

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LUCIANA BANDEIRA ALVES SCHMIDT

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GALACTOSE
SOBRE VIAS APOPTÓTICAS EM CÉREBROS DE RATOS
JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós - graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia
Fernanda Schuck

**CRICIÚMA, SC
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S353e Schmidt, Luciana Bandeira Alves.

Efeito da administração aguda de galactose sobre vias apoptóticas em cérebros de ratos jovens / Luciana Bandeira Alves Schmidt ; orientadora : Patrícia Fernanda Schuck . – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

58 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2015.

1. Galactosemia. 2. Galactose – Administração. 3. Morte celular. 4. Apoptose. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.042

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo em colaboração com o Laboratório de Bioenergética, ambos do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Luciana Bandeira Alves Schmidt** sob o título “**Efeito da administração aguda de galactose sobre vias apoptóticas em cérebros de ratos jovens**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 24 de julho de 2014

Alexandra Zugno
Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno
Membro Relator

Paulo Cesar Lock da Silveira
Prof. Dr. Paulo Cesar Lock da Silveira
Membro Interno

Guilherme Baldo
Prof. Dr. Guilherme Baldo
Membro Externo

Patrícia Fernanda Schuck
Profa. Dra. Patrícia Fernanda Schuck
Orientadora

Vanessa Moraes de Andrade
Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Coordenadora Adjunta do PPGCS

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, pelo sopro da vida, pelo abençoar diário, pela persistência e dedicação em minha alma.

Agradecer a meus pais: Enei e Sueli, que não se contentaram apenas em me presentear com a vida e com seu amor, mas que em muitos momentos abdicaram de seus sonhos em favor dos meus. Pai, Mãe vocês são minha fonte de inspiração, minha certeza diária que se um dia eu for capaz de distribuir amor, respeito e fidelidade como vocês, serei feliz!

Agradecer a minhas filhas: Kiara e Niara, meus amores e minha razão única de vida! Filhas desculpem pelas minhas ausências diárias, foram noites intermináveis de estudos e dedicação e por tantas vezes pensei em desistir... E o que me impulsionava a seguir em frente? O amor presente em seus rostos, seus sorrisos, suas palavras. O amor presente até no silêncio de estar com vocês!

Ao meu marido: Valdinei, meu porto seguro, minha tranquilidade em meio às inquietudes, meu sorriso eterno... Eu te amo e sempre te amarei! Por que seus olhos são o meu olhar, sua boca é meu sorrir... Obrigado pelo apoio incansável, pelas palavras de carinho e estímulo, pelos sorrisos, pela parceria!

A minhas queridas sobrinhas, que às vezes parecem filhas: Elisandra, Veridiana, Lidiane e Márcia, obrigado pelas conversas, pelas risadas, pelo incentivo, pelo apoio.

Aos meus pequenos amores Gui, Lulu e Tuco amo vocês!

À minha amiga Thaís, talvez em meio a todos os momentos de cumplicidade na elaboração deste projeto eu não tenha explicitado o tanto de carinho, confiança e admiração que sinto por ti.

À minha orientadora Patrícia Fernanda Schuck, pela orientação e dedicação, que impulsionou o meu crescimento profissional e pessoal através dos conhecimentos compartilhados durante a elaboração da dissertação.

A todos vocês o meu muito obrigada!!!

RESUMO

A galactosemia é uma condição causada pela deficiência de uma das quatro enzimas envolvidas no metabolismo da galactose: galactose mutarotase, galactocinase, galactose-1-fosfato uridiltransferase e UDP galactose - 4 - epimerase. Como consequência deste bloqueio, os indivíduos afetados pela galactosemia não podem efetivamente converter galactose em glicose, apresentando acúmulo de galactose e seus metabólitos em seus tecidos, especialmente nas células do tecido nervoso central, fígado e rins. Dentre os principais achados clínicos, destaca-se disfunção cerebral com atraso de desenvolvimento e deficiência de aprendizado e de memória, cuja fisiopatologia ainda não está esclarecida. Considerando-se o parco conhecimento a respeito dos mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral apresentado por pacientes galactosêmicos, o presente trabalho avaliou o efeito da administração aguda de galactose sobre vias apoptóticas em cérebros de ratos jovens. Para tanto, vinte e quatro ratos machos da linhagem Wistar de 30 dias foram divididos em dois grupos: controle e galactosemia. Os animais do grupo galactosemia receberam uma única administração subcutânea de 5 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal de galactose. Os animais do grupo controle receberam solução salina nos mesmos volumes por via subcutânea. Uma hora após a administração deste carboidrato, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina e o córtex cerebral e o cerebelo foram isolados e limpos. Foram então determinados os imunoconteúdo de Bax, Bcl-2, AIF e p53, proteínas que fazem parte de vias de morte celular por apoptose, e a razão Bax/Bcl-2 nestes tecidos por *western blotting*. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos conteúdos das proteínas avaliadas, bem como na razão entre Bax/Bcl-2 em nenhuma das estruturas cerebrais estudadas. Os resultados do presente trabalho sugerem que a administração aguda de galactose não altera os processos de morte celular por apoptose via proteínas Bax, Bcl-2, AIF e p53 em cérebro de ratos jovens.

Palavras-chave: Galactose. Galactosemia. Cérebro. Morte celular. Apoptose

ABSTRACT

Galactosemia is a condition caused by the deficiency of one of for enzymes involved in the metabolism of galactose: galactose mutarotase, galactokinase, galactose-1-phosphate uridyl transferase and UDP galactose – 4 - epimerase. As a consequence of this blockade, the individuals affected by galactosemia present accumulation of galactose and its metabolites in tissues, especially in the cells of the central nervous system, liver and kidneys. The main signal and symptoms are brain dysfunction with development delay and learning and memory disability, whose pathophysiology is not well understood. Considering the little knowledge about the pathophysiology mechanism of brain damage shown by galactosemic patients, this study evaluated the effect of acute administration of galactose on apoptotic pathways in the brain of young rats. Twenty-four 30-day-old male Wistar rats were divided into two groups: control and galactosemia. The animals of the galactosemia group received a single subcutaneous administration of 5 µmol/g of body weight of galactose. The animals of the control group received the same volume of a saline solution subcutaneously. One hour after the administration, the animals were killed by decapitation and the cerebral cortex and the cerebellum were isolated and cleaned. The brain structures were used for the determination of the content of the proteins involved in the apoptotic cascade: Bax, Bcl-2, AIF, and p53 by western blotting, and the ratio Bax/Bcl-2. It was not observed any significant difference in Bax, Bcl-2, AIF, and p53 between groups in the brain structures evaluated. Moreover, the ratio Bax/Bcl-2 was not altered in cerebral cortex and cerebellum of animals of galactosemia group when compared to control group. Taken together, the present results demonstrated that the acute administration of galactose does not alter the process of cellular death by apoptosis involving the proteins Bax, Bcl-2, AIF, and p53 in the brains of young rats.

Keywords: Galactose. Galactosemia. Brain. Cellular death. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da galactose.....	21
Figura 2 - Metabolismo da Galactose pela Via de Leloir	23
Figura 3 - Diagrama representativo dos mecanismos de morte celular por apoptose.....	30
Figura 4 - Vias de Sinalização Utilizadas pela proteína p53	31
Figura 5 - Efeito da administração aguda de galactose sobre imunoconteúdo de Bax em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6).	38
Figura 6 - Efeito da administração aguda de galactose sobre imunoconteúdo de Bcl-2 em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)....	39
Figura 7 - Efeito da administração aguda de galactose sobre a razão de Bax/Bcl-2 em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6).....	40
Figura 8 - Efeito da administração aguda de galactose sobre o imunoconteúdo de AIF em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)	41
Figura 9 - Efeito da administração aguda de galactose sobre o imunoconteúdo de p53 em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)	42

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIF Fator indutor de apoptose (do inglês *apoptosis induction factor*)
- Apaf -1 Fator de ativação apoptótico protease 1 (do inglês *apoptotic protease activating factor 1*)
- ATP Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
- Bad Antagonista de Bcl-2 associado à morte celular (do inglês *Bcl-2-associated death promoter*)
- Bak Proteína membro da família Bcl-2, associada à morte celular (do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer*)
- Bax Proteína X associada à Bcl-2 (do inglês *Bcl-2-associated X*)
- Bcl- 2 Proteínas de linfoma de células B (do inglês *antiapoptotic B-cell lymphoma 2*)
- Bid Antagonista de domínio de morte associado a BH3 (do inglês *BH3 interacting-domain death agonist*)
- CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DNA Ácido desoxirribonucleico (do inglês *desoxiribonucleic acid*)
- Endo G Endonuclease G
- Eros Espécies Reativas de Oxigênio
- FADD FAS-com domínio para morte (do inglês *Fas-associated death domain*)
- Fas Receptor do fator de necrose tumoral membro da superfamília do receptor 6 (do inglês *TNF receptor superfamily, member 6*)
- Gal-1-P Galactose-1-fosfato (do inglês *galactose-1-phosphate*)
- GALK Galactocinase (do inglês *galactokinase*)
- GALE UDP galactose-4-epimerase
- GALM Galactose mutarrotase
- GALT Galactose-1-fosfato uridiltransferase
- IAP Proteínas inibidoras de apoptose (do inglês *inhibitor of apoptosis*)
- TNF Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)
- UMP Monofosfato de uridina (do inglês *uridine monophosphate*)
- UDP Glicose - monofosfato de uridina-glicose (do inglês *uridine monophosphate-glucose*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 GALACTOSE.....	21
1.2 GALACTOSEMIA	24
1.2.1 Apresentações clínicas	24
1.2.2 Diagnóstico.....	25
1.2.3 Tratamento	25
1.2.4 Fisiopatologia da Galactosemia	25
1.3 MORTE CELULAR	27
1.4 A PROTEÍNA P53.....	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 ANIMAIS	35
4.2 ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GALACTOSE.....	35
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	35
4.4 WESTERN BLOTTING.....	36
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO(S).....	57
ANEXO A: DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 GALACTOSE

