MONIQUE FRÖHLICH

EFEITO DA GALACTOSEMIA CLÁSSICA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E SOBRE A ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS: PAPEL PROTETOR DO ÁCIDO ASCÓRBICO, TROLOX E GLUTATIONA

JOINVILLE

2015

MONIQUE FRÖHLICH

EFEITO DA GALACTOSEMIA CLÁSSICA SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E SOBRE A ACETILCOLINESTERASE EM CÉREBRO DE RATOS: PAPEL PROTETOR DO ÁCIDO ASCÓRBICO, TROLOX E GLUTATIONA

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orietadora: Profª Drª Daniela Delwing de Lima.

JOINVILLE

2015

Termo de Aprovação

"Efeito da Galactosemia Clássica Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e Sobre a Acetilcolinesterase em Cérebro de Ratos: Papel Protetor do Ácido Ascórbico, Trolox e Glutationa"

por

Monique Fröhlich

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre 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)

Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro
Coorientadora (FURB)

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro
Coorientadora (FURB)

Profa. Dra. Ana Lúcia Bertarello Zeni
(FURB)

Profa. Dra. Carla Werlang Coelho
(UNIVILLE)

Joinville, 09 de novembro de 2015

RESUMO

Na presente investigação, foram avaliados os efeitos *in vitro* da galactose sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), proteínas carboniladas, conteúdo total de sulfidrilas, sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GSH-Px) e sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos. Além disso, testou-se a influência dos antioxidantes trolox, ácido ascórbico e glutationa sobre os efeitos causados pela galactose nos parâmetros avaliados. Foram utilizados ratos machos Wistar de 30 dias de idade, não tratados; a galactose foi adicionada ao ensaio a fim de se obter concentrações finais de 0,1, 3,0, 5,0 e 10,0mM; o grupo controle foi realizado sem a adição de galactose. Para a prevenção com trolox (alfa-tocoferol), ácido ascórbico e glutationa, as estruturas cerebrais dos ratos foram divididas em 8 grupos: grupo 1 (controle-salina), grupo 2 (galactose), grupo 3 (controle-trolox 1,0mM), grupo 4 (controle-ácido ascórbico 1,0mM), grupo 5 (controle-glutationa 1,0mM), grupo 6 (galactose + trolox 1,0mM), grupo 7 (galactose + ácido ascórbico 1,0mM) e grupo 8 (galactose + glutationa 1,0mM). Os resultados mostraram que a galactose na concentração de 3,0mM aumentou os níveis de TBA-RS em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos. A galactose na concentração de 5,0mM aumentou TBA-RS em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, aumentou o conteúdo de proteínas carboniladas em córtex cerebral, aumentou a atividade da CAT em hipocampo e aumentou a atividade da SOD e da GSH-Px em cerebelo de ratos. A galactose na concentração de 10,0mM aumentou os níveis de TBA-RS no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, aumentou proteínas carboniladas e a atividade da CAT no córtex cerebral, aumentou a atividade da CAT e diminuiu a atividade da SOD no hipocampo e aumentou a atividade da SOD e da GSH-Px no cerebelo de ratos. Com relação à acetilcolinesterase, a galactose na concentração de 10,0mM reduziu a sua atividade no córtex cerebral de ratos. Os dados sugerem que a galactose altera as defesas antioxidantes, provoca danos a proteínas e induz peroxidação lipídica no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos. Os antioxidantes e glutationa preveniram as alterações causadas pela galactose no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos. Os dados indicam que a indução do estresse oxidativo é provavelmente mediada pela geração de radicais livres, uma vez que os antioxidantes impediram os efeitos causados pela galactose no córtex,

cerebelo e hipocampo de ratos. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o uso de antioxidantes deve ser considerado como uma estratégia terapêutica adjuvante para melhorar os danos causados pela galactose em pacientes com galactosemia.

PALAVRAS CHAVES: Galactosemia clássica, estresse oxidativo, colinesterases, estruturas cerebrais, ratos.

ABSTRACT

In the present study, the *in vitro* effects of galactose were evaluated on the thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), protein carbonyl content, total sulfhydryl content and on the activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and on the activity of acetylcholinesterase in hippocampus, cerebral cortex and cerebellum of Wistar rats of 30 days old. In addition, we tested the influence of trolox antioxidant, ascorbic acid and glutathione on the effects caused by galactose on the evaluated parameters. Untreated thirty day-old male Wistar rats were used. Galactose was added to the assay at final concentrations: 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM. The control group was performed without the addition of galactose. For prevention with trolox (alpha-tocopherol), ascorbic acid and glutathione, rats were divided into 8 groups: group 1 (control saline), group 2 (galactose), group 3 (control + 1.0mM trolox), group 4 (control + ascorbic acid 1.0mM), group 5 (control + 1.0mM glutathione), group 6 (galactose + 1.0mM trolox), Group 7 (galactose +1.0mM ascorbic acid) and group 8 (galactose + 1.0mM glutathione). Results showed that galactose at a concentration of 3.0mM enhanced TBA-RS levels in the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum of rats. The concentration of galactose in 5.0mM TBARS increased in the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum, increased carbonylated proteins in cerebral cortex, increased CAT activity in hippocampus and decreased the activity of SOD and GSH-Px in rat cerebellar. The galactose at a concentration of 10.0mM increased TBARS levels in the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum, increased protein carbonyls and CAT activity in the cerebral cortex, increased CAT activity and decreased SOD activity in hippocampus and increased the activity of SOD and GSH-Px in the rat cerebellum. With respect to acetylcholinesterase, galactose at a concentration of 10.0mM reduced its activity in the cerebral cortex of rats. Data suggest that galactose alters antioxidant defenses, causes damage to proteins and induces lipid peroxidation in the hippocampus, cerebral cortex and cerebellum of rats, however, in the presence of antioxidants and glutathione, most of these alterations caused by galactose in oxidative stress were prevented. Data indicate that oxidative stress induction is probably mediated by free radicals, since glutathione and antioxidants prevented the effects caused by galactose in the cortex, cerebellum and hippocampus of rats. The results obtained in this study indicate that

the use of antioxidants should be considered as an adjunctive strategy to improve the damage caused by galactose in patients with galactosemia

Keywords: classic galactosemia, oxidative stress, cholinesterase, brain structures, rats.

LISTA DE FIGURAS REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Metabolismo da galactose 20

Figura 2 - Reação de auto-oxidação.....26

Figura 3 - Reação de dismutação.....26

Figura 4 – Reação de Haber-Weiss.....26

Figura 5 – Reação em cadeia da lipoperoxidação.....30

Figura 6 - Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase.....32

Figura 7 - Reação catalisada pela enzima glutationa peroxidase.....33

Figura 8 – Reação de formação da glutationa peroxidase pela ação da enzima glutationa redutase.....33

Figura 9 - Reação de dismutação do radical superóxido.....34

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO GALACTOSEMIA

Figura 1 - *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) 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 30-day-old rats……...64

Figura 2 - *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on the activities of CAT (A), GSH-Px (B) and SOD (C) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30-day-old rats……..65

Figura 3 - *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on Acethylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30-day-old rats……..66

Figura 4 - *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione on TBA-RS in the cerebral cortex (A), cerebellum (B) and hippocampus (C) of 30-day-old rats, on protein carbonyl content in the cerebral cortex of 30-day-old rats (D), on CAT activity in the cerebral cortex (E) and hippocampus (F) of 30-day-old rats, on SOD activity in the cerebellum (G), on GSH-Px activity in the hippocampus (H) and cerebellum (I) and on AChE activity in the cerebral cortex (J) of 30-day-old rats……67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

BuChE – Butirilcolinesterase

CAT - Catalase

DTNB - Ácido Ditionitrobenzóico

EIM - Erro Inato do Metabolismo

GALK - Galactoquinase

GALE - UDP-galactose-4-epimerase

GALT - Galactose-1-fosfato-uridiltransferase

Gal-1-P – Galactose-1-fosfato

Gli-1-P – Glicose-1-fosfato

GSH - Glutationa

GSH-Px - Glutationa Peroxidase

GSSG - Glutationa Oxidada

$L^{\bullet}$- Radical Lipídico

LOO - Radical Peroxila

LOOH - Hidroperóxidos

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO - Óxido Nítrico

NO_2 – Dióxido de Nitrogênio

O_2 - Oxigênio

$O_2^{\bullet -}$ Radical Superóxido

$OH^{\bullet}$ - Radical Hidroxil

$ONOO^{-}$ - Ânion Peroxinitrito

ONOOH – Ácido Peroxinitroso

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio

RNS - Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

TBA-RS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

8-oxoG - 8-di-hidro-8-oxo-guanosina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS REFERENCIAL TEÓRICO

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO GALACTOSEMIA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS.....17
2.1 Objetivo geral.....17
2.2 Objetivos específicos.....17

3 REVISÃO.....18
3.1 Erros inatos do metabolismo.....18
3.2 Galactosemia.....19
3.3 Radicais livres.....23
3.4 Estresse oxidativo.....28
3.4.1 Mecanismos de dano celular por estresse oxidativo.....29
3.4.1.1 Ácidos nucleicos.....29
3.4.1.2 Lipídeos.....29
3.4.1.3 Proteínas.....30
3.5 Sistema de defesa antioxidante.....31
3.5.1 Enzimas antioxidantes.....32
3.5.2 Antioxidantes exógenos.....35
3.6 Acetilcolinesterase.....38

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....41
4.1 Animais.....41
4.2 Protocolo experimental.....41
4.2.1 Estudo *in vitro*.....41
4.2.2 Prevenção com trolox, ácido áscórbico e glutationa.....41
4.3 Estudos bioquímicos.....42
4.3.1 Preparação dos tecidos.....42
4.3.2 TBA-RS.....42
4.3.3 Catalase.....42
4.3.4 Gutationa peroxidase.....43
4.3.5 Superóxido dismutase.....43
4.3.6 Carbonilas.....43
4.3.7 Conteúdo total de sulfidrilas.....43
4.3.8 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase.....44
4.3.9 Dosagem de proteínas.....44
4.4 Análise estatística.....44

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....45
5.1 Artigo: Galactose alters markers of oxidative stress and achetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants……..…45

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....71

REFERÊNCIAS.....73

1 INTRODUÇÃO

Erros inatos do metabolismo (EIM) são alterações genéticas (Young & Woodside, 2001) (Chanprasert & Scaglia, 2015) caracterizadas por distúrbios metabólicos causados por ausência completa ou parcial de uma atividade enzimática que resulta não só em aumento no nível do substrato específico, mas também em alterações na concentração de vários constituintes metabólicos, e, possivelmente, na ativação de vias alternativas (Scolamiero *et al.* 2015), resultando no acúmulo de substâncias tóxicas que podem interferir nas funções normais dos órgãos e que podem causar insuficiência de sintetizar compostos essenciais (Chanprasert & Scaglia, 2015).

EIM podem estar presentes em qualquer idade - da vida fetal a velhice - e os sintomas variam entre os grupos bem como dentro dos grupos. Nem todos os EIM são facilmente diagnosticados, e não existe tratamento para muitos deles, embora muitos possam ser tratados alterando a dieta do paciente (Sahoo, Franzson, Jonsson, & Thiele, 2012).

A galactosemia clássica (tipo I) é uma doença genética rara causada pela deficiência na atividade da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) (EC 2.7.7.12), a qual está envolvida no metabolismo da galactose (Chiappori, Merelli, Milanesi, & Marabotti, 2013) (Viggiano et al., 2015). Essa enzima catalisa a conversão reversível da UDP-glicose e galactose-1-fosfato (Gal-1-P) a UDP-galactose e glicose-1-fosfato (Zou, 2007). Em pacientes galactosêmicos, a insuficiência da GALT não permite que estas reações prossigam, e, por conseguinte os substratos acumulam-se no interior das células (Chiappori *et al.* 2013) causando intoxicação devido ao acúmulo de galactose e de seus metabólitos (Mayatepek, Hoffmann, & Meissner, 2010).

O diagnóstico é feito pela detecção de galactose e Gal-1-P no sangue ou de galactose na urina e, é estabelecida por meio da avaliação das enzimas em células do sangue periférico (Tsakiris, Michelakakis, & Schulpis, 2005). A forma mais comum e clinicamente grave da doença é a galactosemia clássica (tipo I), que afeta cerca de 1/30.000 a 60.000 nascidos vivos (Zou, 2007) com uma prevalência de 1 em 47.000 na população branca (Viggiano *et al.* 2015).

Estudos mostram que os EIM estão associados ao estresse oxidativo o qual ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Uma vez que estes radicais livres são altamente reativos, o excesso de espécies reativas do oxigênio (ROS) pode prejudicar a integridade de diversas biomoléculas, incluindo importantes classes de macromoléculas tais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2014). Defeitos nos processos de reparação dos danos oxidativos acumulados pode contribuir para o desenvolvimento de doença e no processo de envelhecimento (Halliwell, 2013). Para proteger os sistemas biológicos da toxicidade dos radicais livres, vários mecanismos de defesa antioxidante mantem a produção de ROS em cheque, incluindo vias enzimáticas e não enzimáticas (Wu, Kosten, & Zhang, 2013).

A galactosemia clássica causa danos neurológicos e a acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel importante na manutenção da integridade e permeabilidade da membrana durante a transmissão e condução sináptica (Marinou, Tsakiris, Tsopanakis, Schulpis, & Behrakis, 2005). A AChE nas terminações nervosas é alvo molecular de muitas substâncias. Quando a enzima é bloqueada por essas substâncias não ocorre hidrólise da acetilcolina (ACh). Assim, a ação da ACh é reforçada e ocasiona efeitos tóxicos envolvendo o sistema simpático e parassimpático e o sistema nervoso central. Estudos recentes relataram que a galactosemia *in vitro* resultou em uma inibição da atividade da AChE, tanto na enzima pura como em homogeneizados de cérebro (Marinou *et al.* 2005).

Considerando que a disfunção neurológica característica da hipergalactosemia é pouco conhecida, que a doença causa dificuldades cognitivas e problemas de memória em humanos, que a atividade da acetilcolinesterase é essencial para a cognição, que os EIM estão associados ao estresse oxidativo, este trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* da galactose sobre parâmetros de estresse oxidativo, como: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), proteínas carboniladas, conteúdo total de sulfidrilas e sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD). Em adição investigou-se os efeitos *in vitro* da galactose sobre a atividade da acetilcolinesterase nas estruturas utilizadas nas análises. Posteriormente investigou-se a influência dos antioxidantes trolox (alfa-tocoferol),

ácido ascórbico e glutationa sobre os efeitos causados pela galactose nos parâmetros estudados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos *in vitro* da galactose e a influência dos antioxidantes trolox (α-tocoferol), ácido ascórbico e glutationa sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de ratos de 30 dias de idade.

2.2 Objetivos específicos

1) Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose (0,1mM, 3,0mM, 5,0mM e 10,0mM) sobre os níveis de TBA-RS, proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de idade;

2) Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose (0,1mM, 3,0mM, 5,0mM e 10,0mM) sobre a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase) em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de idade;

3) Verificar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de galactose (0,1mM, 3,0mM, 5,0mM e 10,0mM) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de idade;

4) Investigar a influência dos antioxidantes trolox (α-tocoferol), ácido ascórbico e glutationa sobre os efeitos *in vitro* da galactose sobre o TBA-RS, proteínas carboniladas, conteúdo total de sulfidrilas, atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase) e atividade da acetilcolinesterase em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo de ratos.

