

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

**MÁRCIA BAIROS DE CASTRO**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GALACTOSE  
SOBRE O ESTADO REDOX CELULAR EM ESTRUTURAS  
CEREBRAIS DE RATOS JOVENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia  
Fernanda Schuck

**CRICIÚMA  
2016**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C355e Castro, Márcia Bairros de.

Efeitos da administração aguda de galactose sobre o estado redox celular em estruturas cerebrais de ratos jovens / Márcia Bairros de Castro; orientadora: Patrícia Fernanda Schuck, – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

93 p: il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2016.

1. Galactosemia. 2. Galactose. 3. Erros inatos do metabolismo. 4. Estresse oxidativo. 5. Estresse nitrosativo. 6. Metabolismo energético. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 616.042



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 Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Márcia Bairos de Castro** sob o título **“Efeitos da administração aguda de galactose sobre o estado redox celular em estruturas cerebrais de ratos jovens”**, para obtenção do grau de **DOUTOR 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 Tese.

Criciúma, SC, 29 de julho de 2016.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Membro Relator – UNESC

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **MARIA INÊS DA ROSA**  
Membro Interno – UNESC

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **FABRÍCIA CARDOSO PETRONILHO**  
Membro Externo - UNISUL

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **MARISA JÁDNA SILVA FREDERICO**  
Membro Externo - UFSC

Prof. Dr. **Eduardo Pacheco Rico**  
Professor do PPGCS  
Representante de Incentivamento e Supervisão  
  
Prof. Dr. **Eduardo Pacheco Rico**  
Representante da Orientadora

  
Prof. Dr. **Cláudio Teodoro de Souza**  
Coordenador do PPGCS



*Dedico este trabalho aos meus pais (in memoriam), Assis e Claudiana, que jamais mediram esforços para que eu recebesse o maior bem que poderiam me presentear: a educação. Se hoje me encontro a defender uma Tese de Doutorado, o mérito é de vocês, meus amores, meu exemplo.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Professor Dr. Gustavo Ferreira da Costa, por ter aceitado o desafio de orientar alguém de fora de sua área de atuação e com tão limitados conhecimentos específicos. À Professora Dra. Patrícia Fernanda Schuck, por ter continuado com atenção, carinho e paciência na sequência de minha orientação. Vocês serão sempre meus Mestres, independente dos caminhos que trilhamos.

À Bruna Klippel Ferreira, Ândrea Ramos e Maria Luiza Gomes, parceiras de laboratório, companheiras de ensino e aprendizado, trabalhadoras incansáveis no desempenho da ciência.

Aos companheiros de estrada e de desafio: Elvis e Miriam Wisniewski, Irany Achilles Denti, Wolnei Centenaro e às irmãs de vida, Mari Lúcia Sbardelotto, Fernanda Dal’Maso Camera, Janesca Mansur Guedes e Ana Lúcia Bernardo de Carvalho Morsch. Vocês fizeram a diferença durante esse trajeto.

Aos meus alunos que entenderam minhas ausências e meus atrasos...

A minha casa, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Curso de Fisioterapia, pelo apoio incondicional.

Ao meu maior presente, Susana Ferreira Krampe, pela imensa paciência e organização de nossa vida, durante esses anos finais de doutorado.