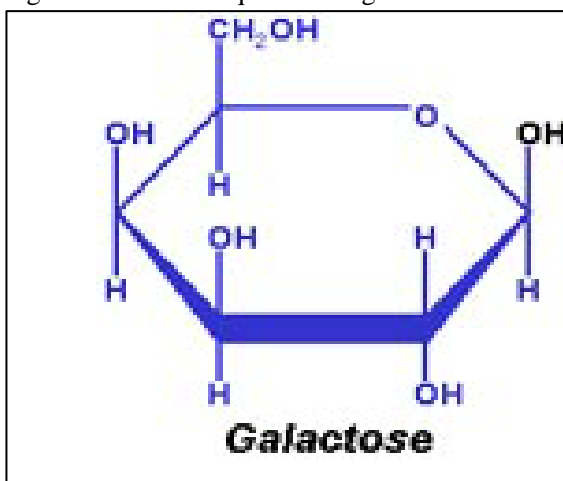
A galactose ($C_6 H_{12} O_6$) é um carboidrato simples (monossacarídeo) com grupo funcional aldeído, classificado como aldose (figura 1), isômero da glicose e epímero desta no carbono 4. Sua obtenção pode ocorrer de três formas:

I - Pela biossíntese;

II - Pela dieta, como molécula livre;

III - Através da dieta, em decorrência da quebra do dissacarídeo lactose no intestino delgado pela ação da enzima lactase, originando dois monossacarídeos, glicose e galactose, sendo assim absorvidas (FRIDOVICH-KEIL; WALTER, 2001).

Figura 1 - Estrutura química da galactose



Fonte: Página Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição.

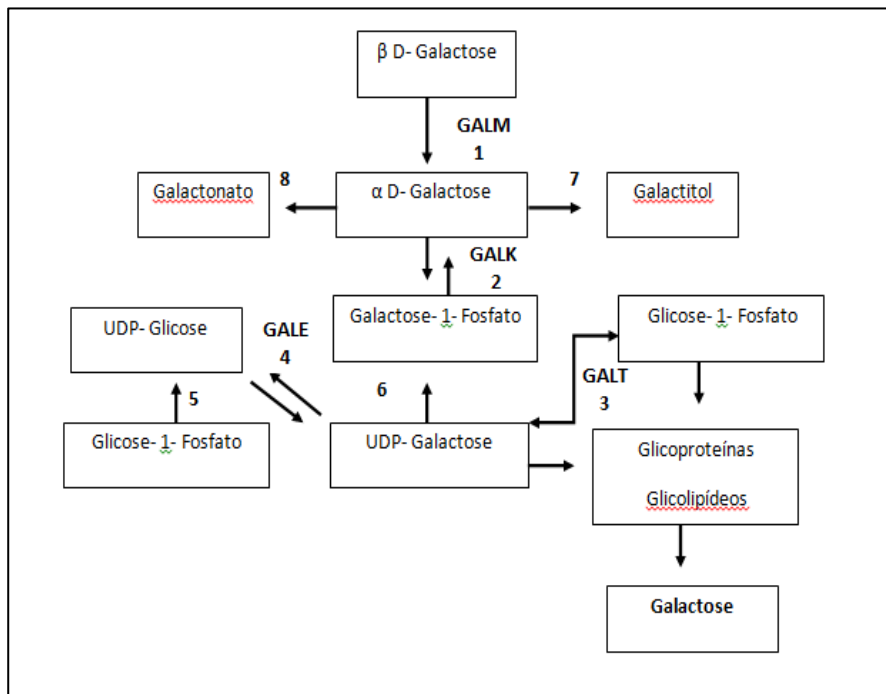
Este monossacarídeo é um constituinte importante da dieta alimentar desde o nascimento (SILVA, 2008), pois a lactose presente no leite é a principal fonte de galactose na dieta. Também ocorre a produção endógena deste carboidrato, principalmente através da conversão enzimática entre a uridina difosfato-glicose (UDP-glicose) e UDP-galactose e da rotatividade natural de glicolípídeos e glicoproteínas (LAI et al., 2009).

O intestino delgado está envolvido no fornecimento dos glicídios para a circulação sistêmica através da absorção dos produtos resultantes da digestão dos carboidratos (MORAES, 2011). Após a ingestão e consequente absorção nas microvilosidades intestinais, a galactose é rapidamente convertida em glicose no fígado. O fígado é o órgão que metaboliza a maior quantidade de galactose, e a conversão de galactose em glicose ocorre de forma tão eficaz que cerca de metade da galactose ingerida já estará convertida em glicose após trinta minutos de sua ingestão (MARKS, 1998; ROCHA, 2000; SMITH, 2008).

A hidrólise da lactose por uma galactosidase – a lactase (E.C. 3.2.1.108) – nas microvilosidades intestinais leva à liberação de glicose e galactose (SEGAL et al., 2004). No fígado, a galactose é rapidamente metabolizada pela ação de quatro principais enzimas, que constituem a via de Leloir (Figura 2): galactose mutarrotase (GALM; E.C. 5.1.3.3), galactocinase (GALK; E.C. 2.7.1.6), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT; E.C. 2.7.7.12) e UDP galactose-4-epimerase (GALE; E.C. 5.1.3.2) (HOLDEN et al., 2003; MORAES, 2011).

No primeiro passo da via de Leloir, a β -D-galactose é epimerizada a α -D-galactose pela enzima GALM. O próximo passo é dependente de ATP, em que ocorre a fosforilação através da enzima GALK, formando galactose-1-fosfato (Gal-1-P). A terceira enzima do metabolismo da galactose é a GALT, que catalisa a transferência do grupo uridinamono-fosfato (UMP) da uridinadifosfato-glicose (UDP-glicose) para Gal-1-P, gerando assim glicose-1-fosfato e UDP-galactose. A via se completa através da enzima GALE, que converte UDP-galactose em UDP-glicose (HOLDEN et al., 2003; SILVA, 2008).

Figura 2 - Metabolismo da Galactose pela Via de Leloir



Fonte: Silva, 2008

Onde: (1) galactose mutarrotase (GALM), (2) galactocinase (GALK), (3) galactose-uridiltransferase (GALT), (4) galactose epimerase (GALE), (5) difosfato de uridina-glicose pirofosforilase, (6) difosfato de uridina-glicose fosforilase, (7) aldoserredutase, (8) galactose desidrogenase.

Embora a via de Leloir seja claramente a rota predominante do metabolismo da galactose em humanos e outras espécies, esta não é a única rota. Estudos em micro-organismos, camundongos e humanos evidenciam a existência de outras rotas para o metabolismo da galactose, como a redução da galactose ou galactitol pela enzima aldose redutase (E.C. 1.1.1.21) e a oxidação da galactose através da galactose desidrogenase (E.C. 1.1.1.19) formando galactonato (BOSCH, 2010). O galactitol não pode ser metabolizado, sendo predominantemente excretado na urina e o galactonato é metabolizado pela via das pentoses-fosfato (LAI et al., 2009).

1.2 GALACTOSEMIA

A galactosemia é um dos principais achados clínicos dos erros inatos de metabolismo da galactose, de herança autossômica recessiva (Holden et al., 2003), causados pela deficiência de uma das três enzimas da Via de Leloir: GALK (OMIM 230200), GALT (OMIM 230200) e GALE (OMIM 230350) (OMIM; 2006).

Os pacientes afetados pela galactosemia não podem efetivamente converter galactose em glicose, apresentando acúmulo deste carboidrato e seus metabólitos, como galactitol, galactonato e Gal-1-P (HOLTON et al., 2001; BOSCH, 2006). O acúmulo de Gal-1-P é decorrente na deficiência de GALT e GALE, enquanto o acúmulo de galactitol e galactonato é decorrente da deficiência da GALK (LAI et al., 2009). Esses metabólitos acumulam-se em vários tecidos, mas especialmente nas células do tecido nervoso central, fígado, rins e cristalino e em líquidos biológicos (HOLTON et al., 2001; BOSCH, 2006; SILVA, 2008).

Dados epidemiológicos dos diferentes tipos de galactosemia variam conforme o local do estudo. No Brasil, há uma frequência geral estimada de 1:20.000 nascidos vivos (CAMELO Jr. et al., 2009).

1.2.1 Apresentações clínicas

As apresentações clínicas da galactosemia variam conforme o defeito enzimático na Via de Leloir. A mais comum e clinicamente mais grave forma de galactosemia é denominada galactosemia clássica, causada pela deficiência de GALT (MUMMA et al., 2008). Na deficiência de GALT, inicialmente os sintomas clínicos são perda de peso, vômitos, diarreia, hipotonia e letargia. Posteriormente, pode haver icterícia, hepatomegalia, insuficiência hepática, doença tubular renal, anormalidades hematológicas (anemia hemolítica), falência ovariana precoce e septicemia (particularmente por *Escherichia coli*) (BERRY et al., 2004; SILVA, 2008; CAMELO Jr. et al., 2009).