3 REVISÃO

3.1 Erros inatos do metabolismo

O termo "erros inatos do metabolismo" (EIM), que também é chamado de doenças metabólicas congênitas ou doenças metabólicas hereditárias foi descrito pela primeira vez por um médico britânico Archibald Garrod (1857-1936) para descrever a deficiência hereditária ou alteração em reações enzimáticas no início do século 20. Estas resultam em acúmulo de substrato e provocam moderados a graves sintomas clínicos, principalmente com sintomas neurológicos e psiquiátricos, que muitas vezes levam à morte ou a uma vida de invalidez (Low, 1996).

EIM é um grupo de doenças genéticas, caracterizado por um processamento anormal de reações bioquímicas, resultando no acúmulo de substâncias tóxicas que podem interferir com as funções normais dos órgãos, e insuficiência de sintetizar compostos essenciais. EIM são individualmente raros, mas coletivamente numerosos. As apresentações clínicas cobrem um espectro amplo e podem envolver praticamente qualquer sistema de órgãos (Chanprasert & Scaglia, 2015).

Muitos EIM causam graves consequências clínicas para o recém-nascido afetado, e um diagnóstico precoce permite o tratamento pré sintomático de doentes para prevenir sequelas permanentes graves e, em alguns casos a morte. A maioria dos distúrbios metabólicos é causada por ausência completa ou parcial de uma atividade enzimática que resulta não só em 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).

EIM não são doenças raras quando observamos sua incidência cumulativa, que é cerca de 1 em cada 5.000 nascidos vivos. No entanto, a prevalência de cada doença tem muitas variáveis, especialmente em relação a raça (Martins, 1999).

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 sobrevida. 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).

Dessa forma, os EIM podem estar presentes em qualquer idade - da vida fetal a velhice - e os sintomas variam entre os grupos bem como dentro dos grupos. Nem todos os EIM são facilmente diagnosticados, e não existe tratamento para muitos deles, embora muitas doenças possam ser tratadas alterando a dieta do paciente. Nos últimos anos tem-se analisado os EIM sobre vários aspectos, incluindo os programas de triagem de recém-nascidos, aumentando assim sua importância e o interesse geral na compreensão das bases moleculares dos EIM (Sahoo *et al.* 2012).

A base molecular de alterações bioquímicas em doenças metabólicas hereditárias são mutações genéticas em *loci* enzimático que afetam a ativação de proteínas ou cofatores de enzimas, proteínas de transporte, sistemas de transporte ou marcadores de reconhecimento (Martins, 1999).

Com a identificação de enzimas específicas e vias metabólicas, doenças metabólicas podem ser diagnosticadas em muitos casos com testes bioquímicos do sangue e com triagem metabólica da urina, tal como o teste de cloreto férrico, teste de Rothera, teste Cetavlon, teste de Cianeto nitroprussiato, etc. No entanto, a caracterização completa da condição particular geralmente envolve estudos mais específicos, tais como ensaios enzimáticos, análise de DNA e estudos de família (Low, 1996).

O diagnóstico rápido é muito importante para impedir que os sintomas se agravem. Assim, a triagem neonatal é fundamental para o diagnóstico em fase pré-clínica, prevenindo o dano neurológico e em alguns casos a morte do paciente. De acordo com a literatura cerca de 30% dos EIM cursam com anormalidades neurológicas (Souza, Martins, D'Almeida, & Silva, 2007).

3.2 Galactosemia

A galactosemia clássica (tipo I) é uma doença genética rara causada pela deficiência na atividade da enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) (EC 2.7.7.12), a qual está envolvida no metabolismo de galactose (Chiappori *et al.* 2013)

(Viggiano et al., 2015). Essa enzima catalisa a conversão reversível de UDP-glicose e galactose-1-fosfato (gal-1-P) a UDP-galactose e glicose-1-fosfato (gli-1-P) (Zou, 2007) (Figura 1).

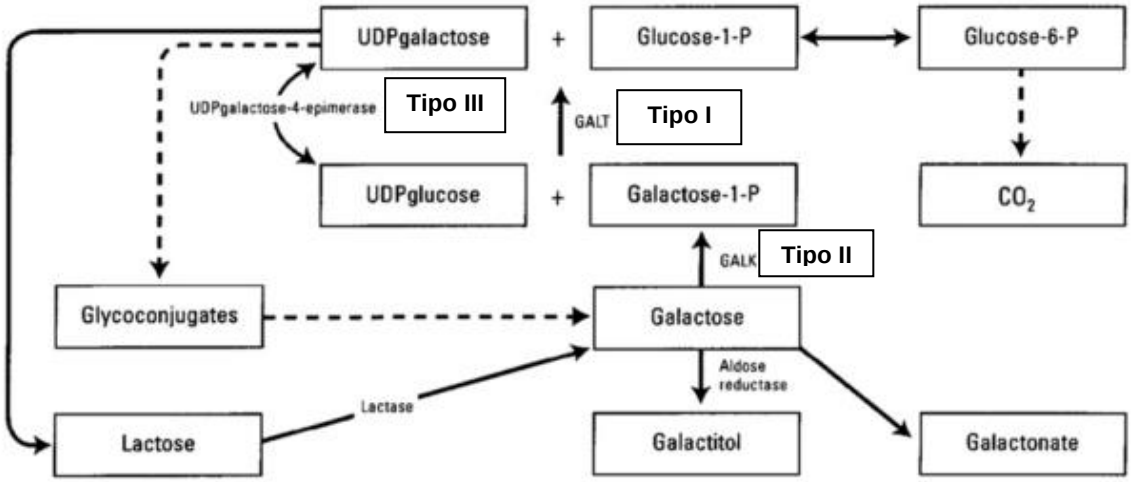


Figura 1. Metabolismo da galactose (Berry, 2012).

A galactosemia resulta da incapacidade de metabolizar a galactose e seus derivados. A primeira causa desta deficiência identificada foi a mutação do gene que codifica a enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT, EC 2.7.7.12) na via de Leloir. Esta forma de galactosemia é a mais comum e é conhecida como galactosemia tipo I. Existem duas outras variantes da doença, uma causada pela deficiência da enzima galactoquinase (GALK 1; EC 2.7.1.6) que resulta em galactosemia tipo II, que é a forma mais branda da doença e a outra causada por mutações no gene que codifica a enzima UDP-galactose 4'epimerase, que resulta na galactosemia tipo III (Gale; EC 5.1.3.2) (McCorvie & Timson, 2011).

A forma mais comum e clinicamente grave da doença é a galactosemia clássica (tipo I), que afeta cerca de 1/30.000 a 60.000 nascidos vivos (Zou, 2007) com uma prevalência de 1 em 47.000 na população branca (Viggiano *et al*. 2015).

Na ausência da galactosemia, a enzima GALT converte gal-1-P em gli-1-P, que pode subsequentemente entrar na via glicolítica. No entanto, em pacientes com galactosemia não tratados, a insuficiência da enzima GALT não permite que estas reações prossigam, e, por conseguinte, gal-1-P acumula no interior das células. Algumas hipóteses têm sido sugeridas sobre a possível interferência da gal-1-P na atividade de várias enzimas do metabolismo de carboidratos (Chiappori *et al.* 2013).

De acordo com Berry (2012) existem três formas básicas de deficiência de GALT: a galactosemia clássica; a galactosemia variante clínica; e a galactosemia variante bioquímica. O genótipo tipificado na clássica é caracterizado por Q188R/Q188R, na variante clínica por S135L/S135L e na variante bioquímica pelo N314D/Q188R. Porém, a maioria dos laboratórios não faz distinção entre pacientes das variantes clássica e clínica, e todas são agrupadas na galactosemia clássica.

A enzima GALT está localizado no cromossomo 9p13, disposto em 11 exons que medem cerca de 4,0 kb de sequência genômica, e codifica um polipeptídeo de 379 aminoácidos. A galactosemia clássica exibe grande heterogeneidade de alelos com 4.260 variações descritas (Coelho *et al.* 2015).

Dados da literatura mostram que tanto pacientes tratados como não tratados possuem acúmulo anormal e/ou depleção de metabólitos específicos, e que estes pacientes demonstram ainda anormalidades específicas de glicosilação, apesar da restrição dietética prolongada de galactose, oferecendo a possibilidade de que a biossíntese anormal de glicoproteínas e/ou glicolipídeos pode contribuir não só para a fase aguda, mas também para algumas das complicações a longo prazo (Zou, 2007).

De acordo com Zou (2007), metabólitos específicos como a galactose, gal-1-P, galactitol e inositol apresentam níveis anormais nos hemolisados e/ou tecidos de pacientes não tratados com galactosemia clássica. Na doença também ocorre a formação de galactonato, porém é excretado na urina e não se acumula nos tecidos.

Em 1995, Gitzelmann sugeriu que o aumento intracelular de gal-1-P poderia inibir a atividade de enzimas importantes, como a glicose-6-fosfatase, fosfoglicomutase, glicogênio fosforilase hepática, UDP-glicose pirofosforilase e glicose-6-fosfato desidrogenase, interferindo dessa forma no metabolismo. Estudos realizados por Gitzelmann (1995) também mostraram que após restrição dietética de galactose, os pacientes com galactosemia clássica apresentaram valores de gal-1-P frequentemente fora do intervalo normal (>5mM em pacientes não tratados, 0,1mM em pacientes tratados, sendo esses valores indetectáveis em indivíduos normais) (Gitzelmann, 1995).

Além disso, observa-se na literatura que concentrações elevadas de gal-1-P inibe o crescimento celular em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é utilizada como organismo modelo para esta patologia (Chiappori *et al.* 2013).

Com relação ao tratamento, Mason e Turner (1935) foram os primeiros a relatar o sucesso do uso de uma dieta isenta de leite em uma criança com galactosemia. Na década de 1950, diferentes estratégias para alimentar crianças com uma dieta sem galactose foram citados na literatura (Bosch, 2011). Por outro lado, 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 (NBS) para galactosemia, raramente tem se encontrado recém-nascidos em estágios críticos da doença (Berry, 2012).

A subtração de galactose da dieta do paciente é o único tratamento atualmente aplicável, mas isto não é suficiente visto que a galactose é também produzida endogenamente, por exemplo, a partir do *turnover* de glicolipídeos e glicoproteínas. No entanto, a galactose não parece ser o principal responsável pela evolução clínica da galactosemia clássica, pois pacientes galactosêmicos acumulam principalmente gal-1-P nas suas células. Este fenômeno é considerado como a principal causa dos sintomas crônicos de pacientes com galactosemia clássica (Chiappori *et al*. 2013).

Embora geralmente assintomática no momento do nascimento, os pacientes com galactosemia clássica desenvolvem sintomas crescentes após a exposição a uma dieta à base de leite. Na ausência de intervenção, estes sintomas, que incluem vômitos, diarréia, catarata, hepatomegalia e sepse por *E. coli*, podem levar à morte neonatal. Ao longo da vida a restrição dietética de galactose, padrão atual de tratamento, alivia ou previne esses sintomas agudos e potencialmente letais; no entanto, muitos pacientes com galactosemia clássica passam a desenvolver complicações graves a longo prazo. Os problemas mais comuns incluem deficiências cognitivas em 30-50% de todos os pacientes e insuficiência ovariana primária ou prematura em 85% dos pacientes do sexo feminino. Outras complicações incluem a doença atáxica neurológica, retardo de crescimento e diminuição da densidade óssea (Zou, 2007).

O diagnóstico é feito pela detecção de galactose e gal-1-P no sangue ou galactose na urina e, é estabelecida por meio da avaliação das enzimas em células do sangue periférico (Tsakiris *et al*. 2005).

Tipicamente, os sintomas clínicos ocorrem dentro dos primeiros dias de vida. Recém-nascidos não tratados com deficiência de GALT são intoxicados por galactose e seus metabólitos, galactose-1-fosfato e galactitol. Na ausência de intervenção, a função hepática é severamente perturbada e distúrbios de coagulação e icterícia podem aparecer no início da vida. A formação de catarata parece ser devido à formação de galactitol. Em mulheres com galactosemia, observa-se insuficiência ovariana em mais de 75% delas. Também pode ocorrer hipogonadismo hipergonadotrófico, por exemplo, como amenorréia e, se suspeita de dano ovariano pré-natal. Devido às suas restrições alimentares pacientes com deficiência de GALT tem um maior risco de desenvolver osteoporose ao longo da vida. Nas mulheres com hipogonadismo hipergonadotrófico este risco é ainda mais acentuado (Mayatepek *et al*. 2010).

Os sintomas neurológicos na galactosemia podem incluir ataxia, tremor, apraxia de fala e déficit cognitivo. 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).

3.3 Radicais Livres

Um radical livre pode ser definido como um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não emparelhados em órbita exterior e que seja capaz de existência independente. 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. Assim, 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 et al.* 2014).

O oxigênio é um elemento indispensável para a vida. Quando as células utilizam oxigênio para gerar energia, os radicais livres são formados como

consequência da produção de ATP (adenosina trifosfato) pelas mitocôndrias. Estes subprodutos são geralmente espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como espécies reativas de nitrogênio (RNS) que resultam do processo redox celular. Estas espécies desempenham um duplo papel sendo ambos compostos tóxicos e benéficos. O equilíbrio entre seus dois efeitos antagônicos é claramente um aspecto importante da vida (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008).

Muitos tipos de ROS (incluindo o $OH^{\bullet}$) são formados *in vivo* e causam danos às biomoléculas (dano oxidativo). Tal dano ocorre constantemente *in vivo*, e as células devem repará-los ou substituir as moléculas danificadas (lipídeos, proteínas em maior número e RNA em menor número). Defeitos nos processos de reparação dos danos oxidativos acumulados podem contribuir para o desenvolvimento de doença e no processo de envelhecimento (Halliwell, 2013).

ROS possuem propriedades químicas especiais. O radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) é reativo com quase todas as biomoléculas, enquanto o superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e óxido nítrico (NO) são radicais muito mais seletivos. Não existe um antioxidante universal; cada um reage de uma maneira diferente com diferentes ROS para gerar produtos finais de reatividade distinta (Halliwell, 2013).

A formação de ROS e RNS pode ocorrer nas células por duas formas: as reações enzimáticas e não enzimáticas. As reações enzimáticas que geram radicais livres incluem aquelas envolvidas na cadeia respiratória, na fagocitose, na síntese de prostaglandinas e no sistema do citocromo P450. Os radicais livres podem ser produzidos também a partir de reações não enzimáticas que ocorrem entre o oxigênio e compostos orgânicos, as quais se iniciam por radiações ionizantes. O processo não enzimático também pode ocorrer durante a fosforilação oxidativa (respiração aeróbica) na mitocôndria (Pham-Huy *et al.* 2008).

A maioria das células *in vivo* em animais são expostas a baixas concentrações de O_2, no nível de 1-10,0mmHg, embora haja exceções (incluindo epiderme da pele, córnea do olho, e as células que revestem o trato respiratório). Quando ocorrer aumento do consumo de O_2 tem-se um aumento na produção de ROS. Dependendo da magnitude e do tempo de curso, aumento da produção de ROS pode causar aumento da proliferação celular, cessar a proliferação, ou levar a senescência, a morte celular, ou adaptação. Mesmo nas células que se adaptam e

proliferam, as suas propriedades são susceptíveis de serem alteradas (por exemplo, alterações na morfologia e função mitocondrial) (Halliwell, 2014).

Em níveis baixos ou moderados, as ROS e RNS exercem efeitos benéficos sobre as respostas celulares e função imunológica. Em concentrações elevadas, eles geram o estresse oxidativo, um processo deletério que pode danificar todas as estruturas celulares (Young & Woodside, 2001).

O excesso de ROS pode prejudicar a integridade das diversas biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e DNA que conduzem 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 *et al.* 2014).

