

SIMONE SASSO

**EFEITO DA GALACTOSEMIA CLÁSSICA SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO E DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS**

**JOINVILLE
2019**

SIMONE SASSO

**EFEITO DA GALACTOSEMIA CLÁSSICA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO E DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Daniela Delwing de Lima.

JOINVILLE

2019

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Sasso, Simone

S252e Efeito da galactosemia clássica sobre parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético em ratos / Simone Sasso; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2019.

124 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Galactose. 2. Stress oxidativo. 3. Antioxidantes – Efeito fisiológico. 4. Metabolismo energético. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Título.

CDD 612.39

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

Termo de Aprovação

“Efeito da Galactosemia Clássica sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e de Metabolismo Energético em Ratos”

por

Simone Sasso

Tese julgada para a obtenção do título de Doutora em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

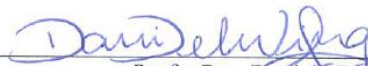


Profª. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:



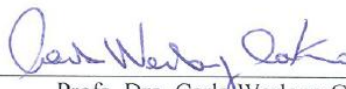
Profª. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)



Profª. Dra. Ana Lúcia Bertarello Zeni
(FURB)



Profª. Dra. Samira Dal-Toé De Prá
(UNISOCIESC)



Profª. Dra. Carla Werlang Coelho
(UNIVILLE)

Joinville, 10 de maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela vida;

Aos meus pais pela boa educação que me passaram e pelo companheirismo em todos os momentos da minha vida;

Ao meu marido Claudio, filho Gabriel e ao nosso futuro filho pelo amor, carinho e apoio;

Aos meus colegas de doutorado que sempre me ajudaram quando precisei.

Aos bolsistas que contribuíram muito para a minha pesquisa e que não mediram esforços para me ajudar;

Em especial agradecer a minha querida orientadora Daniela que sempre esteve ao meu lado me apoiando e ajudando em todos os momentos. O meu muito obrigado de coração por tudo o que fizestes por mim.

Também quero agradecer o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

RESUMO

A galactosemia é um erro inato do metabolismo da galactose, causada pela deficiência na atividade da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase, o que causa acúmulo de galactose e galactose-1-fosfato. Pacientes afetados apresentam disfunção cerebral, incluindo dificuldades cognitivas e sintomas psiquiátricos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos *in vitro* e *in vivo* (injeção intracerebroventricular) de galactose e a influência dos antioxidantes trolox (α -tocoferol), ácido ascórbico e glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e sobre o metabolismo energético em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos de 30 e/ou 60 dias de idade. Nos experimentos *in vitro*, a galactose foi adicionada ao ensaio nas concentrações finais de 0,1, 3,0, 5,0 e 10,0 mM. O grupo controle foi realizado sem a adição de galactose. Nos experimentos *in vivo* os ratos receberam galactose (5,0 mM) ou solução salina por injeção intracerebroventricular e foram sacrificados por decapitação após 1 h. Um outro grupo foi pré-tratado diariamente durante 1 semana com solução salina ou α -tocoferol (40 mg / kg) mais ácido ascórbico (100 mg / kg, i.p.). Doze horas após a última injeção de antioxidantes, os animais receberam uma infusão intracerebroventricular de galactose (5,0 mM) ou salina e foram sacrificados 1 h mais tarde. Nos experimentos *in vitro* a galactose nas concentrações de 3,0, 5,0 e 10,0 mM diminuiu a atividade da piruvato quinase em córtex cerebral e na concentração de 10,0 mM diminuiu a atividade da piruvato quinase em hipocampo. A galactose (10,0 mM) reduziu a atividade da succinato desidrogenase (SDH) e do complexo II no cerebelo e no hipocampo e reduziu a atividade da citocromo C oxidase no hipocampo. Adicionalmente, a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase foi diminuída pela galactose (10,0 mM) no córtex cerebral e no hipocampo; por outro lado, as concentrações de galactose 3,0 e 5,0 mM aumentaram a atividade desta enzima no cerebelo. Nos experimentos *in vivo* a galactose elevou as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), o conteúdo de proteínas carboniladas e a atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) e diminuiu o conteúdo total de sulfidrilas e a atividade da catalase (CAT) no córtex cerebral. No hipocampo, aumentou TBA-RS, diminuiu o teor de sulfidrilas totais e aumentou a atividade da AChE, enquanto no cerebelo diminuiu o conteúdo total de sulfidrilas e aumentou as atividades da CAT e da superóxido dismutase (SOD). Os antioxidantes preveniram total ou parcial as alterações causadas pela galactose na maioria dos parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético *in vivo* e *in vitro*. Concluindo, os dados mostram que a galactose gera estresse oxidativo, interfere no metabolismo energético e altera a atividade da AChE cerebral, o que pode estar associado à sintomatologia neurológica presente em pacientes galactosêmicos. Dessa forma, sugere-se que a administração de antioxidantes seja considerada como uma terapia adjuvante, associada à restrição de galactose, para pacientes galactosêmicos.

Palavras-chave: Galactose; antioxidantes; estresse oxidativo; metabolismo energético; acetilcolinesterase; cérebro.

ABSTRACT

Galactosemia is an innate error in the metabolism of galactose, caused by deficiency in the activity of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase enzyme, and subsequent accumulation of galactose-1-phosphate and galactose. Affected patients present central nervous system dysfunction, including cognitive difficulties and psychiatric symptoms. The aim of this study was to study the *in vitro* and *in vivo* effects (intracerebroventricular injection) of galactose and the influence of the antioxidants trolox (α -tocopherol), ascorbic acid and glutathione on some parameters of oxidative stress, on acetylcholinesterase (AChE) and on energetic metabolism in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30 and / or 60 days-old rats. In the *in vitro* experiments, galactose was added to the assay at the final concentrations of 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM. The control group was performed without the addition of galactose. In the *in vivo* experiments, the rats received galactose (5.0 mM) or saline by intracerebroventricular injection and were sacrificed by decapitation after 1 h. Another group was pretreated daily for 1 week with saline or α -tocopherol (40 mg / kg) plus ascorbic acid (100 mg / kg, i.p.). Twelve hours after the last injection of antioxidants, the animals received an intracerebroventricular infusion of galactose (5.0 mM) or saline and were sacrificed 1 h later. In the *in vitro* experiments, galactose at concentrations of 3.0, 5.0 and 10.0 mM decreased the activity of pyruvate kinase in the cerebral cortex and at concentration of 10.0 mM decreased the activity of pyruvate kinase in hippocampus. Galactose (10.0 mM) reduced the activities of succinate dehydrogenase (SDH) and complex II in the cerebellum and hippocampus and reduced cytochrome C oxidase activity in the hippocampus. In addition, Na^+K^+ -ATPase activity was decreased by galactose (10.0 mM) in the cerebral cortex and in the hippocampus; on the other hand, concentrations of galactose 3.0 and 5.0 mM increased the activity of this enzyme in the cerebellum. In the *in vivo* experiments, galactose increased the reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS), the content of carbonylated proteins and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and decreased total sulfhydryl content and the activity of catalase (CAT) in the cerebral cortex. In the hippocampus, it increased TBA-RS, decreased total sulfhydryl content and increased AChE activity, whereas in the cerebellum it decreased the total sulfhydryl content and increased CAT and superoxide dismutase (SOD) activities. Antioxidants prevented total or partial changes caused by galactose in most parameters of oxidative stress and energy metabolism *in vivo* and *in vitro*. In conclusion, the data show that galactose generates oxidative stress, interferes with energy metabolism and alters the activity of cerebral AChE, which may be associated with the neurological symptomatology present in galactosemic patients. Thus, it is suggested that the administration of antioxidants is considered as an adjuvant therapy, associated with the restriction of galactose, for galactosemic patients.

Keywords: Galactose; antioxidants; oxidative stress, energy metabolism, acetylcholinesterase, brain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da galactose.....	16
Figura 2 - Reação de auto-oxidação.....	19
Figura 3 - Reação de dismutação.....	19
Figura 4 - Reação de Fenton e de Haber-Weiss.....	20
Figura 5 - Reação em cadeia da lipoperoxidação.....	23
Figura 6 - Lipoperoxidação catalisada por íons de Ferro e Cobre.....	23
Figura 7 - Formação do radical hidroxil através da via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA.....	25
Figura 8 - Sistema de defesa enzimático.....	27
Figura 9 - Reação de dismutação do radical superóxido.....	27
Figura 10 - Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.....	28
Figura 11 - Reação catalisada pela enzima glutathione peroxidase.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Erros Inatos do Metabolismo.....	14
3.2 Galactosemia Clássica.....	15
3.3 Radicais Livres.....	18
3.4 Estresse Oxidativo.....	21
3.4.1 Peroxidação Lipídica.....	22
3.4.2 Dano a proteína.....	23
3.4.3 Dano ao DNA.....	24
3.5 Defesas Antioxidantes.....	25
3.6 Sistema de Defesa Enzimático.....	26
3.6.1 Superoxido Dismutase.....	27
3.6.2 Catalase.....	27
3.6.3 Glutathione Peroxidase.....	28
3.7 Sistema de Defesa não Enzimático.....	29
3.7.1 Vitamina C.....	29
3.7.2 Vitamina E.....	30
3.7.3 Glutathione.....	31
3.8 Metabolismo energético.....	32
3.8.1 Glicólise.....	32
3.8.2 Ciclo de Krebs.....	33
3.8.3 Cadeia Respiratória.....	33
3.8.4 Bomba Na ⁺ K ⁺ -ATP-se.....	35
4 INTERDISCIPLINARIDADE	36

5 METODOLOGIA.....	37
5.1 Animais.....	37
5.2 Protocolo Experimental.....	37
5.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	37
5.2.2 Cirurgia e administração intracerebral de galactose.....	37
5.2.3 Prevenção com trolox (alfa-tocoferol), ácido ascórbico e glutatona.....	38
5.2.4 Pré-tratamento com vitaminas E e C.....	38
5.3 Estudos bioquímicos.....	39
5.3.1 Preparação dos tecidos.....	39
5.3.2 TBA-RS.....	39
5.3.3 Catalase (CAT).....	40
5.3.4 Glutathione peroxidase (GSH – Px).....	40
5.3.5 Superóxido dismutase (SOD).....	40
5.3.6 Conteúdo Total de Sulfidrilas.....	41
5.3.7 Conteúdo Total de Carbonilas.....	41
5.3.8 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase	42
5.3.9 Atividade do complexo II e succinato desidrogenase.....	42
5.3.10 Atividade da Citocromo C oxidase.....	42
5.3.11 Atividade da Piruvato Quinase.....	43
5.3.12 Atividade da Bomba Na ⁺ K ⁺ -ATP-se.....	43
5.3.13 Dosagem de proteínas.....	44
 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6.1 Artigo Científico 1 - Antioxidants effects on the intracerebroventricular galactose damage in rats.....	45
6.2 Artigo Científico 2 – <i>In vitro</i> galactose impairs energy metabolism in the brain of young rats: protective role of antioxidants.....	72
 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
 8 REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO.....	122

1 INTRODUÇÃO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são distúrbios genéticos que se caracterizam por um defeito enzimático que tem como consequência a interrupção de uma via metabólica (SCOLAMIERO *et al.*, 2015). Na galactosemia clássica (tipo I) ocorre a deficiência na atividade da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) (EC 2.7.7.12), a qual está envolvida no metabolismo da galactose (ISSELBACHER, 1956; LELOIR, 1951). Essa enzima catalisa a conversão reversível da UDP-glicose e galactose-1-fosfato a UDP-galactose e glicose-1-fosfato (FREY *et al.*, 1982; MCCORVIE; TIMSON, 2011).

Em vários países o diagnóstico da galactosemia é realizado por meio de programas de triagem neonatal, sendo considerada a maior iniciativa de saúde pública e pediatria preventiva do sistema público de saúde na área da genética (HUMAN GENETICS PROGRAMME, 2004). De preferência o diagnóstico deve ser realizado antes dos cinco dias de vida, a fim de prevenir a morbidade e mortalidade desta doença (BOSCH, 2006).

A detecção da galactosemia através da triagem neonatal minimiza a patologia aguda, a qual pode incluir icterícia, catarata, vômito, diarreia, hepatomegalia, sepse e óbito neonatal (JUMBO-LUCIONI, 2012). Algumas hipóteses têm sido sugeridas sobre a interferência da galactose-1-fosfato sobre a atividade de várias enzimas do metabolismo dos carboidratos (LAI; ELSAS; WIERENGA, 2009). Dados da literatura mostram que tanto pacientes tratados como não tratados apresentam alterações na glicosilação (TYFIELD; WALTER, 2002; WALTER *et al.*, 1999).

Embora a doença seja geralmente assintomática no momento do nascimento, os pacientes com esse EIM da galactose desenvolvem sintomas crescentes após a exposição a uma dieta à base de leite. A restrição da galactose alivia e previne os sintomas, entretanto, muitos pacientes com galactosemia clássica continuam a desenvolver complicações graves a longo prazo (HOLTON; WALTER; TYFIELD, 2001), como insuficiência prematura dos ovários, disfunção no sistema nervoso central, dificuldades cognitivas, motoras e na fala (ELSAS, 1993). Outras complicações incluem atraso no crescimento e diminuição da densidade óssea (TYFIELD; WALTER, 2002).

O estresse oxidativo tem atraído à atenção da comunidade científica nas últimas décadas, uma vez que estudos indicam que este está envolvido no mecanismo de muitas doenças, incluindo câncer, aterosclerose, envelhecimento, diabetes tipo-2 e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (JEZEK; HLAVATÁ, 2005). O estresse oxidativo também é comumente observado em alguns EIM intermediário, participando de sua fisiopatologia (COLOME; SIERRA; VILASECA, 2000; DELWING *et al.*, 2005; DELWING *et al.*, 2006; DELWING *et al.*, 2007; WAJNER *et al.*, 2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial celular e tecidual (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Considerando que a patogênese do quadro clínico característico apresentado por pacientes galactosêmicos é ainda pouco compreendida, esse estudo visa auxiliar no entendimento das alterações que a galactose ocasiona nos parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos e se o uso de antioxidantes como terapia adjuvante no tratamento da galactosemia é efetivo ou não no tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos *in vitro* e *in vivo* (injeção intracerebroventricular) da galactose e a influência dos antioxidantes trolox (α -tocoferol), ácido ascórbico e glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, sobre a atividade da acetilcolinesterase e sobre o metabolismo energético em estruturas cerebrais de ratos de 30 e/ou 60 dias de idade.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose (0,1, 3,0, 5,0 e 10,0 mM) sobre a atividade da piruvatoquinase, Na^+K^+ -ATPase, complexo II e succinato desidrogenase e citocromo C oxidase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de idade.
- Verificar o efeito da infusão intracerebroventricular de galactose (5,0 mM) sobre o TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e proteínas carboniladas em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 60 dias de idade;
- Verificar o efeito da infusão intracerebroventricular de galactose (5,0 mM) sobre a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 60 dias de idade;
- Verificar o efeito da infusão intracerebroventricular de galactose (5,0 mM) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 60 dias de idade;
- Investigar a influência dos antioxidantes trolox (α -tocoferol), ácido ascórbico e glutathione sobre os efeitos *in vitro* da galactose sobre a piruvatoquinase, Na^+K^+ -ATPase, complexo II e succinato desidrogenase e citocromo C oxidase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos.
- Investigar a influência do pré-tratamento com os antioxidantes trolox (α -tocoferol) e ácido ascórbico sobre os efeitos *in vivo* da galactose sobre os parâmetros de

estresse oxidativo estudados e atividade da acetilcolinesterase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os EIM são doenças genéticas, caracterizadas pela falta ou síntese de uma determinada proteína anômala, geralmente uma enzima ou um transportador (OLSEN; CORNELIUS; GREGERSEN, 2015; SCRIVER *et al.*, 2001). Essa interrupção metabólica pode levar ao acúmulo de metabólitos tóxicos e/ou falta de produtos essenciais (MAK *et al.*, 2013; OLSEN; CORNELIUS; GREGERSEN, 2015).

A sua classificação é de acordo com a área do metabolismo afetada, subdividindo-se em EIM: de aminoácidos, ácidos orgânicos, glicídios, lipídeos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, enzimas eritrocitárias, lipoproteínas, hormônios e proteínas plasmáticas (SCRIVER *et al.*, 2001).

A maioria dos distúrbios metabólicos é causada pela ausência completa ou parcial de atividade enzimática que resulta não só do aumento no nível do substrato específico, mas também em alterações na concentração de vários constituintes metabólicos, e, possivelmente, na ativação de vias metabólicas alternativas (SCOLAMIERO *et al.*, 2015).

Dependendo da deficiência enzimática e do distúrbio metabólico, o início dos sintomas pode ocorrer no período neonatal, com diminuição da sucção, hipotonia, letargia, vômitos e crises convulsivas, situação frequentemente confundida com quadro infeccioso (SAUDUBRAY; CHARPENTIER, 2014). Já em outras situações, os EIM manifestam-se posteriormente, com a sintomatologia determinada por um estresse metabólico de modo agudo e com períodos de remissão, quando controlados os fatores desencadeantes. Adicionalmente, pode-se ter quadros ainda mais graves, que incluem atraso do desenvolvimento, dismorfias e infecções de repetição (BEAUDET, 2010).

A idade de início é muito variável, mas esta aflige principalmente a população pediátrica. Os avanços na gestão, e o novo arsenal terapêutico resultaram em melhoria da assistência ao paciente e aumento da sobrevivência. Ao todo, os indivíduos com EIM vivem mais tempo e muitos deles estão no período de transição da infância para a idade adulta. Além disso, os indivíduos com EIM podem apresentar as características clínicas plenas somente na idade adulta, já que o espectro de

apresentação clínica em alguns desses transtornos pode ser específica por idade (CHANPRASERT; SCAGLIA, 2015).

Atualmente a literatura reconhece mais de 1000 diferentes tipos de EIM, acometendo qualquer grupo étnico. Se analisarmos os EIM em conjunto a incidência pode chegar a 1:800 nascidos vivos, já individualmente são consideradas doenças raras (MAK *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura, não são todos os EIM que são facilmente diagnosticados, e não existe tratamento para muitos deles, embora muitos possam ser tratados alterando sua dieta (SAHOO; FRANZSON; JONSSON; THIELE, 2012). Diagnosticar, rapidamente, é muito importante para impedir que os sintomas se agravem. Assim, a triagem neonatal é fundamental na fase pré-clínica, a fim de prevenir o dano neurológico e em alguns casos a morte do paciente (MARTINS *et al.*, 2003; JARDIM; ASHTON-PROLLA, 1996; SOUZA, 2002).

3.2 Galactosemia Clássica

A Galactosemia Clássica (GC) é apontada como o segundo EIM mais recorrente. A frequência de nascidos vivos com GC varia de uma população para outra (FRIDOVICH-KEIL; WALTER, 2008). É uma doença autossômica recessiva, caracterizada por uma mutação no gene que codifica a enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT), que está situado no braço curto do cromossomo 9, na região 9p13 (COELHO *et al.*, 2015). A mutação Q188R é a mais frequente associada com a galactosemia clássica, foi relatada pela primeira vez em 1991, correspondendo a 63% - 64% de todos os alelos galactosêmicos na população caucasiana (FRIDOVICH-KEIL; WALTER, 2008; SUZUKI; WEST; BEUTLER, 2001; FLANAGAN *et al.*, 2010).

A enzima GALT catalisa a conversão reversível da UDP-glicose e galactose-1-fosfato a UDP-galactose e glicose-1-fosfato (FREY *et al.*, 1982; MCCORVIE; TIMSON, 2011). Existem duas outras formas de galactosemia, a galactosemia tipo II (GALK, EC 2.7.1.6), caracterizada pela deficiência na enzima galactoquinase, a qual fosforila a galactose produzindo galactose-1-fosfato e a galactosemia tipo III (GALE, EC 5.1.3.2), caracterizada pela deficiência na enzima UDP-galactose-4'-epimerase,

a qual interconverte UDP-galactose e UDP-glicose (Figura 1) (HOLDEN; RAYMENT; THODEN, 2003; THODEN *et al.*, 2005; TIMSON, 2006). A deficiência em qualquer uma dessas enzimas em humanos resulta em uma forma de doença metabólica hereditária, a galactosemia (TYFIELD; WALTER, 2002).

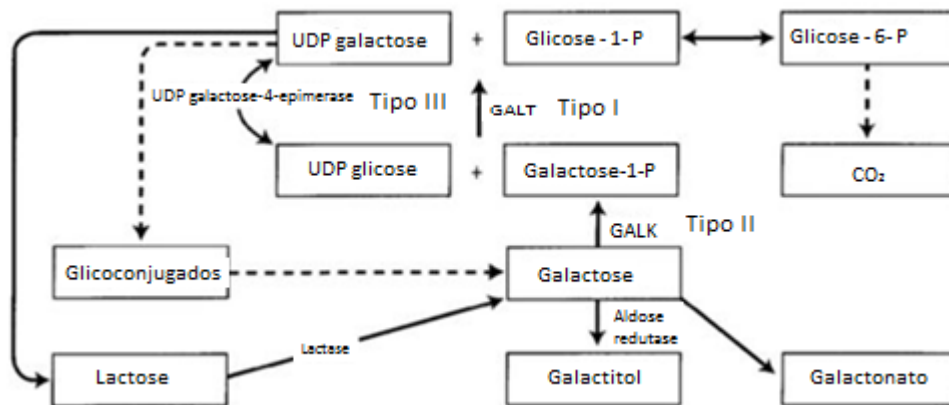


Figura 1- Metabolismo da galactose (Adaptado de BERRY, 2012).

Na ausência da GC, a enzima GALT converte galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato, que pode subsequentemente entrar na via glicolítica (CHIAPPORI *et al.*, 2013). Em pacientes com deficiência na atividade da GALT ocorre o acúmulo tecidual de galactose, galactose-1-fosfato e galactitol, sendo que a galactose é encontrada em maior concentração acumulada, uma vez que é o primeiro metabólito da rota (FRIDOVICH-KEIL; WALTER, 2008; SCHULPIS *et al.*, 2005). Acredita-se que a produção endógena de galactose inicia ainda durante a vida intrauterina, pois elevados níveis de galactitol e galactose-1-fosfato foram encontrados em cordão umbilical, eritrócitos e líquido amniótico de recém-nascidos com GC (BERRY, 2012).

Estudos mostram que mesmo com restrição dietética de galactose, frequentemente os pacientes apresentam complicações a longo prazo, como atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, dispraxia verbal, anormalidades motoras e hipogonadismo hipergonadotrófico (RIDEL *et al.*, 2005; RUBIO-AUGUSTI *et al.*, 2013; GUBBELS *et al.*, 2013). Os padrões são inconsistentes, e alguns pacientes podem ter sintomas discretos. Anormalidades na fala podem ser vistos na infância, mas normalmente persiste na idade adulta (SCHADEWALDT *et al.*, 2010). Além disso, estudos de neuroimagem confirmam pobre mielinização, anormalidades na substância branca, atrofia cerebral e atrofia cerebelar em alguns pacientes, como também anormalidades na captação de glicose em muitas regiões cerebrais

(WAISBREN *et al.*, 2012). Os pacientes galactosêmicos clássicos homozigotos, com mutação Q188R, mesmo com restrição de lactose, excretam 5 a 10 vezes mais galactitol na urina (PALMIERI *et al.*, 1999).

Na doença também ocorre a formação de galactonato, porém é excretado na urina e não se acumula nos tecidos (ZOU, 2007). De acordo com Chiappori *et al.*, (2013), concentrações elevadas de galactose-1-fosfato também inibe o crescimento celular em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é utilizada como organismo modelo para esta patologia.

Com relação ao tratamento, este consiste na remoção de galactose da dieta, o que reverte os sintomas clínicos iniciais. Todo recém-nascido que for detectado com galactosemia, independentemente da enzima deficiente, deve iniciar o tratamento imediatamente, o qual consiste em eliminar qualquer ingestão de galactose no período de lactente, substituindo o leite materno, leite de vaca ou fórmulas infantis tradicionais por leite de soja ou fórmula elementar livre de galactose, dando preferência pela última, tendo em vista que algumas fórmulas de soja contêm alguma porcentagem de galactose, evitando assim o acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos (SCRIVER *et al.*, 2001).

Na ausência de restrição à galactose, como após o consumo de lactose no período neonatal, as crianças afetadas desenvolvem um processo de doença potencialmente letal com envolvimento de múltiplos órgãos, porém desde o advento da triagem neonatal para galactosemia, raramente tem se encontrado recém-nascidos em estágios críticos da doença (BERRY, 2012).

A restrição de galactose na dieta pode diminuir ou evitar imediatamente as manifestações agudas, mas parece não impedir a longo prazo complicações que incluem insuficiência ovariana, deficiência na aprendizagem e na fala, entre outros problemas (WAISBREN, 2012).

O diagnóstico da GC é dado a partir de programas de triagem neonatal ou pela observação clínica da sintomatologia (FRIDOVICH-KEIL; WALTER, 2008). De preferência o diagnóstico deve ser realizado antes dos cinco dias de vida, a fim de prevenir a morbidade e mortalidade desta doença (BOSCH, 2006).

Entre os métodos para diagnosticar a Galactosemia está a pesquisa de substâncias redutoras na urina, o teste de rastreio neonatal, a determinação do galactitol ou da galactose-1-fosfato por espectrometria de massa *em tandem* e a

caracterização molecular para identificar mutações no gene GALT (BOSCH, 2006; VASQUEZ, 2007). O diagnóstico mais utilizado é por meio da detecção de galactose e galactose-1-fosfato no sangue ou galactose na urina e, é estabelecida por meio da avaliação das enzimas em células do sangue periférico (TSAKIRIS; MICHELAKAKIS; SCHULPIS, 2005).

3.3 Radicais Livres

Radical livre é qualquer átomo ou molécula com um ou mais elétrons desemparelhados, cujo elétron desemparelhado esteja sozinho em um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL, 2012; VALKO *et al.*, 2007). O número ímpar de elétrons de um radical livre o torna instável, de curta duração e altamente reativo. Devido à sua elevada reatividade, eles podem capturar elétrons de outros compostos para atingir a estabilidade. Com isso, a molécula atacada perde seu elétron e se torna um radical livre, dando início a uma cascata de reação em cadeia, ocasionando danos celulares (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

Em seres aeróbios, a geração de espécies reativas constitui um processo biológico essencial e contínuo, pois no organismo estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade, defesa celular e síntese de substâncias biológicas. Dessa forma, a formação de radicais livres ou espécies reativas (reações de oxi-redução) pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias, a fim de gerar a energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) e para os demais processos descritos acima (VIZZOTTO, 2017).

O excesso de ERO pode prejudicar a integridade das diversas biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e o DNA, conduzindo ao aumento do estresse oxidativo em várias doenças humanas, tais como o diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, artrite reumatóide, catarata, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, bem como no processo de envelhecimento (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

As ERO possuem propriedades químicas especiais, sendo que enquanto o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) é reativo com quase todas as biomoléculas, o superóxido ($\text{O}_2^\bullet$) e o óxido nítrico (NO) são radicais muito mais seletivos. Com relação aos antioxidantes, Halliwell (2013) afirma que não existe um antioxidante universal; uma vez que cada um reage de uma maneira diferente com diferentes ERO para gerar produtos finais de reatividade distinta.

O radical superóxido é principalmente produzido dentro das mitocôndrias e a sua reatividade com as biomoléculas é baixa. É o mais importante das ERO formadas pelo processo enzimático, reação de auto-oxidação e por reações não enzimáticas de transferência de elétrons, na qual um elétron é transferido para a molécula de oxigênio. Dentre as enzimas capazes de produzir $\text{O}_2^\bullet$ destaca-se a xantina oxidase, lipoxigenase, ciclo-oxigenase e oxidases dependentes de NADPH. Pode existir em duas formas, tais como $\text{O}_2^\bullet$ ou radical hidroperoxil (HO_2), cuja forma predomina em pH baixo. O HO_2 é a forma mais importante e pode facilmente entrar na bicamada fosfolipídica onde muda para forma carregada ($\text{O}_2^\bullet$). Sob pH fisiológico, a forma mais comum é o $\text{O}_2^\bullet$, o qual pode atuar como agente redutor e reduzir complexos de ferro, tais como o citocromo-C e ácido férrico-etileno diaminotetra acético (Fe^+EDTA), em que Fe^{+3} é reduzido a Fe^{+2} . Ele pode também atuar como agente oxidante e oxidar o ácido ascórbico e o tocoferol (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014). (Figura 2).