***Muito obrigado!!!!***



## RESUMO

A galactosemia é um erro inato do metabolismo em que há deficiência no metabolismo da galactose, levando ao acúmulo de galactose e seus metabólitos nos tecidos e líquidos biológicos de pacientes. Os sinais incluem alterações comportamentais e deficiência intelectual, bem como danos hepáticos, renais e musculares, podendo ocasionar a morte. Estudos têm demonstrado que administrações crônicas e com altas concentrações de galactose causam efeitos deletérios em diversos tecidos corporais, incluindo o sistema nervoso central. Entretanto, a fisiopatologia da doença ainda não está totalmente desvendada. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da administração aguda de D-galactose sobre parâmetros de metabolismo energético e de estresse oxidativo em estruturas cerebrais de ratos jovens. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, de 30 dias de vida, divididos em dois grupos: controle e galactosemia. Para a avaliação de parâmetros de metabolismo energético, os animais do grupo galactosemia receberam uma única administração subcutânea de galactose (5  $\mu\text{mol/g}$ ), enquanto os animais controles receberam solução salina no mesmo volume. Uma hora após a administração, os animais sofreram eutanásia e o córtex cerebral, soro e líquido cefalo raquidiano foram isolados e analisados. Para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo, o protocolo de administração foi idêntico ao anterior. Uma, doze e vinte e quatro horas após a administração, os animais sofreram eutanásia e o córtex cerebral e cerebelo foram isolados limpos e analisados. Observou-se que a administração aguda de D-galactose em ratos jovens causou diminuição significativa da succinato desidrogenase (SDH) em córtex cerebral, no período de uma hora. Também houve alteração da homeostase redox em córtex e cerebelo, com danos oxidativos e prejuízo das defesas antioxidantes, em todos os tempos estudados. Além disso, houve aumento significativo do estresse nitrosativo em córtex cerebral em todos os tempos estudados, porém em cerebelo apenas no período de doze horas da administração de D-galactose. Os resultados do presente trabalho sugerem alterações no metabolismo energético cerebral e danos oxidativos e nitrosativos precoces em cérebro de ratos jovens. Tais



achados podem colaborar para o esclarecimento dos danos cerebrais encontrados em pacientes galactosêmicos.

Palavras-chave: cerebelo; córtex cerebral; estresse nitrosativo; estresse oxidativo; galactose; galactosemia.



## ABSTRACT

Galactosemia is an inborn error of metabolism in which there is a deficiency in the metabolism of galactose, leading to the accumulation of galactose and its metabolites in biological tissues and fluids of patients. Signs include behavioral changes and intellectual disabilities, as well as liver, kidney and muscle damage and may cause death. Studies have shown that chronic and high concentrations of galactose administrations cause deleterious effects in various body tissues including the central nervous system. However, the pathophysiology of the disease is not yet fully unraveled. The aim of this study was to evaluate the effects of acute administration of D-galactose on energy metabolism and oxidative stress parameters in brain structures of young rats. Wistar rats, male, 30-days-old, divided into two groups: control and galactosemia. For the assessment of energy metabolism parameters, galactosemia group of animals received a single subcutaneous administration of galactose (5  $\mu\text{mol} / \text{g}$ ), while control animals received saline at the same volume. One hour after administration, the animals were sacrificed and the cerebral cortex, serum and cerebrospinal fluid were isolated and analyzed. For the evaluation of oxidative stress parameters, the administration protocol was identical to the previous. One, twelve, and twenty-four hours after administration, the animals were sacrificed and the cerebral cortex and the cerebellum were isolated, cleaned and analyzed. It was observed that acute administration of D-galactose in young rats caused a significant reduction in succinate dehydrogenase (SDH) in the cerebral cortex within one hour period. There was also disruption of redox homeostasis in cortex and cerebellum, with oxidative damages of antioxidant defenses in all-time points. In addition, there was significant increase in nitrosative stress in cerebral cortex at all-time points, however in cerebellar only during the twelve hours of the administration of D-galactose. The results of this study suggest injury to brain energy metabolism and oxidative and nitrosatives early damages in brain of young rats. These findings may contribute to the clarification of brain damages found in galactosemic patients.



Keywords: cerebellum; cerebral cortex; galactose; galactosemia; nitrosative stress; oxidative stress.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da galactose.....	29
<b>Figura 2:</b> Metabolismo da galactose.....	31
<b>Figura 3:</b> Principais vias metabólicas envolvidas na síntese de ATP.....	37
<b>Figura 4:</b> Ciclo do ácido cítrico.....	39
<b>Figura 5:</b> Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.	41
<b>Figura 6:</b> Fontes endógenas de produção de espécies reativas e sistemas enzimáticos e não enzimáticos.....	43
<b>Figura 7:</b> Protocolo Experimental para determinação de parâmetros de metabolismo energético.....	50
<b>Figura 8:</b> Protocolo experimental para determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	51
<b>Figura 9:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) e da enzima malato desidrogenase (MDH) em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida, 1 hora após administração.....	57
<b>Figura 10:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre a atividade dos complexos I-III (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em córtex cerebral, fígado, rim e músculo esquelético de ratos de 30 dias de vida, 1 hora após administração.....	58
<b>Figura 11:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida, 1 hora após administração.....	60
<b>Figura 12:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose em parâmetros de estresse oxidativo em cerebelo de ratos de 30 dias de vida, 1 hora após administração.....	61
<b>Figura 13:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida, 12 horas após administração.....	62
<b>Figura 14:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose em parâmetros de estresse oxidativo em cerebelo de ratos de 30 dias de vida, 12 horas após administração.....	63