3.3.1 Propriedades dos Radicais Livres

Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O radical superóxido é o mais importante das ROS 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. É principalmente produzido dentro das mitocôndrias e a sua reatividade com as biomoléculas é baixa. As enzimas que podem produzir superóxido incluem a xantina oxidase, lipoxigenase, ciclo-oxigenase e oxidases dependentes de NADPH. Pode existir em duas formas, tais como $O_2^{\bullet-}$ ou radical hidroperoxil (HO_2) em pH baixo. O radical hidroperoxil é a forma mais importante e pode facilmente entrar na bicamada fosfolipídica onde muda para forma carregada ($O_2^{\bullet-}$). Sob pH fisiológico a forma mais comum é o superóxido, 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 *et al.* 2014) (Figura 2).

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

$$O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \text{(auto-oxidation)}$$

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).

$$O_2 + O_2^{\bullet -} + 2H_2O \xrightarrow{\text{Cu,Zn,Mn-SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Figura 3. Reação de dismutação (Phaniendra, Jestadi, Periyasamy, 2014).

Radical Hidroxil ($OH^{\bullet}$)

O $OH^{\bullet}$ é a forma neutra do íon hidróxido e é um radical livre altamente reativo. Pode reagir fortemente com moléculas orgânicas e inorgânicas, incluindo DNA, proteínas, lípideos e carboidratos e causar danos graves para as células como nenhuma outra ROS pode fazer. Ele é formado na reação de Fenton, em que o H_2O_2 reage com os íons de metais (Fe^{+2} ou Cu^{+}), frequentemente ligados em complexo com diferentes proteínas tais como a ferritina (uma proteína intracelular que armazena ferro) e ceruloplasmina (proteína do plasma transportadora de cobre) ou outras moléculas. Sobre condições de estresse, um excesso de $O_2^{\bullet -}$ libera ferro livre da ferritina e este ferro livre participa na reação de Fenton para formar $OH^{\bullet}$. Ele é também formado pela reação entre o radical superóxido e o H_2O_2 em uma reação denominada Haber-Weiss (Phaniendra *et al*. 2014) (Figura 4).

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\bullet} + OH^- \text{(Fenton reaction)}$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^- \text{(Haber-Weiss reaction)}$$

Figura 4. Reação de Haber-Weiss (Phaniendra, Jestadi, Periyasamy, 2014).

Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é formado *in vivo* numa reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Não é um radical livre, mas pode causar dano à célula em concentração relativamente baixa (10µM), porém em níveis mais elevados pode inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Essa ERO pode facilmente penetrar nas membranas biológicas. O H_2O_2 não tem efeito direto no DNA, mas pode danificar o DNA através da produção de $OH^{\bullet}$ na presença de íons de metais de transição. As principais enzimas antioxidantes que podem eliminar o H_2O_2 incluem a catalase, glutationa-peroxidase e as peroxirredoxinas (Phaniendra *et al*. 2014).

Radical Peroxil ($ROO^{\bullet}$)

O $ROO^{\bullet}$ é derivado de oxigênio em sistemas vivos. A forma mais simples de $ROO^{\bullet}$ é o radical peridroxil ($HOO^{\bullet}$) que é formado pela protonação do superóxido. Cerca de 0,3% do total de $O_2^{\bullet-}$ no citosol de uma célula típica está na forma protonada. Ele inicia a peroxidação de ácidos graxos e também pode promover o desenvolvimento de tumor (Phaniendra *et al.* 2014).

Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)

O $ONOO^{\bullet}$ é formado pela reação entre o $O_2^{\bullet-}$ e NO. É altamente tóxico e pode reagir diretamente com o CO_2 para formar outro peroxi carboxilato nitroso altamente reativo ($ONOOCO_2^{\bullet}$) ou ácido peroxinitroso (ONOOH). O ONOOH sofre uma ruptura homolítica formando $OH^{\bullet}$ e dióxido de nitrogênio (NO_2) ou se rearranja para formar nitrato (NO_3). O $OONO^{\bullet}$ 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 peroxinitrito (Phaniendra *et al*. 2014).

3.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre em consequência de um controle oxidação-redução (redox) anormal, quando há o excesso de produção de ROS e/ou insuficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes. No estado redox balanceado com níveis de ROS adequadas, ROS são necessárias e benéficas para a função fisiológica normal. Elas podem proteger a célula contra infecções destruindo patógenos invasores em locais de inflamação; desempenham papel fisiológico como mensageiros secundários na regulação do funcionamento de células cardíacas e vasculares; e estão envolvidas na regulação da concentração de cálcio intracelular, na fosforilação e/ou desfosforilação de proteínas e na ativação de fatores de transcrição (Wu *et al.* 2013).

Por outro lado, o excesso de ROS pode ter efeitos prejudiciais, pois tem como alvos componentes celulares incluindo macromoléculas importantes, tais como DNA, proteínas e lípideos. As ROS podem perturbar a manutenção do estado normal de adenina e de nucleotídeos de piridina, o que pode afetar a viabilidade do DNA, introduzir mutações e modificar a expressão gênica. Oxidação da proteína por ROS pode levar a perda de grupos sulfidrilas e modificações de aminoácidos que tornam as proteínas não funcionais (Stadtman & Levine, 2003). As ROS também podem causar dano peroxidativo de lipídeos resultando em danos para a membrana celular, bem como para as organelas celulares (Wu *et al.* 2013).

Os principais componentes de membrana, fosfolipídeos e ácidos graxos poliinsaturados, são altamente suscetíveis à agressão dos radicais livres e a auto-oxidação, os quais geram radicais peróxidos dentro de membranas, resultando em estruturas de membrana instáveis, alteração da fluidez e permeabilidade da membrana e transdução de sinal prejudicada. Além disso, os hidroperóxidos podem decompor-se a espécies tóxicas, tais como o malondialdeído (MDA), o que também conduzem a múltiplas consequências patológicas na membrana celular (Wu *et al.* 2013).

3.4.1 Mecanismos de Dano Celular por Estresse Oxidativo

Quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, ocorre aumento nas concentrações de radicais livres levando ao estresse oxidativo. Uma vez que estes radicais livres são altamente reativos, eles podem danificar classes de moléculas biológicas incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Phaniendra *et al.* 2014).

3.4.1.1 Ácidos Nucleicos

As ROS/RNS podem danificar oxidativamente os ácidos nucleicos. O DNA mitocondrial é mais vulnerável ao ataque de ROS do que o DNA nuclear porque está localizado próximo do local gerador de ROS. O mais importante, o radical $OH^{\bullet}$ reage diretamente com todos os componentes do DNA, tais como as bases purínicas e pirimidínicas e o açúcar desoxirribose, causando certo número de alternâncias como quebras em cadeia simples e dupla do DNA. O radical $OH^{\bullet}$ abstrai átomos de hidrogênio para produzir uma série de bases de purinas bem como de pirimidinas modificadas, subprodutos e ligações cruzadas de proteínas no DNA *(*Phaniendra *et al.* 2014).

As ROS também podem atacar diferentes RNAs produzidos no corpo. O RNA é mais propenso a danos oxidativos do que o DNA, devido à sua natureza de cadeia simples, a falta de um mecanismo de reparo ativo para o RNA oxidado e devido menor proteção por proteínas do que o DNA. Além disso, esses RNAs citoplasmáticos estão localizados em estreita proximidade com as mitocôndrias onde as ROS são produzidas. 8-di-hidro-8-oxo-guanosina (8-oxoG) é o produto mais estudado de dano ao RNA e os seus níveis são elevados em várias condições patológicas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, hemocromatose e miopatias (Phaniendra *et al.* 2014).

3.4.1.2 Lipídeos

Os lipídeos da membrana, particularmente os resíduos de ácidos graxos poli-insaturados de fosfolipídeos são mais susceptíveis à oxidação por radicais livres. A

peroxidação lipídica resulta na perda de função da membrana, por exemplo, diminuição da fluidez e na inativação de enzimas ligadas à membrana e receptores. A peroxidação dos lipídeos é iniciada 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 ($L^{\bullet}$). O radical lipídico pode reagir com moléculas de oxigênio para formar um radical lipídico peroxila ($LOO^{\bullet}$). O radical peroxila resultante ($LOO^{\bullet}$) irá sofrer um rearranjo através de uma reação de ciclização para formar os endoperóxidos, que finalmente formam o malondialdeído (MDA) e 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 *et al.* 2014) (Figura 5).

$$LH + OH^{\bullet} \text{ (ou } LO^{\bullet}) \longrightarrow L^{\bullet} + H_2O \text{ (ou LOH)} \quad \textbf{Iniciação}$$
$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet} \quad \textbf{Propagação}$$
$$LH + LOO^{\bullet} \longrightarrow L^{\bullet} + LOOH \quad \textbf{Propagação}$$
$$LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LOOL \quad \textbf{Terminação}$$
$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOL + O_2 \quad \textbf{Terminação}$$

Figura 5. Reação em cadeia da lipoperoxidação onde L representa o lipídio (Ferreira; Matsubara, 1997)

3.4.1.3 Proteínas

A oxidação de proteínas pode ser induzida por espécies de radicais, tais como $O_2^{\bullet}$-, $OH^{\bullet}$, $ROO^{\bullet}$, alcoxila, hydroperoxil, bem como por espécies não-radicais, tais como H_2O_2, O_3, HOCl, oxigênio singlet, $OONO^{-}$. As ROS oxidam diferentes aminoácidos presentes em proteínas, provocando a formação de ligações cruzadas de proteína-proteína, o que resulta na desnaturação e perda da função de proteínas, perda de atividade enzimática, perda de função dos receptores e de proteínas de transporte (Phaniendra *et al*. 2014).

Os aminoácidos como metionina e cisteína são mais susceptíveis a oxidação por ROS e são convertidos em dissulfuretos e sulfóxido de metionina respectivamente (Phaniendra *et al*. 2014).

3.5 Sistemas de defesa antioxidante

Para proteger os sistemas biológicos de toxicidade dos radicais livres, mecanismos de defesa antioxidante mantêm os níveis de ROS em equilíbrio *(Wu et al.* 2013). Os mecanismos antioxidantes podem ser enzimáticos (incluindo catalases, superóxido e peroxidases) ou não enzimáticos (tal como a vitamina A, C ou E) e são essenciais para proteger as células contra danos induzidos por ROS, tanto no estado de equilíbrio quanto sobre o estresse oxidativo (Oakley, Abbott, Li, & Engelhardt, 2009).

As enzimas antioxidantes primárias contra os radicais $O_2^{\bullet-}$ incluem superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), e glutationa 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 $O_2^{\bullet-}$ e $OH^{\bullet}$, o $O_2^{\bullet-}$ 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 $OH^{\bullet}$ (Wu *et al.* 2013).

Em adição a CAT, a GSH-Px é uma enzima antioxidante intracelular bem conhecida que converte os peróxidos e $OH^{\bullet}$ em formas não tóxicas, em conjunto com a oxidação da glutationa reduzida (GSH) para formar a glutationa dissulfeto (GSSG). GSSG é então convertida novamente em GSH pela glutationa redutase (GR) (Wu *et al*. 2013).

Outras enzimas que ajudam na desintoxicação de ROS também constituem uma defesa antioxidante importante. Por exemplo, glutationa-S-transferase catalisa a conjugação da GSH para centros eletrofílicos em uma ampla variedade de substratos, por meio de um grupo sulfidrila, o que diminui os níveis de peróxido.

Além disso, a maior contribuição para a capacidade total antioxidante vem de moléculas antioxidantes no plasma. Os componentes antioxidantes não enzimáticos consistem em moléculas que interagem com ROS e terminam a cadeia de reações dos radicais livres. Existem várias moléculas antioxidantes no plasma, tais como albumina, ácido úrico e ácido ascórbico, que correspondem a 85% do total da capacidade antioxidante. Outros antioxidantes presentes no sangue incluem a bilirrubina, α-tocoferol e β-caroteno (Wu *et al.* 2013).

Considerando que os radicais de oxigênio e outras ROS desempenham papel em muitas doenças humanas, causando dano oxidativo e que diminuir o dano oxidativo irá retardar ou impedir o desenvolvimento da doença, a suplementação com antioxidantes, em alimentos ou em comprimidos, tem sido indicada (Haliwell, 2013). Porém as defesas antioxidantes sintetizadas endogenamente são mais importantes para os seres humanos do que aportes de vitaminas E, C, carotenóides ou flavonóides. Assim, os agentes que desafiam nossos sistemas de adaptação e provocam elevações em defesas antioxidantes endógenas e outros sistemas de proteção podem acabar por ser mais protetor contra danos nos tecidos devido ao estresse oxidativo do que o consumo de grandes quantidades de vitaminas (Halliwell, 2012).

3.5.1 Antioxidantes Endógenos

CATALASE

A catalase foi a primeira enzima antioxidante a ser caracterizada, e catalisa as duas etapas da conversão de H_2O_2 em água e oxigênio (Figura 6):

$$\textbf{catalase-Fe(III)} + H_2O_2 \rightarrow \textbf{composto I}$$
$$\textbf{composto I} + H_2O_2 \rightarrow \textbf{catalase-Fe(III)} + 2H_2O + O_2$$

Figura 6. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (Young, Woodside, 2001).

A catalase é constituída por quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um grupo heme e uma molécula de NADPH. A constante de velocidade para as reações descritas acima é extremamente elevada (~107M/seg), o que implica que é praticamente impossível saturar a enzima *in vivo*. A catalase é amplamente localizada em peroxissomos no interior das células, que também contêm a maior parte das enzimas capazes de gerar H_2O_2. A quantidade de catalase no citoplasma e em outros compartimentos subcelulares permanece pouco clara, porque os peroxissomos são facilmente rompidos durante a manipulação de células. A maior atividade está presente no fígado e eritrócitos, mas a catalase é encontrada em todos os tecidos (Young & Woodside, 2001).

GLUTATIONA PEROXIDASE

Glutationa peroxidases catalisam a oxidação de glutationa à custa de um hidroperóxido, que pode ser H_2O_2 ou outra espécie, como um hidroperóxido de lipídeo (Figura 7):

$$\mathbf{ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH}$$

Figura 7. Reação glutationa peroxidase (Young, Woodside, 2001).

Outros peróxidos, incluindo, hidroperóxidos de lipídeos também podem atuar como substratos para estas enzimas, que podem, por conseguinte, desempenhar um papel na reparação de danos resultantes da peroxidação lipídica. Glutationa peroxidases requerem selênio no centro ativo, e deficiência pode ocorrer na presença de uma falta grave de selênio. Várias enzimas glutationa peroxidases são codificadas por genes distintos.

A forma plasmática da enzima glutationa peroxidase acredita-se ser sintetizada principalmente no rim. Dentro das células, as concentrações mais elevadas são encontradas no fígado, embora a glutationa peroxidase esteja amplamente distribuída em quase todos os tecidos. A distribuição subcelular predominante está no citosol e mitocôndria, sugerindo que a glutationa peroxidase é o principal captador de H_2O_2 nestes compartimentos subcelulares. A atividade da enzima depende da disponibilidade de glutationa reduzida. A proporção de glutationa reduzida/oxidada é geralmente mantida muito alta, como resultado da atividade da enzima glutationa redutase (Figura 8):

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Figura 8. Reação da enzima glutationa redutase (Young, Woodside, 2001).

O NADPH necessário para a atividade desta enzima para reabastecer o fornecimento de glutationa reduzida é fornecido pela via da pentose fosfato. Qualquer via que utiliza NADPH (como a via da aldose-redutase) pode conduzir a uma deficiência de glutationa reduzida e, portanto, prejudicar a ação da glutationa

peroxidase. A glutationa redutase tem uma distribuição nos tecidos semelhante a glutationa-peroxidase (Young & Woodside, 2001).