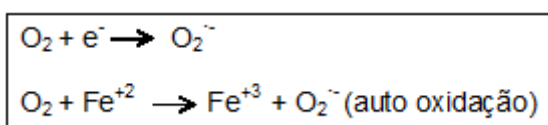


Figura 2 - Reação de auto-oxidação (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

Além disso, o radical superóxido pode reagir com outro radical superóxido em uma reação de dismutação em que um radical é oxidado para oxigênio e o outro é reduzido para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 3).

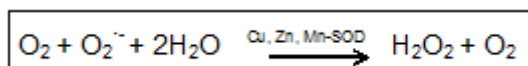


Figura 3 - Reação de dismutação (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

O $\text{OH}^\bullet$ é um radical livre altamente reativo. Pode reagir fortemente com moléculas orgânicas e inorgânicas, incluindo o DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos, e causar danos graves para as células, sendo mais agressivo do que qualquer outra ERO. Ele é formado na reação de Fenton, em que o H_2O_2 reage com os íons de metais Ferro (Fe^{+2}) ou Cobre (Cu^+) frequentemente ligados em complexo com diferentes proteínas, tais como a ferritina (uma proteína intracelular que armazena ferro) e a ceruloplasmina (proteína do plasma transportadora de cobre) ou outras moléculas. Sobre condições de estresse, um excesso de $\text{O}_2^{\bullet-}$ libera ferro livre da ferritina, e este ferro livre participa da reação de Fenton para formar $\text{OH}^\bullet$. Ele é também formado pela reação entre o radical superóxido e o H_2O_2 , em uma reação denominada Haber-Weiss (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014). (Figura 4).

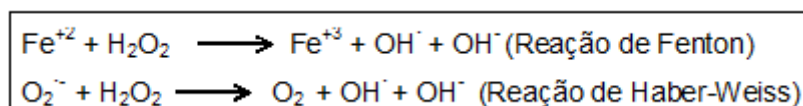


Figura 4 - Reação de Fenton e de Haber-Weiss (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

Quanto ao H_2O_2 , é formado *in vivo* através de uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Não é um radical livre, mas pode causar dano à célula em concentração relativamente baixa ($10\mu\text{M}$), porém em níveis mais elevados pode inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, interferindo na via glicolítica. Essa ERO pode facilmente penetrar nas membranas biológicas, porém não tem efeito direto sobre o DNA, mas pode danificar o DNA através da produção de $\text{OH}^\bullet$, na presença de íons de metais de transição. As principais enzimas antioxidantes que podem eliminar o H_2O_2 incluem a catalase, glutathione peroxidase e as peroxirredoxinas (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

O radical peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) é derivado do oxigênio em sistemas vivos, sendo sua forma mais simples o radical peridroxil ($\text{HOO}^\bullet$) que é formado pela protonação do $\text{O}_2^{\bullet-}$. Dados indicam que cerca de 0,3% do total de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no citosol de uma célula típica está na forma protonada. Essa ERO pode iniciar a peroxidação lipídica e também pode promover o desenvolvimento de tumor (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

Também se ressalta o peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\bullet}$), que é formado pela reação entre o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o NO. É altamente tóxico e pode reagir diretamente com o dióxido de carbono (CO_2) para formar o peroxi carboxilato nitroso ($\text{ONOOCO}_2^{\bullet}$), que é altamente reativo ou o ácido peroxinitroso (ONOOH). O ONOOH pode sofrer uma ruptura homolítica formando $\text{OH}^{\bullet}$ e dióxido de nitrogênio (NO_2) ou se rearranja para formar nitrato (NO_3). O $\text{OONO}^{\bullet}$ pode oxidar lipídeos, resíduos de metionina e tirosina em proteínas e o DNA para formar nitroguanina. Os resíduos de nitrotirosina são considerados como marcador de danos celulares induzidos por $\text{ONOO}^{\bullet}$ (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

3.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre devido ao excesso de produção de ERO e/ou insuficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes, decorrente de um controle anormal de oxidação-redução (redox) (WU; KOSTEN; ZHANG, 2013). Esta situação pode danificar diferentes biomoléculas a ponto de provocar perda da função celular, sendo que as biomoléculas mais susceptíveis ao ataque dos radicais livres são as proteínas, DNA e lipídeos (HALLIWELL, 2012; VALKO *et al.*, 2006).

Os radicais livres e a auto-oxidação agredem os principais componentes de membrana, como os fosfolipídeos e os ácidos graxos poliinsaturados, gerando radicais peróxidos dentro das membranas, resultando em estruturas instáveis, alterando a fluidez e a permeabilidade da membrana e causando prejuízos a transdução de sinal. Além disso, os hidroperóxidos podem decompor-se a espécies tóxicas, tais como o malondialdeído (MDA), o que também conduz a múltiplas consequências patológicas na membrana celular (WU; KOSTEN; ZHANG, 2013).

O estresse oxidativo é comumente observado em alguns EIM intermediário, participando de sua fisiopatologia (COLOME; SIERRA; VILASECA, 2000; DELWING *et al.*, 2005; DELWING *et al.*, 2006; DELWING *et al.*, 2007; WAJNER *et al.*, 2004). Embora a causa do estresse oxidativo aumentado nestas doenças não esteja completamente compreendida, pode ser devido ao acúmulo de metabolitos tóxicos que levam à produção excessiva de radicais livres ou à depleção celular de defesas antioxidantes (ARTUCH *et al.*, 2004; VAN BACKEL *et al.*, 2000).

Relatos clínicos e experimentais sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na degeneração neuronal, em doenças como o Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Huntington (MILLER *et al.*, 2010; ALIEV *et al.*, 2013). A participação do estresse oxidativo também está relacionado à fisiopatologia de diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon (REUTER *et al.*, 2010).

3.4.1 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (MAHATTANATAWEE *et al.*, 2006; STAHL *et al.*, 2001). A peroxidação lipídica leva à formação de hidroperóxidos de lipídeos e lipídeos reativos que contribuem no processo de autooxidação (NAM, 2011; SULTANA *et al.*, 2013; ZAMBO *et al.*, 2013).

A natureza complexa do processo de peroxidação lipídica têm atraído cientistas de diferentes áreas, devido a sua relação com inúmeras doenças, tais como aterosclerose (BERLINER; HEINECKE, 1996), câncer (HAMMAD *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2010), diabetes (SILVERSTEIN; FEBBRAIO, 2009), exposição crônica ao álcool (YANG *et al.*, 2010), lesão pulmonar aguda (IMAI *et al.*, 2008; NONAS *et al.*, 2006) bem como doenças neurodegenerativas (SIMONIAN; COYLE, 1996), que incluem Alzheimer (MONTINE *et al.*, 2005) e Parkinson (PORTER *et al.*, 2010).

O mecanismo de lipoperoxidação é um processo em cadeia constituído pela fase de iniciação, propagação e terminação. Ela inicia quando um radical livre ataca um átomo de hidrogênio de grupos metileno (CH_2) em um ácido graxo (LH), resultando na formação de um radical lipídico ($\text{L}^\bullet$). O radical lipídico pode reagir com moléculas de oxigênio para formar um radical lipídico peroxila ($\text{LOO}^\bullet$). O radical peroxila resultante ($\text{LOO}^\bullet$) irá sofrer um rearranjo através de uma reação de ciclização para formar os endoperóxidos, que finalmente formam o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-nonenal (4-HNA), que são produtos finais tóxicos da peroxidação lipídica que causam danos ao DNA e proteínas. Estes radicais podem

propagar ainda mais o processo de peroxidação, abstraindo átomos de hidrogênio a partir de outras moléculas lipídicas (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014) (Figura 5).

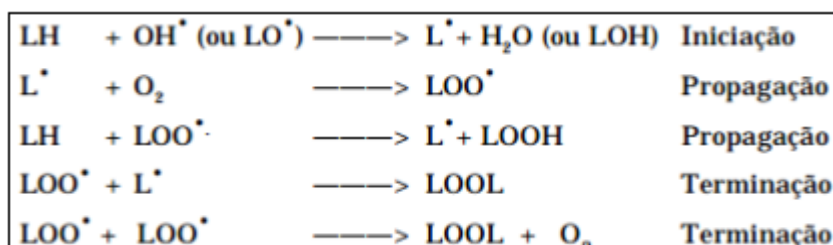


Figura 5 - Reação em cadeia da lipoperoxidação. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Lipídeo (L).

Ainda, a lipoperoxidação pode ser induzida por metais de transição como o ferro e o cobre, através da decomposição de LOOH (Figura 6) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007).

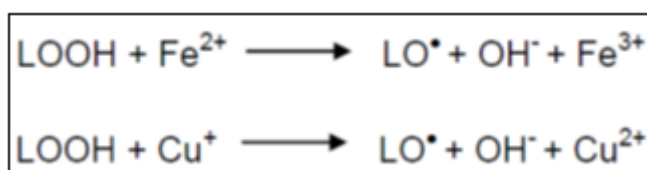


Figura 6 - Lipoperoxidação catalisada por íons de Ferro e Cobre (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007).

A peroxidação lipídica pode ser medida pela determinação química de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), através da quantidade de (MDA) formado, sendo este um importante indicador de estresse oxidativo (KOCHA *et al.*, 1997; PIZZIMENTI *et al.*, 2013).

3.4.2 Dano a Proteína

As proteínas desempenham um papel importante em uma variedade de funções celulares, como transdução de sinal, mitose celular e sistemas de transporte. A sua oxidação decorre da ação dos radicais livres sobre os grupos tióis,

causando também agregação e fragmentação de aminoácidos (BUDANOV et al., 2010).

As ERO oxidam diferentes aminoácidos presentes em proteínas, provocando a formação de ligações cruzadas de proteína-proteína, o que resulta na desnaturação e perda da função proteica, perda de atividade enzimática, perda de função dos receptores e de proteínas de transporte. A oxidação de proteínas pode ser induzida por espécies de radicais, tais como o $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, alcóxila, HO_2 , bem como por espécies não-radicais, tais como H_2O_2 , ozônio (O_3), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlet, $OONO^{\cdot}$ (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

As ERO também podem atuar inibindo a enzima que edita e corrige o RNA transportador, para formar a sequência correta de aminoácidos da proteína, resultando, dessa forma, em síntese de proteínas anômalas (LING; SOLL, 2010). Além disso, os radicais livres oxidam os aminoácidos cisteína e metionina, provocando sérias alterações na estrutura e função das proteínas (ZHANG, 2010). A união entre proteínas danificadas e produtos da peroxidação lipídica dá origem a um pigmento fluorescente chamado de lipofuscina, o qual corresponde a um agregado que é armazenado nos lisossomos e constitui um biomarcador do envelhecimento, que se acumula no cérebro, fígado e outros órgãos ou tecidos (HÖHN et al., 2010; JUNG; HÖHN; GRUNE, 2010).

3.4.3 Dano ao DNA

O acúmulo de ERO representa uma importante fonte de instabilidade genômica e danos sucessivos ao DNA, podendo ocasionar alterações em genes específicos responsáveis por desempenhar funções importantes na homeostasia celular. Entre eles estão os genes envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular, reparação de dano ao DNA e dos mecanismos antioxidantes (COUSSENS; WERB, 2002; ROESSNER et al., 2008).

Estudos indicam que as ERO são capazes de induzir danos diretos na molécula de DNA. As quatro bases do DNA, assim como a própria molécula de desoxirribose podem ser lesadas. Deste dano podem resultar quebras simples ou duplas das cadeias (com consequentes modificações cromossômicas) e alterações

oxidativas nas bases. De forma indireta, são também capazes de condicionar dano ao DNA através da peroxidação lipídica, da oxidação de proteínas e de alterações na expressão gênica (COUSSENS; WERB, 2002; KRYSTON *et al.*, 2011). Além disso, as mutações em células somáticas podem promover a instabilidade do genoma e diretamente levar a várias doenças humanas, incluindo cancro, anomalias neurológicas, imunodeficiência, envelhecimento prematuro, entre outras (IYAMA; WILSON, 2013).

O dano oxidativo devido a ação das ERO pode levar a formação de moléculas alteradas de DNA. Uma destas moléculas é chamada de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG, que se destaca pela facilidade de medição e com isso é considerada um biomarcador de dano oxidativo). Ela é potencialmente mutagênica, uma vez que tem a capacidade de se emparelhar com resíduos de adenina, aumentando a frequência de translocações espontâneas G:C→T:A (ROESSNER *et al.*, 2008; DINCER *et al.*, 2007).

Dados mostram que as reações de Fenton podem ocorrer constantemente ao redor do DNA (Figura 7), e que o $\text{OH}^\bullet$ formado, pode reagir em sítios específicos provocando danos às bases purinas e pirimidinas (HERMES-LIMA, 2004; NEOFYTOU *et al.*, 2012; KALYANARAMAN, 2013).

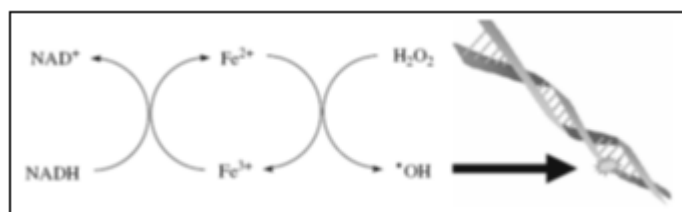


Figura 7 - Formação do radical hidroxil através da via reação de Fenton e subsequente ataque ao DNA. Fonte: (MATTOS, 2009).

3.5 Defesas Antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante é uma estratégia de defesa que envolve diferentes níveis de proteção (ANGELO; JORGE, 2007). Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente

como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não fisiológicas, como a exposição à fumaça de cigarro ou outros agentes nocivos (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

As enzimas antioxidantes primárias incluem a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), a catalase (CAT; EC 1.11.1.6), e a glutathione peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9). Estas enzimas atuam em conjunto, e alterada a atividade de uma dessas enzimas, sem mudanças compensatórias na atividade de outra enzima, podem levar a peroxidação lipídica. Para impedir a peroxidação lipídica pelos radicais $O_2^{\cdot -}$ e $OH^{\cdot}$, o $O_2^{\cdot -}$ é primeiramente convertido pela SOD em H_2O_2 , o qual é decomposto subsequentemente em água e oxigênio pela CAT, prevenindo assim a formação de radicais $OH^{\cdot}$ (WU *et al.*, 2013). A glutathione peroxidase catalisa a oxidação de glutathione à custa de um hidroperóxido, que pode ser do H_2O_2 ou outra espécie, como um hidroperóxido de lipídeo. A distribuição subcelular predominante está no citosol e mitocôndria, sugerindo que a glutathione peroxidase é o principal captador de H_2O_2 nestes compartimentos subcelulares (YOUNG, WOODSIDE, 2001).

Os antioxidantes podem ser de fontes endógenas como as enzimas que atuam na mitocôndria, ou exógenas como a alimentação ou suplementação com vitaminas antioxidantes (VASCONSELOS *et al.*, 2007). A inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância, pois contribui nos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos. Assim sendo, o consumo de frutas e vegetais está relacionado diretamente com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

A classificação mais utilizada para estas substâncias é a que as divide em dois sistemas, o enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo, e o não enzimático, fazendo parte deste grupo as vitaminas e outras substâncias, como os flavonoides, licopeno, glutathione e a bilirrubina (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

3.6 Sistema de Defesa Enzimático

As enzimas antioxidantes são consideradas, em geral, antioxidantes secundários porque não evitam a formação, e sim eliminam os radicais livres já formados antes que reajam e danifiquem os sistemas biológicos. As principais

enzimas antioxidantes são a SOD, GSH-Px e a CAT (VASCONCELOS *et al.*, 2007; MENG; ZHANG, 2013) (Figura 8).

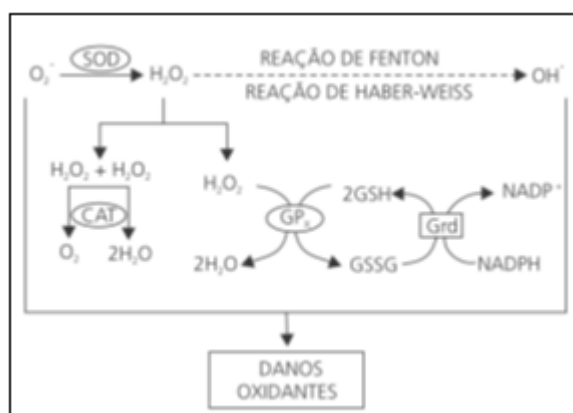


Figura 8 - Sistema de defesa enzimático. Fonte: (BARBOSA, 2010).

3.6.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das ERO. É uma das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficazes, está presente em todos os organismos aeróbicos e compartimentos subcelulares propensos a uma explosão oxidativa devido a um estresse abiótico ou biótico (GILL; TUTEJA, 2010).

As SODs removem $O_2^{\bullet-}$, catalisando a sua dismutação, onde um $O_2^{\bullet-}$ é reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 (Figura 8). Ela remove $O_2^{\bullet-}$ e, portanto, diminui o risco de formação de $OH^{\bullet}$ intracelular. As SODs são classificadas conforme os seus cofatores (metais) em três tipos conhecidos: o cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), o manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD), que estão localizados em diferentes compartimentos celulares (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010).



Figura 9 - Reação de dismutação do radical superóxido. Fonte: (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010).

3.6.2 Catalase (CAT)

A CAT é encontrada em todos os organismos vivos, porém em maiores concentrações no fígado e nos rins (VASCONCELOS *et al.*, 2007; GOYAL; BASAK,

2010). É uma das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 . Ela converte duas moléculas de H_2O_2 em 2 moléculas de H_2O e uma molécula de O_2 (Figura 10) (HELDT; HELDT, 2005; DUBEY, 2011). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, quando os níveis de H_2O_2 estão mais elevados, por isso são consideradas indispensáveis em condições de estresse oxidativo (DUBEY, 2011).



Figura 10 - Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase. Fonte: (HELDT; HELDT, 2005; DUBEY, 2011).

As enzimas CAT e GSH-Px agem de forma integrada a fim de impedir o acúmulo de H_2O_2 e evitar a geração do $\text{OH}^\bullet$, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (VASCONCELOS *et al.*, 2007; GOYAL; BASAK, 2010).

3.6.3 Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A glutathione (GSH) tem como função proteger as células contra danos oxidativos causados por radicais oxidantes, sequestrando-os a fim de manter o balanço redox da célula e defendê-la contra agentes eletrofílicos (ANGELO; JORGE, 2007; KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006; GASPARRI, 2005; DALVI *et al.*, 2013). O mecanismo de ação da GSH-Px ocorre por meio da redução do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos com utilização da GSH, que atua como co-substrato da GSH-Px, tendo propriedade de doador elétrons, e posteriormente sendo regenerada por ação da glutathione redutase (GR), com a transferência de hidrogênio do NADPH formado pela via pentose-fosfato (ANGELO; JORGE, 2007; KALIORA; DEDOUSSIS, 2006; GASPARRI, 2005; DALVI *et al.*, 2013).

A GSH-Px, tem um papel importante na detoxicação de substâncias geradas pelos xenobióticos, como o H_2O_2 ou os peróxidos orgânicos, cofatores para formação de glutathione oxidada (GSSG) (TEKMAN *et al.*, 2008). A GSH-Px converte a GSH à GSSG, removendo H_2O_2 e formando água (Figura 11) (FERRARI *et al.*, 1985).

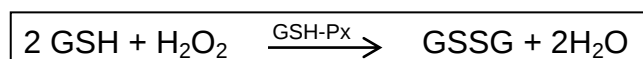


Figura 11 - Reação catalisada pela enzima glutathione peroxidase. Fonte: (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

As enzimas CAT e GSH-Px agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de H_2O_2 . Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do $OH^\bullet$, contra o qual não há sistema enzimático de defesa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A GSH-Px é largamente utilizada como biomarcadora, apresentando resultados expressivos em diversas situações de estresse, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos (COGO *et al.*, 2009).

3.7 Sistema de Defesa não Enzimático

3.7.1 Vitamina C

O ácido ascórbico ou vitamina C é um dos micronutrientes necessários para o ser humano e demais organismos (DU *et al.*, 2013). É uma vitamina hidrossolúvel, não é sintetizada pelo organismo, assim necessita ser obtida de forma exógena, através da dieta (PENTEADO, 2003; SHILS *et al.*, 2009).

A vitamina C é encontrada na natureza sob duas formas: reduzida (ácido ascórbico) ou na forma oxidada (ácido deidroascórbico). As duas são ativas, porém a forma oxidada está menos difundida nas substâncias naturais. A transformação do ácido ascórbico em ácido deidroascórbico acontece de forma natural no organismo e é reversível (ROCHA *et al.*, 2013).

Essa vitamina desempenha uma função importante na varredura $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^\bullet$, oxigênio *singlet* e o óxido nítrico (BARROS *et al.*, 2011). O ascorbato é um importante antioxidante na ausência de metais de transição, enquanto que na presença destes, possui propriedades pró-oxidantes (BERGENDI *et al.*, 1999).

A ingestão adequada de vitamina C é importante, pois age prevenindo o acúmulo excessivo de radicais livres no organismo, ajudando assim a combater o envelhecimento precoce dos tecidos (BARROS; BOCK, 2009). Devido a sua solubilidade em água, acredita-se que ela faça parte da primeira linha de defesa do organismo e pela facilidade em doar elétrons apresenta também ação antioxidante

(SILVA; COZZOLINO, 2009). Devido as suas características, a vitamina C ajuda a prevenir a oxidação das moléculas solúveis em água e, indiretamente, protege as vitaminas A e E de oxidação (TORRES; GUINAND; GUERRA, 2003).

3.7.2 Vitamina E

A vitamina E com sua complexa função biológica, tem gerado enorme interesse entre as comunidades de ciências básicas e clínicas, devido a sua utilidade aparente no combate a uma série de distúrbios relacionados ao estresse oxidativo (COMBS, 2012). A vitamina E é um composto lipossolúvel descoberto em 1922 por Evans e Bishop (NIKI; TRABER, 2012). Existem oito formas de vitamina E, sendo elas α , β , γ e δ tocoferóis e α , β , γ e δ tocotrienóis (RIZVI *et al.*, 2014). O α -tocoferol é a forma mais bioativa em seres humanos. Por ser solúvel em gordura, o α -tocoferol protege as células das membranas celulares de danos por radicais livres. Sua função antioxidante reside principalmente na proteção contra a peroxidação lipídica (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

Após a sua atividade antioxidante, o α -tocoferol torna-se α -tocoferil, que é um radical de baixa reatividade, que quando reage com outros antioxidantes, como por exemplo a vitamina C, consegue se regenerar. O α -tocoferol também é capaz de prender óxidos de nitrogênio na membrana solúvel eletrofílica, dessa forma inibe danos de forma mais eficiente, frente os derivados de ERN (COHEN, 2011).

Os compostos vitamínicos E apresentam estabilidade na ausência de O_2 e lipídeos oxidantes. Em contrapartida, a taxa de degradação da vitamina E aumenta quando o O_2 está presente, demonstrando ser mais rápida quando radicais livres estão presentes (DAMODARAM, 2010).

Os efeitos antioxidantes da suplementação com α -tocoferol vêm sendo estudado em diversos tecidos e patologias como, por exemplo, seu uso no combate à enxaqueca (BÜTÜM *et al.*, 2014), problemas na mucosa gástrica (KAMISAH *et al.*, 2014), estresse oxidativo induzido pelo exercício (STEPANYAN *et al.*, 2014), recuperação do tecido muscular (HOWARD; McNEIL; McNEIL, 2011), em vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e na doença de Alzheimer (RIZVI *et al.*, 2014).

No cérebro, tem sido mostrado que a vitamina E possui papel protetor, pois é capaz de reduzir a degeneração de células hipocâmpais após isquemia cerebral (HARA *et al.*, 1990). De acordo com o estudo de Jain e colaboradores (2000), a suplementação com vitamina E aumenta os níveis de GSH e diminui a concentração de lipídeos peroxidados em eritrócitos (JAIN; MC VIE; SMITH, *et al.*, 2000), uma vez que ela possui a propriedade de finalizar a propagação de reações dos radicais livres nas membranas lipídicas (MARSHALL; BANGERT, 1995).

Ainda, as vitaminas C e E apresentam um efeito cooperativo, sendo que a interação destas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação lipídica da membrana e na proteção ao DNA (GEY, 1998). A vitamina C regenera a vitamina E à sua forma reduzida, doando elétrons ao radical α -tocoferil, prolongando dessa maneira, seu efeito antioxidante (CARR; FREI, 1999; SENER *et al.*, 2005).

3.7.3 Glutationa

A Glutationa (GSH) possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutathione um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (ROVER *et al.*, 2001).

A GSH atua como co-substrato da GSH-Px, tendo propriedade de doador de elétrons, e posteriormente sendo regenerada por ação da glutathione redutase (GR), com a transferência de hidrogênio do NADPH formado pela via pentose-fosfato (ANGELO; JORGE, 2007; KALIORA; DEDOUSSIS, 2006; GASPARRI, 2005; DALVI *et al.*, 2013).

Ela atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em particular,

problemas na síntese e metabolismo da glutathione estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutathione e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ROVER *et al.*, 2001).

3.8 Metabolismo Energético

3.8.1 Glicólise

A glicólise é uma via metabólica presente em todos os seres vivos, nela a molécula de glicose é degradada por uma série de reações catalisadas por enzimas à duas moléculas de piruvato. Durante as reações, parte da energia da glicose é armazenada e transferida para moléculas de ATP e nicotinamida adenina dinucleotídeo, estado reduzido (NADH) (NELSON; COX, 2004).

A glicólise ocorre na presença ou ausência de oxigênio. Consiste em 10 reações que convertem a molécula de glicose com 6 átomos de carbono (6C) em duas moléculas de piruvato com 3C, com produção de 2 ATPs e redução de 2 NAD^+ em $\text{NADH} + \text{H}^+$. A glicólise pode ser dividida em dois grupos de reações: a fase de ativação, em que é fornecida energia da hidrólise do ATP à glicose para que se torne quimicamente ativa e se dê início a sua degradação; e a outra fase chamada de fase de rendimento, onde a oxidação dos compostos orgânicos permite aproveitar energia liberada para a produção de ATP. Na presença de oxigênio, o piruvato entra na mitocôndria e é oxidado formando um composto de 2 carbonos, o acetato, com liberação de energia e CO_2 . Durante este processo o acetato liga-se a coenzima A (CoA) – formando o acetil-coenzima A (MOREIRA, 2013).

Em resumo, a via glicolítica possui os seguintes objetivos: degradar uma molécula de seis carbonos em duas moléculas de três carbonos; fosforilar adenosina difosfato (ADP) para formar ATP, através da energia liberada no processo; e transferir um íon hidrogênio (H^+) e dois elétrons para a nicotinamida adenina dinucleotídeo, estado oxidado (NAD^+) para formar NADH (LODISH *et al.*, 2000).

3.8.2 Ciclo de Krebs

Nos organismos aeróbios o piruvato resultante da glicólise entra na mitocôndria e sofre descarboxilação oxidativa pela ação de um complexo enzimático denominado piruvato desidrogenase, formando uma molécula de NADH e uma de acetil-CoA que é oxidada no ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico (VOET; VOET, 1995; NELSON; COX, 2004).

O ciclo de Krebs se inicia com a condensação de acetil-CoA com oxaloacetato, formando uma molécula de citrato, por meio da reação catalisada pela enzima citrato sintase. O citrato é isomerizado a isocitrato que sofre ação da enzima isocitrato desidrogenase e gera α -ceto-glutarato (MARZZACO; TORRES, 2007). Posteriormente, o α -ceto-glutarato é transformado em succinil CoA por ação da enzima α -ceto-glutarato desidrogenase. Succinil CoA é convertida a succinato pela enzima succinato sintetase. Após, o succinato é oxidado a fumarato pela enzima succinato desidrogenase. O fumarato formado é hidratado a malato pela fumarase e por fim o malato é oxidado a oxaloacetato sob ação da malato desidrogenase, completando o ciclo (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Em resumo, o ciclo de Krebs catalisa 4 reações de óxido-redução para a formação de 3 moléculas de NADH e uma de flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH_2), além de liberar diretamente uma molécula de ganosina trifosfato (GTP), formada na clivagem da ligação tio éter da succinil CoA. Posteriormente, os elétrons são transferidos dos carreadores (NADH e FADH_2) para a cadeia de transporte de elétrons (MARZZOCO; TORRES, 2007).