Cronicamente, os achados clínicos mais relevantes são alterações neurológicas decorrentes da exposição prolongada ao excesso de galactose e incluem déficit cognitivo, comprometimento da aprendizagem e memória, ataxia e dispraxia (WIERENG et al., 2008). Um percentual significativo dos pacientes afetados pela galactosemia clássica apresenta na idade adulta complicações decorrentes da patologia como deficiência cognitiva, problemas de fala, distúrbios neurológicos e de movimento (WAGGONER et al., 1999; SCHWEITZER-KRANTZ,

2003; BOSCH, 2006; FRIDOVICH-KEIL; WALTER, 2001). Estudos de neuroimagem em pacientes galactosêmicos demonstram alterações de mielinização, anormalidades na substância branca, perda de células de Purkinje, atrofia cerebral e cerebelar (DUBROFF et al., 2008; LAI et al., 2008).

A deficiência da enzima GALK, também conhecida como galactosemia do tipo II, apresenta como principal achado clínico a catarata, geralmente bilateral, encontrada ainda em neonatos (BOSCH, 2010). Por outro lado, a galactosemia tipo III, causada pela deficiência da enzima GALE, inicialmente se apresenta de forma assintomática e posteriormente pode apresentar quaisquer dos danos dos outros tipos de galactosemias (DUBROFF et al., 2008).

1.2.2 Diagnóstico

O achado da galactosúria associado ao quadro clínico é evidência suficiente para que se inicie tratamento para galactosemia. Entretanto, o diagnóstico definitivo consiste na determinação da atividade da enzima deficiente em eritrócitos isolados associada à determinação dos níveis plasmáticos de galactose e/ou Gal-1-P, diferenciando os tipos de galactosemia (SHIN-BUEHRING; SCHAUB, 1980; MORAES, 2011).

1.2.3 Tratamento

Todo recém-nascido em que for detectada a galactosemia, independentemente da enzima deficiente, deve iniciar tratamento imediatamente. Este consiste em eliminar qualquer ingestão de galactose no período de lactente, substituindo o leite materno, leite de vaca ou fórmulas infantis tradicionais por leite de soja ou fórmula elementar (leite livre de galactose). Dá-se preferência pela última, tendo em vista que algumas fórmulas de soja contêm alguma porcentagem de galactose, evitando assim o acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos (BOSCH, 2010; HOLDEN et al., 2003).

1.2.4 Fisiopatologia da Galactosemia

A importância do metabolismo normal da galactose foi reconhecida há mais de trinta anos, quando a via de Leloir foi completamente identificada (HOLDEN et al., 2003). Mesmo após décadas de estudo dos mecanismos fisiopatológicos da galactosemia, a toxicidade da galactose e seus metabólitos ainda é desconhecida

(MUMMA et al., 2008; LAI et al., 2009). Atualmente, são propostos quatro mecanismos fisiopatológicos para a galactosemia:

i) Acúmulo de metabolitos tóxicos bloqueados na via de Leloir:

Os pacientes com galactosemia, devido à biossíntese, estão constantemente expostos à galactose e são continuamente submetidos aos efeitos tóxicos dos metabólitos acumulados na via de Leloir, podendo manifestar síndrome de toxicidade aguda e crônica (SEGAL; BERRY, 1995).

ii) Acúmulo de produtos tóxicos do catabolismo alternativo da galactose:

A galactose não metabolizada pela via de Leloir levará à formação de galactitol e o galactonato (BERRY et al., 2004). O galactitol não pode ser metabolizado e é excretado predominantemente na urina (SIEGEL et al., 1998), no entanto, parte deste galactitol se acumula em fibras do cristalino e de outros tecidos. Por outro lado, o galactonato é metabolizado através do via das pentoses e ainda não está claro se esta acumulação é tóxica (SIEGEL et al., 1998).

iii) Deficiência de UDP-galactose (e UDP-glicose), com implicações na glicosilação de proteínas e galactosilação:

Para cada molécula de glicose-1-fosfato produzido, uma molécula de UDP-glicose e uma molécula de Gal-1-P são consumidas e uma molécula de UDP-galactose é formada sem gasto de energia. A UDP-glicose pode vir da epimerização da UDP-galactose ou da reação da fosforilase. Assim, a produção de glicose-1-fosfato a partir de cada molécula de Gal-1-P pode ocorrer em detrimento da formação de UDP-galactose (Potter et al., 2008). Tal declínio na disponibilidade de UDP-glicose prejudicaria ainda mais a formação de UDP-galactose a partir da reação catalisada pela GALE, e este por sua vez levaria à produção anormal de glicoproteínas e glicolipídeos.

iv) Alteração no metabolismo do inositol:

Wells et al. (1965) relataram uma diminuição no inositol livre e ligado a lipídeos em tecidos de pacientes e animais com galactosemia. Recentemente, a expressão de inositol monofosfatase humana confirmou a toxicidade da galactose em células de levedura, sugerindo um papel patogênico da redução do inositol na galactosemia.

Alguns estudos afirmam que a toxicidade pré-natal causada pela exposição ao excesso de galactose e seus metabólitos ainda na vida intraútero pode ser mais um mecanismo participante da fisiopatologia da galactosemia (HOLDEN et al., 2003; LAI et al., 2008). Neste contexto, poucos estudos foram realizados com o intuito de demonstrar efeitos tóxicos da galactose, especialmente com respeito à galactosemia.

Estudos demonstraram que altas concentrações de galactose inibe a síntese de receptores de serotonina, o que poderia estar relacionado à grave deficiência intelectual apresentada por pacientes galactosêmicos (FRIEDMAN et al., 1989, ZHANG et al., 2005; KUMAR, 2013).

Em relação às complicações de longo prazo, distúrbios neurológicos têm sido tema de intensa investigação. Até o momento, os estudos de toxicidade deste órgão na deficiência de GALT foram principalmente descritivos, com pouco conhecimento sobre o mecanismo exato da patogenia (LAI et al., 2009). Uma depleção das células de Purkinje é observada no cerebelo, mas nada se sabe sobre o motivo de sua redução em número ou porque estas células são mais suscetíveis à toxicidade da galactose em comparação a outros tipos celulares (FRIEDMAN et al., 1989).

Segundo Kubo et al. (1999), as complicações mais comuns da galactosemia em neonatos podem ser causadas por um aumento da produção de espécies reativas. Estes autores demonstraram que o excesso de galactose resultou na ativação da aldose redutase, aumentando a produção de galactitol, esgotando assim NADPH e inibindo a atividade da glutatona redutase. Como resultado, o peróxido de hidrogênio é acumulado, causando dano oxidativo às biomoléculas.

Recentemente, estudos têm observado que a galactose, administrada por diferentes vias, induz estresse oxidativo em diferentes tecidos, como cérebro, fígado e rins (CAKATAY et al., 2013; PRAKASH; KUMAR, 2013; YANG et al., 2013; KALAZ et al., 2014). Em um modelo animal de administração crônica de galactose, os animais apresentaram deterioração gradual na aprendizagem e capacidade de memória. Além disso, houve indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e morte celular por apoptose no cérebro de camundongos (PRAKASH; KUMAR, 2013).

1.3 MORTE CELULAR

Desde o desenvolvimento embrionário e durante toda a vida, centenas ou milhares de células são perdidas e restituídas diariamente. Assim células que não estão em pleno funcionamento, apresentando danos irreversíveis perdem sua magnitude vital. Contudo, não há um único mecanismo de morte celular. Atualmente existem muitas formas de morte celular conhecidas, contudo, as mais frequentes são: a necrose e a apoptose (OUYANG, 2012).

A necrose pode ser causada por agentes físicos e químicos e apresenta características morfológicas e bioquímicas distintas, que

desencadeiam processo inflamatório, atingindo as células vizinhas (SIEGEL et al., 1999). A morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta a dano grave às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular (SAMALI et al., 1996). Conseqüentemente ocorre à geração de uma resposta inflamatória, que pode causar dano e até morte de células vizinhas podendo afetar um grande número de células ao mesmo tempo. Devido ao desencadeamento do processo inflamatório, há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN et al., 2002).

No processo de morte celular por necrose, ocorrem alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP interferindo na função da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, levando a tumefação celular devido ao aumento de Na^+ citosólico. O aumento do Ca^{2+} citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem ruptura da membrana plasmática, ativação de proteases com conseqüente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando a migração de macrófagos ativando uma resposta inflamatória do sistema imune. Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um intumescimento celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da Na^+ , K^+ -ATPase, ocasionando a perda da permeabilidade seletiva da membrana (SAMALI et al., 1996; MCCONKEY, 1998; ROCHA et al., 2007).

A apoptose foi associada ao termo ‘morte celular programada’, proposto por Lockshin em 1964, ao designar um tipo de morte celular que ocorre de forma programada (GEWIES; GRIMM, 2003). Atualmente, sabe-se que a apoptose é um processo vital para o desenvolvimento embrionário, para manutenção da homeostase tecidual e para o funcionamento do sistema imune. Neste processo, ocorre a condensação do citoplasma e núcleo juntamente com a fragmentação do DNA em oligômeros. Por fim, os ‘corpos apoptóticos’ formados pela fragmentação das células são fagocitados pelas células do sistema retículo-endotelial (SIEGEL et al., 1999; ROCHA, 2000).