SUPERÓXIDO DISMUTASE

A superóxido dismutase catalisa a dismutação de superóxido em H_2O_2 (Figura 9).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Figura 9. Reação de dismutação do radical superóxido (Young, Woodside, 2001).

O H_2O_2 deve ser removido pela catalase ou glutationa peroxidase, como descrito acima. Existem três formas de superóxido dismutase em tecidos de mamíferos, cada um com um local subcelular específico e distribuição diferente nos tecidos.

(1) cobre zinco superóxido dismutase (CuZn-SOD): CuZnSOD encontra-se no citoplasma e organelas de praticamente todas as células de mamíferos. Tem uma massa molecular de aproximadamente 32 000 kDa e possui duas subunidades protéicas, cada uma contendo um átomo de cobre e zinco cataliticamente ativo.

(2) manganês superóxido dismutase (MnSOD): MnSOD é encontrada na mitocôndria de quase todas as células e tem uma massa molecular de 40 000 kDa. É constituída por quatro subunidades protéicas, cada uma provavelmente contendo um único átomo de manganês. A sequência de aminoácidos da MnSOD é totalmente diferente da CuZnSOD e não é inibida por cianeto, permitindo que a atividade da MnSOD possa ser distinguida da atividade de CuZnSOD.

(3) superóxido dismutase extracelular (EC-SOD): EC-SOD foi descrita por Marklund em 1982 e é um secretor de cobre e de zinco contendo SOD distinta da CuZnSOD descrita acima. EC-SOD é sintetizada apenas por alguns tipos de células, incluindo fibroblastos e células endoteliais, e é expressa na superfície da célula, onde é ligada a sulfatos de heparano. EC-SOD é a principal SOD detectável em fluidos extracelulares e é liberada para a

circulação pela superfície do endotélio vascular por ação da heparina. EC-SOD pode desempenhar um papel na regulação do tônus vascular, porque o fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico ou um composto intimamente relacionado) é neutralizado no plasma pela superóxido (Young & Woodside, 2001).

3.5.2 Antioxidantes exógenos

VITAMINA E

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel com elevado poder antioxidante. A vitamina E é um composto quiral com oito estereoisômeros: α, β, γ, δ tocoferol e α, β, γ, δ tocotrienol. 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 *et al.* 2008).

A administração de vitamina E tem sido proposta para a prevenção de câncer do cólon, próstata e mama, algumas doenças cardiovasculares, isquemia, catarata, artrite e certos distúrbios neurológicos. No entanto, um estudo recente revelou que doses diárias de α-tocoferol de 400 UI ou mais pode aumentar o risco de morte e deve ser evitado. Em contraste, não há um aumento do risco de morte com uma dose de 200 UI por dia ou menos, e pode mesmo haver algum beneficio. Embora controversa, a suplementação de vitamina E a longo prazo em doses elevadas exige cuidado até que uma evidência satisfatória de segurança esteja disponível. As fontes alimentares de vitamina E são os óleos vegetais, óleo de gérmen de trigo, grãos integrais, nozes, cereais, frutas, ovos, aves e carne (Pham-Huy *et al*. 2008).

Estudos indicam que em membranas celulares e lipoproteínas a função antioxidante da vitamina E é capturar radicais $ROO^{\bullet}$ para impedir a reação em cadeia da peroxidação lipídica. A vitamina E não irá impedir a formação inicial de radicais em um ambiente rico em lípideos, mas irá minimizar a formação de radicais secundários. O α-tocoferol reage rapidamente com o $ROO^{\bullet}$ para formar um radical relativamente estável, o radical tocoferoxila. O α-tocoferol pode ser regenerado por meio de reação na interface aquosa com o ácido ascórbico ou outro antioxidante que

quebre a cadeia de fase aquosa, tais como a glutationa reduzida ou o urato (Young & Woodside, 2001).

Dados na literatura mostram que as ROS contribuem significativamente para a origem e progressão do câncer (Halliwell, 2012) e de doenças neurodegenerativas, em especial a doença de Alzheimer. Para a demência, a conclusão não é tão certa; há alguma evidência consistente com eficácia limitada de vitamina E em retardar a progressão da demência, mas é muito inconclusivo. Dados indicam que a suplementação de vitamina E tem grande dificuldade em aumentar os seus níveis no cérebro, porém pesquisas sugerem que talvez em maior concentração a vitamina E poderia ter uma maior eficácia (Halliwell, 2013).

VITAMINA C

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é uma vitamina solúvel em meio aquoso. É essencial para o colágeno, a carnitina e a biossíntese de neurotransmissores. A vitamina C apresenta vários benefícios para a saúde como antioxidante, anti-aterogênica, anti-carcinogênica e imunomoduladora. O efeito positivo da vitamina C reside na redução da incidência de câncer do estômago e na prevenção de câncer de pulmão e colo-retal. Além disso, a vitamina C funciona sinergicamente com a vitamina E para eliminar os radicais livres e também regenera a forma reduzida da vitamina E. No entanto, a ingestão de doses elevadas de vitamina C (2.000mg ou mais/dia) tem sido objeto de debate por sua eventual ação pró-oxidante ou propriedade carcinogênica. Fontes naturais de vitamina C podem ser encontradas nas frutas ácidas, vegetais verdes e tomates (Pham-Huy *et al.* 2008).

Nos seres humanos, o ascorbato atua como um cofactor essencial para várias enzimas que catalisam as reações de hidroxilação. Na maioria dos casos, ele fornece elétrons para enzimas que requerem íons metálicos numa forma reduzida para alcançar atividade enzimática completa. Seu papel mais conhecido é como cofator para a prolil e lisil oxidase na síntese de colágeno. Entretanto, além destas ações bem definidas, várias outras vias bioquímicas dependem da presença de ascorbato (Young & Woodside, 2001).

O ascorbato é capaz de eliminar $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $OH^{\bullet}$, ácido hipocloroso, radicais $ROO^{\bullet}$ aquosos e oxigênio *singlet.* Durante a sua ação antioxidante, o ascorbato sofre uma redução de dois elétrons, inicialmente para o radical semidesidroascorbato e, posteriormente, para desidroascorbato. O radical semidesidroascorbato é relativamente estável, devido à dispersão da carga associada com a presença de um único elétron ao longo dos três átomos de oxigênio, e que pode ser prontamente detectado por ressonância eletrônica de spin em fluidos corporais, na presença de um aumento da produção de radicais livres (Young & Woodside, 2001). Já o desidroascorbato é relativamente instável e hidrolisa prontamente para formação subsequente de ácido oxálico. Dois mecanismos têm sido descritos de como o desidroascorbato pode ser reduzido para ascorbato; um deles seria mediado pela enzima seleno tioredoxina redutase e o outro por uma reação não enzimática que utiliza glutationa reduzida. Desidroascorbato no plasma provavelmente é rapidamente absorvido pelos eritrócitos antes da reciclagem, de modo que muito pouco, se algum, desidroascorbato está presente no plasma (Young & Woodside, 2001).

GLUTATIONA

A glutationa possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular; a sua concentração é ~ 2mM e mais de 10mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidrila (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 glutationa um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidrila 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 Júnior, Höehr, Vellasco, & Kubota, 2001).

Glutationa, um tripeptídeo (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando 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 glutationa estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutationa 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 Júnior *et al.* 2001).

3.6 Acetilcolinesterase

A acetilcolina (Ach) é conhecida como o principal neurotransmissor em neurônios colinérgicos no cérebro, nos nervos parassimpáticos pós-ganglionares e simpáticos colinérgicos, e na periferia em ambas as fibras pré-ganglionares do simpático e do parassimpático. Além disso, várias células periféricas, tais como as células alfa pancreáticas, células endoteliais e células da placenta expressam ACh não neuronal. Moléculas colinérgicas vêm sendo detectadas na circulação, em trombócitos e em linfócitos. De forma correspondente, a sinalização colinérgica está envolvida em processos cognitivos centrais, no controle da homeostase, através da ativação periférica do sistema parassimpático e no bloqueio da resposta inflamatória (Shenhar-Tsarfaty, Berliner, Bornstein, & Soreq, 2014).

A sinalização colinérgica equilibrada depende da expressão concertada de vários receptores, enzimas e transportadores, e resposta desequilibrada pode levar a doenças. Consequentemente, durante o último século, muito esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de métodos confiáveis para a manipulação da sinalização colinérgica e medida do seu efeito e, ainda mais especificamente, para desenvolver biomarcadores para distinguir entre a saúde e as diversas doenças em que a sinalização colinérgica está prejudicada (Shenhar-Tsarfaty *et al*. 2014).

Colinesterases é uma família de enzimas que catalizam a hidrólise da acetilcolina (Ach) em colina e ácido acético, um processo essencial para permitir o restabelecimento do neurônio colinérgico. As colinesterases são divididas em dois tipos: a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7.) e a butirilcolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8). A AChE participa na neurotransmissão colinérgica pela hidrólise da

acetilcolina. Ela é expressa em células nervosas e sanguíneas. Em comparação com a AChE, a importância da BuChE não é bem compreendida. A BuChE é conhecida como colinesterase ou pseudocolinesterase plasmática. Da mesma forma, a AChE é conhecida como colinesterase eritrocitária, uma vez que sua atividade permanece na massa celular após a centrifugação do sangue (Pohanka, 2011).

A AChE desempenha um papel importante na manutenção da integridade e permeabilidade da membrana durante a transmissão e condução sináptica.Tem sido sugerido que o efeito de pequenos compostos anfipáticos sobre a atividade de algumas enzimas ligadas à membrana plasmática pode alterar a fluidez da membrana, provocando alterações funcionais nas propriedades alostéricas de enzimas integrais (Marinou *et al*. 2005).

Estudos têm mostrado que a AChE em terminações nervosas é alvo molecular de muitas substâncias. Quando a enzima é bloqueada não ocorre a hidrólise da ACh. Assim, a ação da ACh é reforçada e, devido à ampla difusão da função colinérgica, ocasiona efeitos tóxicos envolvendo o sistema simpático e parassimpático e o sistema nervoso central (Marinou *et al*. 2005).

Estudos recentes relataram que a galactosemia *in vitro* resultou em uma inibição da atividade da AChE, tanto na enzima pura como em homogeneizados de cérebro. Visto que a AChE desempenha um papel importante no desenvolvimento do cérebro neonatal, sendo essencial na maturação neuronal e diferenciação celular, uma redução da atividade enzimática pode contribuir para uma menor taxa de desenvolvimento do cérebro, QI baixo, combinada com distúrbios comportamentais observados em pacientes galactosêmicos (Marinou *et al*. 2005).

De acordo com Marinou e colaboradores (2005), a exposição a longo prazo (crônica) a níveis elevados de galactitol e galactose-1-fosfato comumente encontrados em pacientes galactosêmicos “sem tratamento", podem ser responsáveis pelas anormalidades patológicas provocadas pela inibição significativa da AChE. Os autores também relataram que o declínio da atividade de AChE presente no cortex frontal pelas misturas de concentrações de Galtol e Gal-1P podem levar a um aumento da concentração de ACh na fenda sináptica, o qual pode estar envolvido no mecanismo de dispraxia verbal e tremor, como observado em pacientes galactosêmicos não tratados (Marinou *et al*. 2005).

A atividade da AChE pode ser também influenciada pela ação de outras enzimas, como por exemplo, a Na^+,K^+-ATPase. A partir deste ponto de vista, também se pode sugerir que a presença de radicais livres produzidos por derivados da galactose podem estar envolvidos na inibição da enzima estudada e estes achados podem fornecer uma nova compreensão dos mecanismos dos distúrbios neurológicos observados na galactosemia (Marinou *et al*. 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar de 30 dias de idade (tamanho aproximado da amostra: 35) provenientes da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade e mantidos em seis por gaiola, em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região do Vale do Itajaí – UNIVALI, protocolo CEUA 01/14 – 14/03/2014. As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1996".

4.2 Protocolo Experimental

4.2.1 Estudos *in vitro*:

Foram utilizadas as estruturas cerebrais de 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 10,0mM. O grupo controle foi realizado sem a adição da galactose.

4.2.2 Prevenção com trolox (alfa-tocoferol), ácido ascórbico e glutationa:

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

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

4.3 Estudos bioquímicos

4.3.1 Preparação do tecido:

Os ratos foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, o cérebro foi rapidamente removido e o hipocampo, córtex cerebral e cerebelo foram dissecados e mantidos em gelo com tampão fosfato de sódio. O homogeneizado foi preparado em tampão adequado usando homogeneizador Potter-Elvehejem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm, 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 da atividade das enzimas antioxidantes, proteínas carboniladas, conteúdo total de sulfidrilas, TBA-RS e atividade da acetilcolinesterase (Ferreira *et al*. 2012).

4.3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS):

TBA-RS é usado como um índice de dano a lipídeos, para os experimentos *in vitro*, foi determinado pelo método de Esterbauer e Cheeseman (1990). TBA-RS foi determinado espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído por mg de proteína.

4.3.3 Catalase (CAT):

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). A decomposição do H_2O_2 foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos. Uma unidade de enzima é definida como 1µmol de H_2O_2 consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.3.4 Glutationa peroxidase (GSH-Px):

A atividade da GSH-Px foi determinada pelo método de Wendel (1981) com algumas modificações. O tert-butil-hidroperóxido foi utilizado como substrato da reação. A decomposição da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos. Uma unidade de enzima é definida como 1µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.3.5 Superóxido dismutase (SOD):

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985). A auto-oxidação do pirogalol foi continuamente monitorado com espectrofotômetro em 420 nm. A atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.3.6 Carbonilas:

A carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Reznicke Packer (1994).

4.3.7 Conteúdo Total de sulfidrilas:

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado pelo método de Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado foram adicionados a 1ml 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.

4.3.8 Ensaio da atividade da acetilcolinesterase (AChE):

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 x g por 10 min, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade da AChE e concentração proteica. A atividade da enzima AChE foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Ellman e colaboradores, (1961) com algumas modificações.

4.3.9 Dosagem de proteínas:

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4.4. Análise estatística:

Os dados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido do Teste múltiplo de Duncan, quando o F-teste foi significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos. Salvo disposição em contrário, os resultados são expressos pela média ± desvio-padrão (Dp) para sete experimentos independentes (animais) realizados em duplicata. ***$P<0,001$, **$P<0,01$ e *$P<0,05$, foram comparados com o grupo-controle (Teste múltiplo de Duncan).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

GALACTOSE ALTERS MARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND ACHETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN THE CEREBRUM OF RATS: PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANTS

Daniela Delwing de Lima[ab*], Monique Fröhlich [b], Leticia Dalmedico[c], Juliana Gruenwaldt Maia Aurélio[c], Débora Delwing-Dal Magro[d], Eduardo Manoel Pereira[c], Angela T.S. Wyse[e]

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

[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, Brazil.

[c] Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

[d] 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.

[e] 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: 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

ABSTRACT

In the present study, we evaluated the *in vitro* effects of galactose at 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content, protein carbonyl content, on the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of rats. We also investigated the influence of the antioxidants (each at 1mM) α-tocopherol, ascorbic acid and glutathione on the effects elicited by galactose on the parameters tested. Results showed that galactose at a concentration of 3.0mM enhanced TBA-RS levels in the hippocampus, cerebral cortex, and cerebellum of rats. In the cerebral cortex, galactose at concentrations of 5.0 and 10.0mM increased TBA-RS and protein carbonyl content, and at 10.0mM increased CAT activity and decreased AChE activity. In the cerebellum, galactose at concentrations of 5.0 and 10.0mM increasing TBA-RS, SOD and GSH-Px activities. In the hippocampus, galactose at concentrations of 5.0 and 10.0mM increased TBA-RS and CAT activity and at 10.0mM decreased GSH-Px. Antioxidants prevented most alterations caused by galactose on the oxidative stress parameters evaluated and on AChE activity. Data showed that at the pathologically high concentration of galactose (greater than 5.0mM), as it may occur in plasma of galactosemics patients, galactose induces lipid peroxidation, protein carbonylation, alters antioxidant defenses in the cerebrum, as well altering cholinesterase activity. Trolox, ascorbic acid and gluthatione addition prevented the majority of alterations in oxidative stress parameters and the decrease of AChE activity that were caused by galactose. Our findings lend support to a potential therapeutic strategy for this condition, which may include the use of appropriate antioxidants for ameliorating the damage caused by galactose.