<b>Figura 15:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida, 24 horas após administração.....	64
<b>Figura 16:</b> Efeitos da administração aguda de D-galactose em parâmetros de estresse oxidativo em cerebelo de ratos de 30 dias de vida, 24 horas após administração.....	65



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AChE = Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)  
ADP = Difosfato de adenosina (do inglês *adenosine diphosphate*)  
AR = Aldose redutase  
ATP = Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)  
CAT = Catalase  
CoA = Coenzima A  
CoQ = Coenzima Q  
DNA = Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)  
ERN = Espécies reativas de nitrogênio  
ERO = Espécies reativas de oxigênio  
FAD = Dinucleotídeo de adenina e guanina, forma oxidada (do inglês *flavin adenine dinucleotide, oxidized form*)  
FADH<sub>2</sub> = Dinucleotídeo de adenina e guanina, forma reduzida (do inglês *flavin adenine dinucleotide, reduced form*)  
GALE = Uridina difosfato-4-epimerase  
GALK = Galactocinase (do inglês *galactokinase*)  
GALT = Galactose-1-fosfato uridiltransferase  
GDH = Galactose desidrogenase (do inglês *galactose dehydrogenase*)  
GDP = Difosfato de guanosina (do inglês *guanosine diphosphate*)  
GLUT = Transportador de glicose (do inglês *glucose transporter*)  
GPx = Glutationa peroxidase  
GR = Glutationa redutase  
GSH = Glutationa reduzida  
GTP = Trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)  
Hsp90 = Proteína de choque térmico 90 (do inglês *heat shock protein 90*)  
i.p. = Intraperitoneal  
iNOS = Óxido nítrico sintase induzível (do inglês *inducible nitric oxide synthase*)  
LCR = Líquido céfalorraquidiano  
MDA = Malondialdeído  
MDH = Malato desidrogenase



mtDNA = DNA mitocondrial (do inglês *mitochondrial deoxyribonucleic acid*)  
NAD<sup>+</sup> = Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form*)  
NADH = Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form*)  
NADPH = Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form*)  
NO = Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)  
NOS = Óxido nítrico sintase (do inglês *nitric oxide synthase*)  
NOX = NADPH oxidase  
PET-scan = Escaneamento tomográfico por emissão de pósitrons (do inglês *positron emission tomography scan*)  
Pi = Fosfato inorgânico  
s.c. = Subcutâneo  
SNC = Sistema nervoso central  
SDH= Succinato desidrogenase  
SOD = Superóxido dismutase  
TBA-RS = Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid-reactive substances*)  
UCP = Proteína desacopladora (do inglês *uncoupler protein*)  
UDP = Difosfato de uridina (do inglês *uridine diphosphate*)  
UTP = Trifosfato de uridina (do inglês *uridine triphosphate*)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
1.1 GALACTOSE.....	29
1.2 GALACTOSEMIAS.....	31
1.2.1 Deficiência da GALT.....	32
1.2.2 Deficiência da GALK.....	33
1.2.3 Deficiência da GALE.....	34
1.3 FISIOPATOLOGIA DAS GALACTOSEMIAS.....	34
1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO.....	36
1.4.1 Vias metabólicas que levam à síntese de ATP.....	38
1.5 ESPÉCIES REATIVAS E SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	42
1.6 JUSTIFICATIVA.....	44
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>49</b>
3.1 ANIMAIS.....	49
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE D-GALACTOSE.....	49
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	49
3.3.1. Administração da D-galactose.....	49
3.3.2 Ensaio bioquímico para a análise de parâmetros energéticos.....	51
3.3.2.1 Atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons.....	51
3.3.2.1.1 Determinação da atividade do complexo I+CoQ+III ....	51
3.3.2.1.2 Determinação da atividade do complexo II .....	52
3.3.2.1.3 Determinação da atividade do complexo II+CoQ+III ....	52
3.3.2.1.4 Determinação da atividade do complexo IV.....	52
3.3.2.2 Atividade das enzimas do ciclo de Krebs.....	53
3.3.2.2.1 Atividade da enzima SDH.....	53
3.3.2.2.2 Atividade da enzima MDH.....	53
3.3.2.2.3 Determinação dos níveis de proteínas totais.....	53
3.3.2.2.4 Determinação do conteúdo de glicogênio.....	53



