

Efeito *in vivo* da administração aguda de beta-alanina sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo no cérebro de ratos.

Bruna May^{1,2}, Tanise Gemelli², Rodrigo Binkowski de Andrade², Denise Bertin Rojas², Clóvis Milton Duval Wannmacher (orientador)²

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS,

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

Introdução

A beta-alaninemia é uma desordem muito rara da via de degradação das pirimidinas conhecido como um erro inato do metabolismo, caracterizando-se pelo acúmulo de beta-alanina (SCRIVER et al, 2001)⁸. As principais manifestações bioquímicas são altas concentrações de beta-alanina e GABA na urina podendo desenvolver patologias clínicas como alterações neurológicas e diferentes anormalidades contribuídas pelo estresse oxidativo (HIGGINS et al, 1994)⁵. O dano oxidativo pode resultar de uma diminuição dos antioxidantes e/ou da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) gerando assim, um acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que causam danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999)⁴. O objetivo do estudo é observar o efeito *in vivo* agudo da beta-alanina em cérebro de ratos de 21 dias de idade sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo.

Metodologia

Ratos Wistar de 21 dias de idade receberam três injeções de beta-alanina (300mg/kg) ou salina (controle) com intervalo de 3 horas. Uma hora após a última injeção os animais foram mortos por decapitação. O córtex cerebral e cerebelo foram retirados e homogeneizados 1:10 (peso/volume) com uma solução de tampão fosfato de sódio 20mM com KCL 140mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 700 G durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e conservado em freezer a -70°C para ser utilizado para os diferentes ensaios de estresse oxidativo.

Os ensaios realizados foram espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)³, conteúdo total de sulfidrilas⁶ e de glutathione reduzida (GSH)², conteúdo de 2'7'diclorofluoresceína formado (DCF)⁷ e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT)¹ e superóxido dismutase (SOD)⁶.

Resultados e Discussão

Inicialmente, nos medimos a produção de espécies reativas pela técnica de DCF (Fig. 1), TBA-RS (Fig. 2) e sulfidrilas (Fig. 3). Observamos que a beta-alanina aumentou os níveis de DCF em córtex cerebral ($t=3,48$; $P<0.05$) e cerebelo ($t=3,04$; $P<0.05$). O mesmo aumento foi observado com o conteúdo total de tiol no córtex cerebral ($t=7,09$; $P<0.05$) e cerebelo ($t=6,44$; $P<0.05$). TBA-RS não foi alterado no modelo de beta-alaninemia em ambos tecidos. Além disso, investigamos os níveis de GSH (Fig. 4) e atividades das enzimas antioxidantes CAT (Fig. 5) e SOD (Fig. 6). Entretanto, não observamos diferença significativa nos níveis de GSH. A beta-alanina foi capaz de aumentar a atividade da CAT em córtex cerebral ($t=5,05$; $P<0.01$) e cerebelo ($t=5,01$; $P<0.01$), mas inibiu a atividade da SOD em córtex cerebral ($t=2,88$; $P<0.05$) e cerebelo ($t=3,00$; $P<0.05$).

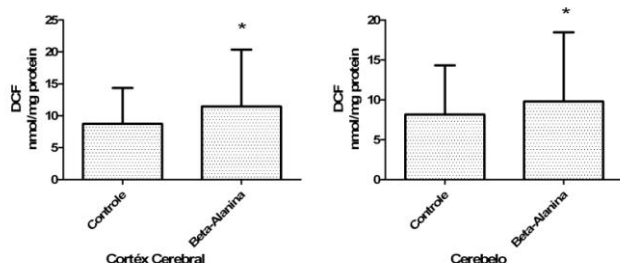


Figura 1 – Efeito da administração aguda de beta-alanina (300mg/kg) sobre o conteúdo de 2',7'-diclorofluoresceína formado (DCF) em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens. Resultados estão expressos em nmol de DCF por mg de proteína. Os dados estão como média $\pm$ DP para 7 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

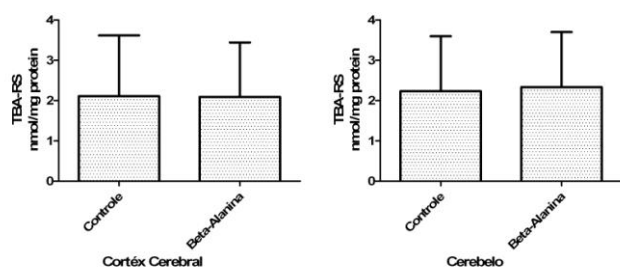


Figura 2 – Efeito da administração aguda de beta-alanina (300mg/kg) sobre a determinação de substâncias reativas ao ácido-tiobarbitúrico (TBARS) em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens. Resultados estão expressos em nmol de TBA-RS por mg de proteína. Os dados estão como média $\pm$ DP para 7 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