Keywords: Galactose, antioxidant, acetylcholinesterase, oxidative stress, cerebrum.

INTRODUCTION

Classic galactosemia is a rare genetic disease caused by the deficiency of galactose-1-phosphate uridyl-transferase (GALT) enzyme (EC 2.7.7.12), involved in galactose metabolism [1]. This enzyme transfers UDP from UDP-glucose to galactose-1-phosphate, thereby releasing glucose 1-phosphate and producing UDP-galactose [2]. Two other variants of the disease are recognized. Deficiency of galactokinase (GALK; EC 2.7.1.6) which results in type II galactosemia (OMIM #230200), the mildest form of the disease, and the third variant, that is caused by mutations in the gene encoding UDP-galactose 4'-epimerase (GALE; EC 5.1.3.2) which results in type III galactosemia (OMIM #230350) [3]. The most common and clinically severe form of galactosemia is classic galactosemia (OMIM 230400), which affects about 1/30,000 to 60,000 live-births [2] with a prevalence of 1 in 47,000 in the white population [4].

Although typically asymptomatic at birth, patients with classic galactosemia develop escalating symptoms following exposure to a milk-based diet. In the absence of intervention, these symptoms, which include vomiting, diarrhea, cataracts, hepatomegaly, and *E. coli* sepsis, can lead to neonatal death. Life-long dietary restriction of galactose, the current standard of care, relieves or prevents these acute and potentially lethal symptoms; however, many patients with classic galactosemia will develop serious long-term complications. The most common problems include speech and/or cognitive disabilities in 30–50% of all patients, and primary or premature ovarian failure in almost 85% of females. Other complications include ataxic neurologic disease, delayed growth and decreased bone density [2].

Oxidative stress occurs as a result of oxidation-reduction control (redox) abnormal, when there is overproduction of reactive oxygen species (ROS) and/or failure of the antioxidant defense mechanisms [5]. In order to protect biological systems from free radical toxicity, several cellular antioxidant defense mechanisms keep the production of ROS in check [5]. These mechanisms can be either enzymatic (including catalases, dismutases and peroxidases) or non-enzymatic (such as vitamin A, C or E) and are critical to protect cells against ROS-induced damage, both at steady state and upon oxidative stress [6]. These enzymes work together and

alterations in the activity of an enzyme without compensatory changes in other enzyme activity may lead to lipid peroxidation [5].

As such, we investigated the *in vitro* effects of different concentrations of galactose on lipid peroxidation, including the thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS), on protein damage, analyzing total sulfhydryl content and protein carbonyl content, and on the activity of the main antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD). In addition we investigated the *in vitro* effect of galactose on the activity of acethylcholinesterase (AChE) in the hippocampus, cerebellum and cerebral cortex of 30-day-old Wistar rats. Furthermore, we also verified the influence of the antioxidants α-tocopherol (trolox), ascorbic acid and gluthatione on the effects elicited by galactose.

MATERIALS AND METHODS

Animals and reagents

Thirty-day-old Wistar rats (120-150g), obtained from the Univali University, Itajaí, Brazil, were used in the experiments. The animals from our own breeding stock 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.

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 10.0mM. Control experiments were performed without galactose addition. After incubation, aliquots were taken to measure TBA-RS,

total sulfhydryl content, protein carbonyl content, the activity of antioxidant enzymes and AChE activity.

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 - 1.0mM trolox), group 4 (galactose + 1.0mM trolox), group 5 (control - 1.0mM ascorbic acid), group 6 (galactose + 1.0mM ascorbic acid), group 7 (control – 1.0mM glutathione), and group 8 (galactose + 1.0mM glutathione). The concentrations of trolox, ascorbic acid and glutathione utilized in the present study were chosen according to previous studies [7, 8, 9].

Tissue preparation

After decapitation, the cerebrum was removed, cerebral cortex, cerebellum and hippocampus were dissected and kept in ice-cold buffered sodium phosphate (20mM, pH 7.4, 140mM KCl). 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-Elvehejem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India); by passing 5 pulses and centrifuged at 800 x g for 10min at 4°C, to discard 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 [10].

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Esterbauer and Cheeseman [11]. TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation caused mainly by hydroxyl free radicals. For the *in vitro* measurements, tissues was mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 25 min. TBA-RS was 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.

Total Sulfhydryl Content

The total thiol group concentration was determined by the method of Aksenov and Markesbery [12]. Briefly, 50µl of homogenate was added to 1ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 containing 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30µL of 10mM 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 blank (DTNB absorbance) was also performed. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

Protein carbonyl Content

Carbonyl content was assayed by a method of Reznick and Packer [13] based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200 µL of homogenate were added to plastic tubes containing 400µL of 10mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). This was kept in the dark for 1 h and vortexed each 15 min. After that, 500µL of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 x *g* rpm for 3 min. The supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 x *g* rpm for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600µL of 6M guanidine (prepared in a 20mM potassium phosphate solution pH 2.3). The sample was vortexed and incubated at 60°C for 15 min. After that, it was centrifuged at 14,000 rpm x *g* for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results were reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

Catalase Assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi [14] using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H_2O_2, 0.1 % Triton X-100, 10mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel [15] using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate 12 NADPH disappearance was monitored at 340nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2mM 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.

Superoxide Dismutase (SOD) assay

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ($O_2^{\bullet-}$) which is a substrate for SOD [16]. Briefly, to 15μl of each sample, 215μl of a mixture containing 50μM Tris buffer, pH 8.2, 1μM EDTA and 30μM CAT were added. Then, 20μl of pyrogallol was added and the absorbance was immediately recorded each 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, of which activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as 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.

Acetylcholinesterase activity assay

After dissection, the cerebrum was quickly removed. The cerebral structures were homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.5. The homogenate was centrifuged at 1000 x g for 10 min, the pellet was discarded and the supernatant used for the determination of the acetylcholinesterase activity and protein concentration. The acetylcholinesterase activity was determined according to the colorimetric method of Ellman et al. [17] with some modifications.

Protein determination

Protein was measured by the Lowry et al. [18] method, using serum bovine albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when the F-test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC compatible computer. Values of $P<0.05$ were considered to be significant. If not otherwise stated, results are expressed as mean ± SD for seven independent experiments (animals) performed in duplicate. ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$ and *$P < 0.05$, compared to the control group (Duncan's multiple range test).

RESULTS

In vitro effects of galactose on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in the cerebrum of rats

We initially verified the *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM) on TBA-RS, total sulfhydryl content and protein carbonyl content in cerebrum (cerebral cortex, cerebellum and hippocampus) of rats. Figure 1 shows that galactose at a concentration of 3.0, 5.0 and 10.0mM significantly enhanced TBA-RS (A) [$F(4,30)=12.653$; $P<0.001$], [$F(4,30)=33.637$; $P<0.001$],

[F(4,30)=113.066; P<0.001] in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of rats, respectively; but did not alter total sulfhydryl content (B) [F(4,30)=0.933; P>0.05], [F(4,30)=1.645; P>0.05] and [F(4,30)=2.365; P>0.05] in these structures, respectively. Also, galactose (5.0mM and 10.0mM) significantly increased protein carbonyl content (C) [F(4,30)=16.286; P<0.001] in the cerebral cortex, but did not alter these parameter in the cerebellum [F(4,30)=0.462; P>0.05] and hippocampus [F(4,30)=0.440; P>0.05] of rats.

In vitro effects of galactose on the activities of antioxidant enzymes in the cerebrum of rats

The *in vitro* effects of different concentrations of galactose (0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM) on the activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the cerebrum of rats were also verified. As can be seen in Figure 2, galactose (10.0mM) enhanced the activity of CAT (A) [F(4,30)=3.328; P<0.05] in the cerebral cortex and at 5.0mM and 10.0mM [F(4,30)=5.332; P<0.01] in the hippocampus, but did not alter this enzyme activity in the cerebellum of rats [F(4,30)=0.051; P>0.05], as compared to the control group. With regard to GSH-Px activity (B), galactose (5.0mM and 10.0mM) increased this enzyme activity [F(4,30)=5.631; P<0.01] in the cerebellum, and at 10.0mM decreased GSH-Px activity [F(4,30)=7.770; P<0.001] in the hippocampus, but did not alter in the cerebral cortex [F(4,30)=0.044; P>0.05] of rats. Regarding the activity of SOD (C), galactose at 5.0mM and 10.0mM increased this enzyme activity [F(4,30)=27.902; P<0.001] in the cerebellum, but did not alter in the cerebral cortex [F(4,30)= 0.301; P>0.05] and hippocampus [F(4,30)=0.927; P>0.05] of rats.

In vitro effects of galactose on the activity of acethylcholinesterase in the cerebrum of rats

Subsequently, the *in vitro* effects of galactose on the AChE activity were also analyzed. In the cerebral cortex, galactose at 10.0mM decreased AChE activity in Figure 3 [F(4,30)=3.905; P<0.05], in opposition, did not alter this enzyme activity in the cerebellum [F(4,30)=0.978; P>0.05] and in the hippocampus [F(4,30)=0.451; P>0.05] of rats.

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

Finally, this study evaluated whether the alterations in TBA-RS, protein carbonyl content, the activities of antioxidant enzymes and AChE activity caused by galactose (*in vitro)* in the cerebrum of rats 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 produced by galactose on these parameters. As can be seen in Figure 4, trolox and glutathione were able to prevent the increase in TBA-RS in the cerebral cortex (A) [F(15.96)=178.533; P<0.001], but not ascorbic acid that partially prevented. In cerebellum (B) [F(15,96)=123.172; P<0.001], trolox and gluthatione prevented the increase in TBA-RS levels caused by galactose 3.0mM, prevented partially the increase caused by galactose 5.0mM and did not prevent the increase caused by galactose 10.0mM, and ascorbic acid prevented the increase caused by galactose 3.0mM and did not prevent the increase caused by 5.0 and 10.0mM of galactose. About hippocampus (C) [F(15,96)=130.633; P<0.001], trolox prevented the increase caused by galactose 3.0 and 5.0mM, and prevented partially the increase caused by 10.0mM; glutathione and ascorbic acid prevented the increase caused by galactose 3.0mM, and prevented partially the increase caused by 5.0mM and 10.0mM of galactose in TBA-RS levels. Furthermore, trolox, ascorbic acid and glutathione were able to prevent the increase caused by galactose in protein carbonyl content in the cerebral cortex of rats (D) [F(11,73)=8.779; P<0.001]. With regard to the antioxidant enzymes, shows that the antioxidants prevented the increase in CAT activity in the cerebral cortex (E) [F(7,48)= 5.228; P<0.001], and hippocampus (F) [F(11,72)=16.611;P<0.001], except at 10.0mM in wich trolox did not prevent the alteration in CAT activity caused by galactose. Trolox, ascorbic acid and gluthatione also prevented the increase in SOD activity in the cerebellum (G) [F(11,72)= 43.051; P<0.001] and the decrease in GSH-Px activity in the hippocampus (H) [F(7,48)= 14.805; P<0.001], but ascorbic acid not prevented the increase in GSH-Px activity in cerebellum caused by galactose at 5.0mM and 10.0mM (I) [F(11,72)=10.872; P<0.001]. With regard to the AChE activity, trolox and glutathione were able to prevent the decrease caused by galactose in the cerebral cortex, but not ascorbic

acid that did not prevent the action of galactose at 10.0mM (J) [$F(7,48)=9.498$; $P<0.001$].

DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the *in vitro* effects of galactose on the status of oxidative stress and on the activity of AChE in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of rats. To our knowledge, these issues have not been investigated thus far. The added galactose concentrations tested were 0.1, 3.0, 5.0 and 10.0mM. This range covers physiological and pathological concentrations including those occurring in galactosemia [19]. We measured different biomarkers of oxidative stress, TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content and the activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px, as well as a marker of cognitive dysfunction, AChE activity. We also investigated the effects of the antioxidants α-tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C), as well as of gluthatione, essential factor for glutathione peroxidase on the effects elicited by galactose in the cerebrum of rats [5]. Our study revealed different effects of galactose on the parameters of oxidative stress in the biological samples investigated, as well as alteration on AChE activity. It seems that appreciable effects of galactose on the parameters of oxidative stress and cognitive dysfunction usually require high concentration of 5.0 and 10.0mM.

This study revealed that galactose, at a concentration of 3.0mM, 5.0mM and 10.0mM significantly enhanced TBA-RS in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of rats, but did not alter total sulfhydryl content in these cerebral structures. Also, galactose (5.0mM and 10.0mM) significantly increased protein carbonyl content in the cerebral cortex, but did not alter these parameters in the cerebellum and hippocampus of rats. TBA-RS reflect the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde resulting from lipid breakdown due to lipid peroxidation process. On the other hand, the level of carbonyl groups of proteins is widely used as a marker of oxidative protein damage. Thus, our data indicate that galactose *in vitro* elicits oxidative damage to lipids and proteins in the cerebrum of rats.

In respect to antioxidant enzymes, galactose (10.0mM) enhanced the activity of CAT in the cerebral cortex and at 5.0mM and 10.0mM in the hippocampus, but did not alter this enzyme activity in the cerebellum of rats. With regard to GSH-Px activity, galactose (5.0mM and 10.0mM) increased this enzyme activity in the cerebellum, and at 10.0mM decreased GSH-Px activity in the hippocampus, but did not alter this enzyme in the cerebral cortex of rats. Regarding the activity of SOD, galactose (5.0mM and 10.0mM) increased this enzyme activity in the cerebellum, but did not alter in the cerebral cortex and hippocampus of rats. CAT is a ferric heme protein that directly catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide. SOD removes the anion superoxide by accelerating the rate of its dismutation to hydrogen peroxide [20]. Glutathione peroxidase catalyzes the decomposition of H_2O_2 or organic peroxides and reduces glutathione (GSH) which forms oxidized glutathione (GSSG). GSSG is again reduced to GSH by glutathione reductase, thus forming the redox cycle [21]. Since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defense of the tissue and the reactive species generated, our present data strongly indicate that galactose provokes oxidative stress *in vitro* in the cerebrum, which induces oxidation of lipids and proteins and changes in the CAT, GSH-Px and SOD activity.

Next, we verified the *in vitro* effects of galactose on the AChE activity in the cerebrum of rats. AChE participating in cholinergic neurotransmission by hydrolysis of acetylcholine to choline and acetic acid, an essential process to allow the restoration of the cholinergic neuron [22]. Studies have shown that AChE is molecular target of many substances. When the enzyme is blocked not occur the hydrolysis of acethylcholine (ACh). Thus, the action of ACh is enhanced and because of the wide diffusion of cholinergic function, causes toxic effects involving the sympathetic and parasympathetic system and the central nervous system [23]. In this study, galactose at 10.0mM decreased AChE activity in the cerebral cortex, however, did not alter this enzyme activity in the cerebellum and hippocampus of rats. This result are in agreement with previous findings reporting by Marinou and colleagues [23] showing that galactosemia *in vitro* reduced AChE activity both as pure enzyme as in cerebrum homogenates. Since AChE plays an important role in neonatal brain development and is essential in neuronal cell maturation and differentiation, reduction of the enzymatic activity can contribute to a lower rate of development of

the brain, low QI, combined with behavioral disturbances observed in galactosemic patients [23].