3.8.3 Cadeia respiratória

A energia na forma de ATP é essencial para a realização de diversas funções celulares, assim como para a realização de eventos biológicos e moleculares. Redução nos níveis energéticos pode representar uma ameaça para a integridade e homeostase celular, já que prejuízos no metabolismo energético podem causar sinalização pró-apoptótica, dano oxidativo, excitotoxicidade e impedir o reparo do DNA mitocondrial (OWEN; SUNRAM-LEA, 2011).

A mitocôndria consiste em uma rede funcional integrada que regula o equilíbrio energético celular, sendo a fonte primária de energia na célula, já que nela ocorre a respiração celular que converte nutrientes em energia (IRWIN *et al.*, 2011). A cadeia respiratória, ou cadeia transportadora de elétrons, ocorre na membrana mitocondrial interna e é formada por quatro complexos proteicos integrais de membrana: o complexo I (NADH: ubiquinona oxirredutase ou NADH desidrogenase), complexo II (succinato: ubiquinona oxirredutase), complexo III (citocromo bc_1 ou ubiquinona: citocromo C oxirredutase) e complexo IV (citocromo C oxidase), e dois transportadores móveis de elétrons: a coenzima Q ou ubiquinona e o citocromo c (ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2013; VARTAK; PORRAS; BAI, 2013).

Na cadeia respiratória ocorre a oxidação dos equivalentes redutores NADH e $FADH_2$ provenientes de diferentes rotas metabólicas como a glicólise, a beta-oxidação e o ciclo de Krebs (ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2013). O Complexo I é o principal ponto de entrada de elétrons para a cadeia respiratória. Ele transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona dentro da membrana. Já o complexo II consiste em um ponto alternativo de entrada de elétrons provenientes do $FADH_2$ para a cadeia respiratória, onde os elétrons são então transferidos do succinato para a ubiquinona (ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2013; DUDKINA *et al.*, 2008). A succinato desidrogenase (SDH) é uma enzima que encontra-se ligada à membrana mitocondrial e está envolvida tanto no ciclo de Krebs (responsável pela oxidação do succinato a fumarato na matriz mitocondrial, com a consequente formação de $FADH_2$), quanto na cadeia respiratória (transfere os elétrons para a ubiquinona, sem o bombeamento de prótons na membrana mitocondrial interna) (HUANG; MILLAR, 2013). Os elétrons passam então da ubiquinona para o complexo III, que transfere esses elétrons para o citocromo C. O Complexo IV ou citocromo C oxidase é o complexo final da cadeia respiratória que catalisa a transferência dos elétrons do citocromo c para o O_2 , reduzindo este à H_2O (ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2013; DUDKINA *et al.*, 2008). Essa transferência de elétrons através da cadeia respiratória resulta no bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana nos complexos I, III e IV. Como consequência, um gradiente de prótons é criado, gerando força próton - motriz que impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase (fosforilação oxidativa) a partir de $ADP + P_i$ (ACIN-PEREZ; ENRIQUEZ, 2013; DUDKINA *et al.*, 2008).

3.8.4 Bomba Na^+K^+ -ATP-ase

A Na^+K^+ -ATPase tem como principal função o transporte dos íons Na^+ para o meio extracelular e dos íons K^+ para o meio intracelular, sendo considerada uma das principais proteínas transportadoras de íons situada nas células de quase todos os mamíferos. Está envolvida em numerosos processos como captação de neurotransmissores, aminoácidos e açúcares, extrusão de cálcio, mudanças no potencial elétrico de membrana mediado por canais iônicos, volume celular, produção de calor e regulação do pH intracelular (POÇAS, 2007).

O fluxo de íons, ou seja, o transporte de três íons Na^+ para o meio extracelular e de dois íons K^+ para o meio intracelular mantém um gradiente eletroquímico através da membrana celular (LINGREL; KUNTZWEILER, 1994; ERECINSKA; CHERIAN; SILVER, 2004). Este gradiente é utilizado como fonte energética para a manutenção do potencial de repouso e da excitabilidade das células, regulação do volume celular, pH intracelular e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na^+ , como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (GEERING, 1990). Além disso, a Na^+K^+ -ATPase consome o ATP produzido pelas células, sendo este consumo de 40 a 60% nas células neuronais (ERECINSKA; SILVER, 1994).

Dados da literatura mostram que a atividade da Na^+K^+ -ATPase está reduzida na isquemia cerebral (WYSE *et al.*, 2000), na epilepsia (GRISAR, 1984), em crises convulsivas (RENKAWEK *et al.*, 1992) e em determinadas doenças neurodegenerativas (LEES, 1993; HATTORI *et al.*, 1998, YU, 2003), como por exemplo na doença de Alzheimer (LIGURI *et al.*, 1990; HATTORI *et al.*, 1998).

4 INTERDISCIPLINARIDADE

Esta pesquisa está inserida nas duas áreas de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente. Na saúde, uma vez que estudou-se os efeitos *in vivo* e *in vitro* da Galactosemia Clássica, um EIM, e a influência dos antioxidantes trolox, ácido ascórbico e da glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético. Também visa contribuir para os mecanismos envolvidos na fisiopatologia e tratamento da doença, assim áreas como a patologia, fisiologia, genética, bioquímica e nutrição estão diretamente envolvidas nesta pesquisa. Relaciona-se com o ambiente uma vez que os EIM são doenças genéticas e acometem membros de uma mesma família. Essas doenças exigem diagnóstico e tratamento específico que demandam custo e acompanhamento médico durante toda a vida. Devido as complicações a longo prazo, essas doenças acarretam dificuldade de relacionamento entre os indivíduos afetados e a sociedade, além de redução da qualidade de vida, aumento das internações e consequentemente aumento do custo de vida para o indivíduo.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados 42 ratos machos Wistar de 30 dias e 49 ratos machos Wistar de 60 dias de idade provenientes da Empresa Tecpar (Curitiba). Antes do processo de experimentação, os animais foram acomodados e aclimatados por 7 dias, para adaptação em um novo ambiente. Foram mantidos em salas com ciclo de 12h claro/escuro à temperatura mantida entre 20-22°C com livre acesso à comida (ração) e água. Os animais foram mantidos em número máximo de seis por gaiola contendo maravalha. A frequência de troca de caixas foi a cada 2 dias. Os cuidados com os animais ocorreram conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996".

5.2 Protocolo Experimental

5.2.1 Estudos *in vitro*

Foram utilizados ratos machos Wistar não tratados. A galactose foi adicionada ao ensaio a fim de se obter as seguintes concentrações finais: 0,1, 3,0, 5,0 e 10,0 mM (GITZELMANN, 1995). O grupo controle foi realizado sem a adição da galactose e o tempo de incubação das amostras foi de uma hora a 37°C.

5.2.2 Cirurgia e administração intracerebral de galactose

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina e xilazina (75 and 10 mg/kg, respectivamente). Após a cabeça dos animais foi fixada em aparelho estereotáxico, a pele do crânio foi removida e uma cânula guia de calibre 27 x 10mm foi colocada acima do ventrículo lateral direito (de acordo com as coordenadas relativas ao bregma: AP: -0,9mm; L: -1,5 mm; DV: -2,6mm) (PAXINOS; WATSON, 1986). A cânula foi fixada com cimento acrílico. Os experimentos foram realizados 72h após a cirurgia. Uma cânula de calibre 30 foi colocada na cânula guia e conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa Hamilton de 5 µl.

5.2.3 Prevenção com trolox (alfa-tocoferol), ácido ascórbico e glutathione

Para os experimentos *in vitro*, os ratos foram divididos em grupos: grupo 1 (controle-salina), grupo 2 (galactose), grupo 3 (controle-trolox 1,0 mM), grupo 4 (controle-ácido ascórbico 1,0 mM), grupo 5 (controle-glutathione 1,0 mM), grupo 6 (galactose + trolox 1,0 mM), grupo 7 (galactose + ácido ascórbico 1,0 mM) e grupo 8 (galactose + glutathione 1,0 mM). Após a adição dos compostos descritos acima, os tubos de ensaio foram incubados por 1 hora a temperatura de 37°C. Os experimentos *in vitro* foram realizados com a utilização hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos.

As doses de trolox, ácido ascórbico e glutathione seguiram os protocolos descritos por Streck *et al.*, (2001), Silva *et al.*, (2004) e Avrova *et al.*, (1999), respectivamente.

5.2.4 Pré-tratamento com ácido ascórbico e trolox

Os ratos foram divididos em grupo 1 (controle-salina), grupo 2 (tratado-galactose), grupo 3 (controle-ácido ascórbico + trolox) e grupo 4 (galactose + ácido ascórbico + trolox). Os ratos de 53 dias foram tratados durante 7 dias com uma injeção diária intraperitoneal de salina (grupos 1 e 2) ou de vitaminas E (40 mg/Kg) e C (100 mg/Kg) (grupos 3 e 4) (WYSE *et al.*, 2002; DELWING *et al.*, 2006). Doze

horas após a última injeção, os animais dos grupos 2 e 4 receberam uma infusão intracerebroventricular de galactose 5,0 mM e os animais dos grupos 1 e 3 receberam uma infusão intracerebroventricular de salina e foram sacrificados 1 hora após a injeção por decapitação na ausência de anestesia e o córtex, cerebelo e hipocampo foram removidos. Para o sacrifício não foi usado anestésico, pois a manipulação do animal para administração do anestésico ou ele próprio pode causar estresse, e desta forma interferir nos resultados (LEE, 2012).

5.3 Estudos bioquímicos

5.3.1 Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, o cérebro foi rapidamente removido e o hipocampo, córtex cerebral e cerebelo dissecados e homogeneizados em tampão adequado de acordo com a técnica utilizada. O homogeneizado foi centrifugado a $\times 3.000$ g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo, de metabolismo energético e atividade da acetilcolinesterase e Na^+K^+ -ATPase.

5.3.2 TBA-RS

TBA-RS foi determinada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.*, (1979). A metodologia para análise do TBA-RS mensura o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais $\text{OH}^\cdot$. Para os experimentos *in vitro*, as estruturas cerebrais foram misturadas com ácido tricloroacético a 20% e 1,15% de ácido tiobarbitúrico e aquecidas num banho de água fervente durante 60 minutos. TBA-RS foi determinada pela absorbância à 535nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo

tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/ mg de proteína.

5.3.3 Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi ensaiada pelo método de Aebi (1984), usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H_2O_2 à 240nm num meio de reação contendo 20mM de H_2O_2 , 0,1% de Triton X-100, 10mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0. Uma unidade de CAT é definida como 1 μ mol de H_2O_2 consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

5.3.4 Glutathione peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tert-butil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro à 340nm por 4 minutos usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O meio continha 2mM de GSH, 0,15U/mL de GSH redutase, 0,4mM de azida, 0,5mM de tert-butil-hidroperóxido e 0,1mM de NADPH. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é apresentada como unidades de GSH-Px /mg de proteína.

5.3.5 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15 μ l de cada amostra foi adicionado à 215 μ l de uma mistura contendo 50 μ M de tampão Tris, 1 μ M de EDTA, pH 8,2, e 30 μ M de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20 μ L de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos à 420nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição

da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatada como unidades de SOD/mg de proteína.

5.3.6 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzólico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado foram adicionados a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µl de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

5.3.7 Conteúdo total de Carbonilas

A carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Reznick e Packer (1993), o qual se baseia na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, que foi medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 µL de homogeneizado foi adicionado a tubo de ensaio contendo 400 ul de dinitrofenilhidrazina 10mM (preparado em HCl 2 M). Mantido no escuro durante 1 h e agitado em vórtex a cada 15 min. Depois disso, 500 ul de ácido tricloroacético a 20% foi adicionado a cada tubo. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 14000 rpm durante 3 min. O sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento lavado com 1 mL de etanol: acetato de etila (1: 1, v / v), agitado em vórtex e centrifugado a 14000 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensão em 600µL de guanidina 6M (preparado em solução de fosfato de potássio 20 mM pH 2,3). A amostra foi submetida à vórtex e incubada a 60C durante 15 min. Depois disso, centrifugada a 14000 rpm durante 3 min e o sobrenadante usado para medida

da absorvância a 370 nm. Os resultados foram relatados como conteúdo de carbonila (nmol / mg de proteína).

5.3.8 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x g por 10 min, o pellet descartado e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da acetilcolinesterase e concentração proteica. A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Ellman e colaboradores, (1961) com algumas modificações.

5.3.9 Atividade do complexo II e succinatodesidrogenase

As atividades do complexo II e succinato desidrogenase, foram determinadas pelo método descrito por Fischer *et al.*, (1985), acompanhando o decréscimo na absorvância devido a redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm com 700 nm de comprimento de onda como referência ($\epsilon=19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), na presença de fenazina metossufato (PMS). A mistura da reação, consiste em 40 mM de fosfato de potássio, pH 7,4, 16.0 mM de succinato e 8 μM de DCIP, foi pré-incubada com 40-80 μg da proteína homogeneizada a 30°C por 20 minutos. Subsequentemente, para a atividade do complexo II, 4 mM azida sódica, 7 μM rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 40 μM de DCIP e foi monitorada por 5 minutos.

A atividade da succinato desidrogenase foi obtido pelo mesmo meio de incubação e pela adição de 1 mM de PMS e monitorada por 5 minutos.

5.3.10 Atividade da Citocromo C oxidase

A atividade da citocromo c oxidase foi determinada pelo método descrito por Rustin *et al.*, (1994). A atividade enzimática foi mensurada acompanhando o

decréscimo na absorbância devida a oxidação do citocromo c previamente reduzido. Foi utilizado comprimento de onda de 550 nm sendo 580 nm como comprimento de onda de referência ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). O buffer de reação continha 10 mM de fosfato de potássio, pH 7, 0,6 mM, *n*-dodecyl- β -D-maltoside e 2-4 μg de homogenato de proteína. A reação foi iniciada pela adição de 0,7 μg de citocromo C reduzido.

A Atividade do citocromo C oxidase foi mensurada a 25°C por 10 minutos.

5.3.11 Atividade da Piruvato Quinase

A atividade da piruvatoquinase foi determinada pelo método descrito por Leong *et al.*, (1981).

O meio de incubação consistiu de 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10.0 mM MgCl_2 , 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 unidades de L-lactato desidrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 μL do sobrenadante (livre de mitocôndrias) em um volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada depois de 30 minutos de pré-incubação adicionando 1 mM de fosfoenolpiruvato (PEP).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata a 25°C. Os resultados são expressos como μmol de piruvato formado por minuto por mg de proteína.

5.3.12 Atividade da Bomba Na^+K^+ -ATP-se

A atividade da bomba Na^+K^+ -ATPase foi determinada pelo método descrito por Wyse *et al.*, (2000).

A mistura para o ensaio da atividade de Na^+ , K^+ -ATPase apresentava 5,0 mM de MgCl_2 , 80,0 mM de NaCl, 20,0 mM de KCl e 40,0 mM de Tris-HCl, pH 7,4, num volume final de 200 μL . A reação começou pela adição de ATP. Os controles foram tratados sob as mesmas condições com a adição de 1,0 mM de ouabaína. A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase foi calculada pela diferença entre os dois ensaios, conforme descrito por Wyse *et al.* (1998). A liberação de fosfato inorgânico (Pi) foi medida pelo método descrito por Chan *et al.* (1986) A atividade enzimática foi expressa por nmol Pi libertado por min por mg de proteína.

5.3.13 Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951) ou de Bradford (1976) utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1 - ANTIOXIDANTS EFFECTS ON THE INTRACEREBROVENTRICULAR GALACTOSE DAMAGE IN RATS.

Situação: Publicado na revista Pathology – Research and Practice.

ANTIOXIDANT EFFECTS ON THE INTRACEREBROVENTRICULAR GALACTOSE DAMAGE IN RATS

Simone Sasso^b, Indianara Rodrigues Cruz^a, Mariana Simonato
Lorenzini^a,Débora Delwing-Dal Magro^c, Maitê Beatriz Brueckheimer^a, Thayna
Patachini Maia^a, Geraldo Antonio Bunick Neto Sala^a, Matheus Henrique Ruela
Mews^d, Daniela Delwing-de Lima^{a,b*}

^a Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville–
UNIVILLE,
Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville,
SC, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da
Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte,
CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil.

^c Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais,
Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga,140,CEP89012-900,
Blumenau, SC, Brasil.

^d Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville–
UNIVILLE,
Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte, CEP89201-972, Joinville,
SC, Brasil.

*Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil, Phone 55 47 3461 9112. E-mail: daniela.delwing@univille.br / danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

We investigated the effects of the intracerebroventricular infusion of galactose and the influence of pretreatment with antioxidants on oxidative stress parameters and acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain of 60-day-old Wistar rats. Rats received galactose (5 μ L of 5.0 mM) or saline by intracerebroventricular injection and were killed by decapitation after 1 h. Another group was pretreated daily for 1 week with saline or α -tocopherol (40 mg/kg) plus ascorbic acid (100 mg/kg, *i.p.*). Twelve hours after the last antioxidant injection, animals received an intracerebroventricular infusion of galactose solution (5.0mM) or saline, and were sacrificed 1 h later. Galactose elevated thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), protein carbonyl content and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and decreased total sulfhydryl content and catalase (CAT) activity in the cerebral cortex. In the hippocampus, enhanced TBA-RS, decreased total sulfhydryl content and increased AChE activity, while in the cerebellum it decreased total sulfhydryl content and increased CAT and superoxide dismutase (SOD) activities. Pretreatment with antioxidants prevented the majority of these alterations, indicating the participation of free radicals in these effects. Thus, intracerebroventricular galactose infusion impairs redox homeostasis in the brain; the administration of antioxidants should be considered as an adjuvant therapy to specific diets in galactosemia.

Keywords: Galactose; antioxidants; acetylcholinesterase; oxidative stress; intracerebroventricular injection.

1. Introduction

Classic galactosemia is an autosomal recessive disorder caused by the deficiency of galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT) enzyme (GALT; EC 2.7.7.12), which transfers UDP from UDP-glucose to galactose-1-phosphate, thereby releasing glucose 1-phosphate and producing UDP-galactose [1,2]. Patients with GALT deficiency cannot metabolize galactose-1-phosphate and hence accumulate galactose-1-phosphate and galactose, which can be metabolized through an alternative pathway, leading to the production of galactitol and galactonate [3]. In classic galactosemia, patients develop symptoms following exposure to a milk-based diet, and present vomiting, diarrhea, cataracts, hepatomegaly, and *E. coli* sepsis, leading eventually to neonatal death [4]. Galactose restriction in the diet can immediately mitigate or prevent these acute manifestations, but does not appear to prevent longer-term complications that include premature ovarian failure, mental retardation, cognitive difficulties, psychiatric symptoms, speech and motor problems, among other complications [5-7]. Some patients affected may exhibit neurological abnormalities including tremor, cerebellar ataxia, and dystonia [8-10].

Studies carried out in our laboratory show that at pathologically high concentrations (greater than 5.0mM), *in vitro* galactose induces oxidative stress in the cerebrum and blood and alters cholinesterase activity in the cerebrum of rats [11,12]. In these studies, the antioxidants trolox, ascorbic acid and glutathione were able to prevent the majority of alterations in oxidative stress parameters and the decrease in AChE activity caused by *in vitro* galactose.

Researchers have also demonstrated that different experimental models of galactose cause oxidative stress in *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* and rats [13-15]. The literature shows that different substances such as purple sweet potato color, melatonin and proanthocyanidins may protect against the oxidative stress caused by galactose in animal models due to their antioxidant capacities [16-19]. Furthermore, D-galactose treatment reportedly induces oxidative stress in the mouse brain, resulting in neurodegeneration and cognitive dysfunction [20-22]. *In vivo* findings have also shown that intracerebroventricular or subcutaneous injection of galactose leads to protein, lipid and DNA damage in different brain structures [23,24].

In order to corroborate previous findings and considering that most galactosemia models are chronic or peripheral, we investigated the acute effects of the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0 mM) on lipid peroxidation, by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), on protein damage, analyzing total sulfhydryl and protein carbonyl contents, on the activity of the major antioxidant enzymes (catalase [CAT], glutathione peroxidase [GSH-Px] and superoxide dismutase [SOD]) and on the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the hippocampus, cerebellum and cerebral cortex of 60-day-old Wistar rats. We also tested the influence of pretreatment with the antioxidants, α -tocopherol and ascorbic acid, on the effects elicited by galactose in order to investigate the possible participation of free radicals in the effects elicited by galactose.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and reagents

Sixty-day-old male Wistar rats (220-280g), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$), with free access to water and commercial protein chow. The "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication 85-23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Region Itajaí, Itajaí Brazil, under the protocol number CEUA 01/14-14/03/2014. Environmental conditions, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

2.2. Surgery and intracerebroventricular administration

Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively). The heads of the animals were fixed in a stereotaxic apparatus, the skin of the skull was removed and a 27-gauge 10-mm guide cannula was then placed above the right lateral ventricle (coordinates relative from bregma: AP: -0.9 mm; L: -1.5 mm; DV: -2.6 mm) [25].

The cannula was fixed with acrylic cement. Experiments were performed 48 h after surgery. A 30-gauge cannula was fitted into the guide cannula and connected by a polyethylene tube to a 5- μ l Hamilton microsyringe. The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula towards the lateral cerebral ventricle. We performed two sets of experiments. First, the animals were divided into four groups: group 1 (naïve group), rats that did not undergo surgery; group 2 (procedure group), rats that only underwent surgery; group 3 (sham group), rats that suffered surgery and received saline; and group 4 (galactose-treated group), rats that received 5.0mM of galactose solution. An intracerebroventricular volume of 5 μ l (saline or galactose solution) was administered. The animals were killed by decapitation without anesthesia at 1 h after injection. The galactose dose was chosen based on the plasmatic concentration found in galactosemic patients to try to mimic the conditions of untreated galactosemic patients, who can accumulate millimolar concentrations of galactose in the CNS [26,27].

In the second set of experiments, rats were pretreated for 1 week with daily intraperitoneal administrations of saline (control) or α -tocopherol (40 mg/kg) plus ascorbic acid (100 mg/kg). α -Tocopherol and ascorbic acid doses were chosen according to the protocol described by Wyse et al. (2002) [28]. Twelve hours after the last injection of the antioxidants, animals received an intracerebroventricular infusion of 5.0mM of galactose solution or saline and were killed 1 h later. The naïve group did not undergo surgery.

2.3. Tissue preparation

After decapitation, the brain was immediately removed, cerebral cortex, cerebellum and hippocampus were dissected and kept chilled until homogenization. The time elapsed between decapitation and dissection was less than 1 min. The cerebral structures were homogenized in ten volumes (1:10w/v) of appropriate buffer, according to the technique to be performed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuging at 800 x g for 10min at 4°C before discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for assaying the activity of antioxidant enzymes, damage to proteins, estimation of lipid peroxidation and cholinesterase activity.

2.4. Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) measurement

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979) [29]. TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, mainly by hydroxyl free radicals. Briefly, brain structures homogenized in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was calculated as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

2.5. Total sulfhydryl content determination

The total thiol group concentration was determined by the method of Aksenov and Markesbery (2001) [30]. Initially, 50 µL of homogenate were added to 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 µL of 10.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Total sulfhydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

2.6. Protein carbonyl content

Carbonyl content was assayed by a method determined by Reznick and Packer (1994) [31] based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200 µL of homogenate were added to plastic tubes containing 400 µL of 10.0 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2.0 M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 µL of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 $\times g$ for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1

v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 x *g* for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600µL of 6M guanidine (prepared in a 20.0 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60°C for 15 min. Samples were then centrifuged at 14,000 x *g* for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results are reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

2.7. Catalase assay (CAT)

CAT activity was determined by the method of Aebi (1984) [32] using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10.0 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1µmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

2.8. Glutathione peroxidase assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was determined by the method of Wendel (1981) [33] using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored at 340nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15U/mL GSH reductase, 0.4mM azide, 0.5mM *tert*butyl- hydroperoxide and 0.1mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1µmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein.

2.9. Superoxide dismutase assay (SOD)

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide (O₂•⁻), which is a substrate for SOD [34]. Briefly, to 15µL of each sample, 215µL of a mixture containing 50.0 µM Tris buffer, pH 8.2, 1.0 µM EDTA and 30.0 µM CAT were added. Subsequently, 20.0 µL of pyrogallol were added and the absorbance was immediately recorded every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The inhibition of autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as a reference, to calculate the activity of SOD

present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

2.10. Acetylcholinesterase (AChE) activity assay

The cerebral structures were homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.5. The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min, the pellet was discarded and the supernatant used for the determination of the acetylcholinesterase activity and protein concentration. Acetylcholinesterase activity was determined according to the colorimetric method of Ellman et al. (1961) [35] with some modifications.

2.11. Protein determination

Protein was measured by the Lowry et al. (1951) [36] or Bradford (1976) [37] methods, using serum bovine albumin as standard.

2.12. Statistical analysis

For analyses, data were analyzed by ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the F-test was significant. All analyses were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 using a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

3. Results

3.1. Effects of intracerebroventricular galactose infusion on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the brain of rats

First, we investigated the effect of the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0 mM solution) on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of rats. Fig. 1A shows that the infusion of galactose (5.0 mM) significantly enhanced TBA-RS in the cerebral cortex [$F(3,19) = 8.296$; $p < 0.01$] and hippocampus [$F(3,17) = 6.197$; $P < 0.01$], but did not alter this parameter in the cerebellum [$F(3,19) = 1.919$; $p > 0.05$] of rats, when

compared to the naive, procedure and sham groups. Galactose also decreased total sulfhydryl content (Fig. 1B) in the cerebral cortex [$F(3,18)=17.159$; $p<0.001$], cerebellum [$F(3,19)=5.785$; $p<0.01$] and hippocampus [$F(3,18)=5.195$; $p<0.01$] of rats. Furthermore, the intracerebroventricular infusion of galactose increased the protein carbonyl content (Fig. 1C) in the cerebral cortex [$F(3,18)=8.347$; $p<0.01$], but did not alter this parameter in the cerebellum [$F(3,20)=0.571$; $p>0.05$] or the hippocampus [$F(3,18)=0.223$; $p>0.05$] of rats, when compared to the naive, procedure and sham groups.

3.2. Effects of intracerebroventricular galactose infusion on the activities of antioxidant enzymes in the brain of rats

The effects of the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0mM) on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the brain of rats were also verified. As can be seen in Fig. 2A, galactose enhanced CAT activity in the cerebellum [$F(3,17)=5.990$; $p<0.01$] and decreased this enzyme's activity in the cerebral cortex [$F(3,17)=3.471$; $p<0.05$], but did not alter CAT activity in the hippocampus [$F(3,19)=2.449$; $p>0.05$], as compared to the naive, procedure and sham groups. With regard to GSH-Px activity (Fig. 2B), the infusion of galactose (5.0mM) increased this enzyme's activity in the cerebral cortex [$F(3,20)=24.677$; $p<0.001$], but did not alter the enzyme's activity in the cerebellum [$F(3,20)=1.371$; $p>0.05$] or hippocampus [$F(3,20)=0.872$; $p>0.05$] of rats. With regard to SOD (Fig. 2C), galactose (5.0mM) increased SOD activity in the cerebellum [$F(3,17)=10.598$; $p<0.001$], when compared to the naive, procedure and sham groups, but did not alter it in the cerebral cortex [$F(3,17)=0.656$; $p>0.05$] or hippocampus [$F(3,17)=1.493$; $p>0.05$] of rats.

3.3. Effects of intracerebroventricular galactose infusion on the activity of AChE in the brain of rats

Subsequently, the effect of the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0mM) on AChE activity was also analyzed. In the hippocampus, the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0mM) increased AChE activity (Fig. 3) [$F(3,18)=7.255$; $p<0.01$]; in contrast, galactose did not alter this enzyme's activity in

the cerebral cortex [$F(3,18)=1.204$; $p>0.05$] or in the cerebellum [$F(3,20)=0.788$; $p>0.05$] of rats, as compared to the naive, procedure and sham groups.