A apoptose é decorrente da ativação da via das caspases, pertencentes à família das cisteínas-proteases, que se tornam ativas após a clivagem proteolítica de resíduos do ácido aspártico (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997). Mais de 12 caspases humanas são conhecidas atualmente, sendo que as caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 estão envolvidas no processo apoptótico (THORNBERRY et al., 1998; EARNSHAW et

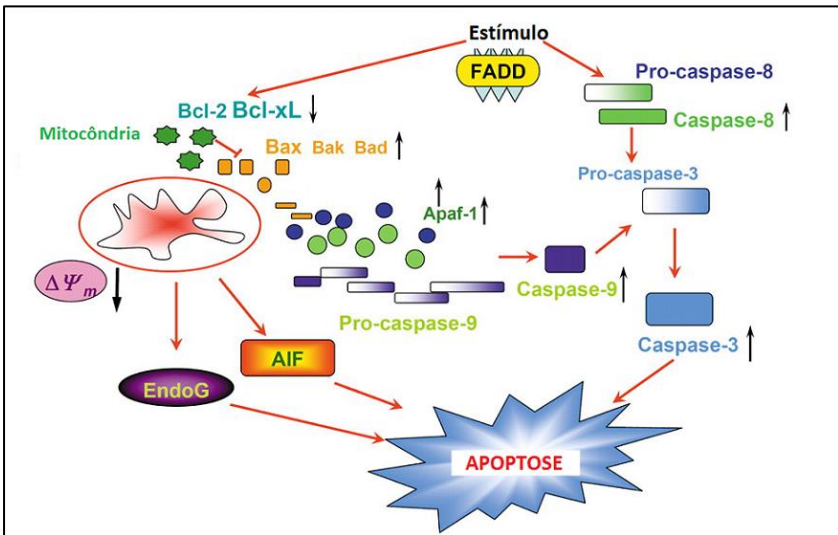
al., 1999). Diferentes caspases são ativadas dependendo da via de execução de apoptose, que pode ser pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial), como observado na figura 3.

Na via extrínseca, ocorre a ativação dos receptores de membrana da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) por ligantes específicos. Estas proteínas apresentam um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular denominado “domínio de morte”. Após a ligação com seu ligante, ocorre a trimerização do receptor, que então irá interagir com uma molécula conhecida como a proteína associada à FAS-com domínio para morte (FADD), que por sua vez recrutará a procaspase 8, desencadeando uma cascata de caspases que executará morte celular por apoptose (NAISMITH et al., 1998; DANIEL et al., 2001).

A via intrínseca é desencadeada em consequência de diferentes sinais de estresse intracelular, como danos ao DNA, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias ou ainda a privação de fatores de crescimento (HENGARTNER, 2000). Estes sinais irão convergir para a mitocôndria, induzindo sua permeabilização e, por fim, a liberação de moléculas pró-apoptóticas (DESAGHER; MARTINOU, 2000). Neste sentido, as proteínas da família Bcl-2, divididas entre proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1) e proteínas pró-apoptóticas (Bad, Bid, Bax e Bak), participam ativamente da regulação da apoptose, sendo que a homeostasia é mantida pelo controle da quantidade destas proteínas. As proteínas pró-apoptóticas, quando há sinal de apoptose, inibem as proteínas antiapoptóticas e promovem a abertura de poros na membrana da mitocôndria, desencadeando permeabilização da membrana mitocondrial externa (CHIPUK et al., 2006). Assim, o citocromo *c*, uma das proteínas liberadas para o citosol, forma um complexo com a proteína Apaf-1, que recrutará a caspase iniciadora 9, formando o chamado apoptossomo. A caspase 9 ativada, por sua vez, ativa as caspases 3 e 7, levando à apoptose (MUNOZ-PINEDO et al., 2006).

Além disso, estudos indicam que a apoptose pode ser decorrente de vias independentes de caspases (HA et al., 1998; MONNEY et al., 1998; DRENOU et al., 1999; MATEO et al., 1999; MILLER et al., 1999; CARMODY; COTTER, 2000; JONES et al., 2000). A endonuclease G (Endo G) e fator de indução da apoptose (AIF), por exemplo, são dois mediadores mitocondriais que, a partir de suas translocações para o núcleo, têm a capacidade de produzir fragmentação de DNA em grande escala, independentemente das caspases (LI et al., 2001; YAKOVLEV; FADEN, 2004).

Figura 3 - Diagrama representativo dos mecanismos de morte celular por apoptose



Fonte: Adaptado de Kumar et al., 2007.

Onde: AIF (fator indutor de apoptose), Apaf-1 (fator de ativação apoptótico protease 1 / apoptotic protease activating factor-1), Bad (antagonista de Bcl-2 associado a morte celular), Bax (proteína X associada a Bcl-2), Bcl-2 (proteínas de células B), Bcl-xL (linfoma de células B-extra grande), Endo G (endonuclease G).

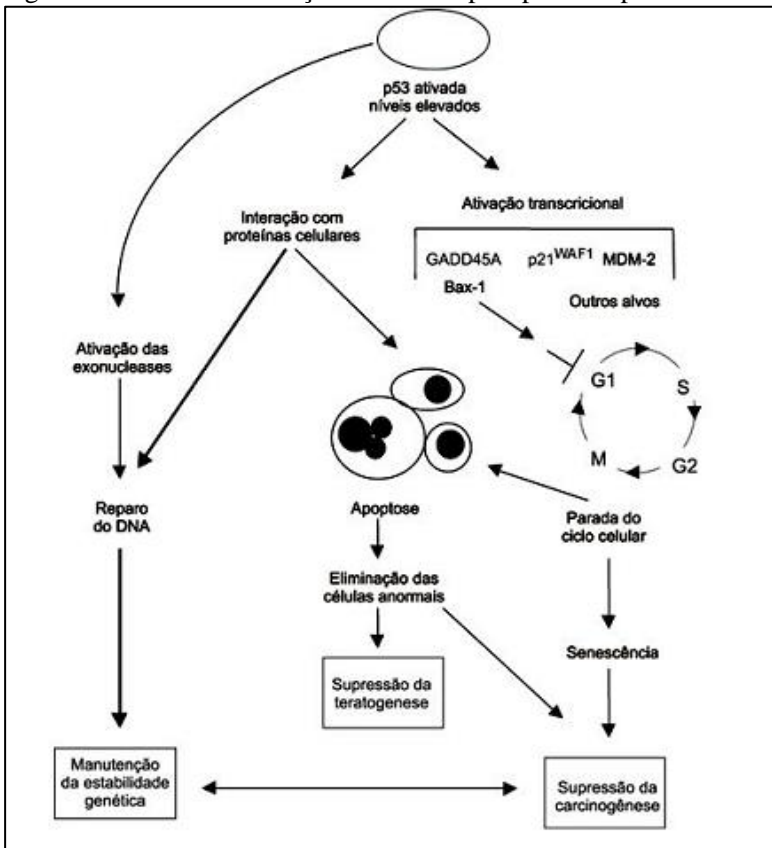
A apoptose é um processo indispensável à vida e, portanto, deve seguir um processo metódico. Qualquer distúrbio em sua regulação, ou seja, tanto o excesso quanto a deficiência, pode provocar inúmeras alterações ao organismo. A apoptose está diretamente envolvida em patologias neurodegenerativas ou lesões como demência progressiva, perda da cognição e memória (SAMALI, 1996; SHELTON et al., 2004; ROCHA et al., 2007).

1.4 A PROTEÍNA P53

A p53 é uma proteína codificada por um gene situado no cromossomo de número 17, o qual leva o mesmo nome. Sua principal função está relacionada à preservação da integridade do código genético de cada célula, ou seja, a manutenção da mesma sequência de

nucleotídeos ao longo de toda a molécula de DNA igualmente presente em cada célula do organismo (ROCHA, 2000). Durante o ciclo de divisão celular, a proteína p53 verifica a eventual ocorrência de uma mutação na sequência do código genético em consequência e uma duplicação defeituosa do DNA. Caso seja identificada uma mutação, é função da proteína p53, através do desdobramento de uma cascata de reações, impedir que esta célula entre em processo de mitose e complete a divisão celular. Para isto dois caminhos poderão ser seguidos: a correção da mutação através da ativação de proteínas de reparo ou indução de morte através da apoptose (Figura 4) (ROCHA, 2000).

Figura 4 - Vias de Sinalização Utilizadas pela proteína p53



Fonte: Klumb, 2002.

Estes defeitos, se pouco extensos, podem ser corrigidos por enzimas especializadas. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose. Ao contrário do gene Bcl-2, o p53 para o ciclo celular, desencadeando os processos de apoptose. Células mutantes para este gene não sofrem apoptose. Tais células sobrevivem por mais tempo, acumulam mais mutações e multiplicam-se sem controle, podendo gerar tumores (BENNETT, 1999).

2 JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral apresentado pelos pacientes galactosêmicos ainda são desconhecidos. A hipótese mais aceita é de que altas concentrações de galactose exerçam efeitos neurotóxicos e contribuam para tal dano tecidual. Portanto, torna-se importante avaliar o efeito agudo de altas concentrações de galactose sobre a cascata apoptótica no sistema nervoso central (SNC).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração aguda de galactose sobre vias apoptóticas em cérebros de ratos jovens.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o imunoconteúdo de Bax em cérebro (córtex cerebral e cerebelo) de ratos de 30 dias de vida submetidos à administração aguda de galactose;
- ✓ Avaliar o imunoconteúdo de Bcl-2 em cérebro (córtex cerebral e cerebelo) de ratos de 30 dias de vida submetidos à administração aguda de galactose;
- ✓ Avaliar a razão Bax/Bcl-2 em cérebro (córtex cerebral e cerebelo) de ratos de 30 dias de vida submetidos à administração aguda de galactose;
- ✓ Avaliar o imunoconteúdo de AIF em cérebro (córtex cerebral e cerebelo) de ratos de 30 dias de vida submetidos à administração aguda de galactose;
- ✓ Avaliar o imunoconteúdo de p53 em cérebro (córtex cerebral e cerebelo) de ratos de 30 dias de vida submetidos à administração aguda de galactose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados vinte e quatro ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, de 30 dias de vida e provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e com exaustão. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Universidade (protocolo n° 72/2010), levando em consideração a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) n° 465 (23/05/2013).