Finally, we evaluated whether the alterations in TBA-RS, protein carbonyl content, activities of antioxidant enzymes and AChE caused by galactose *in vitro* in the cerebrum 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 produced by galactose on these parameters. In fact, vitamins E and C are important antioxidants responsible for scavenging the free radicals and suppression of peroxidation in the aqueous and lipid region of the cell [21]. Glutathione has a central role in biotransformation and elimination of xenobiotics and protection of cells against oxidative stress [24]. Results revealed that the antioxidants trolox and glutathione were able to prevent the increase in TBA-RS in the cerebral cortex, but not ascorbic acid that partially prevented. In cerebellum, trolox and gluthatione prevented the increase in TBA-RS levels caused by galactose 3.0mM, prevented partially the increase caused by galactose 5.0mM and did not prevent the increase caused by galactose 10.0mM, and ascorbic acid prevented the increase caused by galactose 3.0mM and did not prevent the increase caused by 5.0mM and 10.0mM of galactose. About hippocampus, trolox prevented the increase caused by galactose 3.0mM and 5.0mM and prevented partially the increase caused by 10.0mM; glutathione and ascorbic acid prevented the increase caused by galactose 3.0mM and prevented partially the increase caused by 5.0mM and 10.0mM of galactose in the TBA-RS levels. Furthermore, trolox, ascorbic acid and glutathione were able to prevent the increase caused by galactose in protein carbonyl content in the cerebral cortex of rats.

With regard to the antioxidant enzymes, the antioxidants prevented the increase in CAT activity in the cerebral cortex, but not in the hippocampus, in which trolox did not prevent the alteration in CAT activity caused by galactose 10.0mM. Trolox, ascorbic acid and gluthatione also prevented the increase in SOD activity in the cerebellum and the increase in GSH-Px activity in the hippocampus, but ascorbic acid not prevented the increase in GSH-Px activity in cerebellum caused by galactose at 5.0mM and 10.0mM. About the AChE activity, trolox and glutathione were able to prevent the decrease caused by galactose in the cerebral cortex, but not ascorbic acid that did not prevent the action of galactose at 10.0mM.

In conclusion, the present study reinforces the hypothesis that oxidative stress is induced in galactose-1-phosphate-uridylyltransferase-deficiency. Furthermore, our results indicate that galactose alters enzymatic antioxidant defenses, cause lipid oxidation, damage to protein and decreased AChE activity, probably by enhancing reactive species in the cerebrum of rats. In addition, we demonstrated that the alterations in these parameters of oxidative stress and AChE activity are probably mediated by the generation of free radicals which are scavenged by trolox, ascorbic acid and gluthatione, since these antioxidants prevented almost of these effects caused by galactose in the cerebrum of rats. These data point antioxidants as a possible adjuvant therapeutic to limit oxidative damage caused by galactose in galactosemia.

ABBREVIATIONS

ACh – Acethylcholine

AChE – Acethylcholinesterase

CAT - Catalase

DTNB - 5,5´-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

EIM – Innate error of the metabolism

GALK - Galactokinase

GALE - UDP-galactose 4’-epimerase

GALT - Galactose-1-phosphate uridyl-transferase

GSH – Reduced glutathione

GSH-Px - Glutathione peroxidase

GSSG – Oxidized glutathione

MDA - Malondialdehyde

PBS - Phosphate-buffered saline

ROS – Reactive oxigen species

SOD - Superoxide dismutase

TBA-RS - Thiobarbituric acid reactive substances

TNB - 3-thio-2-nitrobenzoic acid

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 Universidade da Região de Joinville and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Brasil).

REFERENCES

[1] F. Chiappori, I. Merelli, L. Milanesi, and A. Marabotti, “Static and dynamic interactions between GALK enzyme and known inhibitors: Guidelines to design new drugs for galactosemic patients”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol.63, pp. 423–434, 2013.

[2] G. M. Zou, “Cancer stem cells in leukemia, recent advances”, *Journal of cellular physiology*, vol. 213, no. 2, pp. 440–444, 2007.

[3] T. J. McCorvie and D. J. Timson, “The structural and molecular biology of type i galactosemia: Enzymology of galactose 1-phosphate uridylyltransferase”, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 63, no. 9, pp. 694–700, 2011.

[4] E. Viggiano, A. Marabotti, A. P. Burlina, C. Cazzorla, M. R. D’Apice, L. Giordano, and A. B. Burlina, “Clinical and molecular spectra in galactosemic patients from neonatal screening in northeastern Italy: Structural and functional characterization of new variations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene”, *Gene*, vol. 559, no. 2, pp. 112–118, 2015.

[5] J. Q. Wu, T. R. Kosten, and X. Y. Zhang, “Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia”, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 46, pp. 200–206, 2013.

[6] C. M. Mak, H. C. H. Lee, A. Y. W. Chan, and C. W. Lam, “Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update”, *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, vol. 50, no. 6, pp. 142–62, 2013.

[7] A. T. S. Wyse, C. S. Bavaresco, M. E. K Hagen, D. Delwing, C. S. Dutra-filho, and M. Wajner, “In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidine compounds accumulating in hyperargininemia”, *Brain Research*, vol. 923, pp. 50–57, 2001.

[8] C. G. Silva, A. R. F. Bueno, P. F. Schuck, G. Leipnitz, C. A. Ribeiro, R. B. Rosa, C. S. Dutra Filho, A. T. Wyse, C. M. Wannmacher, and M. Wajner, “Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex byD-2-hydroxyglutaric acid in vitro”, *Neurochemistry International,* vol. 44, pp. 45–52, 2004.

[9] N. F. Avrova, K. I. Shestak, I. O. Zakharova, T. V. Sokolova, and V. G. Leont’ev, “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”, *Neurochemical Research,* vol. 24, no. 9, pp. 1101-6, 1999.

[10] A. G. K. Ferreira, A. A. Da Cunha, F. R. Machado, C. D. Pederzolli, G. R. Dalazen, A. M. De Assis, and A. T. S. Wyse, “Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver”, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 113, no. 1, pp. 174–183, 2012.

[11] H. Esterbauer, and K. H. Cheeseman, “Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal” *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 407–421, 1990.

[12] V. M. Y. Aksenov, and W. R. Markesbery, “Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer’s disease”, *Neuroscience Letters*, vol. 302, pp. 141-5, 2001.

[13] A. Z. Reznick, and L. Packer, “Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay”, *Methods in Enzymology*, vol. 233, pp. 357–363, 1994.

[14] H. Aebi, “Catalase in vitro”, *Methods of Enzymology*, vol. 105, pp. 121–126, 1984.

[15] A. Wendel, “Glutathione peroxidase”, *Methods in Enzymol*ogy, vol. 77, pp. 325–33, 1981.

[16] S. L. Marklund, “Pyrogallol autoxidation”, *In: Greenwald RA (ed) Handbook for oxygen radical research*, pp. 243–247, 1985.

[17] G. L. Ellman, “Tissue sulfhydryl groups”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, pp. 70–77, 1959.

[18] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent”, *Journal Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265-75, 1951.

[19] R. Gitzelmann, “Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia”, *European journal of pediatrics*, vol. 154, no. 7, pp. S45–S49, 1995.

[20] B. Halliwell, “Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls”, *Biomedical journal*, vol. 37, no. 3, pp. 99–105, 2014.

[21] I. S. Young, and J. V. Woodside, “Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 54, no. 3, pp.

176-186, 2001.

[22] M. Pohanka, “Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology”, *Biomedical Papers*, vol.155, no. 3, pp. 219–230, 2011.

[23] K. Marinou, S. Tsakiris, C. Tsopanakis, K. H. Schulpis, and P. Behrakis, “Suckling rat brain regional distribution of acetylcholinesterase activity in galactosaemia in vitro”, *Metabolic Brain Disease*, vol. 20, no. 3, pp. 227–236, 2005.

[24] L. Rover JR, N. F. Höehr, A. P. Vellasco, and L. T. Kubota, “Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo”, *Química Nova,* vol. 24, no. 1, pp. 112–119, 2001.

Legends to Figures

Fig. 1. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) 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 30-day-old rats. Results are expressed as mean ± SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. ***P<0.001, compared to control group (Duncan's multiple range test).

Fig. 2. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on the activities of CAT (A), GSH-Px (B) and SOD (C) in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30-day-old rats. Results are expressed as mean ± 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. 3. *In vitro* effect of increasing concentrations of galactose (0.1mM - 10.0mM) on Acethylcholinesterase (AChE) activity in in the cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of 30-day-old rats. Results are expressed as mean ± SD for 7 independent experiments (animals) performed in duplicate. *P<0.05, compared to control group (Duncan's multiple range test).

Fig. 4. *In vitro* effects of trolox, ascorbic acid and glutathione on TBA-RS in the cerebral cortex (A), cerebellum (B) and hippocampus (C) of 30-day-old rats, on protein carbonyl content in the cerebral cortex of 30-day-old rats (D), on CAT activity in the cerebral cortex (E) and hippocampus (F) of 30-day-old rats, on SOD activity in the cerebellum (G), on GSH-Px activity in the hippocampus (H) and cerebellum (I) and on AChE activity in the cerebral cortex (J) of 30-day-old rats. Results are expressed as mean ± 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: gluthathione. [#] partial prevent.

Figure 1

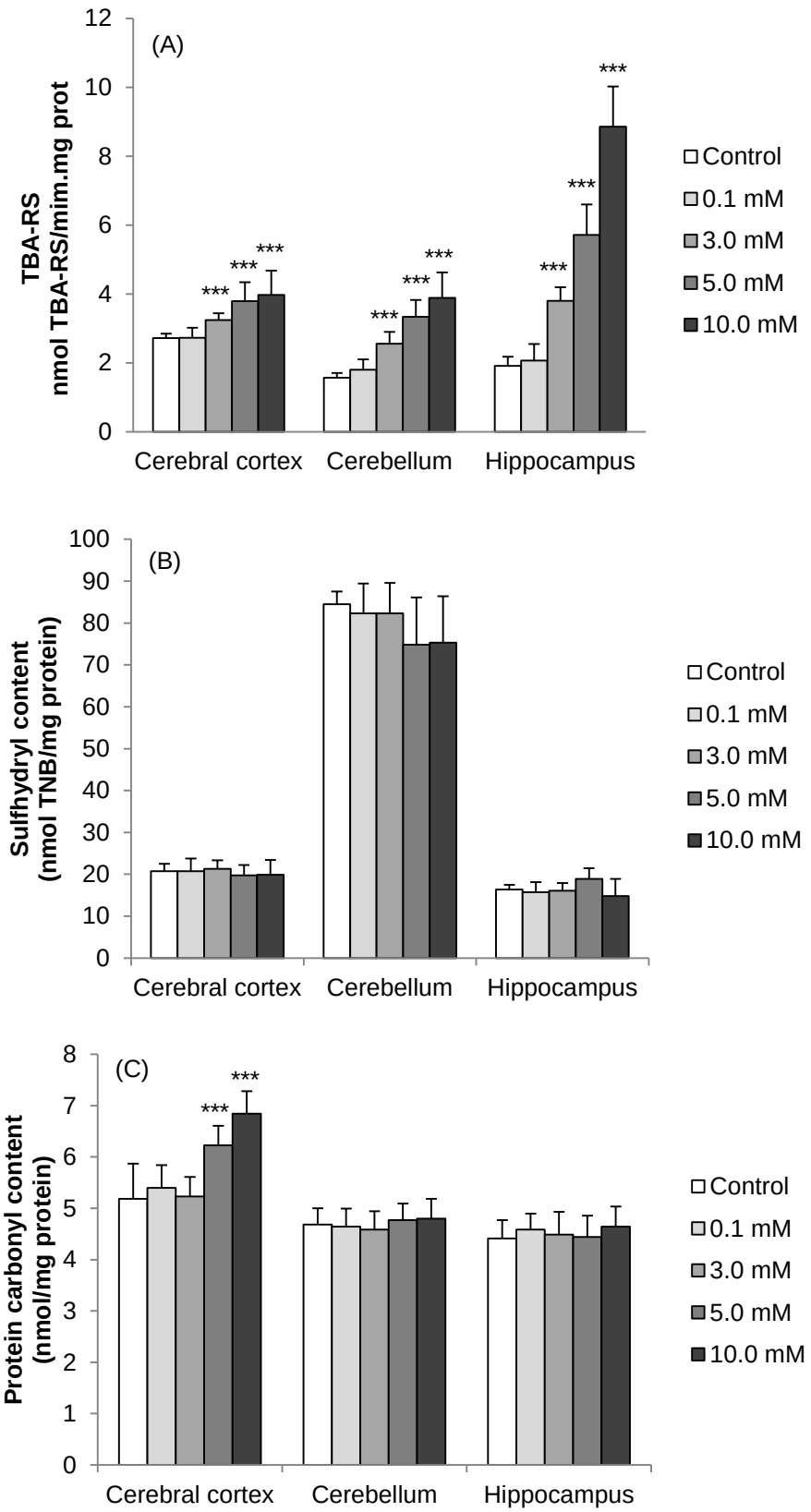

(A)
TBA-RS
nmol TBA-RS/mim.mg prot
12
10
8
6
4
2
0
***
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
(B)
Sulfhydryl content
(nmol TNB/mg protein)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
(C)
Protein carbonyl content
(nmol/mg protein)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
***
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM

Figure 2

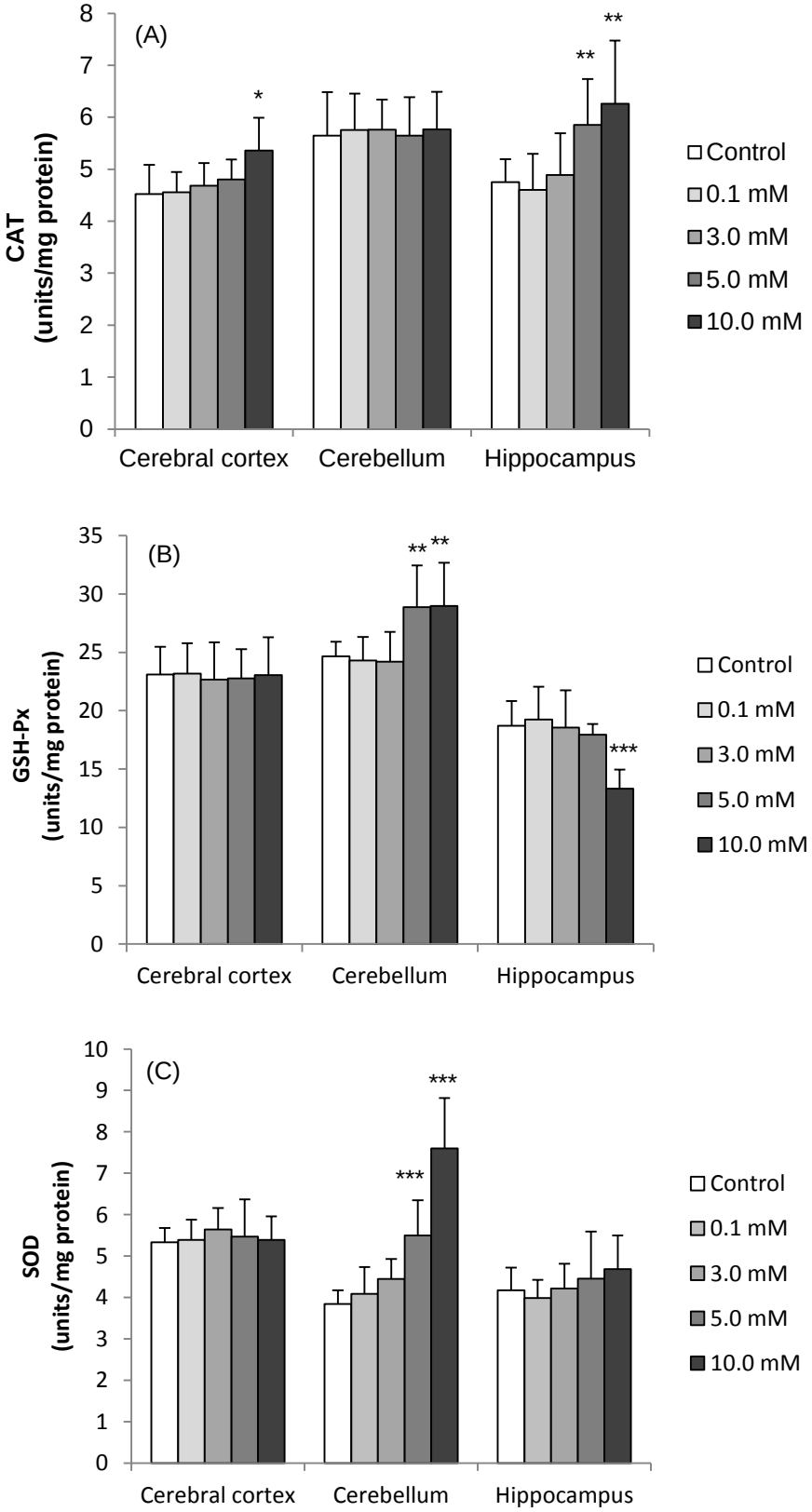

(A)
CAT
(units/mg protein)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
**
**
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
(B)
GSH-Px
(units/mg protein)
35
30
25
20
15
10
5
0
**
**
***
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
(C)
SOD
(units/mg protein)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
***
***
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM

Figure 3

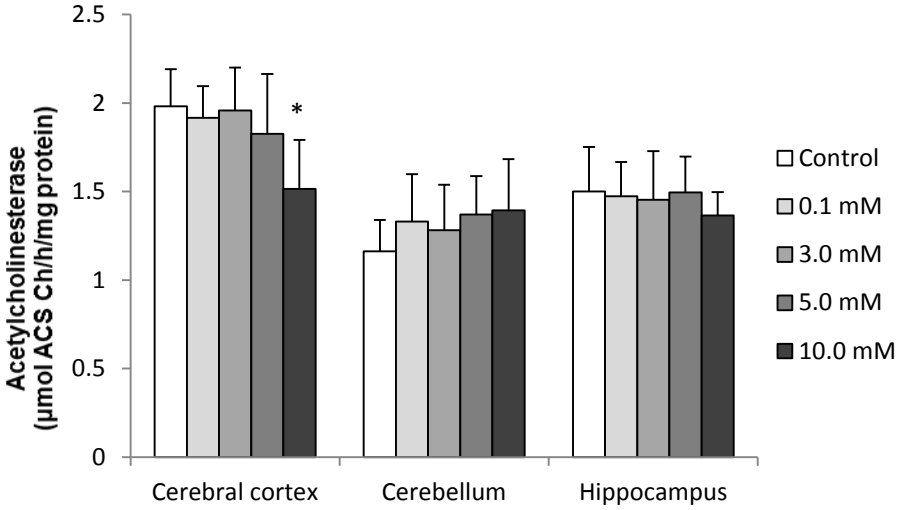
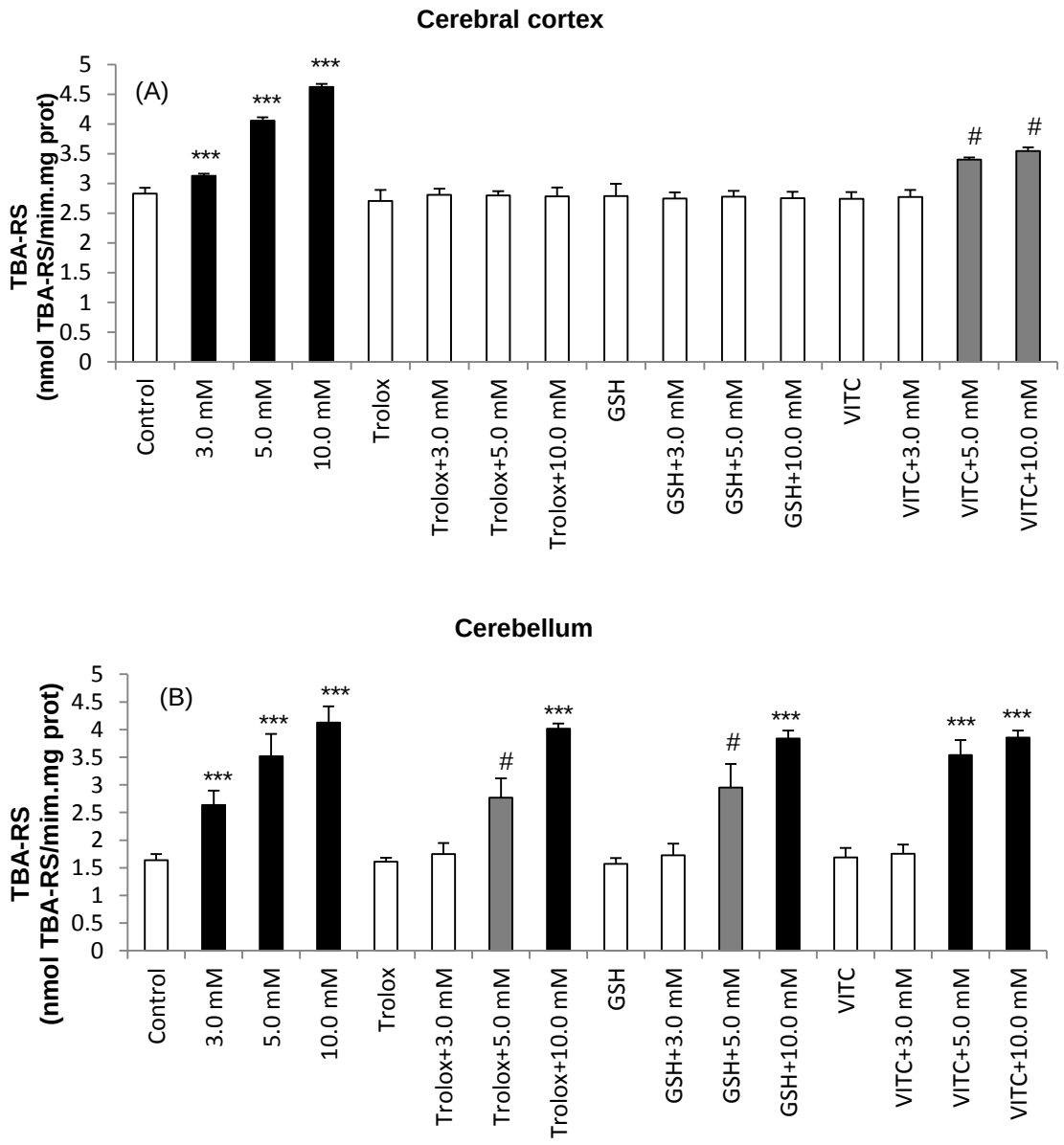
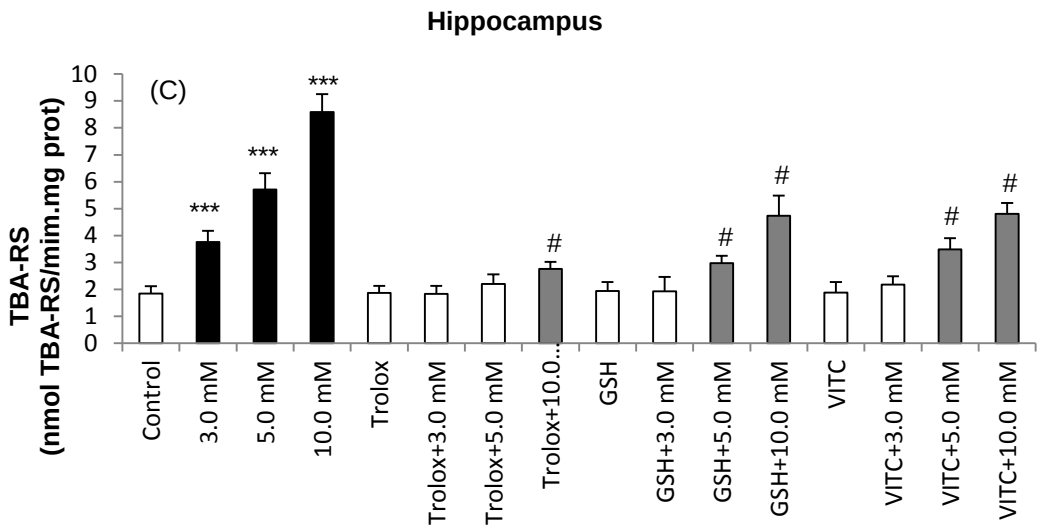
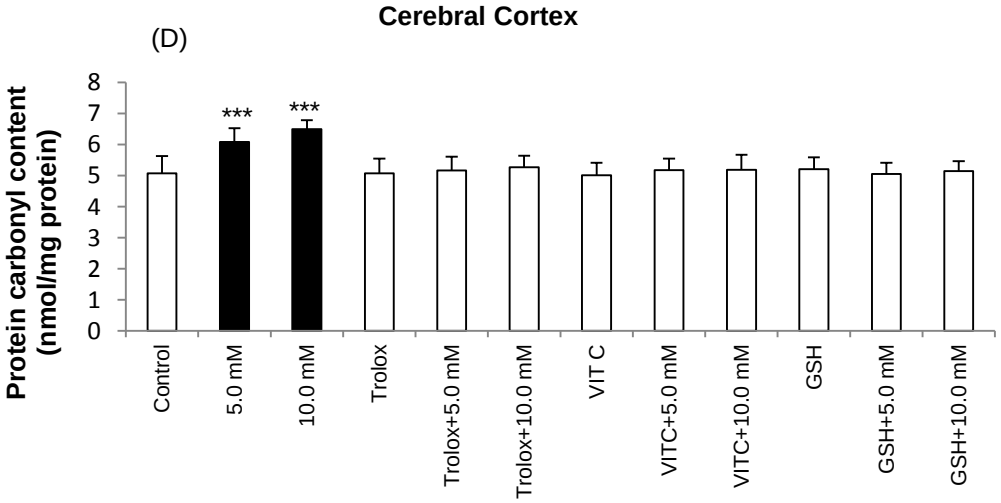
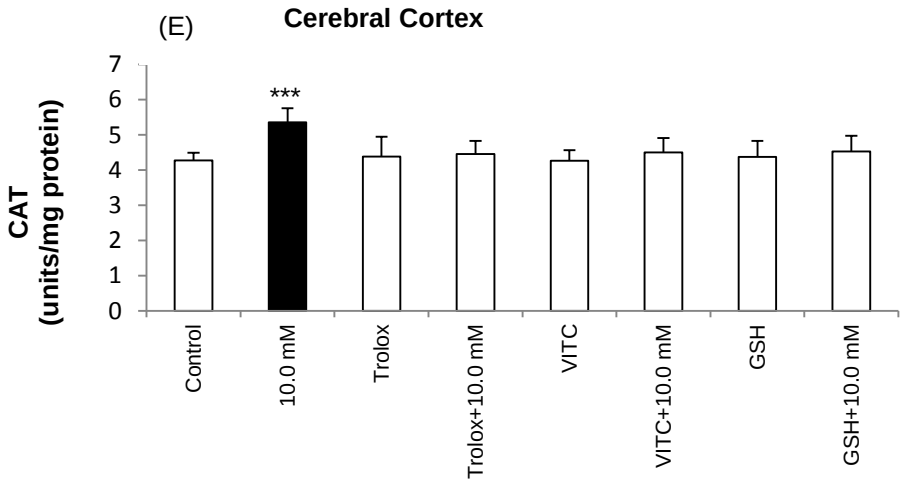

2.5
2
1.5
1
0.5
0
Acetylcholinesterase
(µmol ACS Ch/h/mg protein)
*
Control
0.1 mM
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
Cerebral cortex
Cerebellum
Hippocampus

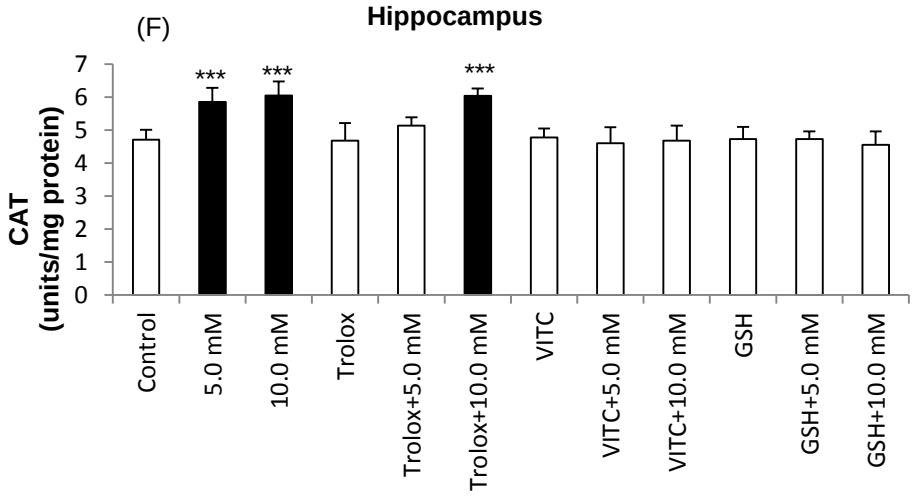
Figure 4

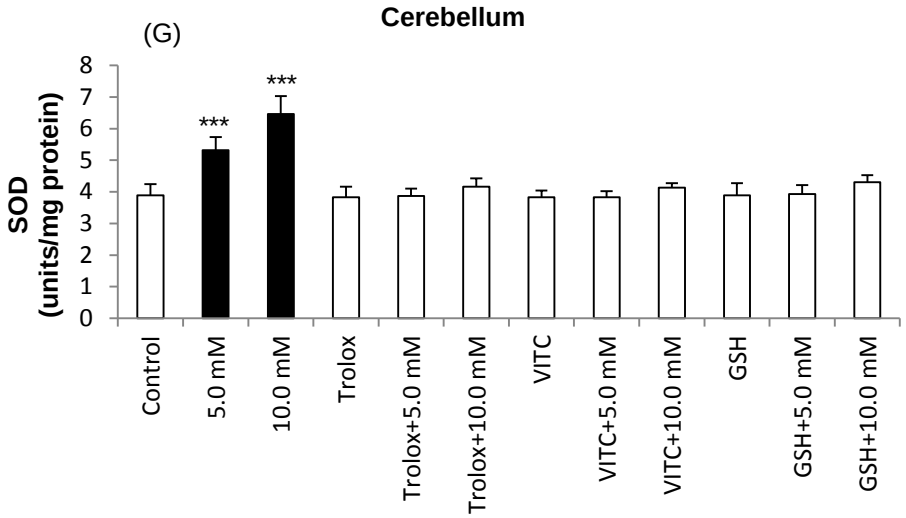

Cerebral cortex
(A)
TBA-RS
(nmol TBA-RS/mim.mg prot)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
***
***
#
#
Control
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+3.0 mM
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0 mM
GSH
GSH+3.0 mM
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM
VITC
VITC+3.0 mM
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM
Cerebellum
(B)
TBA-RS
(nmol TBA-RS/mim.mg prot)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
***
***
#
***
#
***
***
***
Control
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+3.0 mM
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0 mM
GSH
GSH+3.0 mM
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM
VITC
VITC+3.0 mM
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM

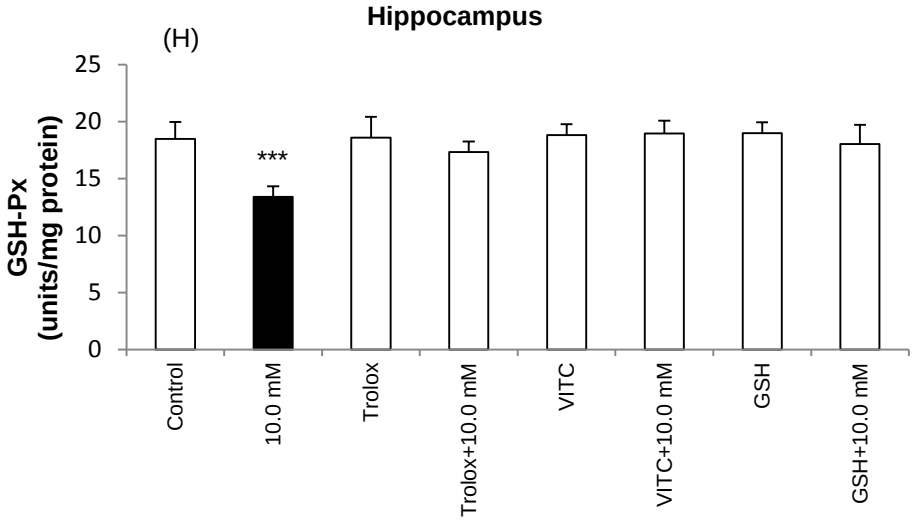

Hippocampus
(C)
TBA-RS
(nmol TBA-RS/mim.mg prot)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
***
***
***
#
#
#
#
Control
3.0 mM
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+3.0 mM
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0...
GSH
GSH+3.0 mM
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM
VITC
VITC+3.0 mM
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM

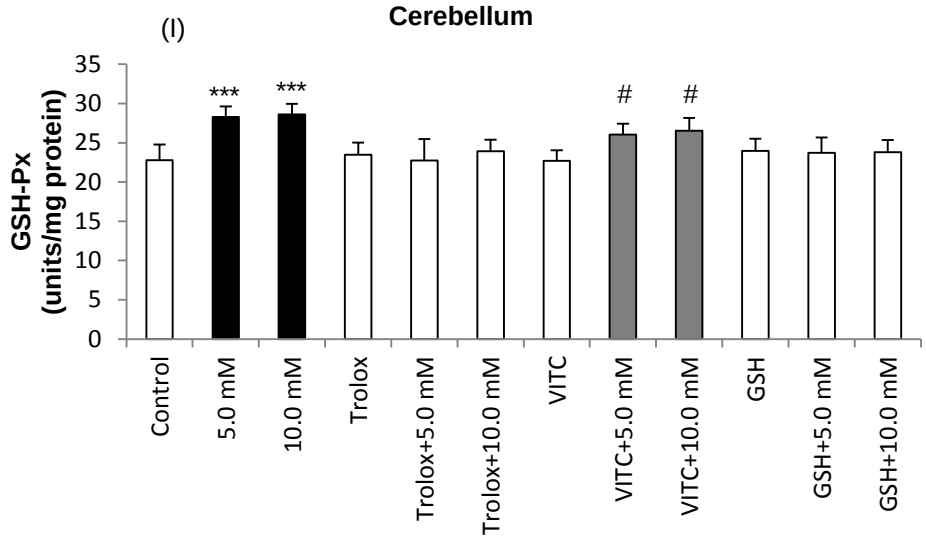

Cerebral Cortex
(D)
Protein carbonyl content
(nmol/mg protein)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
***
***
Control
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0 mM
VIT C
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM

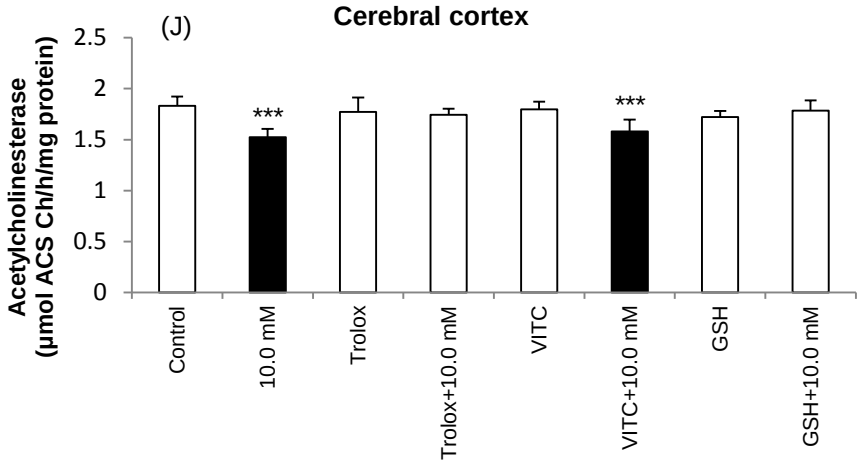

(E)
Cerebral Cortex
CAT
(units/mg protein)
7
6
5
4
3
2
1
0
***
Control
10.0 mM
Trolox
Trolox+10.0 mM
VITC
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+10.0 mM


(F)
Hippocampus
CAT
(units/mg protein)
0
1
2
3
4
5
6
7
***
***
***
Control
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0 mM
VITC
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM


(G)
Cerebellum
SOD
(units/mg protein)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
***
***
Control
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0 mM
VITC
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM


(H)
Hippocampus
GSH-Px
(units/mg protein)
0
5
10
15
20
25
***
Control
10.0 mM
Trolox
Trolox+10.0 mM
VITC
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+10.0 mM


(I)
Cerebellum
GSH-Px
(units/mg protein)
35
30
25
20
15
10
5
0
***
***
#
#
Control
5.0 mM
10.0 mM
Trolox
Trolox+5.0 mM
Trolox+10.0 mM
VITC
VITC+5.0 mM
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+5.0 mM
GSH+10.0 mM


(J)
Cerebral cortex
Acetylcholinesterase
(µmol ACS Ch/h/mg protein)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
***
Control
10.0 mM
Trolox
Trolox+10.0 mM
VITC
VITC+10.0 mM
GSH
GSH+10.0 mM

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que os pacientes galactosêmicos apresentam além de níveis elevados de gal-1-P e galactose nos tecidos (Chiappori *et al*. 2013); possibilidade da inibição de atividade de acetilcolinesterase e estresse oxidativo estarem envolvidos na fisiopatologia de doença (Marinou *et al.* 2005), neste estudo investigamos os efeitos *in vitro* da galactose e a influência dos antioxidantes trolox (α-tocoferol), ácido ascórbico e glutationa sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos de 30 dias de idade.
Nossos resultados mostraram que:

A galactose na concentração de 3,0mM

- Aumentou TBA-RS em córtex cerebral,cerebelo e hipocampo de ratos.

A galactose na concentração de 5,0mM

- Aumentou TBA-RS em córtex cerebral,cerebelo e hipocampo;
- Aumentou proteínas carboniladas em córtex cerebral;
- Aumentou a atividade da CAT em hipocampo;
- Aumentou a atividade da SOD e da GSH-Px em cerebelo;

A galactose na concentração de 10,0mM

- Aumentou TBA-RS em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo;
- Aumentou proteínas carboniladas em córtex cerebral;
- Aumentou a atividade da CAT em córtex cerebral;
- Aumentou a atividade da CAT em hipocampo;
- Aumentou a atividade da SOD e da GSH-Px em cerebelo;
- Diminuiu a atividade da GSH-Px em hipocampo;
- Diminuiu a atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral;

Prevenção com trolox, ácido ascórbico e glutationa sobre os efeitos causados pela galactose na concentração de 3,0mM

- Todos preveniram

Prevenção com trolox, ácido ascórbico e glutationa sobre os efeitos causados pela galactose na concentração de 5,0mM

- O ácido ascórbico preveniu parcialmente o aumento do TBA-RS em córtex cerebral;
- O ácido ascórbico não preveniu e o trolox e a GSH preveniram parcialmente o aumento do TBA-RS em cerebelo;
- O ácido ascórbico e a GSH preveniram parcialmente o aumento do TBA-RS em hipocampo;

Prevenção com trolox, ácido ascórbico e glutationa sobre os efeitos causados pela galactose na concentração de 10,0mM

- O ácido ascórbico preveniu parciamente o aumento de TBA-RS em córtex cerebral;
- Nenhum antioxidante preveniu o aumento de TBA-RS em cerebelo;
- Todos os antioxidantes preveniram parcialmente o aumento de TBA-RS em hipocampo;
- O trolox não preveniu o aumento da atividade da CAT em hipocampo;
- O ácido ascórbico não preveniu a diminuição da atividade da AChE em córtex cerebral.

Os resultados indicam que a galactose induz o estresse oxidativo em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos, pois altera as defesas antioxidantes enzimáticas, causa peroxidação lipídica e dano à proteínas.

Os resultados também mostram que a galactose reduz a atividade da AChE em córtex cerebral de ratos, interferindo nas ações do sistema colinérgico.

Além disso, a presença de antioxidantes preveniu a maioria das alterações causadas *in vitro* pelo acréscimo de galactose.

Os resultados deste trabalho poderão contribuir para um melhor entendimento dos sintomas observados nos pacientes galactosêmicos. Mesmo que seja difícil extrapolar nossos achados para humanos, poderíamos sugerir que o uso de antioxidantes deve ser considerado como uma estratégia terapêutica no tratamento da galactosemia.

7 REFERÊNCIAS

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods of Enzymology*, 105:121–126.

Aksenov, V. M. Y, Markesbery, W. R. (2001). Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, *302*(2-3):141-5.

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. *Neurochemical Research, 24*(9):1101-6.

Berry, G. T. (2012). Galactosemia: When is it a newborn screening emergency? *Molecular Genetics and Metabolism*, *106*(1), 7–11.

Bosch, A. M. (2011). Classic galactosemia: Dietary dilemmas. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *34*(2), 257–260.

Chanprasert, S., & Scaglia, F. (2015). Adult liver disorders caused by inborn errors of metabolism : Review and update. *Molecular Genetics and Metabolism*, *114*(1), 1–10.

Chiappori, F., Merelli, I., Milanesi, L., & Marabotti, A. (2013). Static and dynamic interactions between GALK enzyme and known inhibitors: Guidelines to design new drugs for galactosemic patients. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *63*, 423–434.

Coelho, A. I., Lourenço, S., Trabuco, M., Silva, M. J., Oliveira, A., Gaspar, A., Rivera, I. (2015). Functional correction by antisense therapy of a splicing mutation in the GALT gene. *European journal of human genetics*, *23*(4):500-6.

Ellman, G., L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82:70–77.

Esterbauer, H., Cheeseman, K., H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186:407–421.

Ferreira, A. G. K., Da Cunha, A. A., Machado, F. R., Pederzolli, C. D., Dalazen, G. R., De Assis, A. M., Wyse, A. T. S. (2012). Experimental hyperprolinemia induces mild oxidative stress, metabolic changes, and tissue adaptation in rat liver. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(1), 174–183.

Gitzelmann, R. (1995). Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. *European journal of pediatrics*, *154*(7 Suppl 2), S45–S49.

Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition Reviews*, *70*(5), 257–265.

Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(3), 637–644.

Halliwell, B. (2014). Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: Avoiding pitfalls. *Biomedical journal*, *37*(3), 99–105.

Low, L. C. K. (1996). Inborn errors of metabolism : clinical approach and management. *Hong Kong Medical Journal*, *2*(3), 274-281.

Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, *193*(1):265-75.

Mak, C. M., Lee, H. C. H., Chan, A. Y. W., & Lam, C. W. (2013). Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, *50*(6), 142–62.

Marinou, K., Tsakiris, S., Tsopanakis, C., Schulpis, K. H., & Behrakis, P. (2005). Suckling rat brain regional distribution of acetylcholinesterase activity in galactosaemia in vitro. *Metabolic Brain Disease*, *20*(3), 227–236.

Marklund, S. L. (1985). Pyrogallol autoxidation. I*n: Greenwald RA (ed) Handbook for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, 243–247.

Martins, A. M. (1999). Inborn errors of metabolism: a clinical overview. *São Paulo medical journal, 117*(6), 251–65.

Mayatepek, E., Hoffmann, B., & Meissner, T. (2010). Inborn errors of carbohydrate metabolism. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, *24*(5), 607–618.

McCorvie, T. J., & Timson, D. J. (2011). The structural and molecular biology of type i galactosemia: Enzymology of galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *IUBMB Life*, *63*(9), 694–700.

Oakley, F. D., Abbott, D., Li, Q., & Engelhardt, J. F. (2009). Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(6), 1313–1333.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, *4*(2), 89–96.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2014). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 11–26.

Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*, *155*(3), 219–230.

Reznick, A. Z., Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233:357–363.

Rover JR, L., Höehr, N. F., Vellasco, A. P., & Kubota, L. T. (2001). Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova. 24*(1), 112–119.

Sahoo, S., Franzson, L., Jonsson, J. J., & Thiele, I. (2012). A compendium of inborn errors of metabolism mapped onto the human metabolic network. *Molecular BioSystems*, *8*(10), 2545.

Schadewaldt, P., Hoffmann, B., Hammen, H. W., Kamp, G., Schweitzer-Krantz, S., & Wendel, U. (2010). Longitudinal assessment of intellectual achievement in patients with classical galactosemia. *Pediatrics*, *125*(2), e374–e381.

Scolamiero, E., Cozzolino, C., Albano, L., Ansalone, A., Caterino, M., Corbo, G., Ruoppolo, M. (2015). Targeted metabolomics in the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism. *Molecular BioSystems*, *11*(6),1525-35.

Shenhar-Tsarfaty, S., Berliner, S., Bornstein, N. M., & Soreq, H. (2014). Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, *53*(3), 298–305.

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., Wannmacher, C. M., Wajner, M. (2004). Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex byD-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Neurochemistry International,* 44:45–52.

Souza, C. N. De, Martins, A. M., D'Almeida, V., & Silva, L. C. S. De. (2007). Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. *Revista Paraense de Medicina*, *21*(2), 23–28.

Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, *25*(3-4), 207–

218.

Tsakiris, S., Michelakakis, H., & Schulpis, K. H. (2005). Erythrocyte membrane acetylcholinesterase, Na+, K+-ATPase and Mg2+-ATPase activities in patients with classical galactosaemia. *Acta paediatrica*, *94*(9), 1223–1226.

Viggiano, E., Marabotti, A., Burlina, A. P., Cazzorla, C., D'Apice, M. R., Giordano, L., Burlina, A. B. (2015). Clinical and molecular spectra in galactosemic patients from neonatal screening in northeastern Italy: Structural and functional characterization of new variations in the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene. *Gene*, *559*(2), 112–118.

Waisbren, S. E., Potter, N. L., Gordon, C. M., Green, R. C., Greenstein, P., Gubbels, C. S., Berry, G. T. (2012). The adult galactosemic phenotype. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(2), 279–286.

Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymol*ogy, 77:325–332.

Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *46*, 200–206.

Wyse, A. T. S., Bavaresco, C. S., Hagen, M. E. K., Delwing, D., Dutra-filho, C. S., Wajner, M. (2001). In vitro stimulation of oxidative stress in cerebral cortex of rats by the guanidine compounds accumulating in hyperargininemia. *Brain Research*, 923:50–57.

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, *54*(3):176-186.

Zou, G. M. (2007). Cancer stem cells in leukemia, recent advances. *Journal of cellular physiology*, *213*(2), 440–444.