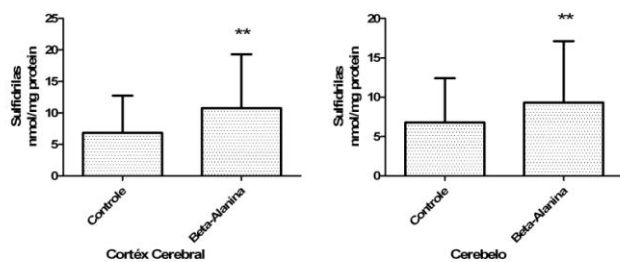


Figura 3 – Efeito da administração aguda de beta-alanina (300mg/kg) sobre o conteúdo total de tiol medido por sulfidrilas em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens. Resultados estão expressos em nmol de TNB por mg de proteína. Os dados estão como média $\pm$ DP para 7 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

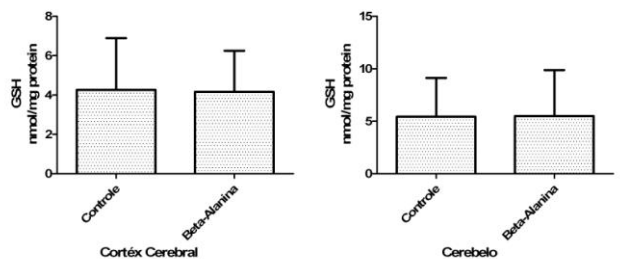


Figura 4 – Efeito da administração aguda de beta-alanina (300mg/kg) sobre os níveis de GSH em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens. Resultados estão expressos em nmol de GSH por mg de proteína. Os dados estão como média $\pm$ DP para 7 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

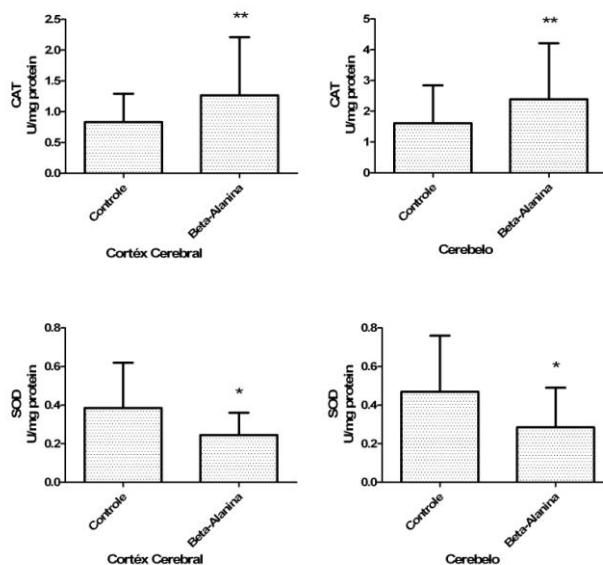


Figura 5 - Efeito da administração aguda de beta-alanina (300mg/kg) sobre a atividade da enzima antioxidante CAT em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens. Resultados estão expressos em unidade de CAT por mg de proteína. Os dados estão como média $\pm$ DP para 7 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

Figura 6 - Efeito da administração aguda de beta-alanina (300mg/kg) sobre a atividade da enzima antioxidante SOD em córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens. Resultados estão expressos em unidade de SOD por mg de proteína. Os dados estão como média $\pm$ DP para 7 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras não pareadas)

Conclusão

Estes resultados sugerem que a administração de beta-alanina induz, direta ou indiretamente, estresse oxidativo. Portanto, caso ocorra o mesmo nos pacientes com beta-alaninemia, é possível que o estresse oxidativo possa ser um dos mecanismos responsáveis pelas alterações cerebrais.

Referências

1. AEBI, H. Catalase, in vitro, *Methods Enzymol.* v.105, p. 121-126, 1984.
2. BROWNE, R.W., ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* v. 108, p. 347-52, 1988.
3. BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v. 52, p. 302-10, 1978.
4. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, W. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. v. 52, p. 253-265, 1999.
5. HIGGINS, J.J., KANESKI, C.R., BERNARDINI, I, BRADY R.O., BARTON, N.W. Pyridoxine-responsive hyper-beta-alaninemia associated with Cohen's syndrome. *Neurology*. v.44, p. 1728-1732, 1994.
6. KUNDU, S.C., WILLSON, R.L., Thiy (sulfhydryl/thiol) free radical reactions, vitamins, beta-carotene, and superoxide dismutase in oxidative stress: design and interpretation of enzymatic studies. *Methods Enzymol.*, v.251, p.36-81, 1995.
7. LEBEL, C.P., ISCHIROPOULOUS, H., BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* v.5, p. 227-231, 1992.
8. SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (eds.). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Ed., *McGraw-Hill*, New York, p. 2079-2105, 2001.