Todos os procedimentos foram realizados por pessoas treinadas e qualificadas em local específico para manipulação animal.

4.2 ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GALACTOSE

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle e grupo galactose. Os animais do grupo controle receberam uma única administração subcutânea de solução de cloreto de sódio 0,9%. Simultaneamente, os animais do grupo galactose receberam uma única administração subcutânea de D-galactose (Sigma) na dose de 5 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal. Uma hora após as administrações, os animais de ambos os grupos sofreram eutanásia por decapitação sem anestesia, de acordo com as Diretrizes para a Prática de Eutanásia (CONCEA, 2013).

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Imediatamente após a eutanásia, o cérebro foi removido e o córtex cerebral e cerebelo foram isolados e homogeneizados (1:20, peso/volume) em Tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi reservado em alíquotas de 100 μL e armazenado a -80°C até o momento da quantificação das proteínas marcadoras de apoptose.

4.4 WESTERN BLOTTING

Foram utilizados 30 µg de proteína para a eletroforese em gel monodimensional de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 10-15%. As proteínas separadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução bloqueadora (5% albumina) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo policlonal de coelho contra a proteína Bcl-2, (CellSignaling - 2876), Bax (CellSignaling - 2772), AIF e p53 (CellSignaling - 9662). Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas foram lavadas 4 vezes durante 15 min. Após as lavagens, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:10.000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignalWest Pico (Pierce). A quantificação das bandas foi avaliada utilizando-se o Software ImageLab (Bio-Rad). Em seguida, a membrana foi submetida ao processo de *stripping* e foi incubada com um anticorpo contra β-actina (Sigma - A2228) na presença de 5% de leite. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:10.000) foi aplicado à membrana e uma incubação por 1 hora à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. Da mesma forma, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS – Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce). A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o Software ImageLab (Bio-Rad). SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen) foi utilizado como um marcador de peso molecular para certificar-se de que as faixas corretas foram analisadas para Bax, Bcl-2, AIF, p53 e β-actina.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

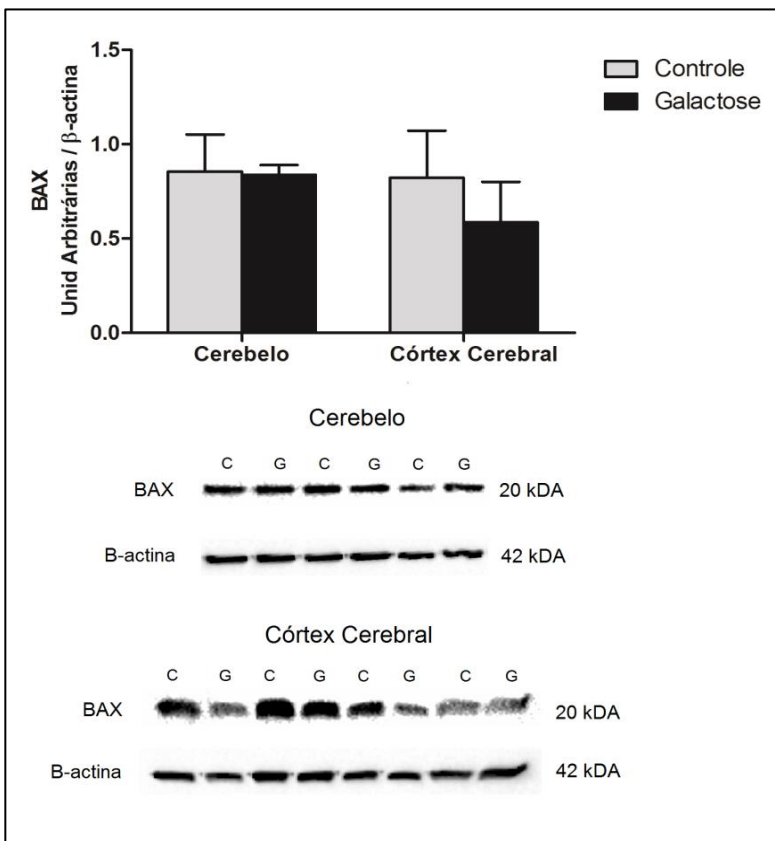
Os resultados foram expressos \pm desvio padrão da média e analisados utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versão 16.0 em um computador PC compatível. O teste estatístico utilizado foi o teste t de *Student*. Considerou-se estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O presente estudo investigou os efeitos da administração aguda de galactose sobre o imunocontéudo de Bax, Bcl-2, AIF e p53 em córtex cerebral e cerebello de ratos de 30 dias de vida.

Em um primeiro momento, avaliou-se o imunocontéudo de Bax e foi observado que não houve diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle em nenhuma das estruturas estudadas (Figura 5).

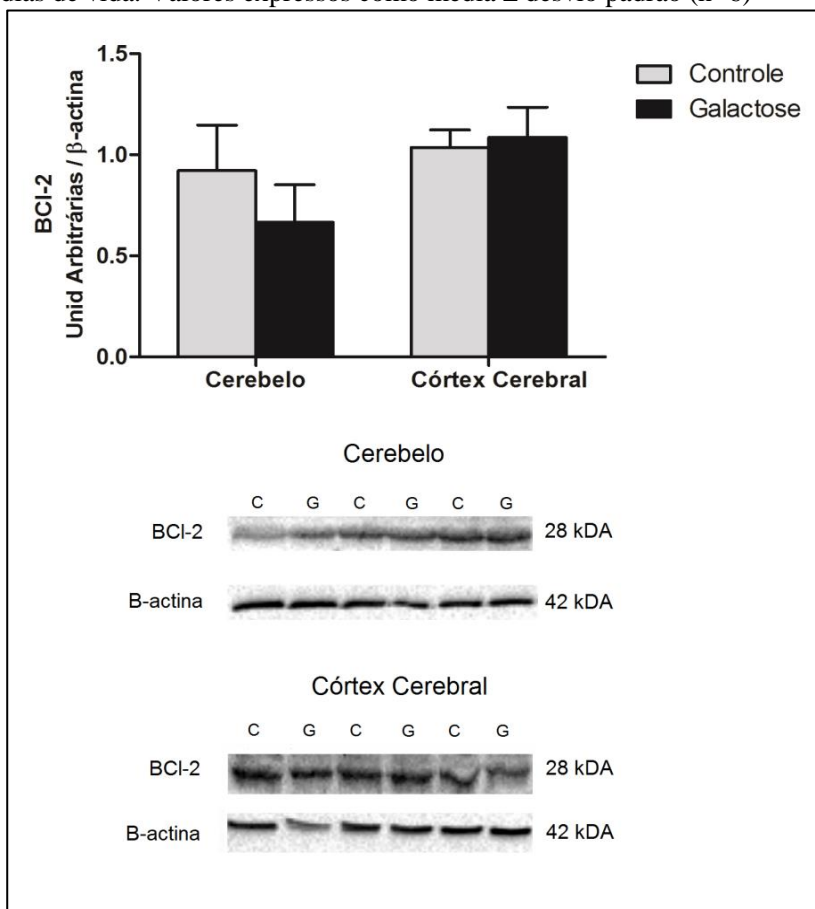
Figura 5 - Efeito da administração aguda de galactose sobre imunocontéudo de Bax em córtex cerebral e cerebello de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6).



Fonte: Dados da pesquisadora

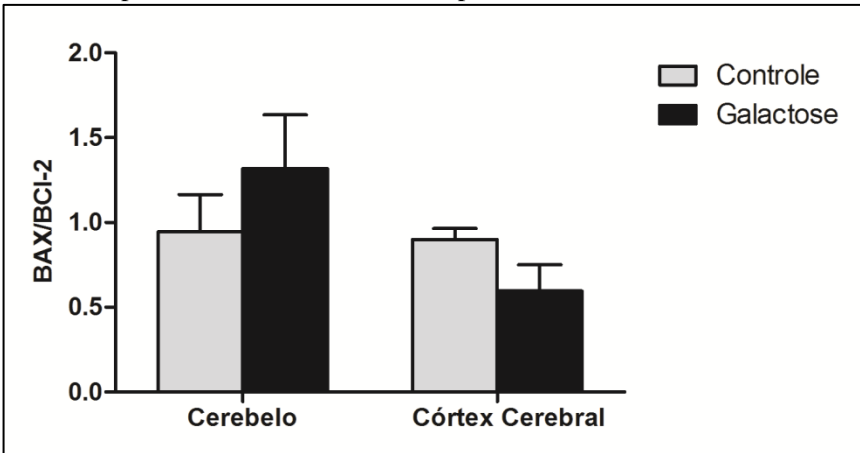
Em seguida, foi avaliado o imunocontéudo de Bcl-2 em córtex cerebral e cerebello de ratos de 30 dias de vida. Também não foi observada diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle em nenhuma das estruturas analisadas (Figura 6). Da mesma forma, não houve alteração na razão Bax/Bcl-2 em estruturas cerebrais de animais que receberam administração aguda de galactose em comparação ao grupo controle (Figura 7).