3.4. Influence of pretreatment with α -tocopherol plus ascorbic acid on the effects elicited by intracerebroventricular galactose infusion in the brain of rats

Finally, we evaluated the influence of antioxidants, namely α -tocopherol plus ascorbic acid, on the galactose-elicited alterations in parameters of oxidative stress and AChE activity, in order to investigate a possible participation of free radicals. Post hoc analyses showed that these antioxidants per se did not alter these parameters. As can be observed in Fig. 4, pretreatment with antioxidants prevented the increase in TBA-RS caused by galactose in the cerebral cortex (Fig. 4A) [$F(4,24)=6.850$; $p<0.01$] and hippocampus (Fig. 4B) [$F(4,24)=5.615$; $p<0.01$] of rats, as well as the reduction in total sulfhydryl content in the hippocampus (Fig. 4C) [$F(4,24)=14.621$; $p<0.001$]. In contrast, Fig. 4D shows that pretreatment with antioxidants partially prevented the decrease in the total sulfhydryl content induced by 5.0mM galactose infusion in the cerebral cortex [$F(4,24)=21.306$; $p<0.001$] and the increase in the protein carbonyl content (Fig. 4E) [$F(4,24)=3.510$; $p<0.05$], but did not prevent the reduction in the total sulfhydryl content in the cerebellum (Fig. 4F) [$F(4,24)=10.127$; $p<0.001$] of rats. With regard to the antioxidant enzymes, the antioxidants prevented the increase in CAT activity (Fig. 5A) [$F(4,24)=13.701$; $p<0.001$] and SOD activity (Fig. 5B) [$F(4,24)=40.480$; $p<0.001$] in the cerebellum and partially prevented the decrease in CAT activity, (Fig. 5C) [$F(4,24)=11.678$; $p<0.001$] and the increase in GSH-Px activity (Fig. 5D) [$F(4,24)=13.174$; $p<0.001$] in the cerebral cortex of rats. Finally, pretreatment with α -tocopherol plus ascorbic acid prevented the galactose-induced increase in AChE activity in the hippocampus of rats (Fig. 6) [$F(4,24)=8.060$; $p<0.001$].

4. Discussion

The purpose of the present study was to investigate the effect of the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0mM) on the oxidative stress status and on the activity of AChE in the brain of rats. We analyzed different biomarkers of oxidative stress, as such TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content,

and the activities of the antioxidant enzymes, CAT, SOD and GSH-Px, as well as a marker of cognitive dysfunction, AChE activity. These parameters were measured in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus, since these brain structures have important functions that may have been damaged by the oxidative stress caused by galactose. We also tested the influence of pretreatment with the antioxidants, α -tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C), on the effects elicited by galactose, in order to investigate the possible participation of free radicals in the effects caused by galactose. The concentration utilized, 5.0mM, mimics a pathological concentration that can occur in galactosemia [26], and as previously employed by Rodrigues et al. (2016) [38]. We used this experimental model of galactose administration to guarantee the presence of galactose in the brain of rats.

This study revealed that intracerebroventricular infusion of galactose (5.0mM solution) enhanced TBA-RS in the cerebral cortex and hippocampus, but did not alter this parameter in the cerebellum, indicating that galactose may induce lipoperoxidation, an effect probably mediated by reactive oxygen species (ROS) generation. Intracerebroventricular galactose administration also increased protein damage in the brain of rats, as indicated by the decreased levels of total sulfhydryl content in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus and the increased protein carbonyl content (another important marker of protein oxidative damage) in the cerebral cortex. However, no alteration in this biomarker of oxidative stress was observed in the cerebellum and hippocampus of rats. Our study suggests that the cerebral cortex is more susceptible to the oxidative stress caused by galactose, when compared to the other structures studied, as this region suffered damage to lipids and proteins.

With regard to brain enzymatic antioxidant activity, galactose enhanced CAT activity in the cerebellum, decreased this enzyme's activity in the cerebral cortex, but did not alter its activity in the hippocampus. Infusion of galactose increased GSH-Px activity in the cerebral cortex, but did not alter the enzyme's activity in the cerebellum or hippocampus of rats. SOD activity in the cerebellum was increased by galactose, but was not altered in the cerebral cortex or hippocampus of rats. These results indicate that high galactose concentrations in the brain, as employed in this *in vivo* model, cause changes in the activity of antioxidant enzymes, suggesting that the antioxidant defenses of the cerebral cortex and cerebellum are more susceptible to

galactose than the hippocampus. In the cerebellum, increased SOD activity indicates a greater degradation of superoxide and the formation of H_2O_2 , which can, in turn, be detoxified by the increase in CAT activity, thereby preventing the formation of harmful hydroxyl radicals. In the cerebral cortex, the increase in GSH-Px activity observed may have occurred in due to the reduction in CAT activity, thus enabling the removal of H_2O_2 . Since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defenses of the tissue and the reactive species generated, our present data indicate that *in vivo* galactose generates oxidative stress in the brain of rats, inducing the oxidation of lipids and proteins and changes in CAT, SOD and GSH-Px activities. Consistent with these results, studies carried out in our laboratory have shown that *in vitro* galactose induces oxidative stress in the cerebrum and blood of rats [14,15].

We subsequently verified the effect of the intracerebroventricular infusion of galactose (5.0mM) on AChE activity. In the hippocampus, intracerebroventricular galactose increased AChE activity, but did not alter this enzyme's activity in the cerebral cortex or in the cerebellum. AChE participates in cholinergic neurotransmission, hydrolyzing acetylcholine to choline and acetic acid, an essential process that allows the restoration of the cholinergic neuron [39]. Our results suggest that the galactose-induced increase in AChE activity causes the constant stimulation of this enzyme, decreasing acetylcholine levels and, in turn, interfering in cholinergic transmission. This interference in cholinergic transmission could contribute to the memory deficits observed in affected patients. Our findings corroborate those of Rodrigues et al. (2016) [38], who reported that galactose increases AChE activity in the hippocampus.

Finally, we evaluated the influence of antioxidants, namely α -tocopherol plus ascorbic acid, on the galactose-elicited alterations in parameters of oxidative stress and AChE activity, in order to investigate the possible participation of free radicals in this mechanism. α -Tocopherol and ascorbic acid are important antioxidants that act as scavengers of free radicals and suppress peroxidation in the aqueous and lipid regions of the cell. [40]. Results showed that pretreatment with antioxidants prevented the increase in TBA-RS caused by galactose in the cerebral cortex and hippocampus of rats, as well as the reduction in total sulfhydryl content in the hippocampus. In contrast, pretreatment with antioxidants partially prevented the

decrease in the total sulfhydryl content induced by galactose infusion in the cerebral cortex and the increase in the protein carbonyl content, but did not prevent the reduction in the total sulfhydryl content seen in the cerebellum of rats. The antioxidants prevented the increase in the activities of the antioxidant enzymes, CAT and SOD, in the cerebellum and partially prevented the decrease in CAT activity and the increase in GSH-Px activity in the cerebral cortex of rats. Importantly, α -tocopherol plus ascorbic acid pretreatment prevented the increase in AChE activity induced by galactose administration in the hippocampus of rats.

In summary, we have demonstrated that “*in vivo*” galactose alters AChE activity and causes oxidative stress in the rat brain by altering enzymatic antioxidant defenses and inducing lipid oxidation and damage to proteins, probably by enhancing reactive species generation. We suggest that these alterations in oxidative stress parameters and AChE activity are probably mediated by the generation of free radicals, which can in turn be scavenged by α -tocopherol and ascorbic acid, since these antioxidants partially or totally prevented most of the alterations elicited by galactose in the brain of rats. Considering the protective effect of these antioxidants, we suggest that these agents could be used as a therapeutic adjuvant, in addition to galactose restriction, to limit oxidative damage and to protect against the toxic actions of galactose in the brain.

Conflict of interest

The authors declare that no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Universidade da Região de Joinville.

References

- [1] G.M Zou, Cancer stem cells in leukemia, recent advances, *J Cell Physiol.* 213 (2007) 440–444.
- [2] K.J Isselbacher, E. Anderson, K. Kurahashi, H.M. Kalckar, Congenital galactosemia, a simple enzymatic block in galactose metabolism, *Science.* 123 (1956) 635–636.
- [3] G.T Berry, S. Segal, R. Gitzelmann, Disorder of Galactose Metabolism. In: J. Fernandes, J.M. Saudu Bray, G. Van Den Berghe, J.H. Walter, *Inborn Metabolic Diseases*, 4th ed. Berlin, Heidelberg; 2006:121-130.
- [4] P.P Jumbo-Lucioni, K. Garber, J. Kiel, I. Baric, G.T Berry, A. Bosch, et al., Diversity of approaches to classic galactosemia around the world: a comparison of diagnosis, intervention, and outcomes, *J Inherit Metab Dis.* 35 (2012) 1037–49.
- [5] A.M. Bosc, Classical galactosaemia revisited, *J Inherit Metab Dis.* 29 (2006) 516–525.
- [6] J.L. Fridovich-Keil, J.H. Walter, Galactosemia. In: D. Valle, *The online molecular and metabolic basis of inherited disease*, (Eds.) McGraw- Hill., New York, 2008, pp. 1-92.
- [7] S.E Waisbren, N.L. Potter, C.M. Gordon, R.C. Green, P. Greenstein, C.S. Gubbels et al., The adult galactosemic phenotype, *J Inherit Metab Dis.* 35 (2012) 279–286.
- [8] C.S. Gubbels, C.M.G. Thomas, W.K. Wodzig, A.J. Olthaar, J. Jaeken, F.C. Sweep, FSH isoform pattern in classic galactosemia, *J Inherit Metab Dis.* 34 (2011) 87–90.
- [9] A.E. Ten Hoedt, H. Maurice-Stam, C.C. Boelen, M.E. Rubio-Gozalbo, F.J. Van Spronsen, F.A. Wijburg, Parenting a child with phenylketonuria or galactosemia: implications for health-related quality of life, *J Inherit Metab Dis.* 34 (2011) 391–8.
- [10] B. Hoffmann, N. Dragano, S. Schweitzer-Krantz, Living situation, occupation and health-related quality of life in adult patients with classic galactosemia, *J Inherit Metab Dis.* 35 (2012) 1051–8.
- [11] D. Delwing-de Lima, M. Fröhlich, L. Dalmedico, J.G. Aurélio, D. Delwing-Dal Magro, E.M. Pereira, et al., Galactose alters markers of oxidative stress and

- acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: Protective role of antioxidants, *Metab Brain Dis.* 32 (2016) 359–368.
- [12] D. Delwing-de Lima, S.B. Hennrich, D. Delwing, J.G. Aurélio, A.P. Serpa, T.W. Augusto, The effect of d-galactose induced oxidative stress on in vitro redox homeostasis in rat plasma and erythrocytes, *Biomed Pharmacother* 86 (2017) 686–693.
- [13] P.P. Jumbo-Lucioni, M.L. Hopson, D. Hang, Y. Liang, D.P. Jones, J.L. Fridovich-Keil, Oxidative stress contributes to outcome severity in a *Drosophila melanogaster* model of classic galactosemia, *Dis Model Mech.* 6 (2013) 84–94.
- [14] X. Cui, L. Wang, P. Zuo, Z. Han, Z. Fang, W. Li et al., D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Muscadomestica* is associated with oxidative stress, *Biogerontology* 5 (2004) 317–25.
- [15] J. Budnia, R. Pacheco, S. da Silva, M.L. Garcez, F. Mina, T. Bellettini-Santos, Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats, *Behav Brain Res.* 302 (2016) 35–43.
- [16] Q. Shan, J. Lu, Y. Zheng, J. Li, Z. Zhou, B. Hu, et al., Purple Sweet Potato Color Ameliorates Cognition Deficits and Attenuates Oxidative Damage and Inflammation in Aging Mouse Brain Induced by D-Galactose, *J Biomed Biotechnol.* 2009 (2009) 1-9.
- [17] Y.X. Shen, S.Y. Xu, W. Wei, X.X. Sun, J. Yang L.H Liu, et al., Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose, *J Pineal Res.* 32 (2002) 173–8.
- [18] D.J. Timson, Purple sweet potato colour a potential therapy for galactosemia? *Int J Food Sci Nutr.* 65 (2011) 391–3.
- [19] Y. Gong, J. Guo, K. Hua, Y.Q. Gao, B.J. Xie, Z.D Sun, et al., Ameliorative effect of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive impairment and brain aging induced by D-galactose, *ExpGerontol.* 74 (2016) 21–28.
- [20] X. Cui, P. Zuo, Q. Zhang, X. Li, Y. Hu, J. Long, et al., Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid, *J Neurosci Res.* 83 (2006) 1584–1590.
- [21] J. Lu, Y.L. Zheng, L. Luo, D.M. Wu, D.X. Sun, Y.J. Feng, Quercetin reverses Dgalactose- induced neurotoxicity in mouse brain, *Behav Brain Res.* 171 (2006) 251–260.

- [22] J. Lu, Y.L. Zheng, D.M. Wu, L. Luo, D.X. Sun, Q. Shan, Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose, *Biochem Pharmacol.* 74 (2007) 1078–1090.
- [23] M.B. Castro, B.K. Ferreira, J.H. Cararo, A.E. Chipindo, M.L. Magenis, M. Michels, et al., Evidence of oxidative stress in brain and liver of young rats submitted to experimental galactosemia, *Metab Brain Dis.* 31 (2016) 1381-1390.
- [24] A.F. Rodrigues, H. Biasibetti, B.S. Zanotto, E.F. Sanches, F. Schmitz, V.T. et al., D-Galactose Causes Motor Coordination Impairment, and Histological and Biochemical Changes in the Cerebellum of Rats, *MolNeurobiol.* 11 (2016) 589–596.
- [25] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7th ed. London: Academic Press, 1986.
- [26] R. Gitzelmann, Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia, *Eur J Pediatrics.* 154 (1995) 45–49.
- [27] G.T. Berry, Is prenatal myo-inositol deficiency a mechanism of CNS injury in galactosemia? *J Inherit Metab Dis.* 34 (2011) 345–355.
- [28] A.T.S. Wyse, A.I. Zugno, E.L. Streck, C. Matté, T. Calcagnotto C.M. Wannmacher, Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment, *Neurochem Res.* 27 (2002) 1685–1689.
- [29] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem.* 95 (1979) 351–358.
- [30] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [31] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 357–363.
- [32] H. Aebi, Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [33] A. Wendel, Glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 325–333.
- [34] S.L. Marklund, Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for oxygen radical research*. (ed). CRC Press: Boca Raton, 1985, pp. 243–247.

- [35] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [36] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [37] M.M Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [38] A.F. Rodrigues, H. Biasibetti, B.S. Zanotto, E.F. Sanches, P. Pierozan, F. Schmitz, Intracerebroventricular D-galactose administration impairs memory and alters activity and expression of acetylcholinesterase in the rat, *Int J Dev Neurosci.* 50 (2016) 1–6.
- [39] M. Pohanka, Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 155 (2011) 219–230.
- [40] I.S. Young, J.V. Woodside, Antioxidants in health and disease *Antioxidants in health and disease*, *J Clin Pathol.* 54 (2001) 176–186.

Figures

Fig. 1

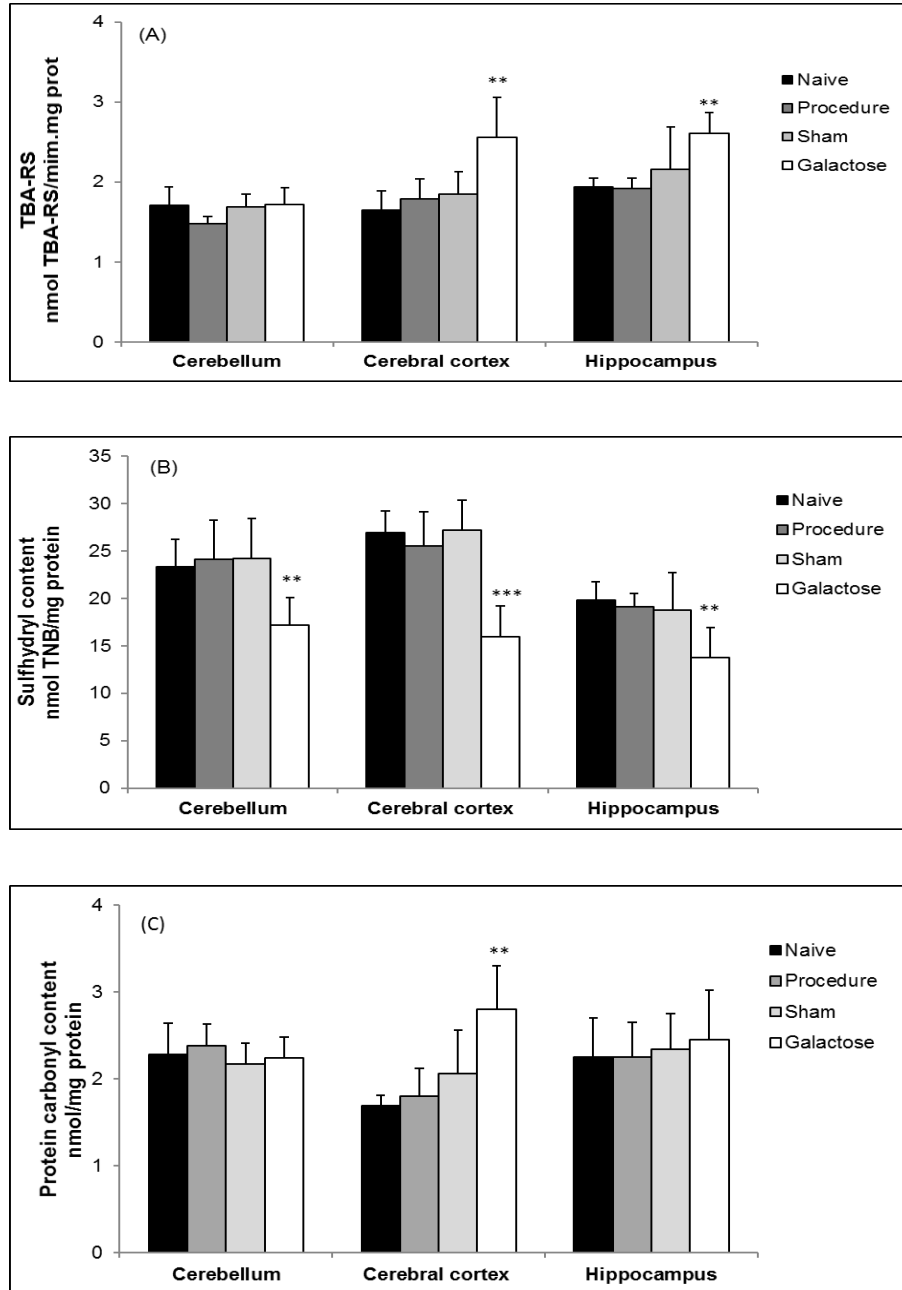


Fig. 1 Effects of the intracerebroventricular administration of galactose on thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) (A), total sulfhydryl content (B) and protein carbonyl content (C) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 6 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $P < 0.001$ and ** $p < 0.01$ compared to naive, procedure and sham groups (Duncan's multiple range test).

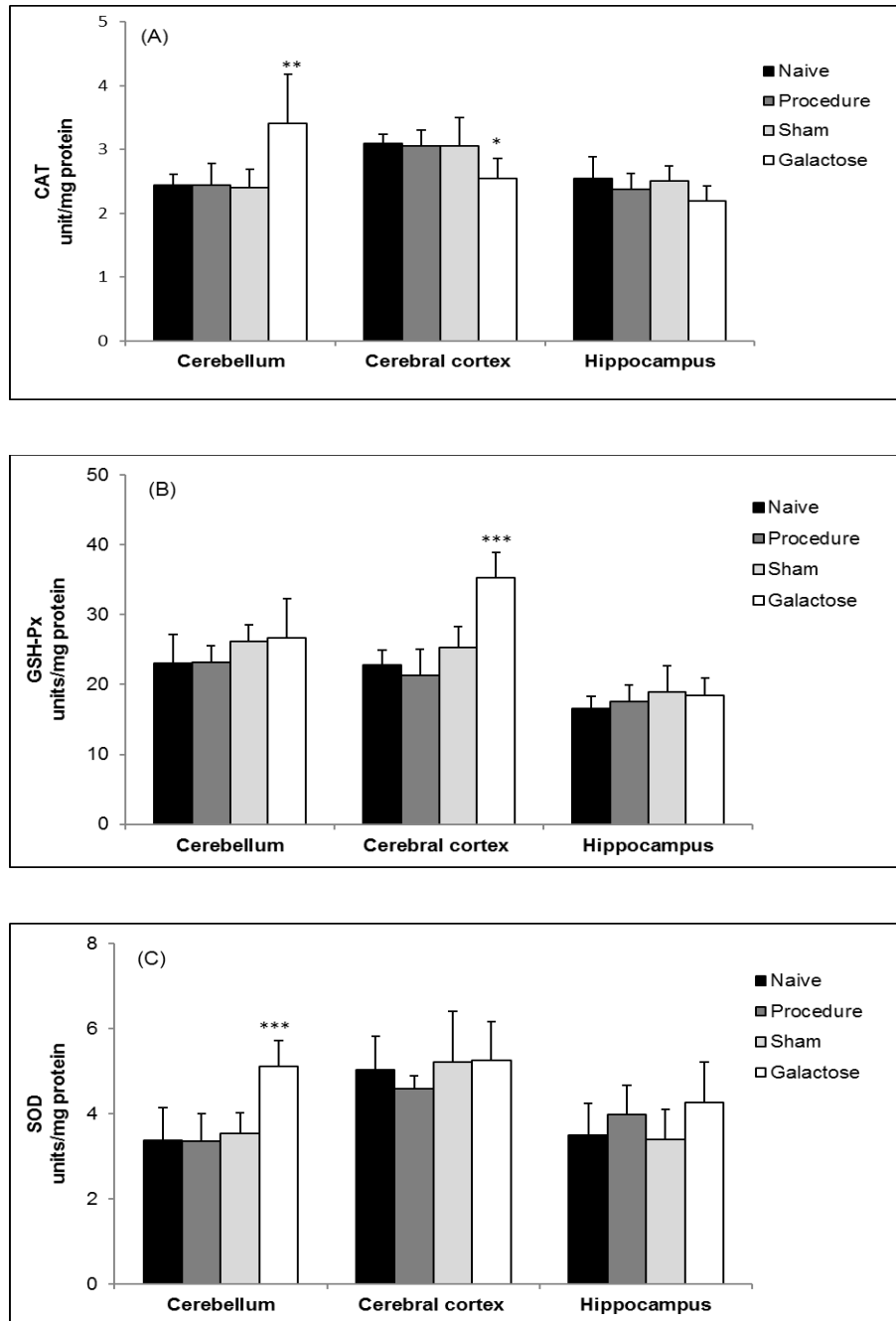
Fig. 2

Fig. 2 Effects of the intracerebroventricular administration of galactose on the activities of CAT (A), GSH-Px (B) and SOD (C) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 6 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $p < 0.05$, compared to naive, procedure and sham groups (Duncan's multiple range test).

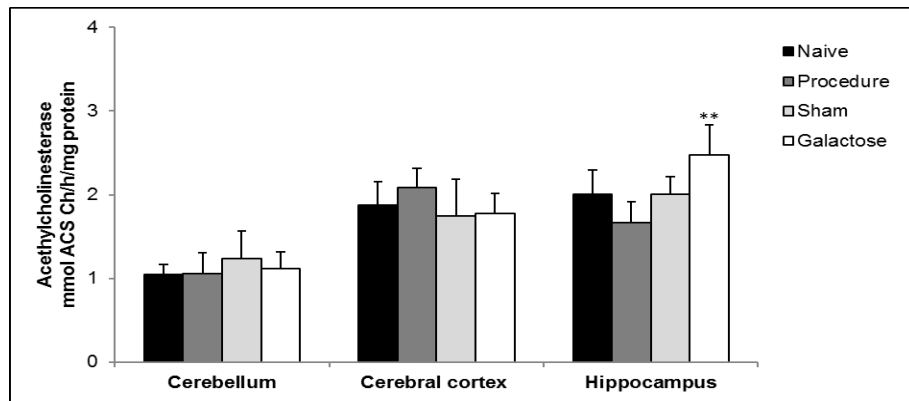
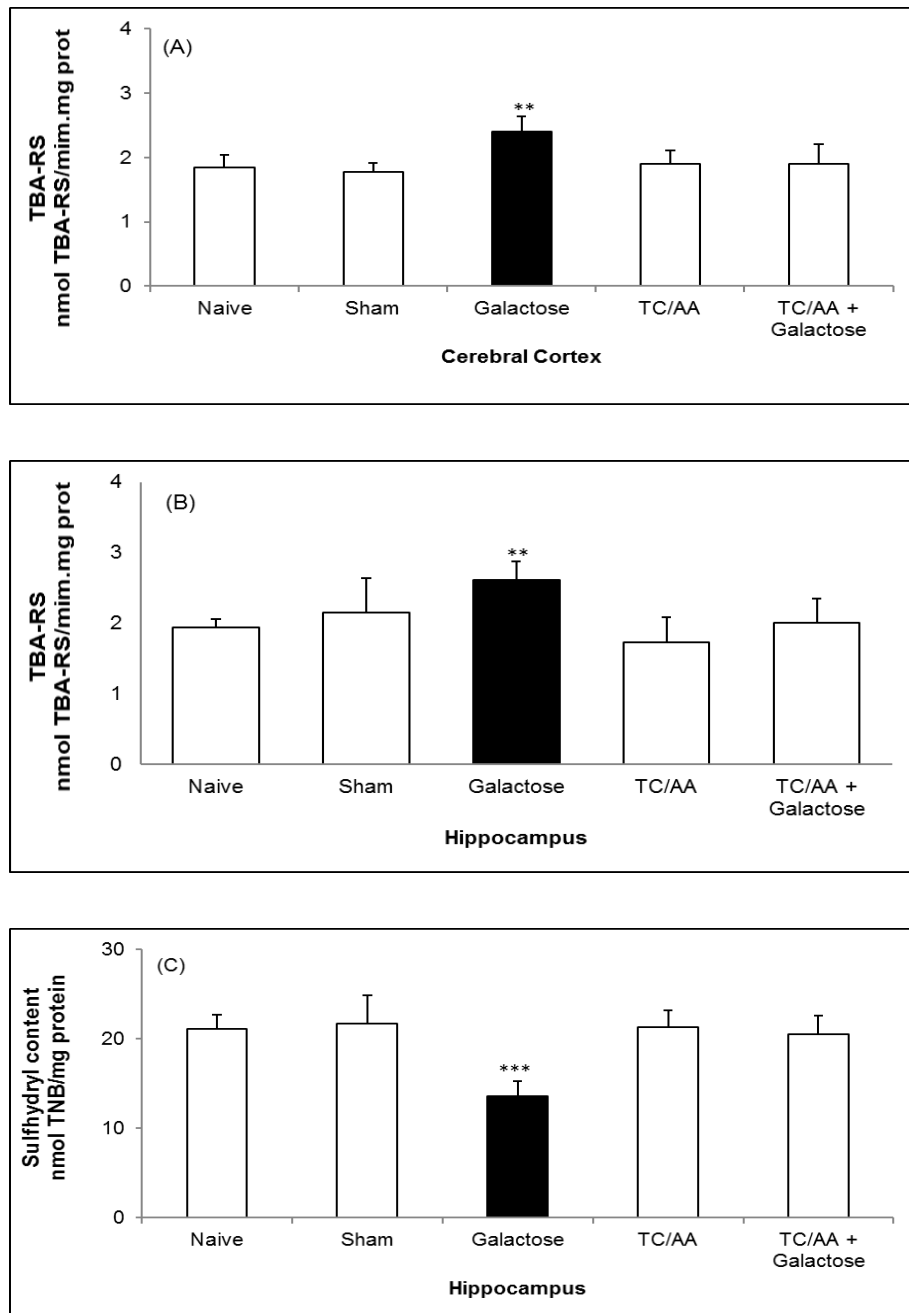
Fig. 3

Fig. 3 Effect of the intracerebroventricular administration of galactose on Acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 6 independent experiments (animals) performed in duplicate. ** $p < 0.01$, compared to naive, procedure and sham groups (Duncan's multiple range test).