3.3.3 Análise do estresse oxidativo.....	54
3.3.3.1 Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	54
3.3.3.2 Medida do conteúdo de grupos carbonila.....	54
3.3.3.3 Medida das atividades das enzimas antioxidantes.....	55
3.3.3.4 Determinação das concentrações de nitratos nitritos.....	55
3.3.3.5 Determinação da concentração de proteínas totais na amostra.....	56
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE D-GALACTOSE SOBRE PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL.....	57
4.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	59
4.2.1 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 1 hora após a administração aguda de D-galactose.....	59
4.2.2 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 12 horas após a administração aguda de D-galactose.....	61
4.2.3 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 24 horas após a administração aguda de D-galactose.....	63
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
ANEXO A.....	93
ANEXO B.....	95



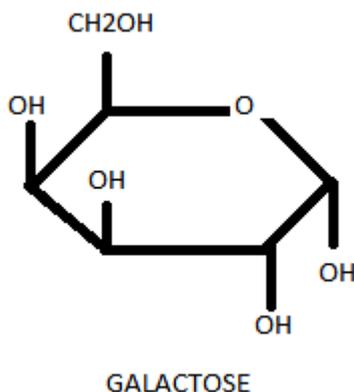




# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 GALACTOSE

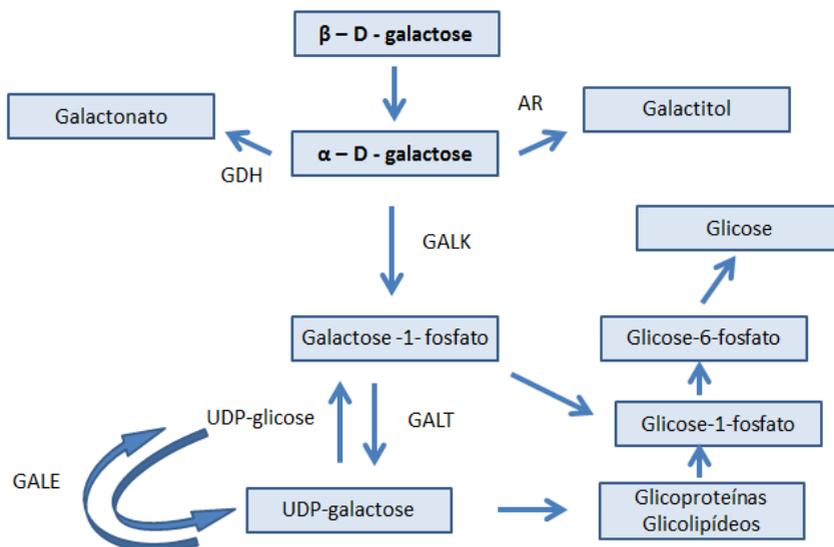
A galactose ( $C_6H_{12}O_6$ ) é uma hexose (Figura 1) presente em abundância principalmente no leite e seus derivados e em alguns vegetais, bem como no metabolismo de glicolípideos e quebra difosfato de uridina-galactose (UDP-galactose). É um constituinte importante na dieta alimentar desde o nascimento por ser precursora da glicose, glicolípideos e glicoproteínas (Jumbo-Lucione et al., 2013). Os derivados da galactose são elementos chave para a estrutura das membranas celulares, matriz extracelular, hormônios, sistema imune e sistema nervoso central (SNC) (Segal et al., 1995; Lai et al., 2009).