Figura 6 - Efeito da administração aguda de galactose sobre imunocontéudo de Bcl-2 em córtex cerebral e cerebello de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)



Fonte: Dados da pesquisadora

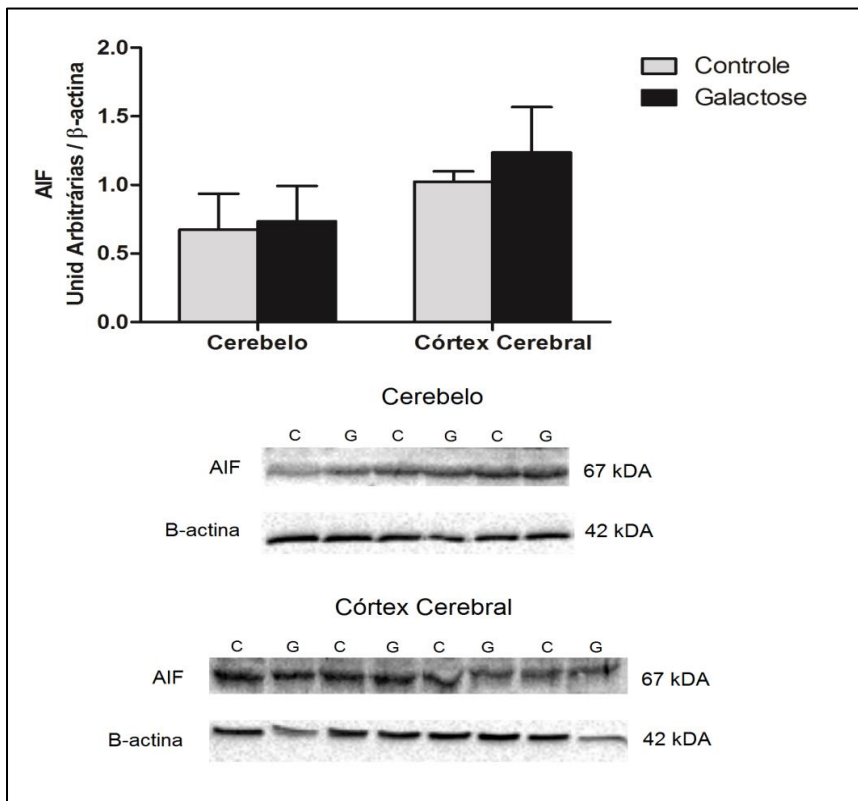
Figura 7 - Efeito da administração aguda de galactose sobre a razão de Bax/Bcl-2 em córtex cerebral e cerebello de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)



Fonte: Dados da pesquisadora

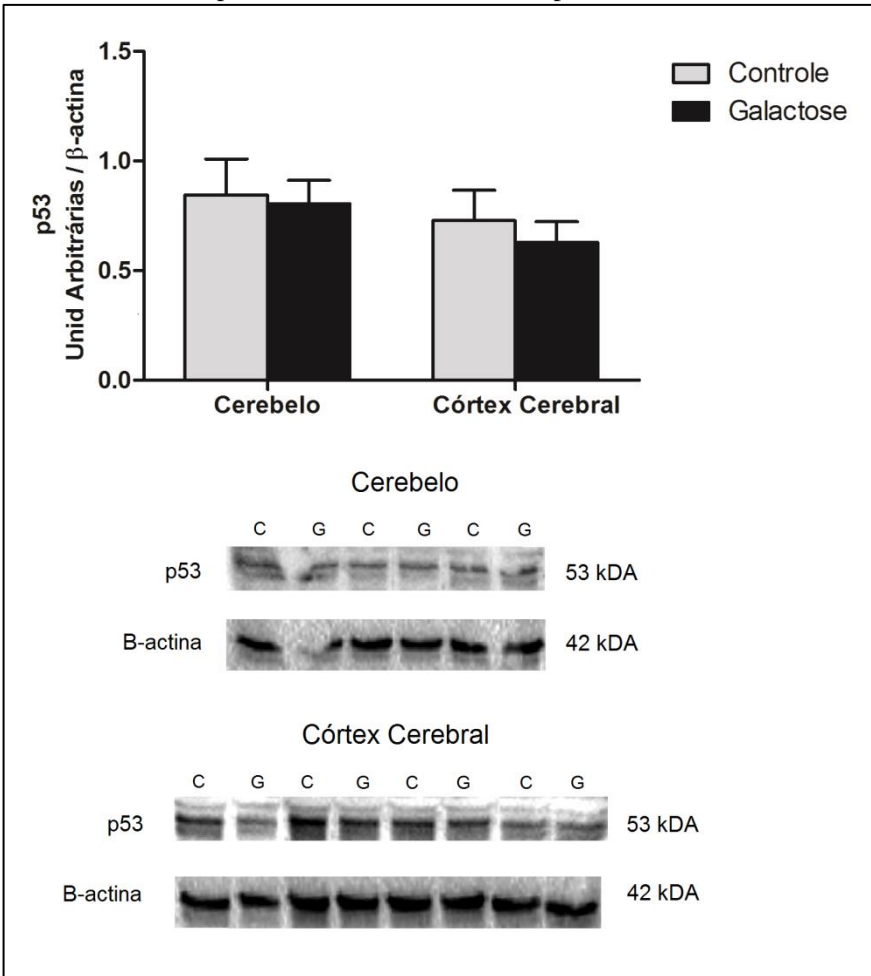
Finalmente, foi analisado o imunoconteúdo das proteínas AIF e p53. Também não foi observada nenhuma diferença significativa entre o grupo submetido ao modelo experimental de galactosemia e o grupo controle em nenhuma das estruturas analisadas (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Efeito da administração aguda de galactose sobre o imunocnteúdo de AIF em córtex cerebral e cerebello de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)



Fonte: Dados da pesquisadora

Figura 9 - Efeito da administração aguda de galactose sobre o imunoconteúdo de p53 em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=6)



Fonte: Dados da pesquisadora

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de altas concentrações de galactose sobre parâmetros envolvidos na morte celular induzida por apoptose em cérebro de ratos jovens para melhor compreender a fisiopatologia do dano neurológico observado nos pacientes acometidos por galactosemia. Alterações em decorrência da exposição prolongada a altas concentrações de galactose foram descritas em pacientes portadores desta doença, incluindo diminuição cognitiva evidenciada em testes de quociente de inteligência, assim como déficit de memória, atraso no desenvolvimento ou alteração de fala e atraso de desenvolvimento global (tônus muscular, postura e marcha) (KAUFMAN et al., 1995). A administração de galactose em concentrações elevadas foi recentemente descrita como sendo um modelo animal de doença neurodegenerativa, devido à semelhança dos achados clínicos referentes ao SNC (LAI et al., 2008). Estudos *in vivo* demonstraram também alterações neurológicas após a administração de galactose em ratos, incluindo alterações comportamentais (memória, atenção e aprendizado) e diminuição de respostas motoras (ataxia, dispraxia) (Waggoner et al., 1999; Holton et al., 2001; SCHWEITZER-KRANTZ, 2003; BOSCH, 2006; DUBROFF et al., 2008; FRIDOVICH-KEIL e WALTER, 2001; LAI et al., 2008; LU et al., 2010).

Para o desenvolvimento do presente estudo, as análises foram realizadas nas estruturas cerebrais que mais sofrem comprometimento frente à exposição a altas concentrações de galactose: *i*) o córtex cerebral, que desempenha funções complexas do cérebro como memória, atenção, consciência, linguagem, percepção e pensamento e *ii*) o cerebelo, responsável pela manutenção do equilíbrio, controle do tônus muscular, movimentos voluntários e aprendizagem motora (NOLTE, 2008).

A avaliação do imunocontéudo de Bax não indicou diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle nas estruturas estudadas. A proteína pró-apoptótica Bax aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à liberação de para o citosol, onde se liga à proteína Apaf-1. Esse complexo ativa a caspase 9, que ativa a caspase 3, desencadeando o processo de apoptose (CHIPUK, 2006; MUNOZ-PINEDO et al., 2006). Em seguida, foi analisado o imunocontéudo de Bcl-2 em córtex cerebral e cerebelo de ratos de 30 dias de vida, não sendo observada diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle nas estruturas estudadas. A proteína antiapoptótica Bcl-2 tem a função biológica de suprimir a morte celular

programada induzida por vários estímulos (BATISTATOU et al., 1993; FICHER et al., 1993). Além disso, foi analisada a razão Bax/Bcl-2 e observou-se a mesma ausência de interferência após a administração aguda de galactose. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que, em córtex cerebral e cerebelo, as vias estudadas não estão ligadas ao mecanismo de morte celular por apoptose no modelo animal de galactosemia utilizado.

Por outro lado, muitos estudos apontam a exposição à galactose como fator indutor de neurodegeneração, que pode estar ligado a estresse oxidativo e morte celular por apoptose (CHANDRA et al., 2000; HO, 2003; LI et al., 2011; PRAKASH E KUMAR, 2013; RUAN et al., 2014). Neurônios são altamente vulneráveis ao dano oxidativo e o SNC tem capacidade reduzida de regeneração celular em comparação a outros órgãos (ANDERSEN, 2004; BARBOSA et al., 2006). Neste sentido, estudos demonstraram uma redução nos níveis das defesas antioxidantes enzimáticas em cérebros de ratos que receberam galactose (KUMMAR et al., 2011; PRAKASH; KUMAR, 2013). Dessa forma, apesar de não serem observadas alterações nos parâmetros de morte celular por apoptose, deve-se ressaltar que a avaliação do estado redox das células cerebrais de animais expostos a altos níveis de galactose deverá ser realizada.