Fig. 4

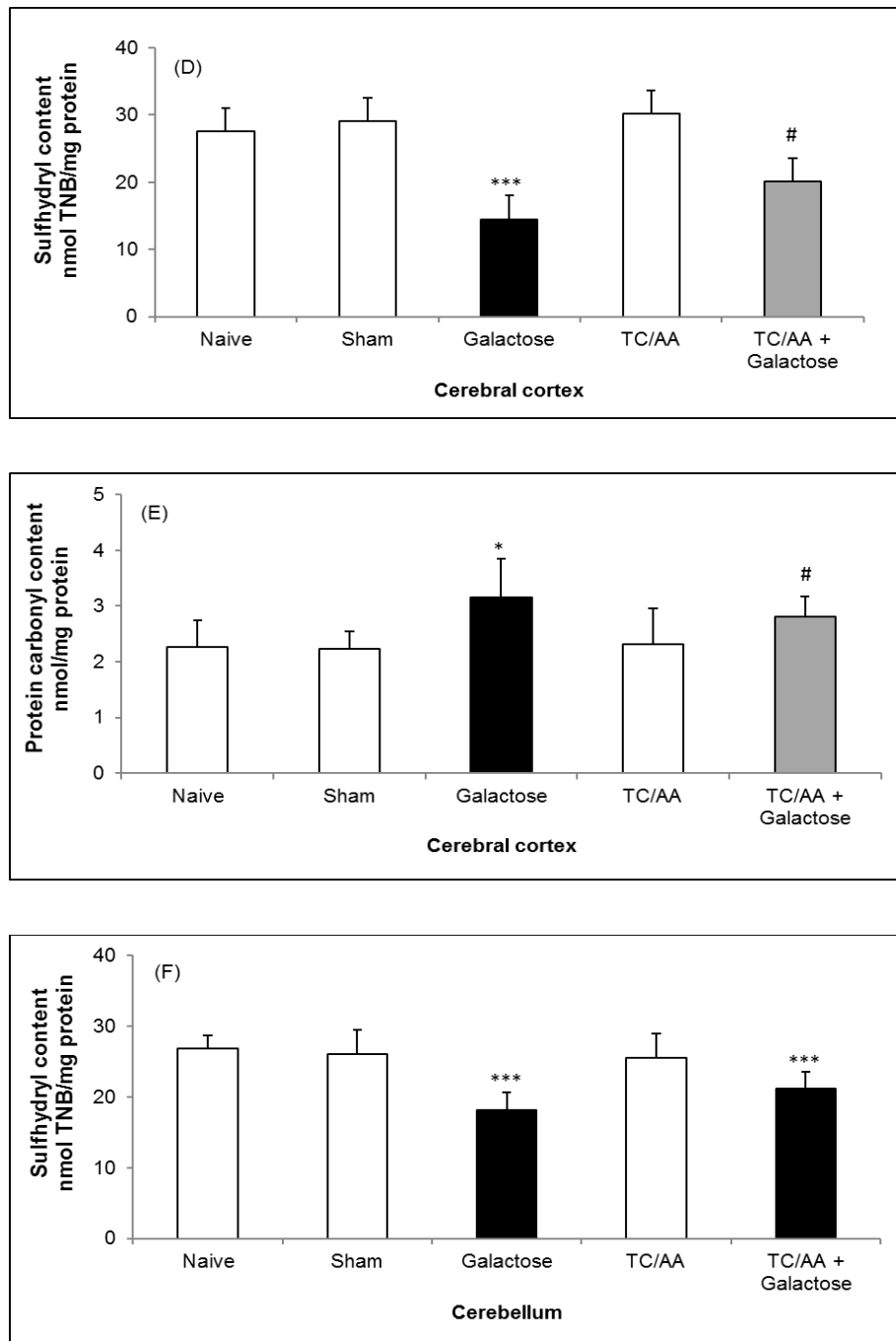
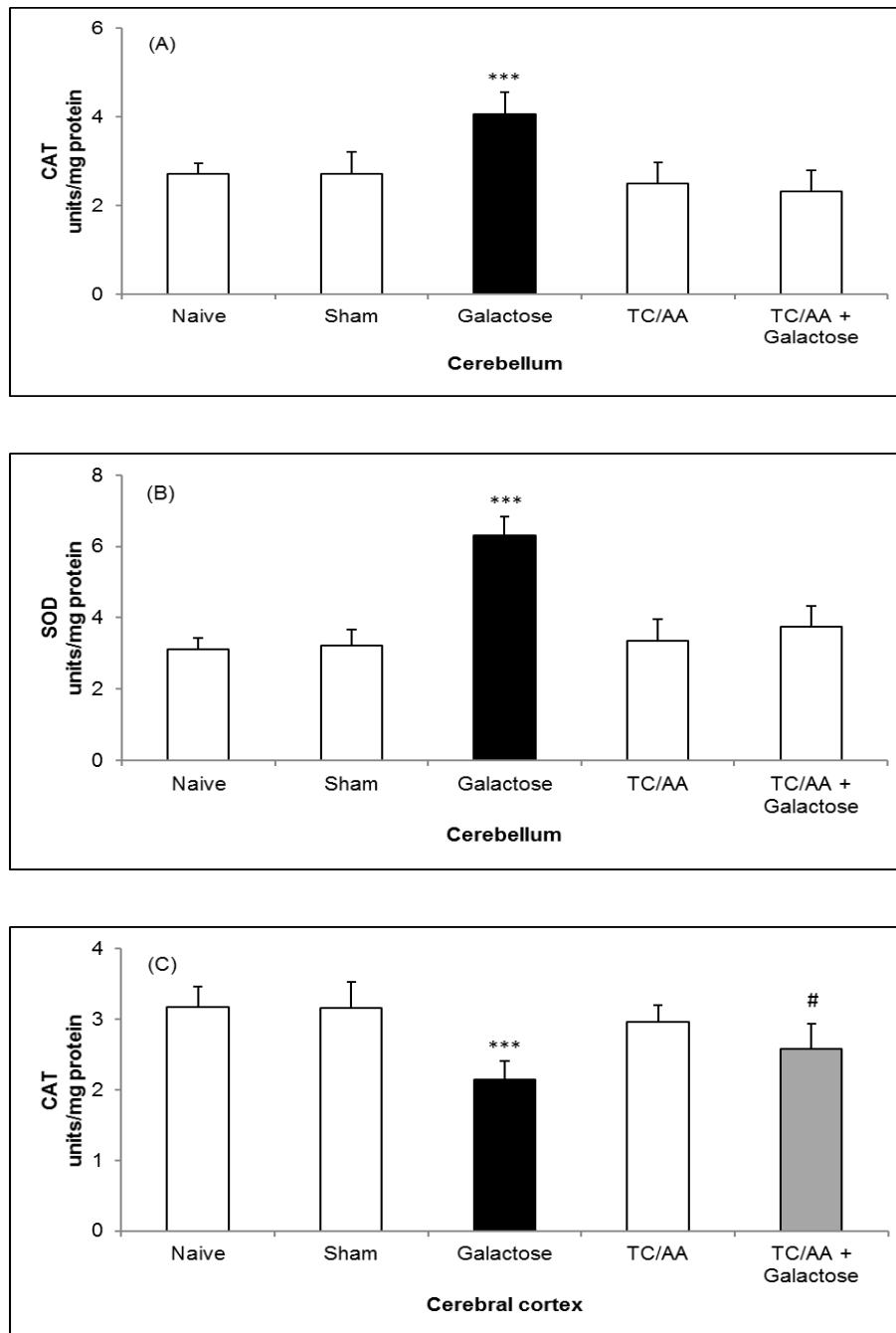


Fig. 4 Effects of α-tocopherol (TC) plus ascorbic acid (AA) on TBA-RS in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B); on total sulfhydryl content in the hippocampus (C) and cerebral cortex (D); on protein carbonyl content in the cerebral cortex (E); and on total sulfhydryl content in the cerebellum (F) of 60-day-old rats. Results are expressed as mean ± SD for 6 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, compared to naive and sham groups (Duncan's multiple range test).

Fig. 5

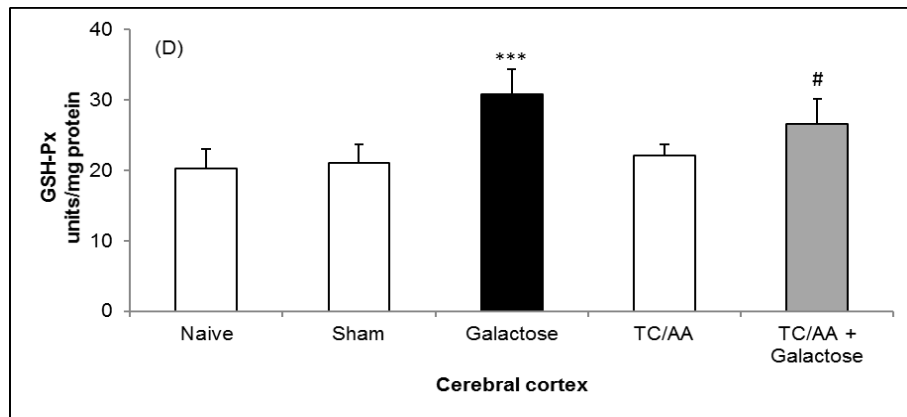


Fig. 5 Effects of α -tocopherol (TC) plus ascorbic acid (AA) on the activities of CAT (A) and SOD (B) in the cerebellum and of CAT (C) and GSH-Px (D) in the cerebral cortex of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 6 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$, compared to naive and sham groups (Duncan's multiple range test). #: Partially prevented.

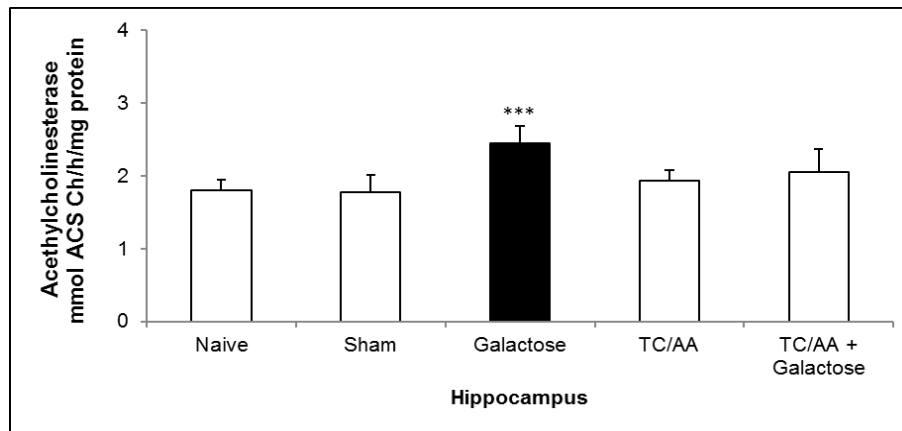
Fig. 6

Fig. 6 Effect of α -tocopherol (TC) plus ascorbic acid (AA) on the activity of Acetylcholinesterase (AChE) in the hippocampus of 60-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 6 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$, compared to naive and sham groups (Duncan's multiple range test). #: Partially prevented.

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2 - *IN VITRO* GALACTOSE IMPAIRS ENERGY METABOLISM IN THE BRAIN OF YOUNG RATS: PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANTS

**IN VITRO GALACTOSE IMPAIRS ENERGY METABOLISM IN THE BRAIN
OF YOUNG RATS: PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANTS**

Daniela Delwing-de Lima^{1,2*}, Simone Sasso², Débora Delwing-Dal Magro³,
Nariana Regina Pereira⁴, André Felipe Rodrigues⁵, Felipe Schmitz⁵, Eduardo Manoel
Pereira⁴, Angela Terezinha de Souza Wyse⁵

¹ Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE,

Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville,
SC, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da
Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte,
CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

³ Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais,
Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900,
Blumenau, SC, Brazil.

⁴ Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville–
UNIVILLE,

Rua Paulo Malschitzki, 10-Zona Industrial Norte, CEP89201-972, Joinville,
SC, Brazil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo,
Porto Alegre, RS, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brasil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br / danidelwing@hotmail.com

Abstract

We investigated the *in vitro* effects of galactose on the activity of pyruvate kinase, succinate dehydrogenase (SDH), complex II and IV (cytochrome *c* oxidase) of the respiratory chain, as well as the activity of Na⁺K⁺-ATPase in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30 day-old rats. We also tested the influence of the antioxidants, (each at 1.0 mM), trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose. Galactose was added to the assay at final concentrations of 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM. Control experiments were performed without galactose. Galactose (3.0, 5.0 and 10.0 mM) decreased pyruvate kinase activity in the cerebral cortex and at 10.0 mM in the hippocampus. Galactose (10.0 mM) reduced the activities of SDH and complex II in the cerebellum and in the hippocampus, and reduced cytochrome *c* oxidase in the hippocampus. Additionally, decreased Na⁺K⁺-ATPase in the cerebral cortex and hippocampus; conversely, galactose (3.0 and 5.0 mM) increased this enzyme's activity in the cerebellum. Data show that, at the highest pathologically-relevant concentration, galactose disrupts energy metabolism and that antioxidants co-incubation were able to prevent the majority of alterations in the parameters analyzed. Our findings suggest that the alterations in energy metabolism caused by galactose in the rat brain may be associated with the neurological symptomatology present in galactosemic patients; as such, treatment with antioxidants may be beneficial in this pathology.

KEYWORDS: Galactose; antioxidants; energy metabolism; Na⁺,K⁺-ATPase; brain.

1. INTRODUCTION

Classic galactosemia is a genetic dysfunction caused by the deficiency of an enzyme involved in the metabolism of galactose, galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GALT). As this enzyme converts UDP-glucose and galactose-1-phosphate to UDP galactose and glucose-1-phosphate, the consequence of the lack of this enzyme is tissue accumulation of galactose-1-phosphate, besides galactose and its metabolites (Mcorvie et al., 2013; Rubio-Agusti et al., 2013).

In the United States, and in some countries in Europe, newborns are generally screened for galactosemia, as children with this condition develop acute symptoms immediately during the first days of breast feeding, such as diarrhea, weight loss, lethargy, hypotonia and liver dysfunction. The disease can progress with the formation of cataracts and septicemia, caused by *Escherichia coli*, and untreated patients die during the neonatal period (Shriberg et al., 2012; Coelho et al., 2014). However, galactose restriction can prevent acute symptoms, but may not prevent continuing complications, such as ovarian failure and neurologic and cognitive disabilities, including reduced intelligence, memory difficulties, problems in general information processing and difficulties in speech and language production (Timmers et al., 2012).

It has been reported that energy metabolism impairment, leading to the increased production of free radicals and oxidative stress, are factors that contribute to the pathology of several diseases related to neurodegeneration, such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, as well as Inborn Errors of Metabolism (IEM). Part of these alterations are due to the low capacity of the post mitotic cells in the central nervous system (CNS) to control oxidative stress, and also, because these cells are more susceptible to damage to their DNA, proteins and lipids (Scannevin et al., 2012; Wajner et al., 2012; Ferreira et al., 2012). In this context, it has been shown that galactosemia leads to autoxidation and the consequent formation of hydrogen peroxide, superoxide, and other free radicals (Pollack et al., 2009).

The generation of aerobic cellular energy is reliant on the routes of tricarboxylic-acid (TCA) cycle and the electron transport chain. It has been demonstrated that the impairment of energy metabolism is associated with brain damage (Beal 1992; Bubber et al., 2009). Studies have shown that the CNS is highly vulnerable to oxidative damage and exceptionally sensitive to disorders of energy

metabolism (Nunomura et al., 2006; Erecinska and Silver, 1994). Furthermore, the accumulation amino acids, such as proline and arginine, in IEM can compromise brain energy metabolism (Ferreira et al., 2010; Delwing et al., 2003; Delwing et al., 2007).

In the present study, we investigated the *in vitro* effects of galactose on some parameters of energy metabolism. We determined the activity of pyruvate kinase, an important enzyme of the glycolytic via; the activity of succinate dehydrogenase (SDH), an enzyme involved in both the TCA and electron transport chain; and the activities of complex II and cytochrome c oxidase, which are key complexes of the respiratory chain; as well as the activity of Na⁺K⁺-ATPase, essential to the generation of the membrane potential. The activities of these enzymes were evaluated in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30 day-old rats. We also tested the influence of antioxidants, namely trolox, ascorbic acid and glutathione, on the effects elicited by galactose.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and reagents

Thirty-day-old male Wistar rats (120-150g), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature (22±1°C), with free access to water and commercial protein chow. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1985) were followed in all the experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Region Itajaí, Itajaí Brazil, under the protocol number CEUA 01/14-14/03/2014. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. 91 rats were used.

2.2 *In vitro* studies

For *in vitro* experiments, cerebral cortex, cerebellum and hippocampus supernatants were pre-incubated for 1 h at 37°C in the presence of galactose at final

concentrations of 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM. Control experiments were performed without galactose addition. After incubation (1h at 37°C), aliquots were taken to measure the activity of pyruvate kinase, complex II and succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome c oxidase and Na⁺K⁺-ATPase.

2.3 Trolox(α -tocopherol), ascorbic acid and glutathione administration

The assays were divided into eight groups: Group 1 (control saline), group 2 (galactose), group 3 (control - 1.0 mM trolox), group 4 (galactose + 1.0 mM trolox), group 5 (control - 1.0 mM ascorbic acid), group 6 (galactose + 1.0 mM ascorbic acid), group 7 (control – 1.0 mM glutathione), and group 8 (galactose+1.0 mM glutathione). The samples were incubated for 1 hour at 37°C. The concentrations of trolox, ascorbic acid and glutathione utilized in the present study were chosen according to previous studies (Wyse et al., 2006; Silva et al., 2004; Avrova et al., 1999).

2.4 Tissue preparation

After decapitation, the brain was removed, and the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus were dissected and kept on an ice-cooled glass plate. The cerebral structures were homogenized with appropriate buffer, according to the technique employed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses, followed by centrifugation at 800 x g for 10min at 4°C before discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for assaying parameters of energy metabolism.

2.5 Pyruvate kinase activity

Pyruvate kinase activity was assayed by the method described by (Leong et al., 1981). The incubation medium consisted of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10.0 mM MgCl₂, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7.0 unit of L-lactate dehydrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 μ L of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 mL. The reaction started after 30 min of pre-incubation by the addition of 1.0 mM phosphoenolpyruvate (PEP). Results were expressed as μ mol of pyruvate formed per min per mg of protein.

2.6 Respiratory chain enzyme activities

a) SDH and complex II activities: The activities of succinate: phenazine oxyreductase (soluble SDH) and complex II (succinate: DCIP oxyredutase) were measured in homogenates from brain structures by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm with 700 nm as the reference wavelength ($\epsilon=19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in the presence of phenazine methasulphate (PMS), according to the method described by (Fischer et al., 1985). The reaction mixture, consisting of 40.0 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16.0 mM succinate and 8 μM DCIP, was preincubated with 40-80 μg homogenate protein at 30°C for 20 min. After, for complex II activity, was added 4.0 mM sodium azide, 7 μM rotenone and the reaction was started by addition of 40 μM DCIP and monitored for 5 min. The activity of SDH was accessed in the same incubation medium by addition of 1.0 mM PMS and monitored for 5 min.

b. Cytochrome c oxidase activity: The activity of cytochrome c oxidase was measured according to the method described by (Rustin et al., 1994). Enzymatic activity was measured by following the decrease in absorbance due to oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm with 580 nm as the reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction buffer contained 10.0 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM *n*-dodecyl- β -D-maltoside, 2-4 μg homogenate protein and the reaction was initiated by the addition of 0.7 μg reduced cytochrome c. The activity of cytochrome c oxidase was measured at 25°C for 10 min.

2.7 Na⁺, K⁺-ATPase activity assay

The reaction mixture for the Na⁺,K⁺-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a final volume of 200 μL . The reaction started by ATP addition. Controls were treated under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by (Wyse et al., 1998). Inorganic phosphate (Pi) release was measured by the method described by (Chan et al., 1986). Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

2.8 Protein determination

Protein determination was measured by the method of (Lowry et al., 1951), using serum bovine albumin as standard.

2.9 Statistical analysis

For analyses, data were analyzed by ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when the F-test was significant. The analyses were performed using the IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0 in a PC compatible computer (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

3 RESULTS

3.1 In vitro effects of galactose on pyruvate kinase activity in the brain of rats

We initially verified the *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM) on the activity of pyruvate kinase in the brain (cerebellum, cerebral cortex and hippocampus) of rats. Fig. 2 shows that galactose, at concentrations of 3.0, 5.0 and 10.0 mM, significantly decreased pyruvate kinase activity in the cerebral cortex [$F(4,30) = 31.279$; $p < 0.001$] and significantly decreased the enzyme's activity, at a concentration of 10.0 mM, in the hippocampus of rats [$F(4,30) = 7.976$; $p < 0.001$]. However, pyruvate kinase activity in the cerebellum was not altered by galactose [$F(4,30) = 1.896$; $p > 0.05$].

3.2 In vitro effects of galactose on the activities of succinate dehydrogenase (SDH), complex II and cytochrome c oxidase in the brain of rats

The *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM) on the activities of succinate dehydrogenase (SDH), complex II and cytochrome c oxidase in the brain of rats were also verified. As shown in Fig. 3 (A), galactose (10.0 mM) reduced the activity of SDH in the cerebellum [$F(4,30) = 7.224$; $p < 0.001$] and in the hippocampus [$F(4,30) = 4.162$; $p < 0.01$], but did not alter this enzyme's activity in the cerebral cortex of rats [$F(4,30) = 0.877$; $p > 0.05$], as compared

to the control group. With regard to complex II activity (Fig. 3B), galactose (10.0 mM) reduced this enzyme's activity in the cerebellum [$F(4,30)=7.089$; $p<0.001$] and hippocampus [$F(4,30)=11.016$; $p<0.001$], however, this enzyme's activity was not altered by galactose in cerebral cortex of rats [$F(4,30)=0.389$; $p>0.05$]. The activity of cytochrome c oxidase (Fig. 3C) was reduced by galactose at a concentration of 10.0 mM only in the hippocampus [$F(4,30)=5.423$; $P<0.01$], while in the cerebellum [$F(4,30)=0.600$; $p>0.05$] and cerebral cortex [$F(4,30)=0.540$; $p>0.05$] of rats, galactose did not change its activity.

3.3 *In vitro* effects of galactose on the activity of Na^+K^+ -ATPase in the brain of rats

Subsequently, the *in vitro* effects of galactose on Na^+K^+ -ATPase activity were also analyzed. In the cerebellum, galactose at 3.0 and 5.0 mM increased Na^+K^+ -ATPase activity (Fig. 4) [$F(4,26)=12.195$; $p<0.001$]; in contrast, at a concentration of 10.0 mM, galactose decreased this enzyme's activity in the cerebral cortex [$F(4,28)=3.266$; $p<0.05$] and in the hippocampus [$F(4,24)=4.546$; $p<0.01$] of rats, as compared to the control group.

3.4 Influence of trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose in the brain of rats

Finally, this study evaluated whether the alterations in pyruvate kinase, SDH, complex II, cytochrome c oxidase and Na^+K^+ -ATPase in the brain of rats, caused by *in vitro* galactose incubation, were mediated by the generation of free radicals. Considering this hypothesis, we examined the possible action of the antioxidants trolox, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose on these parameters. As can be seen in Fig. 5 (A), trolox and ascorbic acid were able to prevent the decrease in the activity of pyruvate kinase in the cerebral cortex [$F(15,80)=13.073$; $p<0.001$], while glutathione only prevented the alteration in pyruvate kinase activity caused by 3.0 mM galactose. In the hippocampus, Fig. 5 (B), trolox, ascorbic acid and glutathione were all able to prevent the reduction in pyruvate kinase activity induced by galactose [$F(7,40)=8.067$; $p<0.001$]. With regard to the activity of SDH, Fig. 6 shows that ascorbic acid and glutathione, but not trolox,

prevented the decrease caused by galactose 10.0 mM in SDH activity in the cerebellum (A) [$F(7,40)=4.881$; $p<0.001$] and hippocampus (B) [$F(7,40)=5.480$; $p<0.001$] of rats. Furthermore, trolox and glutathione, but not ascorbic acid, were able to prevent the reduction in complex II activity caused by 10.0 mM galactose in the cerebellum (Fig. 6C) [$F(7,40)=7.936$; $p<0.001$]. Fig. 6 (D) shows that glutathione also prevented this alteration in the hippocampus [$F(7,40)=7.570$; $p<0.001$] and that trolox and ascorbic acid partially prevented the decrease in activity. With regard to cytochrome c oxidase activity, Fig. 6 (E) shows that trolox, ascorbic acid and glutathione were able to prevent the 10.0 mM galactose-induced reduction in this enzyme's activity, in the hippocampus [$F(7,40)=4.847$; $p<0.01$] of rats. With regard to Na^+K^+ -ATPase activity, Fig. 7 (A) shows that glutathione prevented the increase in Na^+K^+ -ATPase activity caused by galactose at concentrations of 3.0 and 5.0 mM in the cerebellum [$F(11,57)=42.103$; $p<0.001$]. In contrast, while trolox and ascorbic acid *per se* altered this parameter, trolox did not prevent this alteration and, when employed in association with galactose (5.0 mM), it potentiated the increase in enzyme activity. However, the association of galactose (3.0 and 5.0 mM) plus ascorbic acid decreased this enzyme's activity. Fig. 7 (B) shows that glutathione partially prevented the reduction caused by galactose (10.0 mM) in the activity of Na^+K^+ -ATPase in the cerebral cortex [$F(7,36)=46.992$; $p<0.001$]. Trolox and ascorbic acid *per se* altered this parameter; while ascorbic acid did not prevent the galactose-induced alteration in Na^+K^+ -ATPase activity, the association of galactose (10.0 mM) plus trolox increased the activity of this enzyme. As can be seen in Fig. 7 (C), glutathione partially prevented the reduction caused by galactose (10.0 mM) in the activity of Na^+K^+ -ATPase in the hippocampus [$F(7,40)=37.804$; $p<0.001$] and trolox prevented this alteration. In contrast, ascorbic acid *per se* altered this parameter and the association of galactose (10.0 mM) with ascorbic acid significantly reduced the enzyme's activity in this tissue.

4. DISCUSSION

The molecular mechanisms responsible for the neurological symptoms observed in classic galactosemia are poorly established. Therefore, we herein evaluated the *in vitro* effects of galactose, using different galactose concentrations

(0.1, 3.0, 5.0 and 10.0 mM) within the range found in galactosemia on the activities of different metabolic enzymes (Gitzelmann, 1995). The metabolic enzymes studied were; pyruvate kinase, an important regulatory enzyme of the glycolytic pathway; SDH, an enzyme involved in the TCA and electron transport chain; mitochondrial respiratory chain complexes, II and IV; and Na^+K^+ -ATPase, an enzyme that is essential to the generation of the membrane potential. The effects of galactose on the activities of these enzymes were determined in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30 day-old rats. We also tested the influence of the antioxidants, trolox, ascorbic acid and glutathione, on the effects elicited by galactose.

Results showed that galactose, at concentrations of 3.0, 5.0 and 10.0 mM, significantly decreased pyruvate kinase in the cerebral cortex and at concentration of 10.0 mM in the hippocampus. However, it did not alter this enzyme's activity in the cerebellum of rats. Pyruvate kinase is a thiol-enzyme that is essential for glucose metabolism and energy production in the brain. It is possible that the attenuation of this enzyme's activity contributes to the brain damage. Our results corroborate with those of other studies showing that this enzyme is inhibited by amino acids known to accumulate in some genetic diseases that affect brain function (Feksa et al., 2003; Delwing et al., 2009).

The tricarboxylic-acid cycle (TCA) and the electron transport chain are crucial routes for the aerobic generation of cellular energy. Impairment of energy metabolism has been associated with brain damage, and may occur as a result of reduced ATP production and also due to the formation of reactive oxygen species (ROS) (Beal, 2002; Bubber et al., 2009). Tissues with high-energy demands, such as the brain, are known to contain a large number of mitochondria, and are therefore more susceptible to decreases in aerobic energy metabolism (Beal, 2002). Corroborating this idea, studies have shown that the CNS is highly vulnerable to oxidative damage and particularly sensitive to disturbances of energy generation (Nunomura et al., 2006; Erecinska, 1994). This study revealed that galactose at a concentration of 10.0 mM reduced the activity of SDH in the cerebellum and in the hippocampus, but did not alter this enzyme's activity in the cerebral cortex of rats.

With regard to complex II activity, galactose (10.0 mM) reduced this enzyme's activity in the cerebellum and hippocampus, but did not alter complex II activity in the cerebral cortex of rats. Galactose, at a concentration of 10.0 mM, reduced

cytochrome c oxidase activity in the hippocampus, but did not alter the activity of this enzyme in the cerebellum and cerebral cortex of rats. These findings demonstrate that the mitochondrial respiratory chain is altered in brain of rats. Reductions in electron transport chain flow result in lower ATP production to sustain the energy needs of cells. A possible mechanism for this effect could be a direct interaction between galactose and the enzymes, leading to their impaired activities. On the other hand, another mechanism by which galactose exerts effects on the enzymes studied could be oxidative stress, since galactose alters enzymatic antioxidant defenses, causes lipid oxidation and damages protein, probably by enhancing reactive species in the brain of rats (Delwing de Lima et al., 2016). According to (Armstrong, 2007), mitochondrial dysfunction, induced by oxidative stress, could disturb electron transfer and amplify ROS generation, exacerbating oxidative stress in the cell. Our results showed that *in vitro* galactose disrupts energy metabolism, possibly restricting the activities of key enzymes related to ATP production. Our results corroborate with those of a study performed by (Ferreira et al., 2010) in which proline, an amino acid accumulated in hyperprolinemia, also decreased the activity of cytochrome c oxidase, and those of a study conducted by (Delwing et al., 2006) in which arginine, an amino acid accumulated in hyperargininemia, decreased the activity of SDH and complex II of the respiratory chain.