**Figura 1.** Estrutura química da galactose. Adaptado de Harvey e Ferrier, 2012.

O metabolismo da galactose ocorre principalmente no fígado e no músculo esquelético, mas também ocorre em outros tecidos como cérebro, rins e testículos (Fridovich-Keil e Walter, 2008). Esse monossacarídeo é metabolizado através da via de Leloir (Figura 2), sendo precursora de glicose, glicoproteínas e glicolípideos. Esta via metabólica é constituída por três principais enzimas: galactocinase (GALK; EC 2.7.1.6), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT; EC 2.7.7.10) e uridina difosfato-galactose-4-epimerase (GALE; EC 5.1.3.2)

(Nelson e Cox, 2014). Caso o organismo não tenha condições de metabolizar a D-galactose por deficiência de uma dessas enzimas, esta será metabolizada em vias alternativas: a redução da galactose a galactitol, catalisada pela enzima aldose redutase (AR; EC 1.1.1.21) e a oxidação a galactonato pela enzima galactose desidrogenase (GDH; EC 1.1.1.48) (Holden et al., 2003; Fridovich-Keil e Walter, 2008).



**Figura 2.** Metabolismo da galactose pela via de Leloir. A galactose é fosforilada pela galactocinase (GALK), formando galactose-1-fosfato. Esta, por sua vez, reage com o difosfato de uridina-glicose (UDP-glicose), liberando difosfato de uridina-galactose (UDP-galactose) em uma reação catalisada pela enzima galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT). A UDP-galactose é convertida a UDP-glicose pela UDP-galactose-4'-epimerase (GALE). Assim, a UDP-glicose pode entrar novamente na reação, de forma cíclica, até que toda galactose que entra na via seja convertida a glicose. Caso ocorra acúmulo de galactose, por qualquer deficiência enzimática na via, ela será oxidada a galactonato pela galactose desidrogenase (GDH) ou reduzida a galactitol pela aldose redutase (AR). Adaptado de Segal et al., 1995.

## 1.2 GALACTOSEMIAS

O aumento dos níveis de galactose no sangue (galactosemia) e acúmulo desse monossacarídeo nos tecidos são características comuns a doenas ocasionadas pela deficiência de uma das enzimas da via de Leloir. Tais deficiências são genéticas com padrão de herança mendeliana autossômico recessivo (Berry e Segal, 2000). As manifestações clínicas podem iniciar ainda intraútero (Holton, 1995; Holton et al., 1995), porém os sintomas geralmente se iniciam após o

nascimento, quando o paciente é alimentado com leite materno (Ruiz et al., 2011; Karadag et al., 2013).

A prevalência mundial das galactosemias é de aproximadamente 1:48.000 recém-nascidos (National Newborn Screening and Genetics Resource Center, 2014). No Brasil, há uma prevalência relativamente alta, quando comparada a outros países, estimada em 1:20.000 nascidos vivos (Camelo Jr. et al, 2009). A triagem das galactosemias se dá pela determinação dos níveis de galactose em plasma de pacientes com suspeita de alterações no metabolismo da galactose, utilizando-se cromatografia em papel (Camelo Jr. et al., 2011). Adicionalmente, pode-se também realizar análises na urina para pesquisa de galactose e galactitol (Bosch, 2006; Berry e Walter, 2011). O diagnóstico é confirmado pela medida das atividades das enzimas deficientes em cultura de eritrócitos ou fibroblastos (Fridovich-Keil e Walter, 2008; Berry, 2012).

O tratamento atual consiste em acompanhamento dietético com exclusão da galactose da dieta, substituindo-se o aleitamento materno por fórmulas especiais adequadas para a idade e as necessidades nutricionais do paciente. Fórmulas à base de soja não são recomendadas, pois apresentam quantidades vestigiais de galactose (Holton et al., 2001; Bosch, 2006; Bosch, 2010; Karadag et al., 2013).

As galactosemias podem ser classificadas em três tipos, de acordo com a deficiência enzimática: deficiência da GALT, deficiência da GALK e deficiência da GALE.

### 1.2.1 Deficiência da GALT

A galactosemia por deficiência de GALT (OMIM 230400), também chamada de galactosemia clássica ou galactosemia do tipo I, é a mais comum, a mais conhecida e a mais grave dentre os três tipos de galactosemias. O gene *GALT*, que codifica a enzima de mesmo nome, é encontrado no *locus* 13 do braço pequeno do cromossomo 9 e apresenta mais de uma centena de polimorfismos, sendo a maioria mutações *missense*, que é a codificação de um aminoácido de forma diferente do normal. As mais frequentes são p.Q188R, p.K285N e p.S135L (Bosch et al., 2005; Calderon et al., 2007; Garcia et al., 2016). Sua variante mais comum é denominada de variante Duarte, apresentando uma deficiência parcial da atividade da enzima (Elsas Ii et al., 1995).