Estudos relacionando o efeito neurotóxico da galactose são escassos. Entretanto, a morte celular por apoptose em tecidos com exposição excessiva à galactose já foram relatados. Forges et al. (2006) induziram galactosemia em ratas jovens através de suplementação de galactose na dieta, e observaram os mecanismos de danos ovarianos, evidenciando a relevância da toxicidade direta da galactose e seus metabólitos e sua posterior indução de estresse oxidativo e a apoptose. Em outro estudo, foi analisada a função ovariana de ratos alimentados com uma dieta rica em galactose e foi observada uma redução significativa da função ovariana, que ficou evidente por um aumento na expressão de Fas e FasL (membros da família TNF, denominados ligantes de membrana celular, envolvidos no mecanismo de morte celular por apoptose) e diminuição das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose). Estes resultados dão suporte à hipótese de que a disfunção ovariana em ratas galactosêmicas está relacionada ao aumento de apoptose em células ovarianas (LAI et al., 2008). Outros resultados corroboram esta questão afirmando uma relação entre toxicidade induzida por excesso de galactose e seus metabólitos e a disfunção ovariana e ainda que esta relação resulta em morte celular por apoptose (LIU et al., 2000; BANERJEE et al., 2012).

Para que fosse analisada uma via de apoptose independente da ativação de caspases, a determinação dos níveis AIF foi realizada através da quantificação do imunocontéudo deste peptídeo. Em linha com os resultados anteriores, não houve alteração significativa no imunocontéudo deste marcador. Por outro lado, Zanna et al. (2005), em um modelo de neuropatia hereditária utilizando um meio de galactose, observaram morte celular por apoptose mediada por AIF e Endo G.

Estudos relacionando AIF e galactose são escassos, diferentemente da literatura relacionando o AIF como fator indutor de morte celular por apoptose e posterior neurodegeneração. Em um estudo em que foram avaliados córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos transgênicos PSI (com mutações na proteína Presenilina 1 - PS1, presentes no processo neurodegenerativo de pacientes com Alzheimer), foi evidenciada uma redução significativa dos níveis intracelulares de ATP e um aumento de EROs, especialmente em córtex cerebral, sugerindo que AIF pode desempenhar um papel de indutor de morte cerebral independentemente de caspases em regiões específicas do cérebro. Além disso, estes achados estão intimamente relacionados à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e neurodegeneração (YU et al., 2014). O AIF é um fator de indução de apoptose, pois promove a morte celular a partir da translocação nuclear ou, ainda, por interferir na atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Yu et al. (2011) observaram um aumento da expressão de AIF em córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos senis, especialmente em estriado, reforçando que esta proteína está diretamente associada à neurodegeneração.

Avaliou-se também o imunocontéudo da proteína p53, pelo fato desta proteína poder induzir a morte celular e por estar ligada à preservação do código genético celular. Assim como os resultados anteriores, não se observou nenhuma alteração significativa neste marcador. Por outro lado, Banerjee et al. (2012) observaram que a galactose *in vitro* levou a formação de EROs, distúrbio na membrana mitocondrial estimulada pela expressão de p53 e apoptose em células ovarianas.

Estudos relacionam a administração de galactose como forma de indução ao envelhecimento acelerado, incluindo a deterioração de habilidades cognitivas e motoras, sendo estes eventos precedidos por neurodegeneração e apoptose. Zhu et al. (2014) avaliaram o processo de neurodegeneração em hipocampo de ratos induzido pela administração de galactose e observaram que a proteína p53 demonstrou mediar os efeitos adversos sobre a interrupção do ciclo celular e/ou apoptose em

células proliferativas, reforçando a ideia de que a apoptose é precedida pelo acúmulo nuclear de p53 e expressão aumentada de Fas (CD95) (YANG et al., 2013).

Em relação às concentrações utilizadas no presente estudo, sabe-se que, em pacientes com galactosemia, as concentrações séricas de galactose variam conforme a aderência ao tratamento dietético restritivo. Um estudo europeu com quarenta e um pacientes afetados por galactosemia demonstrou que os níveis plasmáticos de galactose eram de $3,8 \pm 1,7 \mu\text{mol/L}$, quando comparados ao grupo controle constituído de trinta e três indivíduos ($0,33 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$) (SCHADEWALDT et al., 2010). Em um estudo similar realizado nos Estados Unidos, foram analisadas as concentrações de galactose no plasma de quinze pacientes com tratamento dietético adequado, encontrando concentração de galactose de $2,72 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$ (indivíduos controles saudáveis: $1,48 \pm 0,7 \mu\text{mol/L}$) (Ning et al., 2000). Por último, foi demonstrado que, antes do início do tratamento, neonatos afetados por galactosemia clássica apresentam concentrações de Gal-1-P de até 6,5 mM em hemolisados e, após o estabelecimento do tratamento com restrição da ingesta de galactose, os níveis caem drasticamente, chegando a 0,1 a 0,2 mM. Cabe salientar que, em indivíduos saudáveis, os níveis de Gal-1-Po são indetectáveis quando são utilizados os mesmos métodos de detecção (GITZELMANN, 1995). Dessa forma, deve-se mencionar que os resultados encontrados no presente trabalho foram obtidos utilizando-se concentrações semelhantes às aquelas encontradas em soro e tecidos de pacientes afetados por galactosemia.

YU et al.(2014) avaliaram um modelo de senilidade utilizando D-galactose na dose de 100 (g/kg)/dia administrados por via subcutânea em ratos e foram observado sintomas evidentes de envelhecimento, tais como apatia, neurodegeneração e déficit motor. Ruan et al. (2014) observaram a indução de estresse oxidativo, envelhecimento e apoptose em cérebro de ratos submetidos à administração crônica de D-galactose na dose de 300 (mg/kg)/dia por administração subcutânea, durante 8 semanas. Neste mesmo modelo, também foram observadas lesão inflamatória e apoptose. Trabalhos futuros devem investigar se um modelo crônico ou doses mais elevadas de galactose são capazes de alterar estes mesmos parâmetros avaliados agudamente no presente estudo.

É importante ressaltar que, no presente estudo, foram avaliados marcadores apoptóticos e fatores de indução de morte celular por apoptose. A investigação da morte celular por necrose não foi o objeto do estudo e, portanto, não se pode excluir o envolvimento destes

mecanismos no processo de neurodegeneração em pacientes afetados por galactosemia.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no presente trabalho não corroboram a hipótese de que a galactose participa dos mecanismos de dano cerebral e morte celular por apoptose. Vários estudos afirmam que modelo animal induzido por galactose induz a neurodegeneração. Acreditamos na possibilidade de que uma dose maior ou modelos com níveis elevados de galactose cronicamente sustentados, ou ainda morte celular por necrose, possam contribuir para elucidar a fisiopatologia desta doença. Dessa forma, novos estudos devem ser realizados no intuito de melhor compreender os mecanismos de neurodegeneração e morte celular em pacientes galactosêmicos.

REFERÊNCIAS

- Andersen, JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature Reviews Neuroscience**. California: Redwood Blvd. 2004; 10(8): 18-19.
- Banerjee S, Chakraborty P, Saha P, Bandyopadhyay SA, Kabir SN. Ovotoxic effects of galactose involve attenuation of follicle-stimulating hormone bioactivity and up-regulation of granulosa cell p53 expression. **Plos One**. 2012; 7(2): 1371-1372.
- Barbosa LF, Medeiros MHG, Augusto O. Danos Oxidativos e Neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocaute? **Química Nova**. 2006; 29(6): 1352-1360.
- Batistatou A Merry DE, Kosmeyer SJ, Grenie LA. Bcl2 Affects survival but not neuronal differentiation of Pcl2 clls. **J Neurociências**. 1993; 13: 443.
- Berry GT, Moate PJ, Reynolds RA, Yager CT, Ning C, Boston RC, Segal S. The rate of de novo galactose synthesis in patients with galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**. 2004; 81(1): 22–30.
- Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. Metabolic dissertation. **Journal Inherited Metabolism Disease**. 2006; 29(4): 516-525.
- Bosch AM. Classic Galactosemia: Dietary dilemmas. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill. 2010; 8: 1553–1583.
- Cakatay U, Aydın S, Atukeren P, Yanar K, Sitar ME, Dalo E, Uslu E. Increased protein oxidation and loss of protein-bound sialic acid in hepatic tissues of D-galactose induced aged rats. **Current Aging Science**. 2013; 6(2): 135-141.
- Camelo JRS, Fernandes MI, Maciel LM, Scrideli CA, Camargo ASJR, Passador CS, Leite PC, Resende DR, Souza LO, Giugliane R, Jorge SM. Galactosaemia in a Brazilian population: High incidence and cost-

benefit analysis. **Journal Inherited Metabolism Disease**. 2009; 32(1): 141-149.

Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radicals Biology Medicals**. 2000; 29: 323–333.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. **Cell Death Differ**. 2006; 13(8): 1396-1402.

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal Immunology Methods**. 2002; 265(2): 49-72.

Daniel PT, Wider T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**. 2001; 15(7): 1022-1032.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biology**. 2000; 10(9): 369-376.

Dubroff JG, Ficicioglu C, Segal S, Wintering NA, Alavi A, Newberg AB. FDG-PET findings in patients with galactosemia. **Journal Inherited Metabolism Disease**. 2008; 31: 533–539.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Review Biochemical**. 1999; 68: 383–424.

Fagundes-Neto U. **Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição**. 2012. Disponível em: Disponível em: <http://gastropedinutri.blogspot.com.br/2012_04_01_archive.html> Acesso em: 10 jun. 2014.

Feldman M, Sleisenger MH, Scharshmidt BF. Liver. In: Feldman M, Sleisenger MH, Scharshmidt BF. **Gastrointestinal and Liver Disease**. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1998.