Na^+K^+ -ATPase is a membrane-bound enzyme that plays a role in the control of neuronal excitability by maintaining the electrochemical gradient (Wyse et al., 2000). This enzyme is present at high concentrations in the brain cellular membrane, consuming about 40–50% of the ATP generated in this tissue, and is highly responsive to changes in membrane fluidity (Erecinska and Silver, 1994). Inhibition of its activity has been found in various neuropathological conditions, including cerebral ischemia, neurodegenerative disorders and IEM (Ferreira et al., 2010; Delwing et al., 2007; Yu, 2003; Wyse, 2001; Delwing et al., 2001). Our data indicate that, in the cerebral cortex and in the hippocampus, galactose at a concentration of 10.0 mM decreases Na^+K^+ -ATPase activity; in contrast, at concentrations of 3.0 and 5.0 mM it increases this enzyme's activity in the cerebellum.

It is well established that some compounds that accumulate in inherited metabolic disorders are inhibitors of enzymes of mitochondrial energy metabolism, while others elicit free radical production (Delwing et al., 2007; Streck et al., 2003;

Delwing et al., 2003). As Na^+K^+ -ATPase consumes approximately 40-50% of the ATP generated in the CNS, a reduction in ATP production can indirectly inactivate its activity. On the other hand, since this enzyme's activity is highly susceptible to free radical attacks, it is possible that the alteration observed in the activity of Na^+ , K^+ -ATPase occurred via free radicals, leading to conformational changes in the catalytic subunits of this enzyme (Lees, 1993; Schmitz et al., 2016).

Finally, this study evaluated whether the alterations in pyruvate kinase, SDH, complex II, cytochrome *c* oxidase and Na^+K^+ -ATPase, caused by *in vitro* galactose, in the brain could be mediated by the generation of free radicals. Considering this hypothesis, we examined the possible action of the antioxidants, trolox, ascorbic acid and glutathione, on the effects elicited by galactose on these parameters. Vitamins E and C are important exogenous antioxidants that are responsible for scavenging free radicals and suppressing lipid peroxidation in the hydrophobic and hydrophilic regions of the cell (Young and Woodside, 2001). Glutathione (GSH) is an antioxidant and detoxifier of excessive free radicals and ROS, and is readily oxidized to glutathione disulphide (GSSG), via a major physiological redox reaction (Al-Aubaidy and Jeline, 2011; Wu et al., 2004).

Trolox and ascorbic acid were able to prevent the decrease in the activity of pyruvate kinase in the cerebral cortex, but glutathione only prevented the alteration caused by 3.0 mM galactose. In the hippocampus, all antioxidants used were able to prevent the galactose-induced reduction in the activity of pyruvate kinase. With regard to the activity of SDH, ascorbic acid and glutathione, but not trolox, prevented the decrease in SDH activity caused by galactose 10.0 mM in the cerebellum and hippocampus of rats. Furthermore, trolox and glutathione, but not ascorbic acid, were able to prevent the reduction in complex II activity caused by 10.0 mM galactose in the cerebellum. Results showed that glutathione also prevented this alteration in the hippocampus and that trolox and ascorbic acid partially prevented this effect. With regard to cytochrome *c* oxidase activity, trolox, ascorbic acid and glutathione were able to prevent the reduction in the activity of this enzyme, caused by galactose 10.0 mM, in the hippocampus of rats. These data strongly indicate that galactose inhibits the activity of enzymes that are important for the regulation of energy metabolism via the formation of free radicals that can be removed by trolox, ascorbic acid and glutathione. The present results corroborate *in vivo* findings, showing that

intracerebroventricular or peripheral injection of galactose leads to protein, lipid and DNA damage in different brain structures (Castro et al., 2016; Rodrigues et al., 2016). In addition, studies carried out in our laboratory showed that at the pathologically high concentrations (greater than 5.0 mM), *in vitro* galactose induces oxidative stress in the cerebrum of rats (Delwing-de Lima et al., 2016). Taken together, there is strong evidence that peroxidation of membrane lipids and oxidation of sulfhydryl groups were possible causes of the inhibitions observed. Comparing these results with findings for other IEM, the studies conducted by (Delwing et al., 2006) and (Ferreira et al., 2010) demonstrated that ascorbic acid and α -tocopherol could also prevent decreases in the activities of enzymes crucial to the respiratory chain.

With regard to Na^+K^+ -ATPase activity, glutathione prevented the increase caused by 3.0 and 5.0 mM galactose in the cerebellum. In contrast, while trolox and ascorbic acid *per se* altered this parameter, trolox did not prevent this alteration; however, the association of galactose (5.0 mM) plus trolox increased this enzyme's activity more intensely, and the association of galactose (3.0 and 5.0 mM) plus ascorbic acid decreased Na^+K^+ -ATPase activity. The association of galactose with trolox or ascorbic acid has an additive effect, suggesting that different mechanisms are involved or might be an artefact of *in vitro* experimental conditions. Results also showed that glutathione partially prevented the reduction caused by galactose (10.0 mM) in the activity of Na^+K^+ -ATPase in the cerebral cortex. While trolox and ascorbic acid *per se* altered this parameter, ascorbic acid also did not prevent the alteration and the association of galactose (10.0 mM) plus trolox increased the activity of the enzyme. Furthermore, glutathione partially prevented the reduction caused by galactose (10.0 mM) in the activity of Na^+K^+ -ATPase in the hippocampus and trolox prevented the alteration. In contrast, ascorbic acid altered this parameter and the association of galactose (10.0 mM) with ascorbic acid further reduced Na^+K^+ -ATPase activity in this tissue. Previous studies have shown that α -tocopherol reduced glutamate uptake in the cerebral cortex slices of rats and did not prevent the reduction in glutamate uptake caused by proline (Delwing et al., 2007). Studies conducted by (Ng et al., 1985) also showed that ascorbic acid is an endogenous inhibitor of isolated Na^+K^+ -ATPase, indicating that the effect of ascorbic acid *per se* on the inhibition of Na^+K^+ -ATPase might be an artefact of the *in vitro* experimental

condition. Importantly, the results obtained in this study corroborate those of a study by (Tsakiris et al., 2004) who showed that glutathione antioxidant reverts the galactose (and its derivatives)-induced decrease in Na^+K^+ -ATPase activity in rat brain homogenates *in vitro*. However, while this previous study investigated the *in vitro* effects of galactose in the whole brain homogenate, our study determined the effects of galactose incubation on isolated brain areas.

In conclusion, we demonstrate that galactose disrupts energy metabolism and alters Na^+K^+ -ATPase activity in the rat brain. We propose that alterations in energy metabolism, caused by galactose, are mediated by reactive oxygen species and that the subsequent reduction in ATP production and/or generation of free radicals may be responsible for the alterations caused in the activity of Na^+K^+ -ATPase. Although it is difficult to extrapolate our *in vitro* findings to the *in vivo* condition, if this is the case, it is conceivable that the impairment of energy caused by galactose may be associated with the neurological symptomatology present in galactosemic patients. The present data suggest the use of antioxidants as an adjuvant therapy, for use together with conventional galactose restriction, as a strategy to improve brain energy metabolism, and slow down the development of neurological symptoms in classic galactosemia.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Universidade da Região de Joinville.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

REFERENCES

- Al-Aubaidy, H.A., Jelinek, H.F., 2011. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 164, 899-904.
- Armstrong, J.S., 2007. Mitochondrial medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease. *Br. J. Pharmacol.* 151, 1154-1165.
- Avrova, N.F., Shestak, K.I., Zakharova, I.O., Sokolova, T.V., Leont'ev, V.G., 1999. The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺, K⁺- ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. *Neurochem. Res.* 24, 1101-1106.
- Beal, M. F., 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? *Ann. Neurol.* 31, 119-130.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P., Gibson, G.E., 2009. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann. Neurol.* 57, 695–703.
- Castro, M.B., Ferreira, B.K., Cararo, J.H., Chipindo, A.E., Magenis, M.L., Michels, M., Danielski, L.G., de Oliveira, M.R., Ferreira, G.C., Streck, E.L., Petronilho, F., Schuck, P.F., 2016. Evidence of oxidative stress in brain and liver of young rats submitted to experimental galactosemia. *Metab Brain Dis.* 31, 1381-1390.
- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
- Coelho, A.I., Trabuco, M., Ramos, R., Silva, M.J., Tavares, A.I., Leandro, P., Rivera, I., Vicente, J.B., 2014. Functional and structural impact of the most prevalent missense mutations in classic galactosemia. *Mol. Genet. Genom. Med.* 2, 484-496.
- Delwing, D., Bavaresco, C.S., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, D.S., Wyse, A.T.S., 2003. Proline induces oxidative stress in cerebral cortex of rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 105-110.
- Delwing, D., Delwing, D., Bavaresco, C.R., Wyse, A.T.S., 2001. Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration. *Brain Res.* 1193, 120-127.

- Delwing, D., Delwing, D., Chiarani, F., Kurek, A.G., Wyse, A.T.S., 2007. Proline reduces brain cytochrome c oxidase: prevention by antioxidants. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 17-22.
- Delwing, D., Delwing, D., Sanna, R.J., Wofchuk, S., Wyse, A.T.S., 2007. Proline promotes decrease in glutamate uptake in slices of cerebral cortex and hippocampus of rats. *Life Sci.* 81, 1645-1650.
- Delwing, D., Delwing-de Lima, D., Sclaro, B., Kuss, G.G., Cruz, J.G.P., Wyse, A.T.S., 2009. Protective effect of antioxidants on cerebrum oxidative damage caused by arginine on pyruvate kinase activity. *Metab. Brain Dis.* 24, 469-479.
- Delwing, D., Tagliari, B., Chiarani, F., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2006. α -tocopherol and ascorbic acid administration prevents the impairment of brain energy metabolism of hyperargininemic rats. *Cell Mol. Neurobiol.* 26, 177-189.
- Delwing, D., Tagliari, B., Streck, E.L., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2003. Reduction of energy metabolism in rat hippocampus by arginine administration. *Brain Res.* 983, 58-63.
- Delwing-de Lima, D., Fröhlich, M., Dalmedico, L., Aurélio, J.G.M., Delwing-Dal Magro, D., Pereira, E.M., Wyse, A.T.S., 2016. Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: Protective role of antioxidants. *Metab. Brain Dis.* 32, 359-368.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 43, 37-71.
- Feksa, L.R., Cornelio, A.R., Vargas, C.R., Wyse, A.T.S., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 2003. Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral cortex of rats. *Metab. Brain Dis.* 18, 129-137.
- Ferreira, A.G.K., Lima, D.D., Delwing, D., Mackedanz, V., Tagliari, B., Kolling, J., Schuck, P.F., Wajner, M., Wyse A.T.S., 2010. Proline impairs energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Metab. Brain Dis.* 25, 161-168.
- Ferreira, A.G.K., Lima, D.D., Delwing, D., Mackedanz, V., Tagliari, B., Kolling, J., Schuck, P.F., Wajner, M., Wyse, A.T.S., 2010. Proline impairs energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Metab. Brain Dis.* 25, 161-168.

- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, M.S., Sengers, R.C, Janssen, A.J., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta.* 153, 23-36.
- Gitzelmann, R., 1995. Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. *Eur. J. Pediatrics.* 154, 45-49.
- Lees, G.J., 1993. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience.* 54, 287-322.
- Leong, S.F., Lai, J.C.K., Lim, L., Clark, J.B., 1981. Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J. Neurochem.* 37, 1548-1556.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75.
- Mcorvie, T.J., Gleason, T.J., Fridovich-Keil, J.L., Timson, D.J., 2013. Misfolding of galactose 1-phosphate uridylyltransferase can result in type I galactosemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 17, 1279-1293.
- Ng, Y.C., Akera, T., Han, C.S., Braselton, W.E., Kennedy, R.H., Temma, K., Brody, T.M., Sato, P.H., 1985. *Biochem Pharmacol.* 34, 2525-30.
- Nunomura, A., Castellani, R.J., Zhu, X., Moreira, P.I., Perry, G., Smith, M.A., 2006. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 631-41.
- Pollack, A., Oren, P., Stark, A.H., Eisner, Z., Nyska, A., Madar, Z., 1999. Cataract development in sand and galactosemic rats fed a natural tomato extract. *J. Agric. Food. Chem.* 47, 5122-5126.
- Rodrigues, A.F., Biasibetti, H., Zanotto, B.S., Sanches, E.F., Schmitz, F., Nunes, V.T., Pierozan, P., Manfredini, V., Magro, D.D., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2016. D-Galactose Causes Motor Coordination Impairment, and Histological and Biochemical Changes in the Cerebellum of Rats. *Mol Neurobiol.* 20, 1-11.
- Rubio-Agusti, I., Carecchio, M., Bhatia, K.P., Kojovic, M., Parees, I., Chandrashekar, H.S., Footitt, E.J., Burke, D., Edwards, M.J., Lachmann, R.H., Murphy E., 2013. Movement disorders in adult patients with classical galactosemia. *Mov. Disord.* 28, 804-810.

- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain efficiencies. Clin. Chim. Acta. 228, 35-51.
- Scannevin, R.H., Chollate, S., Jung, M.Y., Shackett, M., Patel, H., Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Yamamoto, M., Lukashev, M., Rhodes, K.J., 2012. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. J. Pharmacol. Exp. Ther. 341, 274-284.
- Schmitz, F., Pierozan, P., Rodrigues, A.F., Biasibetti, H., Coelho, D.M., Mussulini, B.H., Pereira, M.S., Parisi, M.M., Barbé-Tuana, F., de Oliveira, D.L., Vargas, C.R., Wyse, A.T., 2016. Chronic Treatment with a Clinically Relevant Dose of Methylphenidate Increases Glutamate Levels in Cerebrospinal Fluid and Impairs Glutamatergic Homeostasis in Prefrontal Cortex of Juvenile Rats. Mol Neurobiol. 53, 2384-2396.
- Shriberg, L. D., Potter, N.L., Strand, E.A., 2012. Prevalence and phenotype of childhood apraxia of speech in youth with galactosemia. J. Speech Lang Hear Res. 54, 487-519.
- Silva, C.G., Bueno, A.R.F., Schuck, P.F., Leipnitz, G., Ribeiro, C.A., Rosa, R.B., Dutra Filho, C.S., Wyse, A.T.S., Wannmacher, C.M., Wajner, M., 2004. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid *in vitro*. Neurochem. Int. 44, 45-52.
- Streck, E.L., Matté, C., Vieira, P.S., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T., 2003. Impairment of energy metabolism in hippocampus of rats subjected to chemically-induced hyperhomocysteinemia. Biochim. Biophys. Acta. 1637, 187-192.
- Timmers, I., Jansma, B.M., Rubio, G.M.E., 2012. From mind to mouth: event related potentials of sentence production in classic galactosemia. PLoS One. 7, 528-526.
- Tsakiris, S., Schulpis, K.H., Marinou, K., Behrakis, P., 2004. Protective effect of L-cysteine and glutathione on the modulated suckling rat brain Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities induced by the *in vitro* galactosaemia. Pharmacol Res. 49, 475-479.
- Vizzotto, E. 2017. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-

Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 10p.

- Wajner, M., Latini, A., Wyse, A.T.S., Dutra-Filho, C.S., 2004. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27, 427-448.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134, 489-492.
- Wyse, A.T., Zugno, A.I., Streck, E.I., Matté, C., Calcagnotto, T., Wannmacher, C.M., Wajner, M., 2002. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. *Neurochem. Res.* 27, 1685-9.
- Wyse, A.T.S., Bavaresco, C.S., Bandinelli, C., Streck, E.L., Franzon, R., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2001. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME prevents the decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity in midbrain of rats subjected to arginine administration. *Neurochem. Res.* 26, 515-520.
- Wyse, A.T.S., Brusque, A.M., Silva, C.G., Streck, E.L., Wajner, M., & Wannmacher, C.M.D., 1998. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport.* 9, 1719-1721.
- Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C.A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25, 969-973.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 54, 176-186.
- Yu, S.P., 2003. Na⁺,K⁺-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1601-1609.

Legends and Figures

Fig. 1.

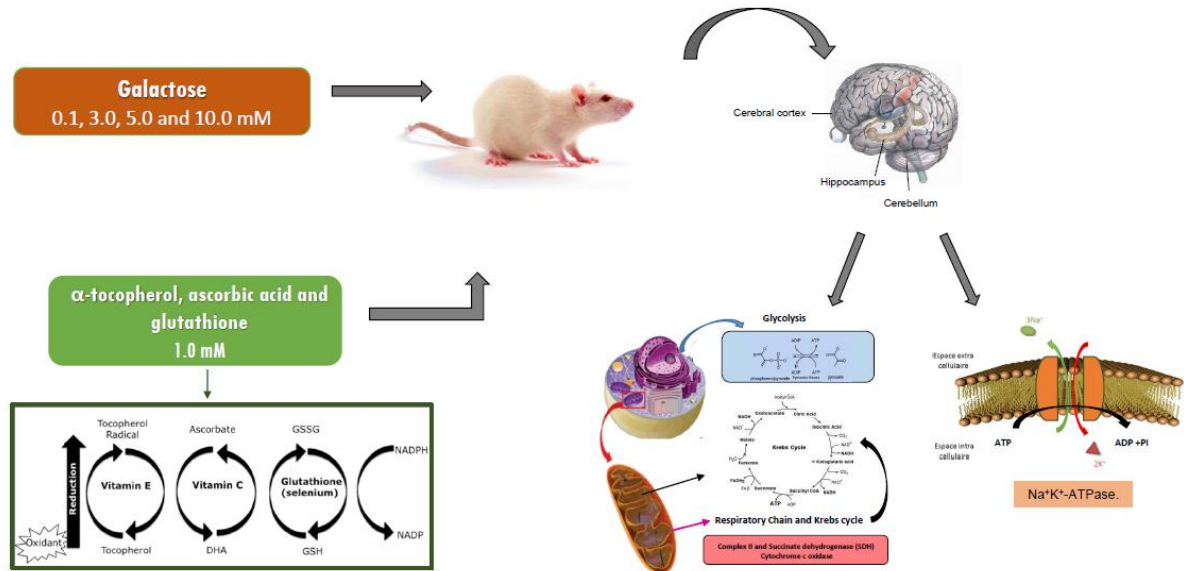


Fig. 1: Schematic representation of experiments: *In vitro* effect of galactose (0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM) and *in vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione (1.0mM) on energy metabolism and Na⁺K⁺-ATPase activity in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of rats.

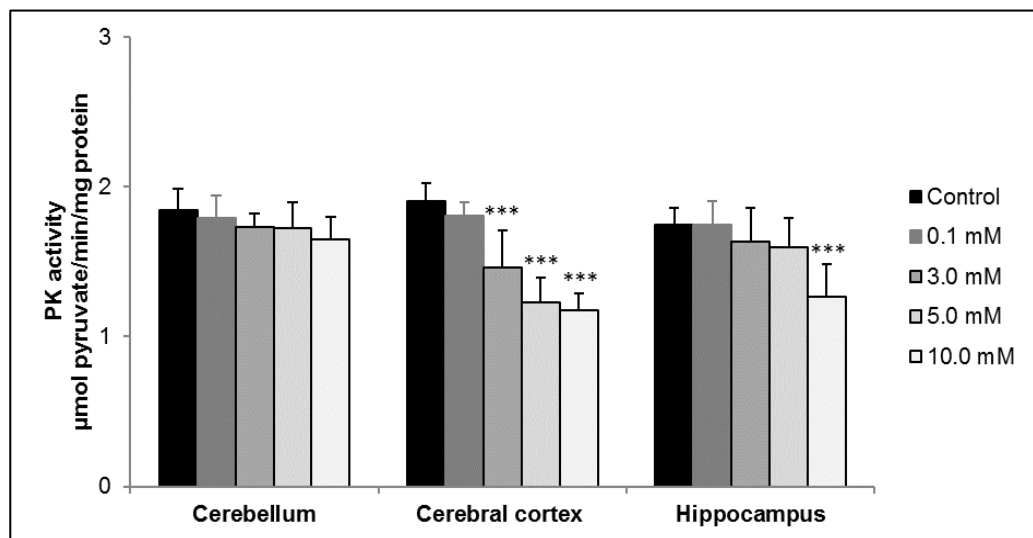
Fig. 2.

Fig. 2. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on pyruvate kinase in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of 30-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. ***p<0.001, compared to control group (Duncan's multiple range test).

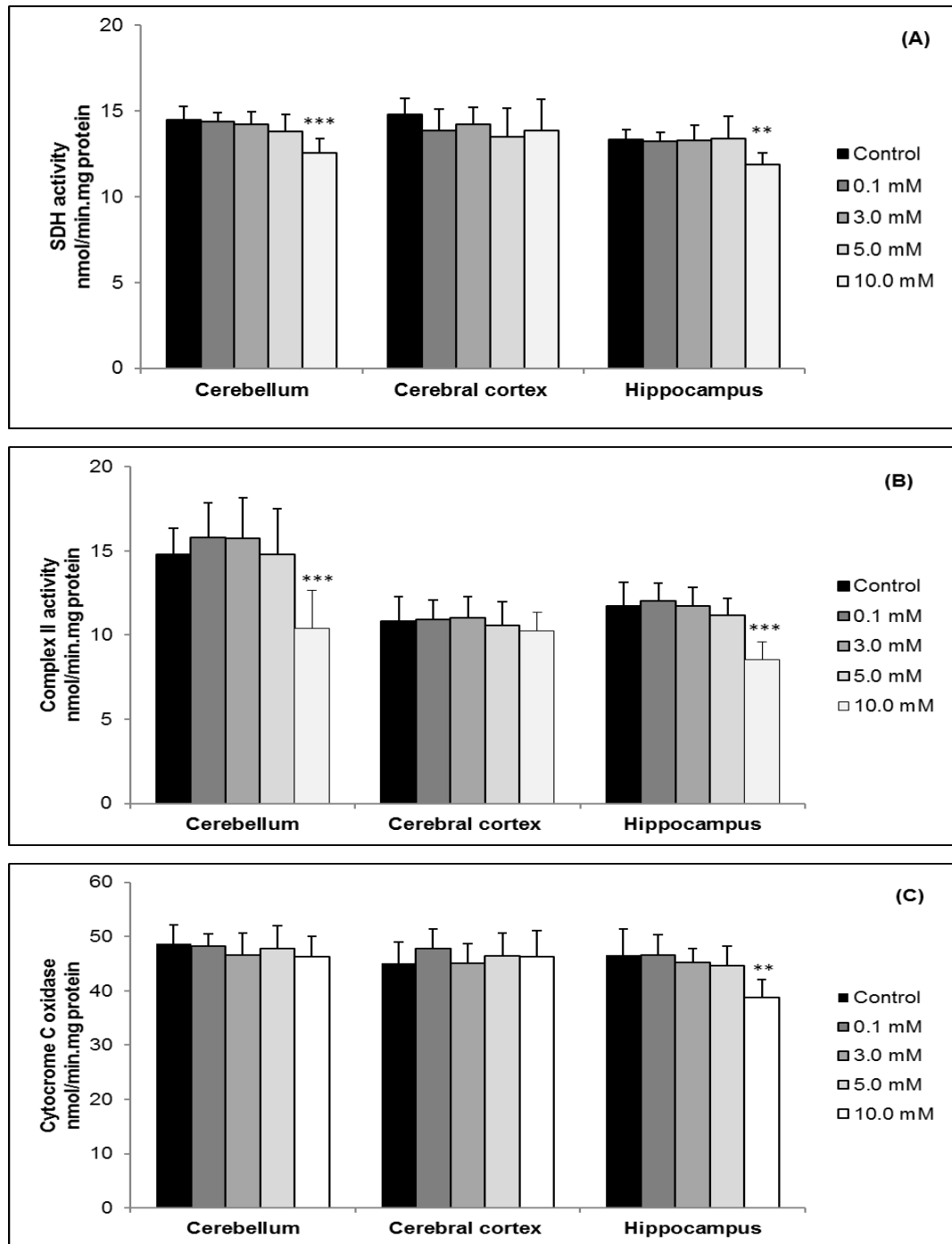
Fig. 3.

Fig. 3. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on the activity of succinate dehydrogenase (SDH) (A), complex II (B) and cytochrome c oxidase (C) in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of 30-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$, compared to control group (Duncan's multiple range test).

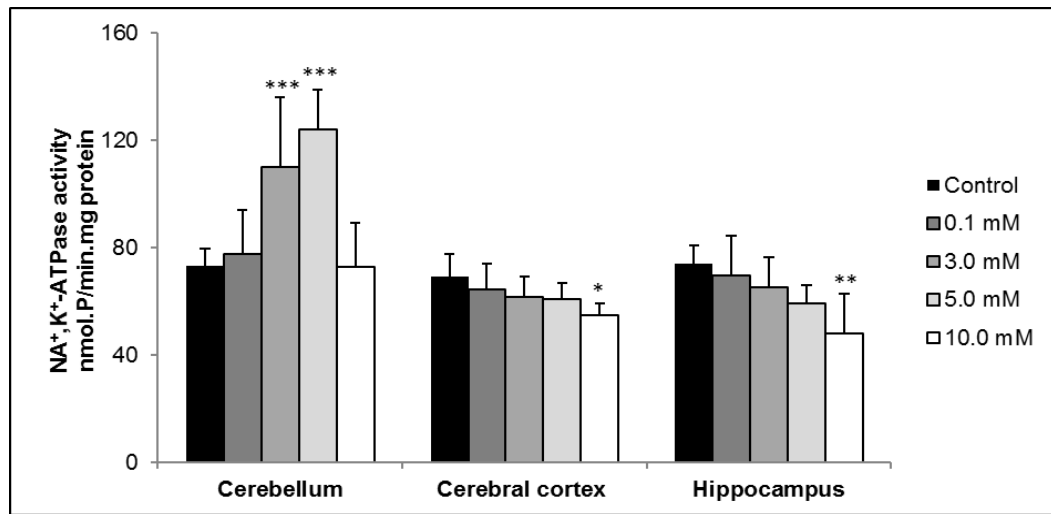
Fig. 4.

Fig. 4. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on Na⁺K⁺-ATPase activity in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of 30-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. ***p<0.001, **p<0.01 and *p<0.05 compared to control group (Duncan's multiple range test).