As alterações metabólicas características da galactosemia clássica incluem o acúmulo de galactose, galactitol, galactonato e galactose-1-

fosfato em sangue e/ou tecidos e a excreção de níveis elevados de galactose, galactitol e galactonato na urina (Elsas Ii et al., 1995; Segal, 1995; Fridovich-Keil, 2006; Fridovich-Keil e Walter, 2008). As manifestações clínicas apresentam-se nas primeiras semanas de vida e incluem perda de peso, vômitos, diarreia, hipotonia e letargia. Posteriormente pode haver icterícia, hepatomegalia, insuficiência hepática, doença tubular renal e anormalidades hematológicas (Camelo Jr. et al., 2009).

Caso o tratamento dietético seja iniciado precocemente, os sintomas podem ser revertidos. Entretanto, mesmo com a aderência ao tratamento, manifestações crônicas, tais como atrasos de desenvolvimento, deficiência intelectual, degeneração cerebelar e problemas de linguagem, podem ocorrer devido à síntese endógena de galactose (Fridovich-Keil e Walter, 2008; Petrosillo et al., 2008; Lai et al, 2009; Hebert et al., 2010; Karadag et al., 2013; Haider et al., 2015).

### **1.2.2 Deficiência da GALK**

A GALK catalisa a segunda etapa da via de Leloir, isto é, a conversão da  $\alpha$ -D-galactose a galactose-1-fosfato (Holden et al., 2004). Na galactosemia causada pela deficiência dessa enzima (OMIM 230200), também conhecida como galactosemia tipo II, ocorre acúmulo de galactose. Esta, por sua vez, é desviada para vias alternativas que produzirão metabólitos tóxicos, tais como galactonato e galactitol (Fridovich-Keil e Walter, 2013; Kalaz et al., 2013).

Esta doença é inata, com padrão de herança autossômico recessivo, e é causada por polimorfismos nos genes *GALK1* (*GK1*) e *GALK2* (*GK2*), que codificam a GALK. O gene *GALK1*, que está mapeado na região 21-22 do braço curto do cromossomo 17 é o que apresenta maior frequência e número de mutações descritas em pacientes com deficiência clínica de GALK, sendo as mais comuns a Q832X e a P28T (Elsevier et al., 1974; Stambolian et al., 1995; Novelli e Reichardt, 2000).

A principal característica clínica da galactosemia tipo II é a catarata precoce, ainda na infância. Outras manifestações clínicas incluem pseudotumores cerebrais, deficiência intelectual, depósitos maculares e convulsões com deterioração neurológica, como ataxia e dispraxia, sugerindo danos em córtex, hipocampo e cerebelo (Holden et al., 2004; Wiereng et al, 2008). O tratamento desta galactosemia consiste basicamente em exclusão de galactose e de lactose, cuja hidrólise no intestino delgado libera galactose (Lawrence, 2013).

### 1.2.3 Deficiência da GALE

A deficiência na atividade dessa enzima (OMIM 230350), também conhecida como galactosemia do tipo III, altera os padrões de glicosilação e galactosilação de proteínas (Lai et al., 2009). O gene *GALE*, que codifica a enzima de mesmo nome, encontra-se na região 36 do braço curto do cromossomo 1. Inúmeros polimorfismos foram descritos para esse gene em indivíduos galactosêmicos, sendo as mais comuns a G90E e a V94M (Timson, 2005).

A maioria dos pacientes apresenta crescimento e desenvolvimento normais. Formas graves são consideradas raras (Holton et al., 2000). Os pacientes desenvolvem manifestações clínicas semelhantes à galactosemia clássica e respondem bem à exclusão de galactose da dieta (Lai et al., 2009). Porém, há comprometimento em longo prazo, como atrasos de desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem e surdez, sugestivas das prováveis consequências dos danos em córtex cerebral e hipocampo (Segal, 1995; Kaufman et al., 1995; Oleiro et al., 2008; Schadewaldt et al., 2010; Sarkar et al., 2010; Gubbels, 2012).