Fridovich-Keil JL, Walter JH. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited**

Disease. 8^a ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

Forges T, Monier BP, Leheup B, Jouvet P. et al. Pathophysiology of impaired ovarian function in galactosemia. **Human Reproduction Update.** 2006; 12(5): 573-584.

Friedman JH; Levy HL; Boustany RM. Late onset of distinct neurologic syndromes in galactosemic Siblings. **Neurology.** 1989; 39: 741-742.

Gewies AM, Grimm S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF-alpha mediated apoptosis. **Bros Journal Cancer.** 2003; 89(8): 1574-1580.

Gitzelmann R. Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. **European Journal Pediatrics.** 1995; 154(2): 45-49.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature.** 2000; 407: 770-776.

Ho SC, Liu JH, Ry W. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. **Biogerontology.** 2003; 4(1): 15-18.

Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and Function of Enzymes of the Leiloir Pathway for Galactose Metabolism. **Journal Biology Chemical.** 2003; 278 (45): 43885-43888.

Holton JB, Walter JH, Tyfield LA, Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly S, Valle D, Childs B, Kinzler KW. **The metabolic and molecular basis of inherited disease.** New York: McGraw-Hill. 2001; 8: 1553-1583.

Kalaz EB, Coban J, Aydın AF, Doğan-Ekici I, Dođru-Abbasođlu S, Oztezcan S, Uysal M. Carnosine and taurine treatments decreased oxidative stress and tissue damage induced by D-galactose in rat liver. **Journal Physiology Biochemical.** 2014; 70(1): 15-25.

Kaufman FR, Kogut MD, Donnel GN, Goebelsmann U, March C, Koch R. Hypergonadotropichypogonadism in female patients with galactosemia. **New England Journal Medics.** 1995; 304: 994-998

- Klumb CE, Júnior GBC. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfoides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2002; 24 (2): 111-125.
- Kubo E, Miyoshi N, Fukuda M, Akagi Y. Cataract formation through the polyol pathway is associated with free radical production. **Experimental Eye Reserach**. 1999; 68(4): 457-464.
- Kumar V, Hogge A, Baer A. **Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed. São Paulo: Editora Saunders Elsevier; 2007.
- Lai K, Tang M, Yin X, Klapper H, Wierenga K, Elsas L. ARHI: A new target of galactose toxicity in Classic Galactosemia. **Bioscience Hypotheses**. 2008; 1(5): 263-271.
- Lai K, Elsas LJ, Wiereng KJ. Galactose Toxicity in Animals. **IUBMB Life**. 2009; 61: 1063-1074.
- Li WJ, Nie SP, Xie MY, Yu Q, Chen Y, He M. Ganoderma atrum polysaccharide attenuates oxidative stress induced by d-galactose in mouse brain. **Life Science**. 2011; 88(15-16): 713-718.
- Liu G, Hale GE, Hughes CL. Galactose metabolism and ovarian toxicity. **Reproduction Toxicology**. 2000; 14(5): 377-384.
- Marks DB, Marks AD, Smith CM. **Amino Acids Found in Proteins**. In: Basic Medical Biochemistry, Baltimore: Williams e Wilkins, 1998.
- Mcconkey D J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**. 1998; 99(3): 157-168.
- Moraes, FA. **A administração aguda de D-Galactose provoca um aumento dependente de idade na atividade da acetilcolinesterase em córtex cerebral de ratos**. [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2011.
- Mumma JO, Chhay JS, Ross KL, Eaton JS, Newell-Litwa KA, Fridovich- Keil JL. Distinct Roles of Galactose- 1P in Galactose Mediated Growth Arrest of Yeast Deficient in Galactose - 1P

Uridyltransferase (GALT) and UDP-Galactose 4'- Epimerase (GALE). **Molecular Genetics Metabolism**. 2008; 93(920): 160-171.

Munoz-Pinedo C, Guio-Carrion A, Goldstein JC, Fitzgerald P, Newmeyer DD, Green DR. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. 2006; 103(31): 11573-11578.

Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochemical Science**. 1998; 23(2): 74-79.

National Center for Biotechnology Information. 2006. OMIM: online Mendelian Inheritance in Man [database]. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>. Acesso em: 03 jun. 2014.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. **Trends Biochemical Science**. 1997; 22(8): 299-306.

Nolte, J. **The Human Brain: An Introduction to its Functional Anatomy**. Philadelphia: Mosby. 2008; 6.

Ouyang L, Shi z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**. 2012; 45(6): 487-498.

Potter NL, Lazarus JA, Johnson JM, Steiner RD, Shriberg LD. Correlates of language impairment in children with galactosaemia. **Journal Inherited Metabolism Disease**. 2008; 31: 524–532.

Prakash A, Kumar A. Pioglitazone alleviates the mitochondrial apoptotic pathway and mito-oxidative damage in the d-galactose-induced mouse model. **Clinical Experimental and Pharmacology & Physiology**. 2013; 40(9): 644-651.

Rocha LCF. **Galactosemia Clássica**. Faculdade Ciências da Nutrição e Alimentação. [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Saúde. – Universidade do Porto. 2000.

Rocha AB, Grivicich I, Regner A, Brondani A. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2007; 53(3): 335-343.

Ruan Q, Hu X, Ao H, Ma H, Gao Z, Liu F, Kong D, Bao Z, Yu Z. The neurovascular protective effects of huperzine a on d-galactose-induced inflammatory damage in the rat hippocampus. **Journal Gerontology**. 2014; 60(5) 45-48.

Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis: the story so far. **Experientia Basel**. 1996; 52(9): 933 – 941.

Schadewaldt P, Hoffmann B, Hammen HW, Kamp G, Schweitzer-Krantz S, Wendel U. Longitudinal assessment of intellectual achievement in patients with classical galactosemia. **Pediatrics**. 2010; 125(2): 374–381.

Schweitzer-Krantz S. Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial tissue of galactosaemia. **Eur J Pediatr**. 2003; 162(1): 50–53.

Segal S, Berry, GT. Disorders of galactose metabolism. In: BA Scriver D, Sly W, Valle D, editors. **The Metabolic Basis of Inherited Diseases**. New York: McGraw-Hill. 1995; 967-1000.

Segal S. Another aspect of the galactosemic enigma. Letter to the editor. **Molecular Genetics Metabolism**. 2004; 81(3): 253–254.

Shelton S B, Krishnamurthy P, Johnson G V W. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. **Journal Neuroscience Research**. 2004; 76(1): 110-120.

Shin - Buering YS, Schaub J. Pitfalls in the radioactive method of galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity measurement. **Clinical Chemistry Acta**. 1980; 25 (2): 231-234.

Siegel CD, Sparks JW, Battaglia FC. Patterns of serum glucose and galactose concentrations in term newborn infants after milk feeding. **Biology Neonate**. 1998; 54 (6): 301–306.

Siegel RM, Fleisher TA. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. **Journal Allergy Clinical Immunology**. 1999; 103(5): 729-738.

Silva ASC. **Diagnóstico da galactosemia clássica**. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.

Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. **Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins. 2008; 2.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. **Science**. 1998; 281: 1312–1316.

Waggoner DD, Buist NRM, Donnell GN. Long-term prognosis in galactosemia: Results of a survey of 350 cases. **Journal Inherited Metabolism Disease**. 1999; 13: 802–818.

Wells WW, Pittiman TA, Egan TJ The Isolation And Identification Of Galactitol From The Brains Of Galactosemia Patients. **Journal Biology Chemical**. 1965; 240: 1002–1004.

Wiereng KJ, Lai K, Buchwald P, Tang M. High-Throughput Screening for Human Galactokinase Inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**. 2008, 13(5): 415-423.

Yang WN, Han H, Hu XD, Feng GF, Qian YH. The effects of perindopril on cognitive impairment induced by d-galactose and aluminum trichloride via inhibition of acetylcholinesterase activity and oxidative stress. **Pharmacology Biochemical and Behavior**. 2013; 114: 31-36.

Yu W, Bonnet M, Farso M, Ma M, Chabot JG, Martin E, Torriglia A, Guan Z, McLaurin J, Quirion R Krantic S. The expression of apoptosis inducing factor (AIF) is associated with aging-related cell death in the cortex but not in the hippocampus in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. **BMC Neurosci**. 2014, 15(1): 73.

Yu W, Gubkina O, Mechawar N, Elwell D, Quirion R, Krantic S. Expression of apoptosis-inducing factor (AIF) in the aged rat brain. **Neurobiology Aging**. 2011; 32(1): 179-180.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease. **Journal Inherited Metabolism Disease**. 2005 (5):997-1007.

Zhang C, Wang SZ, Zuo PP, Cui X, Cai J. Protective effect of tetramethylpyrazine on learning and memory function in d-galactose-lesioned mice. **Chinese medical sciences journal**. 2005; 19(3): 180-184.

Zhu J, Xinyi M, Zeng J, Chunyan X, Liu J. Ginsenoside rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of d-galactose-induced aging. **Plos One**. 2014; 9(6).

ANEXO(S)

ANEXO A: DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou as aulas práticas abaixo.

Protocolo: 72/2010

Professor:

Patrícia Schuck

Título: "Avaliação de parâmetros bioquímicos no sistema nervoso central e em tecidos periféricos de ratos jovens submetidos a concentração elevada de galactose, galactose -1-fosfato e galactitol".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA. www.unesc.net/propex/ceua

Criciúma, 13 de dezembro de 2010.

Carina Rodrigues Boeck

Coordenadora do CEUA