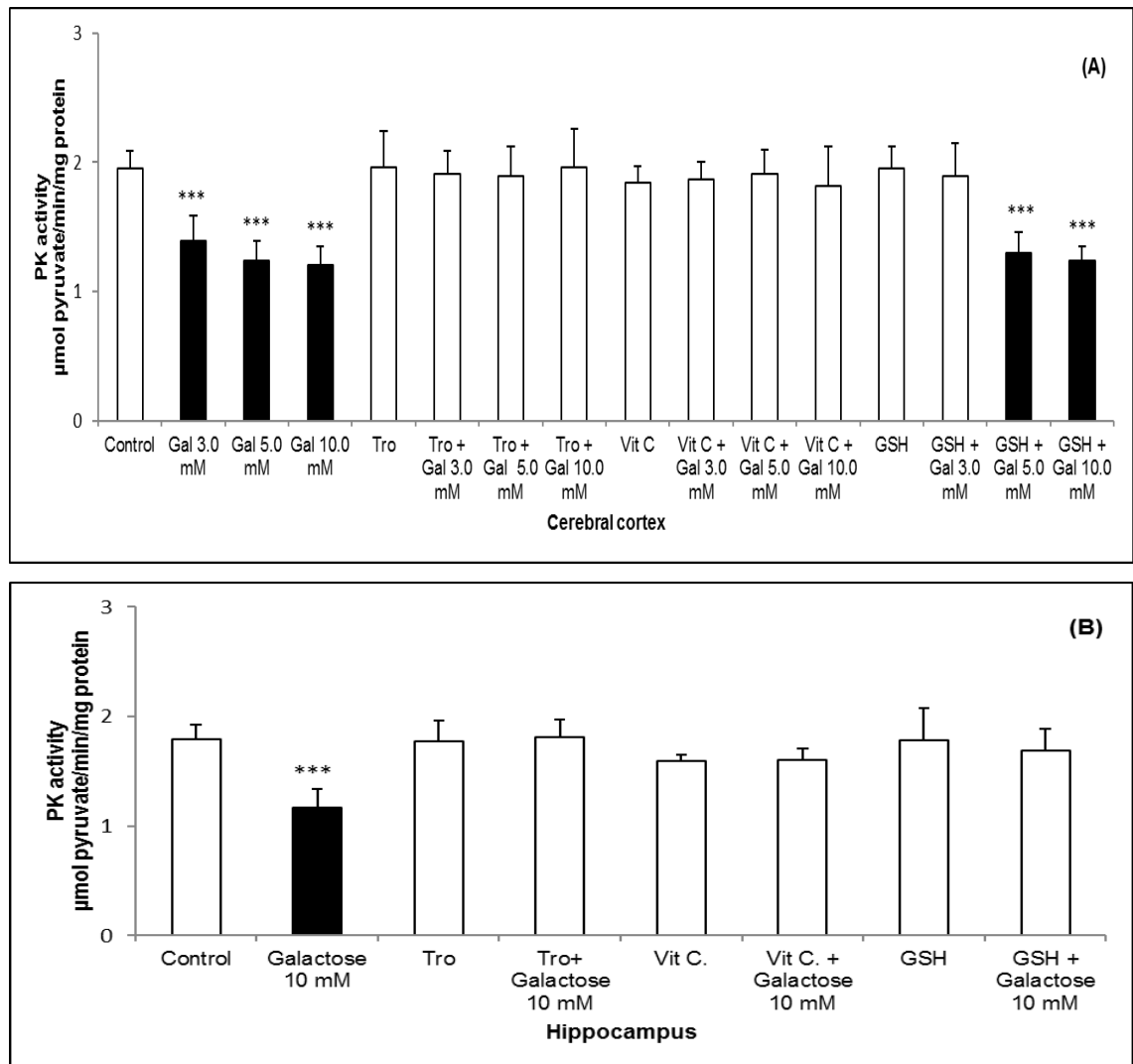
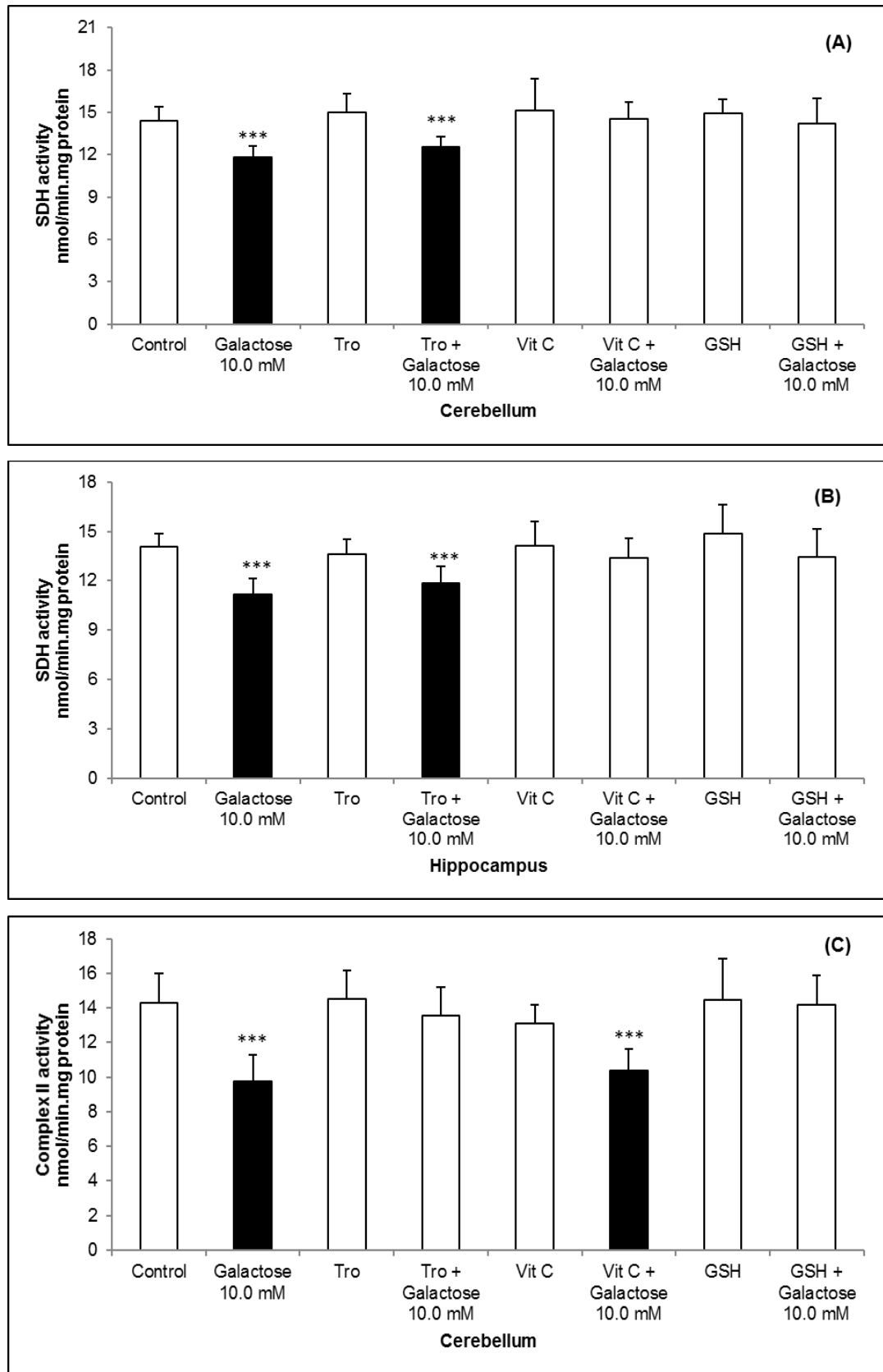
Fig. 5.

Fig. 5. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione on pyruvate kinase in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of 30-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$, compared to control group (Duncan's multiple range test). Tro: trolox; Vit C: ascorbic acid; GSH: glutathione.

Fig. 6.



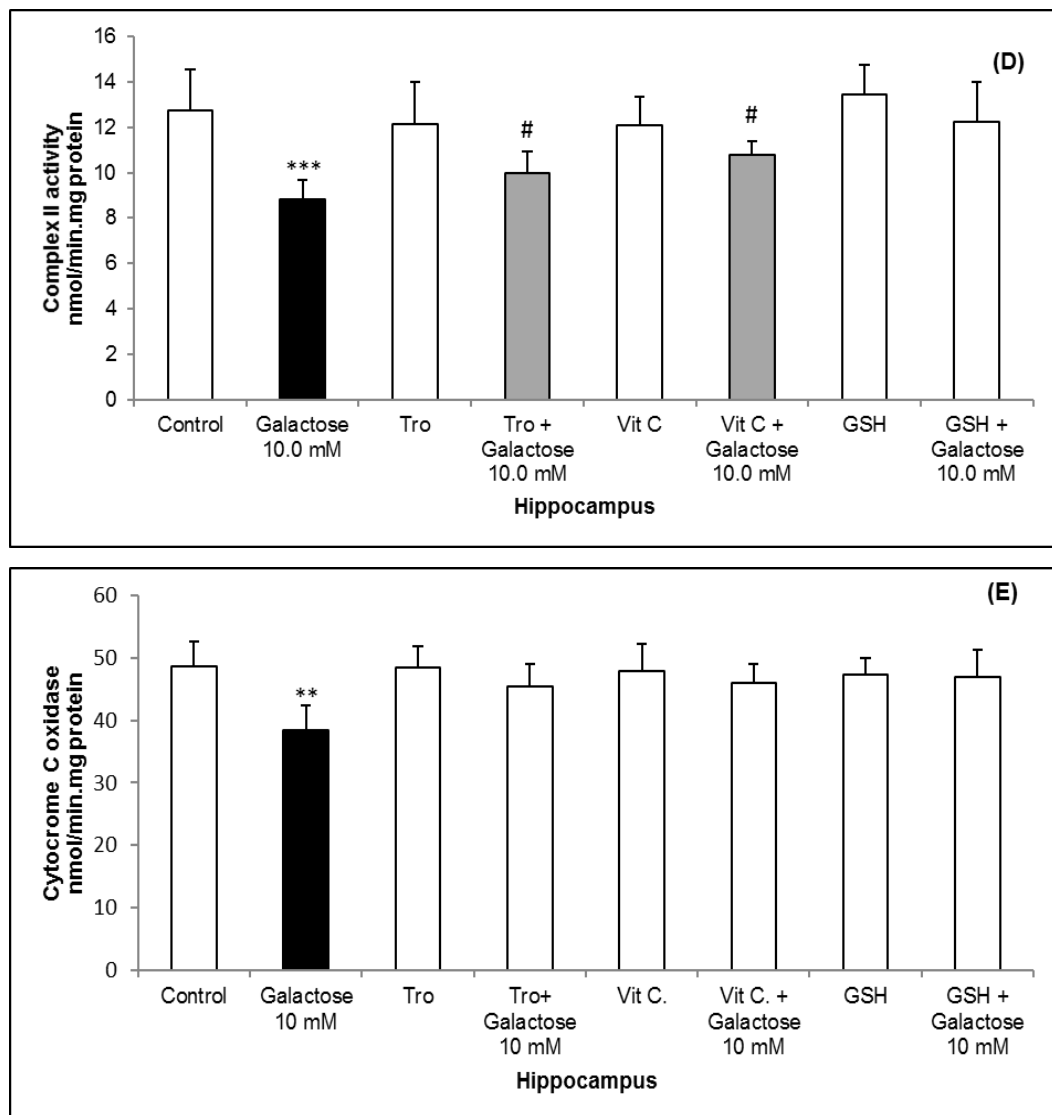


Fig. 6. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione on SDH activity in the cerebellum (A) and hippocampus (B), complex II activity in the cerebellum (C) and hippocampus (D) and cytochrome c oxidase activity in the hippocampus (E) of 30-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$, compared to control group (Duncan's multiple range test). Tro: trolox; Vit C: ascorbic acid; GSH: glutathione; # partially prevented.

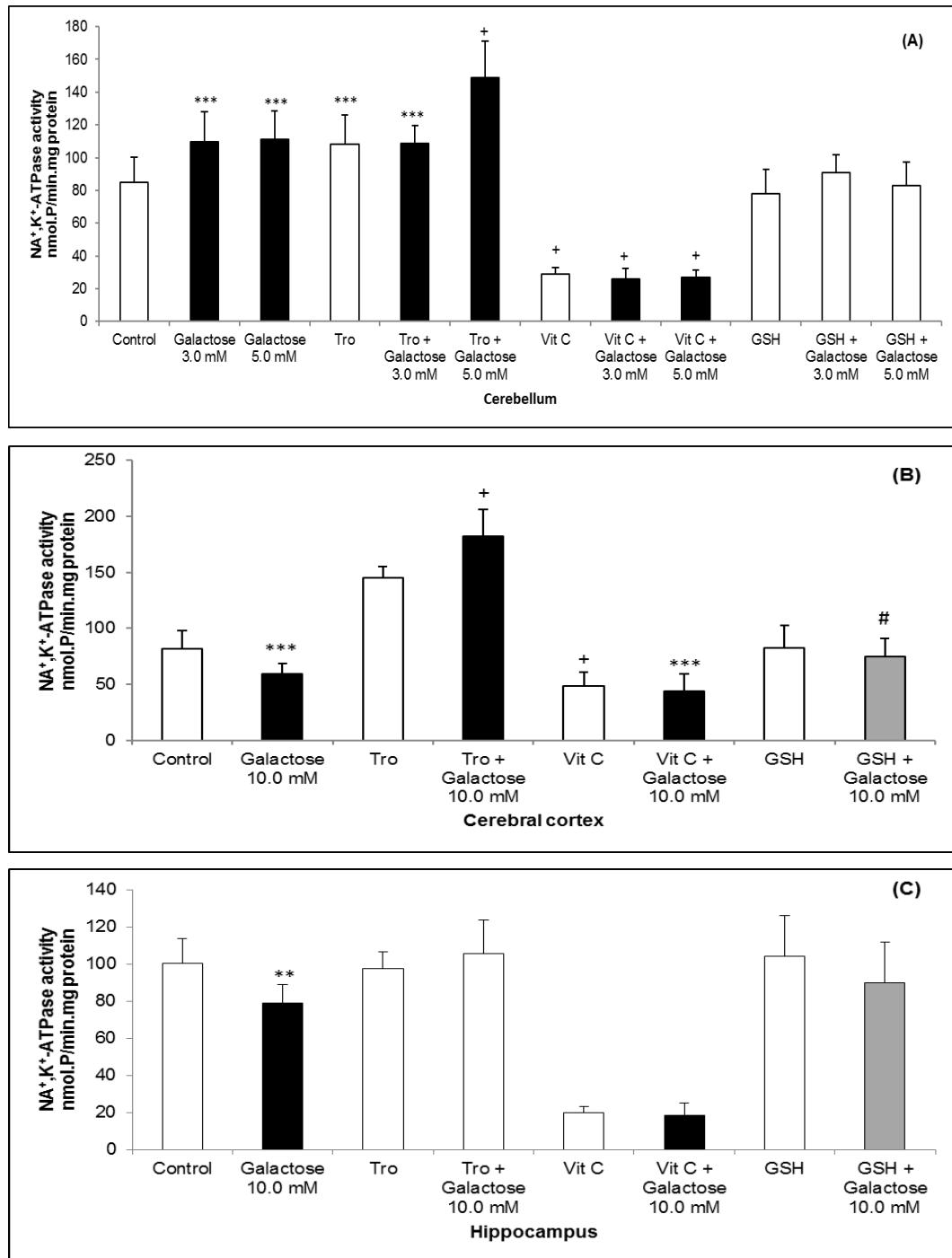
Fig. 7.

Fig. 7. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione on Na⁺K⁺-ATPase in the cerebellum (A), cerebral cortex (B) and hippocampus (C) of 30-day-old rats. Results are expressed as mean $\pm$ SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. *** $p < 0.001$, compared to control group (Duncan's multiplerange test). Tro:trolox; Vit C: ascorbicacid; GSH: glutathione; # partially prevented; + different from control group and galactose group.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na galactosemia os indivíduos afetados apresentam uma falha e/ou deficiência no metabolismo da galactose, não podendo efetivamente converter galactose em glicose, apresentando acúmulo deste carboidrato e seus metabólitos, como galactitol, galactonato e Gal-1-P (HOLTON et al., 2001; BOSCH, 2006).

A maioria dos pacientes com galactosemia apresentam insuficiência ovariana, retardo de crescimento, comprometimento mental, diminuição da densidade óssea, como também vômitos, diarreia e catarata. A restrição dietética de galactose é a principal forma de aliviar ou prevenir os sintomas (ZOU, 2007). A galactosemia pode ser diagnosticada pela presença de galactose e gal-1-P no sangue ou galactose na urina (TSAKIRIS et al., 2005).

No presente estudo investigou-se os efeitos *in vitro* e *in vivo* (injeção intracerebroventricular) de galactose e a influência dos antioxidantes trolox (α -tocoferol), ácido ascórbico e glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, sobre a atividade da acetilcolinesterase e sobre o metabolismo energético em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos de 30 e 60 dias de idade.

Os resultados obtidos foram os descritos abaixo:

Experimentos *in vivo*

- A infusão intracerebroventricular de galactose (5,0 mM) aumentou a atividade da SOD em cerebelo;
- Aumentou a atividade da CAT em cerebelo e diminuiu em córtex cerebral;
- Aumentou a atividade da GSH-Px em córtex cerebral;
- Reduziu o conteúdo total de sulfidrilas em cerebelo, córtex cerebral e hipocampo;
- Aumentou os níveis de TBA-RS em hipocampo e córtex cerebral;
- Aumentou a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo;
- Aumentou o conteúdo total de carbonilas em córtex cerebral;

Prevenção (Pré-tratamento com trolox e o ácido ascórbico)

- O pré-tratamento com o trolox e o ácido ascórbico preveniram o aumento dos níveis de TBA-RS em córtex cerebral e hipocampo;
- O pré-tratamento com o trolox e o ácido ascórbico preveniram a redução do conteúdo total de sulfidrila em hipocampo, preveniu parcialmente em córtex cerebral e não preveniu em cerebelo;
- O pré-tratamento com o trolox e o ácido ascórbico preveniram parcialmente o aumento da carbonilação de proteínas em córtex cerebral.
- O pré-tratamento com o trolox e o ácido ascórbico preveniram o aumento da CAT e da SOD em cerebelo;
- O pré-tratamento com o trolox e o ácido ascórbico preveniram parcialmente a diminuição da CAT e o aumento da GSH-Px em córtex cerebral;
- O pré-tratamento com o trolox e o ácido ascórbico preveniram o aumento da acetilcolinesterase em hipocampo.

Experimentos *in vitro*

- A galactose na concentração de 10,0mM diminuiu a atividade da piruvato quinase em córtex cerebral e nas concentrações de 3,0, 5,0 e 10,0 mM em hipocampo;
- A galactose na concentração de 10,0mM diminuiu a atividade da succinato desidrogenase em cerebelo e hipocampo;
- A galactose na concentração de 10,0mM diminuiu o complexo II em cerebelo e em hipocampo;
- A galactose na concentração de 10,0mM diminuiu o citocromo C oxidase em hipocampo;
- A galactose na concentração de 10,0mM diminuiu a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase em córtex cerebral e hipocampo e nas concentrações de 3,0 e 5,0 mM aumentou a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase em cerebelo.

Prevenção dos experimentos *in vitro* com ácido ascórbico, trolox e glutathiona

- O trolox e o ácido ascórbico preveniram a diminuição da piruvato quinase causada pela galactose 3,0, 5,0 e 10,0 mM em córtex cerebral e a glutathione preveniu a diminuição da piruvato quinase causada pela galactose 3,0 mM, porém não preveniu nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM.
- O trolox, ácido ascórbico e glutathione preveniram a diminuição da piruvato quinase em hipocampo causada pela galactose na concentração de 10,0 mM.
- O ácido ascórbico e a glutathione preveniram a diminuição da atividade da SDH em cerebelo e hipocampo causada pela galactose 10,0 mM e o trolox não preveniu;
- O trolox e a glutathione preveniram a diminuição do complexo II causada pela galactose 10,0 mM em cerebelo, porém o ácido ascórbico não preveniu;
- A glutathione preveniu a diminuição do complexo II causada pela galactose 10,0 mM em hipocampo, porém o trolox e o ácido ascórbico não preveniram;
- Todos os antioxidantes preveniram a diminuição da citocromo C oxidase causada pela galactose 10,0 mM em hipocampo;
- A glutathione preveniu parcialmente e as vitaminas não preveniram a diminuição da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase causada pela galactose 10,0 mM em córtex cerebral;
- As vitaminas não preveniram o aumento da atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase causado pela galactose 3,0 e 5,0 mM em cerebelo, porém a glutathione preveniu;
- O trolox preveniu, a glutathione preveniu parcialmente e o ácido ascórbico não preveniu a diminuição da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase causada pela galactose 10,0 mM em hipocampo.

Concluimos que a galactose “*in vivo*” altera a atividade da AChE e causa estresse oxidativo no cérebro de ratos, alterando as defesas antioxidantes enzimáticas e induzindo peroxidação lipídica e danos às proteínas, provavelmente aumentando a geração de espécies reativas. Sugerimos que essas alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e atividade da AChE são provavelmente mediadas pela geração de radicais livres, que podem ser capturados pelo α -tocoferol e pelo

ácido ascórbico, uma vez que esses antioxidantes impediram parcial ou totalmente a maioria das alterações provocadas pela galactose em cérebro de ratos.

Também concluímos que a galactose diminui o metabolismo energético e altera a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase no cérebro de ratos. Propomos que alterações no metabolismo energético, causadas pela galactose, sejam mediadas por espécies reativas de oxigênio e que a consequente redução na produção de ATP e na geração de radicais livres possam ser responsáveis pelas alterações causadas na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase. Embora seja difícil extrapolar nossos achados *in vitro* para a condição *in vivo*, é concebível que o comprometimento da energia causada pela galactose possa estar associado à sintomatologia neurológica presente em pacientes galactosêmicos.

Por fim, considerando o efeito protetor dos antioxidantes α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathiona, sugerimos que esses agentes possam ser usados como adjuvantes terapêuticos, além da restrição de galactose, para limitar o dano oxidativo e proteger contra as ações tóxicas da galactose no cérebro de pacientes galactosêmicos.

8 REFERÊNCIAS

ACIN-PEREZ, R.; ENRIQUEZ, J.A. The function of the respiratory supercomplexes; the plasticity model. **Biochim biophys Acta**, v.1837, n.4, p.444-50, 2013.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p.121-6, 1984.

ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric OxideDependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev**, 2013.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-40, 2007.

ARTUCH, R.; COLOME, C.; SIERRA, C.; BRANDI, N.; LAMBRUSCHINI, N.; CAMPISTOL, J.; UGARTE, D.; VILASECA, M.A. A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **ClinBiochem**, v.37, n.1-2, p.198–203, 2004.

AVROVA, N.F.; SHESTAK, K.I.; ZAKHAROVA, I.O.; SOKOLOVA, T.V.; LEONT'EV, V.G. The difference in the effect of glutamate and NO synthase inhibitor on free calcium concentration and Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptosomes from various brain regions. **Neurochem. Res**, v.24, n.9, p.1101–1106, 1999.

BARBOSA, K. B. F.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfat, M.S.; Kubota, L.T. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARROS, A.; NUMES, F.M.; GONÇALVES, B.; BENNETT, R. N.; SILVA, A.P. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*castanea sativa* Mill.) **Food Chemistry**, v.128, n.1, p.165-72, 2011.

BARROS, C.M.; BOCK, P.M. **Vitamina C na prevenção do envelhecimento cutâneo**. Porto Alegre, 2012.

BEAUDET, A.L.; SCRIVER, C.R.; SLY, W.S.; VALLE, D. Genetics, biochemistry and molecular bases of variant human phenotypes. In: Beaudet, A.L.; Scriver, C.R.; Sly, W.S.; Valle, W. editors. **The metabolic bases of inherited disease on CD-ROM**. 8. ed. New York: McGraw-Hill Book Company; 2010.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci**, v.65, n.18-19, p.1865-1874, 1999

BERLINER, J.A.; HEINECKE, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radical Biol. Med.** v.20, n.5, p.707-727, 1996.

BERRY, G.T. Galactosemia: When is it a newborn screening emergency? **Molecular Genetics and Metabolism**, v.106, n.1, p.7–11, 2012.

BOSCH, A.M. Classical galactosaemia revisited. Metabolic dissertation. **Journal Inherited Metabolic Disease**, v.29, n.4, p.516-525, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal Biochem.** n.72, p. 248–254, 1976.

BUDANOV, A.V.; Lee, J.H.; Karin, M. Stressin' Sestrins take na aging fight. **EMBO Molecular Medicine**, v.1, n.1, p.1–13, 2010.

BÜTÜN, A.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRCI, S.; CELIK, O.; UĞUZ, A.C. Riboflavin and vitamin E increase brain calcium and antioxidants, and microsomal calcium-ATP-ase values in rat headache models induced by glyceryl trinitrate. **Journal of Membrane Biology**, v.248, n.2, p.205-13, 2014.

CARR, A.; FREI, B. Does Vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J.**, v.13, n.9, p.1007-1024, 1999.

CHAN.; K.M. DELFERT, D.; JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity, **Anal Biochem.** n.157, v.2, p.375-380, 1986.

CHANPRASERT, S.; SCAGLIA, F. Adult liver disorders caused by inborn errors of metabolism : Review and update. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.114, n.1, p.1–10, 2015.

CHIAPPORI, F.; MERELLI, I.; MILANESI, L.; MARABOTTI, A. Static and dynamic interactions between GALK enzyme and known inhibitors: Guidelines to design new drugs for galactosemic patients. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, p. 423–434, 2013.

CHIAPPORI, I.; MERELLI, L.; MILANESI, A.; MARABOTTI, A. Static and dynamic interactions between GALK enzyme and known inhibitors: Guidelines to design new drugs for galactosemic patients. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.63, p. 423–434, 2013.

COELHO, A.I.; LOURENÇO, S.; TRABUCO, M.; SILVA, M.J.; OLIVEIRA, A.; GASPARI, A.; RIVERA, I. Functional correction by antisense therapy of a splicing mutation in the GALT gene. **European journal of human genetics**, v.23, n.4, p.500-6, 2015.

COGO, A.J. D; SIQUEIRA, A.F.; RAMOS, A.C.; CRUZ, Z. M.A.; SILVA, A.G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v.7, n.1, p.37-42, 2009.

COHEN, C.R. **Papel das espécies reativas de oxigênio na hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Hospital das clínicas de Porto Alegre, 2011.

COLOME, C.; SIERRA, C.; VILASECA, M.A. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? **MédClin**, v.115, n.1-2, p.111–117, 2000.

COMBS, J.R.G. **The Vitamins**. 4^a ed. San Diego: Print Book, Academic Press, 2012

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, n.6917, p.860-7, 2002.

DALVI, S. M.; PATIL, V. W.; RAMRAJE, N. N.; PHADTARE, J. M.; GUJARATHI, S. U. Nitric oxide, carbonyl protein, lipid peroxidation and correlation between antioxidant vitamins in different categories of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **Malays J. Med. Sci**, v.20, n.1, p.21-30, 2013.

DAMODARAN, S. **Química de alimentos de Fennema**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2010

DELWING, D.; CHIARANI, F.; BAVARESCO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WYSE, A.T.S. Protective effect of antioxidants on brain oxidative damage caused by proline administration. **Neuroscience Research**, v.51, n.1, p.69–74, 2005.

DELWING, D.; DELWING, D.; CHIARANI, F.; KUREK, A.G.; WYSE, A.T.S. Proline reduces brain cytochrome c oxidase: prevention by antioxidants. **Int J Devl Neuroscience**. v.25, n.1, p.17–22, 2007.

DELWING, D.; TAGLIARI, B.; CHIARANI, F.; WANNMACHER, C.M.D.; WAJNER, M.; WYSE, A.T.S. α -Tocopherol and ascorbic acid administration prevents the impairment of brain energy metabolism of hyperargininemic rats. **Cell MolNeurobiol**. v.26, n.2, p.177–189, 2006.

DINCER, Y.; ERZIN, Y.; HIMMETOGLU, S.; GUNES, K. N.; BAL, K.; AKCAY, T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci**, v.52, n.7, p.1636-41, 2007.

DU, C.; ANDERSON, A.; LORTIE, M.; PARSONS, R.; BODNAR, A. Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v.63, n.2, p.254-263, 2013

DUBEY, R. S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**, p.178-203, 2011.

DUDKINA, N.V.; SUNDERHAUS, S.; BOEKEMA, E.L.; BRAUN, H.P. The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system; mitochondrial supercomplexes. **J. Bioenerg Biomember**, v.40, n.5, p.419-24, 2008.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *BiochemPharmacol*, v.7, p.88–95, 1961.

ELSAS, L.J. **Galactosemia**. In: PAGON, R.A.; BIRD, T.D.; DOLAN, C.R.; STEPHENS, K.; ADAM, M.P. editors. *Gene Reviews*. Seattle: University of Washington, p.1993–2000, 1993.

ERECINSKA, M.; CHERIAN, S.; SILVER I.A. Energy metabolism in mammalian brain during development. **Prog. Neurobiol**, v.73, n.6, p.397-445, 2004.

ERICINSKA, M.; SILVER, I.A. Ions and energy in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v.43, n.1, p.37-71, 1994.

FERRARI, R.; CECONI, C.; CURELLO, S.; GUARNIERI, C.; CALDARERA, M.; ALBERTINI, A.; VISIOLI, O. Oxygen -mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: role of the cellular defenses against oxygen toxicity. **J. Mol. Cell. Cardiol**, v.17, p.937-45, 1985

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**, v.43, n.1, p.61-8, 1997.

FISCHER, J.C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J.A.; TRIJBELS, J.M.; VEERKAMO, J.H.; STADHOUDERS, A.M.; SENGERS, R.C.; JANSSEN, A.J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v.153, n.1, p.23-36, 1985.

