393(4):561-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. 2012;70(5):257-65. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011;32(3):125-30. doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002.

Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72(5):1082-7.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press; 2007. Measurement of reactive species; p. 268-340.

Hayaishi O, et al. Enzymatic studies on the metabolism of beta-alanine. *The Journal of Biological Chemistry*. 1961;236:781-90.

Jursky F, Nelson N. Developmental expression of the neurotransmitter transporter GAT3. *Journal of Neuroscience Research*. 1999;55(3):394-9.

Kihara M, Misu Y, Kubo T. GABA transaminase inhibitors enhance the release of endogenous GABA but decrease the release of beta-alanine evoked by electrical stimulation of slices of the rat medulla oblongata. *Life Sciences*. 1988;42(19):1817-24.

Krnjevic K. Actions of Drugs on Single Neurones in the Cerebral Cortex. *British Medical Bulletin*. 1965;21:10-4.

Mori M, Gähwiler BH, Gerber U. Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *The Journal of Physiology*. 2002;539(1):191-200.

- Navarro A, et al. Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;46(12):1574-80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.007.
- Obuobi S, et al. The role of modulation of antioxidant enzyme systems in the treatment of neurodegenerative diseases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016;31(sup3):194-204. doi: 10.1080/14756366.2016.1205047.
- Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, W. S. Disorders of β - and γ - amino acids in free and peptide-linked forms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8a ed. New York: McGraw Hill; 2001. p. 2079-2105.
- Scriver CR, Pueschel S, Davies E. Hyper-beta-alaninemia associated with beta-aminoaciduria and gamma-aminobutyricacidaia, somnolence and seizures. *The New England Journal of Medicine*. 1966;274(12):635-43.
- Shao W, et al. Combined Metabolomics and Proteomics Analysis of Major Depression in an Animal Model: Perturbed Energy Metabolism in the Chronic Mild Stressed Rat Cerebellum. *OMICS*. 2015;19(7):383-92. doi: 10.1089/omi.2014.0164.
- Tiedje KE, et al. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochemistry International*. 2010;57(3):177-88.
- Tramutola A, et al. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*. 2017;133:88-96. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.06.005.
- Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- van Gennip AH, et al. Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1997;20(2):203-13.
- van Rijt WJ, et al. Inborn Errors of Metabolism That Cause Sudden Infant Death: A Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes. *Neonatology*. 2016;109(4):297-302. doi: 10.1159/000443874.
- Werman R. Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1966;18(4):745-66.
- Yu TW, Anderson D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*. 1997;379(2):201-10.
- Zahid S, et al. Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. *Neurochemical Research*. 2014;39(1):208-15. doi: 10.1007/s11064-013-1210-1.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Concentrações (μM) dos principais metabólitos em plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR)	12
Tabela 2. Resumo dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo, das enzimas do metabolismo intermediário e dos complexos respiratórios.....	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via metabólica das pirimidinas utilizada para conversão de uracila em β -alanina.....	13
Figura 2. Principais vias de metabolização da β -alanina.....	14
Figura 3. Receptores, transportadores e distribuição da β -alanina no SNC. L-ala: L-alanina, L-asp: L-aspartato, BHE: barreira hematoencefálica	15
Esquema 1. Alterações observadas no córtex cerebral após sobrecarga de β -alanina sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético.....	41
Esquema 2. Alterações observadas no cerebelo após sobrecarga de β -alanina sobre parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético.....	42
Esquema 3. Alterações observadas no córtex cerebral e cerebelo após sobrecarga de β -alanina em relação à atividade dos complexos respiratórios	43