FLANAGAN, J.M.; MCMAHON, G.; CHIA, S.H.; FITZPATRICK, P.; TIGHE, O.; O'NEILL, C.; BRIONES, P.; GORT, L.; KOZAK, L.; MAGEE, A.; NAUGHTEN, E.; RADOMYSKA, B.; SCHWARTZ, M.; SHIN, J.S.; STROBL, W.M.; TYFIELD, L.A.; WATERHAM, H.R.; RUSSELL, H.; BERTORELLE, G.; REICHARDT, J.K.; MAYNE, P.D.; CROKE, D.T.; The role of human demographic history in determining the distribution and frequency of transferase-deficient galactosaemia mutations. **Heredity (Edinb)**, v.104, n.2, p.148-54, 2010.

FREY, P.A.; WONG, L.J.; SHEU, K.F.; YANG, S.L. Galactose-1-phosphate uridylyltransferase: detection, isolation, and characterization of the uridylyl enzyme. **Methods Enzymol**, v.87, p.20–36, 1982.

FRIDOVICH-KEIL, J.L.; WALTER, J.H. **Galactosemia**. In: The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. edited by VALLE, D.; BEAUDET, A.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.; ANTONARAKIS, S.; BALLABIO, A. New York, NY: McGraw Hill, 2008.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da Costusspicatus**. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GEERING, K. Subunit assembly and functional maturation of Na, K-ATPase. **J. Membr. Biol**, v.115, n.2, p.109-121, 1990.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, **Oxford**, v.7, n.1-2, p.113-174, 1998.

GILL, S.S.; TUJETA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909- 930, 2010.

GINOCCHIO, V.M.; NICOLA, B.P. Progress toward improved therapies for inborn errors of metabolism. **Hum Mol Genet**, v.25, n.1, p.27-35, 2016.

GITZELMANN, R. Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. **Eur J Pediatrics**, v.154, n.2, p.S45–S49, 1995.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein cell**, v.1, n.10, p.888-897, 2010.

GRISAR, T. Glial and neuronal Na-K pump in epilepsy. **Ann Neurol**, v.16, p.S128-S134, 1984.

GUBBELS, C.S.; WELT, C.K.; DUMOULIN, J.C.; ROBBEN, S.G.; GORDON, C.M.; DUNSELMAN, G.A.; RUBIO-GOZALBO, M.E.; BERRY, G.T. The male reproductive system in classic galactosemia: cryptorchidism and low semen volume. **J Inherit Metab Dis**, v.36, n.5, p.779–86, 2013.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, n.5, p.257–265, 2012.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.75, n.3, p.637–644, 2013.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. 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**. v.142, n.4, p.231–255, 2004.

HAMMAD, L. A.; WU, G.; SALEH, M. M.; KLOUCKOVA, I.; DOBROLECKI, L. E.; HICKEY, R. J.; SCHNAPER, L.; NOVOTNY, M. V.; MECHREF, Y. Rapid Commun. **Mass Spectrom**, v.23, n.6, p.863-76, 2009.

HARA, H.; KATO, H.; KOGURE, K. Protective effect of α -tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. **Brain. Res.**, v.510, n.2, p.335-338, 1990.

HATTORI, N.; KITAGAWA, K.; HIGASHIDA, T.; YAGYU, K.; SHIMIHAMA, S.; WATAYA, T.; PERRY, G.; SMITH, M.A.; INAGAKI, C. Cl-ATPase and Na, K-ATPase activities in Alzheimer disease brain. **Neurosci. Lett**, v.254, n.3, p.141-144, 1998.

HELDT, H. W.; HELDT, F. The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation. In: HELDT, H.W. **Plant Biochemistry**, p.165-193. 2005

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Nova lorque: **John Wiley & Sons**, p.319-368, 2004.

HÖHN, A.; JUNG, T.; GRIMM, S.; GRUNE, T. Lipofuscinbound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. **Free Radic Biol Med**, v.48, n.8, p.1100-8, 2010.

HOLDEN, H.M.; RAYMENT, I.; THODEN, J.B. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. **J Biol Chem**. v.278, n.43, p.43885–43888, 2003.

HOLTON, J.; WALTER, J.; TYFIELD, L. **Galactosemia**. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D.; CHILDS, B.; KINZLER, K.W. editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th Ed. New York: McGraw-Hill, p.1553-87, 2001.

HOWARD, A.C.; McNEIL, A.K.; McNEIL, P.L. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. **Nature Communications**, v.20, n.2, p.1-8, 2011.

HUANG, S; MILLAR, A.H. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. **Curr Opin Plant Biol**, v.16, n.3, p.344–349, 2013.

HUMAN GENETICS PROGRAMME. World Health Organization. Community genetic services in Latin America and regional networks on medical genetics. **Report of a WHO consultation**. Geneva: World Health Organization, 2004.

IMAI, Y.; KUBA, K.; NEELY, G. G.; YAGHUBIAN-MALHAMI, R.; PERKMANN, T.; VAN LOO, G.; ERMOLAEVA, M.; VELDHIJZEN, R.; LEUNG, Y. H.; WANG, H.; LIU, SUN, Y.; PASPARAKIS, M.; KOPF, M.; MECH, C.; BAVARI, S.; PEIRIS, J. S.; SLUTSKY, A. S.; AKIRA, S.; HULTQVIST, M.; HOLMDAHL, R.; NICHOLLS, J.; JIANG, C.; BINDER, C. J.; PENNINGER, J. M. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. **Cell**, v.133, n.2, p.235-49, 2008.

IRWIN, J.A.; PARSON, W.; COBLE, M.D.; JUST, R.S. mtGenome reference population databases and the future of forensic mtDNA analysis. **Forensic Sci Int Genet**, v.5, n.3, p.222-225, 2011.

ISSELBACHER, K.J.; ANDERSON, E.P.; KURAHASHI, K.; KALCKAR, H.M. Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. **Science**, v.123, n.13, p.635–636, 1956.

IYAMA, T.; WILSON, D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, v.12, n.8, p.620–636, 2013.

JAIN, S. K.; MC VIE, R.; SMITH, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. **Diab. Care**, v.23, n.9, p.1389-1394, 2000.

JARDIM, L.B.; PATRÍCIA, A.P. Erros inatos do metabolismo em crianças e recém-nascidos agudamente enfermos: guia para o seu diagnóstico e manejo. **Jornal de Pediatria**, v.72, n.2, p.63-70, 1996.

JEZEK, P.; HLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, n.12, p.2478–2503, 2005.

JUMBO-LUCIONI, P.P.; GARBER, K.; KIEL, J.; BARIC, I.; BERRY, G.T.; BOSCH, A. Diversity of approaches to classic galactosemia around the world: a comparison of diagnosis, intervention, and outcomes. **J Inherit Metab Dis**, v.35, p.1037–1049, 2012.

JUNG, T.; HÖHN, A.; GRUNE, T. Lipofuscin: detection and quantification by microscopic techniques. **Methods Mol. Biol**, v.594, n.2, p.173-93, 2010.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v.187, n.1, p.187-1, 2006.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, v.1, n.1, p. 244-257, 2013.

KAMISAH, Y.; QODRIYAH, H.M.; CHUA, K.H.; NUR AZLINA, M.F. Vitamin E: A potential therapy for gastric mucosal injury. **Pharmaceutical Biology**, v.52, n.12, p.1591-1597, 2014.

KOCHA, T.; YAMAGUCHI, M.; OHTAKI, H.; FUKUDA, T.; AOYAGI, T. Hydrogen peroxide - mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper – and iron - dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. **Biochimica et biophysica acta**, v.1337, n.2, p.319-326, 1997.

KRYSTON, T.B.; GEORGIEV, A.B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutat Res**, v.711, n.1-2, p.193-201, 2011.

LAI, K.; ELSAS, L.J.; WIERENGA, K.J. Galactose toxicity in animals. **IUBMB Life**, v.61, p.1063-1074, 2009.

LEE, J.Y. Oxidative Stress Due to Anesthesia and Surgical Trauma and Comparison of the Effects of Propofol and Thiopental in Dogs. **Surgery**, v.74, n.5, p.663–665, 2012.

LEES, G.J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. **Neuroscience**, v.54, n.2, p.287-322, 1993.

LELOIR, L.F. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. **Arch BiochemBiophys**, v.33, n.2, p.186-190, 1951.

LEONG, S.; LIM, L.; CLARK, J.B. Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. **J Neurochem**, v.37, n.6, p.1548-1556, 1981.

LIGURI, G.; TADDEI, N.; NASSI, P.; LATORRACA, S.; NADIANE, C.; SORDI, S. Changes in Na, K-ATPase, Ca-ATPase and some soluble enzymes relates to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer disease. **Neurosci. Lett**, v.112, n.1-2, p.338-342, 1990.

LING, J.; SÖLL, D. Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.107, n.9, p.4028-33, 2010.

LINGREL, J.B.; KUNTZWEILER, T. Na, K, ATPase. **J. Biol. Chem**, v.269, n.31, p.19659-19662, 1994.

LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**; 3 ed; Scientific American Books, 2000.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, n.1, p.265-75, 1951.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E, A. Total antioxidant activity and fiber content of select Floridagrown tropical fruits. **J. Agric. Food Chem**, v.54, n.19, p.7355-63, 2006.

MAK, C.M.; LEE, H.C.H.; CHAN, A.Y.W.; LAM, C.W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v.50, n.6, p.142–62, 2013.

MARKLUND, S. **Handbook for oxygen radical research**. Boca Raton: CRC press, p. 243-247, 1985.

MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. Free Radicals. In: Metabolic and Clinical Aspects. **Clin. Biochem**, p.765-777, 1995.

MARTINS, A.M. Inborn errors of metabolism: a clinical overview. **São Paulo medical journal**, v.117, n.6, p.251–65, 1999.

MARTINS, A.M.; MICHELETTI, C.; ALMEIDA, V.; FRANGIPANI, B. **Erros Inatos do Metabolismo – Abordagem Clínica**. 2ª ed. São Paulo, p.3-34, 2003.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.386, 2007.

MATTOS, T.C.G. **Mecanismo da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro**. Dissertação de mestrado em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MCCORVIE, T.J.; TIMSON, D.J. The structural and molecular biology of type i galactosemia: Enzymology of galactose 1-phosphate uridylyltransferase. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v.63, n.9, p.694–700, 2011.

MENG, F.-G.; ZHANG, Z.-Y. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase activity by hydroxyl radical. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1834, n. 1, p. 464–469, jan. 2013.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive Oxygen Species Homeostasis and Signalling During Drought and Salinity Stresses. **Plant Cell Environ**, v.33, n.4, p.453-67, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.9, n.7, p.405-410, 2002.

MONTINE, T. J.; MONTINE, K. S.; MCMAHAN, W.; MARKESBERY, W. R.; QUINN, J. F.; MORROW, J. D. F2-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. **Antioxid. Redox Signaling**, v.7, n.1-2, p.269-75, 2005.

MOREIRA, C. Respiração. **Revista de Ciencia Elementar**, v.1, n.1, p.0007, 2013.

NAM, T.G. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. **Toxicological research**, v.27, n.1, p.1-6, 2011.

NASSER, M.; JAVAHERI, H.; FEDOROWICZ, Z.; NOORANI, Z. CARNITINE. Supplementation for inborn errors of metabolism, in: NASSER, M. (Ed.), Cochrane Database of Systematic Reviews. **John Wiley & Sons**, Ltd, Chichester, UK, v.15, n.2, p. CD006659, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**; 4th Edition, W.H. Freeman, 2004.

NEOFYTOU, E.; TZORTZAKI, E. G.; CHATZIANTONIOU, A.; SIAFAKAS, N. M. DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). **International journal of molecular sciences**, v.13, n.12, p.16853-16864, 2012.

NIKI, E.; TRABER, M.G. A history of vitamin E. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.61, p.207–212, 2012.

NONAS, S.; MILLER, I.; KAWKITINARONG, K.; CHATCHAVALVANICH, S.; GORSHKOVA, I.; BOCHKOV, V. N.; LEITINGER, N.; NATARAJAN, V.; GARCIA, J. G.; BIRUKOV, K. G. AM. J. Oxidized phospholipids reduce vascular leak and inflammation in rat model of acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v.173, n.10, p.1130-8, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v.95, n.2, p.351-8, 1979.

OLSEN, R.K.J.; CORNELIUS, N.; GREGERSEN, N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. **J.Inherit.metab Dis**, v.38, n.4, p. 703–719, 2015.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress; implications for cell death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p.143-183, 2007.

OWEN, L.; SUNRAM-LEA, S.I. Metabolic Agents that Enhance ATP can Improve Cognitive Functioning: A Review of the Evidence for Glucose, Oxygen, Pyruvate, Creatine, and L-Carnitine. **Nutrients**, v.3, n.8, p.735-755, 2011.

PALMIERI, M.; MAZUR, A.; BERRY, G.T.; NING, C.; WEHRLI, S.; YAGER, C.; REYNOLDS, R.; SINGH, R.; MURALIDHARAN, K.; LANGLEY, S.; ELSAS, L.; SEGAL, S. Urine and Plasma Galactitol in Patients With Galactose-1- Phosphate Uridyltransferase Deficiency Galactosemia. **Metabolism**. v.48, n.10, p.1294-302, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, London, 1986.

PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v.4, n.2, p.89–96, 2008.

PHAM-HUY, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v.4, n.2, p.89–96, 2008.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.30, n.1, p.11–26, 2014.

PIZZIMENTI, S.; CIAMPORCERO, E.; DAGA, M.; PETTAZZONI, P.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G.; MINELLI, R.; DIANZANI, C.; LEPORE, A.; GENTILE, F.; BARRERA, G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. **Frontiers in physiology**, v.4, n.4, p.242, 2013.

POÇAS, E.S.C. **Caracterização de novos inibidores da Na⁺, K⁺-ATPase**. Dissertação (mestre de ciências biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, Rio de Janeiro, 2007.

PORTER, F. D.; SCHERRER, D. E.; LANIER, M. H.; LANGMADE, S. J.; MOLUGU, V.; GALE, S. E.; OLZESKI, D.; SIDHU, R.; DIETZEN, D. J.; FU, R.; WASSIF, C. A.; YANJANIN, N. M.; MARSO, S. P.; HOUSE, J.; VITE, C.; SCHAFFER, J. E.; ORY, D. S. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. **Sci. Translational Med**, v.2, n.56, p.56-81, 2010.

RENKAWEK, K.; RENIER, W.O.; DE PONT, J.J.; VOGELS O.J.; GABREELS, F. J. Neonatal status convulsus, spongiform encephalopathy, and low activity of Na,K-ATPase in the brain. **Epilepsia**, v.33, n.1, p.58-64, 1992.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radic Biol Med**, v.49, n.11. p.1603-16, 2010.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v.233, p.357-63, 1994.

RIDEL, K.R.; LESLIE, N.D.; GILBERT, D.L. An updated review of the longtermneurological effects of galactosemia. **Pediatr Neurol**, v.33, n.3, p.153–161, 2005.

RIZVI, S.; RAZA, S.T.; AHMED, F.; AHMAD, A.; ABBAS, S.; MAHDI, F. The role of vitamin E in human health and some diseases. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v.14, p.157-165, 2014.

RIZVI, S.; RAZA, S.T.; AHMED, F.; AHMAD, A.; ABBAS, S.; MAHDI, F. The role of vitamin E in human health and some diseases. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v.14, n.2, p.157-165, 2014.

ROCHA, A.V.; COMINETTI, C.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina C, in: COZZOLINO, S.M.F., COMINETTI, C. **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença** . 1ª ed. Barueri: Manole, 2013.

ROESSNER, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; SCHNEIDER-STOCK, R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathol Res. Pract**, v. 204, n.7, p.511-24, 2008.

ROVER, L.J.R.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P., KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112–119, 2001.

RUBIO-AGUSTI, I.; CARECCHIO, M.; BHATIA, K.P.; KOJOVIC, M.; PAREES, I.; CHANDRASHEKAR, H.S.; FOOTITT, E.J.; BURKE, D.; EDWARDS, M.J.; LACHMANN, R.H.; MURPHY, E. Movement disorders in adult patients with classical galactosemia. **Mov Disord**, v.28, n.6, p.804-10, 2013.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; GERARD, B.; BOURGERON, T.; RÖTIG, A.; SAUDUBRAY, J.M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin Chim Acta**, v.228, n.1, p.35–5, 1994.

SAHOO, S.; FRANZSON, L.; JONSSON, J.J.; THIELE, I. A compendium of inborn errors of metabolism mapped onto the human metabolic network. **Molecular BioSystems**, v. 8, n.10, p.2545, 2012.

SAUDUBRAY, J.M.; OGIER, H. **Clinical approach to inherited metabolic disorders**. In: FERNANDES, J.; SAUDUBRAY, J.M.; TADA, K. (eds.) *Inborn Metabolic Diseases*. Berlim, Springer-Verlag, 1990.

SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: VALLE, D.; BEAUDET, A.L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W.; ANTONARAKIS, S.E.; BALLABIO, A. **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 2014.

SCHADEWALDT, P.; HOFFMAN, B.; HAMMEN, H.; KAMP, G.; SCHWEITZER-KRANTZ, S.; WENDEL, U. Longitudinal Assessment of Intellectual Achievement in Patients with Classical Galactosemia. **Pediatrics**, v.125, n.2, p.374–381, 2010.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10, n.1, p.308-13, 2004.

SCHULPIS, K.H.; MICHELAKAKIS, H.; TSAKIRIS, T.; TSAKIRIS, S. The effect of diet on total antioxidant status, erythrocyte membrane Na⁺,K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities in patients with classical galactosaemia. **Clin. Nutr.** v.24, n.1, p.151– 157, 2005.

SCOLAMIERO, E.; COZZOLINO, C.; ALBANO, L.; ANSALONE, A.; CATERINO, M.; CORBO, G.; RUOPPOLO, M. Targeted metabolomics in the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism. **Molecular BioSystems**, v.11, n.6, p.1525-35, 2015.

SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8^a ed. New York: McGraw –Hill, 2001.

SENER, G.; SEHIRLI, A. O.; IPCI, Y.; CETINEL, S.; CIKLER, E.; GEDIK, N.; ALICAN, I.; Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.19, n.2, p.155–164, 2005.

SHILS, M.E.; ROSS, K.; CABALLERO, B. COUSINS, R.J.; TUCKER, K.L.; ZIEGLER, T.R. **Nutrição moderna na saúde e na doença**. 10. ed. São Paulo: Manole, 2009.

SILVA, C.G.; BUENO, A.R.; SCHUCK, P.F.; LEIPNITZ, G.; RIBEIRO, C.A.; ROSA, R.B.; DUTRA FILHO, C.S.; WYSE, A.T.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. **NeurochemInt**, v.44, n.1, p.45-52, 2004.

SILVA, V.L.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina C (Ácido Ascórbico). In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes** . 3.ed. Barueri: Manole, Cap.13, p.354-373. 2009.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, A Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. **Sci. Signal**, v.2, n.72, p.3, 2009.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v.36, n.5, p.83-106, 1996.

SOUZA, I.C.N. **Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento 2002**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

STAHL, W.; AUST, O.; SIES, H.; POLIDORI, M.C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. **J. Chromatogr**, v.936, n.1-2, p.83-93, 2001.

STEPANYAN, V.; CROWE, M.; HALEAGRAHARA, N.; BOWDEN, B. Effects of vitamin E supplementation on exercise-induced oxidative stress: a meta-analysis. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v.39, n.9, p.1029-1037, 2014.

STRECK, E.L.; ZUGNO, A.I.; TAGLIARI, B.; FRANZON, R.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. **Neurochem Res**, v.26, n.2, p.1195-2000, 2001.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; ALLAN BUTTERFIELD, D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free radical biology & medicine**, v.62, n.5, p.157-169, 2013.

SUZUKI, M.; WEST, C.; BEUTLER, E. Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan-ethnic population. **Hum Genet**, v.109, n.2, p.210–215, 2001.

TEKMAN, B.; OZDEMIR, H.; SENTURK, M.; CIFTCI, M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.148, n.2, p.117-121, 2008.

THERRELL, B.L.; PADILLA, C.D.; LOEBER, J.G.; KNEISSER, I.; SAADALLAH, A.; BORRAJO, G.J.; ADAMS, J. Current status of newborn screening worldwide: **Semin. Perinatol**, v.39, n.9, p.171–187, 2015.

THODEN, J.B.; TIMSON, D.J.; REECE, R.J.; HOLDEN, H.M. Molecular structure of human galactokinase: implications for type II galactosemia. **J Biol Chem**. v.280, n.3, p.9662–9670, 2005.

TIMSON, D.J. The structural and molecular biology of type III galactosemia. **IUBMB Life**, v.58, n.2, p.83–89, 2006.

TORRES, A.; GUINAND, J.; GUERRA MODERNELL, M. Propiedades nutricionales y estabilidad de los componentes de los alimentos. In: GUERRA MODERNELL, , 2003.

TSAKIRIS, S.; MICHELAKAKIS, H.; SCHULPIS, K.H. Erythrocyte membrane acetylcholinesterase Na⁺ , K⁺ - ATPase and Mg²⁺ - ATPase activities in patients with classical galactosaemia. **Acta Paediatrica**, v.94, n.9, p.1223-1226, 2005.

TYFIELD, L.; WALTER, J. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. SCRIVER, C.; BEAUDET, A.; SLY, W.; VALLE, D.; CHILDS, B.; KINZLER, K.; VOGELSTEIN, B. editors. **McGraw-Hill**; New York: 2002.

VALKO, M.; RHODES, C. J; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, n.1, p.1–40, 2006.

VAN BACKEL, M.M.; PRINTZEN, G.; WERMUTH, B.; WIESMANN, U.N. Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients. **Am J ClinNutr**, v.72, n.4, p.976–981, 2000.

VARTAK, R.; PORRAS, C.A.; BAI, Y. Respiratory supercomplexes; strutures, funcion and assembly. **Protein Cel**, v.4; n.8, p.582-90, 2013.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de danooxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B.; MACENA, R.H.M.; BASTOS, V.P.D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR, Cient. Ciênc. Biol Saúde**, v.16, n.3, p.213-9, 2014.

VASCONCELOS, T.B.; VERAS, H.R.F.; BATISTA-LIMA, F.J.; ARAUJO, F.Y.R.; MAGALHÃES, P.J.C.; BASTOS, V.P.D. **Análise do estresse oxidativo e degranulação de mastócitos em cobaias submetidas à inalação passiva da fumaça de cigarro**. In: Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC, Maranhão, p.6129, 2012,

VÁSQUEZ, A.B. **Errores congénitos del metabolismo de la galactosa**. In: SANJURJO, P.; VASQUEZ, A.B. eds. Diagnóstico y tratamiento de las endermedades metabólicas hereditrias. 2ª ed. Madrid: Ediciones Ergon; p. 282-291, 2007.

VERNON, H.J. Inborn errors of metabolism: advances in diagnosis and therapy. **JAMA Pediatr**. v.169, n.8, p.778–782, 2015.

VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. New York: **John Wiley & sons**, v.23, n.2, p.104-105, 1995.

WAISBREN, S.E.; POTTER, N.L.; GORDON, C.M.; GREEN, R.C.; GREENSTEIN, P.; GUBBELS, C.S.; RUBIO-GOZALBO, E.; SCHOMER, D.; WELT, C.; ANASTASOAE, V.; D'ANNA, K.; GENTILE, J.; GUO, C.Y.; HECHT, L.; JACKSON, R.; JANSMA, B.M.; LI, Y.; LIP, V.; MILLER, D.T.; MURRAY, M.; POWER, L.; QUINN, N.; ROHR, F.; SHEN, Y.; SKINDER-MEREDITH, A.; TIMMERS, I.; TUNICK, R.; WESSEL, A.; WU, B.L.; LEVY, H.; ELSAS, L.; BERRY, G.T. The adult galactosemic phenotype. **J Inherit Metab Dis**, v.35, n.2, p.279–286, 2012.

WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A.T.S.; DUTRA-FILHO, C.S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **J Inherit Metab Dis**, v.27, n.4, p.427–448, 2004.

WALTER, J.H.; ROBERTS, R.E.P.; BESLEY, G.T.N.; WRAITH, J.E.; CLEARY, M.A.; HOLTON, J.B.; MACFAUL, R. Generaliseduridine diphosphate galactose-4-epimerase deficiency. **Arch Dis Child**, v.80, n.11, p.374–376, 1999.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.325-33, 1981.

WU, J. Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X.Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.46, n.1, p.200–206, 2013.

WU, R. P.; HAYASHI, T.; COTTAM, H. B.; JIN, G.; YAO, S.; WU, C. C. N.; ROSENBAACH, M. D.; CORR, M.; SCHWAB, R. B.; CARSON, D. A. Proc. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. **Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.107, n.16, p.7479-7484, 2010.

WYSE, A.T.S.; STRECK, E.L.; WORM, P.; WAJNER, A.; RITTER, F.; NETTO, C.A. Preconditioning prevents the inhibition of Na, K-ATPase activity after brain ischemia. **Neurochem. Res**, v.25, n.7, p.969-973, 2000.

YANG, V. R.; SAVA, L.; SQUATRITO, S.; SCIACCA, L. Associations of hyperglycemia and insulin usage with the risk of cancer in type 2 diabetes: the Hong Kong Diabetes Registry. **Diabetes**, v.59, n.11, p.1254-1260, 2010.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chem. Rev**, v.111, n.10, p.5944-5972, 2011.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, n.3, p.176-186, 2001.

YU, S.P. Na, K-ATPase, The new face of na old player in pathogenesis and apoptotic hybrid cell death. **Biochem. Pharmacol**, v.66, n.6, p.1601-1609, 2003.

ZAMBO, V.; SIMON-SZABO, L.; SZELENYI, P.; KERESZTURI, E.; BANHEGYI, G.; CSALA, M. Lipotoxicity in the liver. **World journal of hepatology**, v.5, n.10, p.550-557, 2013.

ZHANG, X. H. Regulation of protein function by residue oxidation. **Proteomics Insights**, v.3, n.10, p.17-24, 2010.

ZOU, G.M. Cancer stem cells in leukemia, recent advances. **Journal of cellular physiology**, v.213, n.2, p.440–444, 2007.

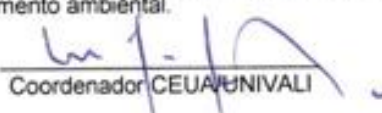
ANEXOS

PARECER
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA/UNIVALI

Título do Projeto: INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOLOGIA DO DANO CEREBRAL E PERIFÉRICO DA GALACTOSEMIA TIPO I: PAPEL PROTETOR DE ANTIOXIDANTES CLÁSSICOS	
Orientador: Daniela Delwing de Lima	
Executor (es) : Débora Delwing Dal Magro (Doutora, FURB), Eduardo Manoel Pereira (Mestre, UNIVILLE), Angela T.S. Wyse (Doutora, UFRGS), bolsistas de iniciação científica (alunos) e alunos de Mestrado.	
Nº Parecer/data: CEUA 01/14/ 14/03/2014	
Objetivos do Projeto Estudar os efeitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (injeção intracerebroventricular) de galactose-1-fosfato e a influência dos antioxidantes trolox (α-tocoferol), ácido ascórbico e glutathione sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo, sobre a atividade das colinesterases e sobre o metabolismo energético em cérebro e sangue de ratos de 30 e/ou 60 dias de idade.	
Itens avaliados	Parecer (comentários)
a) Qualificação da equipe (experiência e/ou treinamento do pesquisador e executor)	Adequada.
b) Justificativa do projeto e possíveis benefícios	Adequado; Considerando que a patogênese do quadro clínico característico apresentado por pacientes hipergalactosêmicos é ainda desconhecida esse projeto visa auxiliar no entendimento das alterações e dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença.
c) Informações sobre o modelo animal experimental (espécie, linhagem, procedência, gênero, idade, peso, número total de animais e descrição dos grupos, planejamento estatístico)	Adequado.
d) Condições de manutenção do animal (período de ambientação do animal, temperatura, luminosidade, umidade, tipo de cama, frequência de trocas de caixas, enriquecimento ambiental, água e alimentação).	Observar recomendações.
e) Detalhamento dos procedimentos experimentais e referências metodológicas	Adequado.

☒ (X) Aprovado
 ☐ () Pendente
 ☐ () Não Aprovado

Recomendação: Especificar o método de eutanásia dos animais e justificar o não uso de enriquecimento ambiental.


 Coordenador CEUA/UNIVALI

AUTORIZAÇÃO

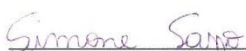
Nome do autor: Simone Sasso

RG: 4.291.235

Título da Tese: Efeito da galactosemia clássica sobre parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético em ratos

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da tese de minha autoria.

Joinville, 08 de julho de 2019.


Assinatura do aluno