### 1.3 FISIOPATOLOGIA DAS GALACTOSEMIAS

Diversos estudos têm demonstrado efeitos *in vivo* e *in vitro* de altas concentrações de galactose sobre diversos tecidos corporais, incluindo o SNC. No entanto, muitos destes estudos foram realizados com modelos para detectar alterações características dos processos de envelhecimento (Shen et al., 2002; Cui et al., 2006; Yanar et al., 2011; Hsia et al., 2012; Wang et al., 2015) utilizando-se uma dieta rica em galactose (Chang et al., 2013; Du et al., 2014; Hadzi-Petrushev et al., 2014). Nesse sentido, alterações histopatológicas cerebrais e hepáticas, déficit cognitivo, resposta inflamatória, neurodegeneração, danos oxidativos e exacerbação dos processos de morte celular por apoptose foram recentemente observados em ratos que receberam altas doses de galactose (300 mg/kg; subcutâneo - s.c. - ou 300 mg/kg; intraperitoneal - i.p.) (Çoban et al., 2014; Hao et al., 2014; Aydın et al., 2015; Çoban et al., 2015; Ullah et al., 2015; Xu et al., 2015). Além disso, foi encontrado um aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) e diminuição significativa dos níveis cerebrais de aminas biogênicas (Haider et al., 2015).

Um estudo de Long et al. (2007) sugeriu que os mecanismos de toxicidade da galactose envolvem disfunção mitocondrial. Em tecidos

hepático e cerebral de ratos submetidos à administração de galactose (100 mg/kg de peso corporal, s.c.), observou-se uma inibição significativa da atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH; EC 1.3.99.1) nesses tecidos, bem como um aumento significativo da atividade do complexo II (EC 1.3.5.1) da cadeia transportadora de elétrons no fígado. Adicionalmente, Chang et al. (2014) demonstraram que a exposição crônica à galactose (125 mg/kg de peso corporal, por dia, s.c., durante 8 semanas) desencadeia dano aos tecidos musculares esquelético e cardíaco por inibição da atividade do complexo I (EC 1.6.5.3) da cadeia respiratória.

Du e colaboradores (2014) demonstraram que ratos machos que receberam administração diária de diferentes doses de galactose (150, 300 e 500 mg/kg de peso corporal, s.c., por 8 semanas) apresentaram um aumento significativo da expressão da enzima fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase 2 (NOX 2; EC 1.6.3.1), dos níveis de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (biomarcador de danos oxidativos ao ácido desoxirribonucleico - DNA) e de proteína desacopladora (UCP) 2. Além disso, observaram uma diminuição da capacidade antioxidante total mitocondrial no córtex auditivo. Nesse mesmo estudo, foram observados níveis aumentados de DNA mitocondrial (mtDNA) no córtex auditivo dos ratos que receberam administração de galactose. Estes resultados sugerem que a atividade aumentada da NOX, associada ao consequente aumento da geração de espécies reativas (ER) de oxigênio (ERO) formadas na mitocôndria, pode contribuir para o dano oxidativo mitocondrial em ratos induzidos ao envelhecimento pela administração de galactose.

Nesse contexto, Anand et al. (2012) observaram uma diminuição significativa da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e catalase (CAT; EC 1.11.1.6), bem como um aumento do conteúdo de grupos carbonila e dos níveis de malondialdeído (MDA) em amostras de tecidos de ratos que receberam administrações i.p. de galactose por 8 semanas. A administração de galactose também induziu estresse oxidativo e osmótico pela conversão desse carboidrato a galactitol (Kalaz et al., 2013). A administração subaguda, i.p., (300 mg/kg) de galactose também provocou um aumento significativo da peroxidação lipídica e da atividade da SOD, enquanto as atividades da CAT e da glutatona peroxidase (GPx; EC 1.11.1.22) foram inibidas em cérebro de ratos de 7 dias de idade. Além disso, houve aumento da atividade da AChE e diminuição significativa nas aminas biogênicas cerebrais (Haider et al., 2015). Em outro modelo de

envelhecimento, em que ratos receberam administrações s.c. de galactose (300 mg/kg de peso corporal) durante 2 meses, houve aumento dos níveis cerebrais de MDA e do conteúdo de carbonilas, acompanhado de diminuição significativa dos níveis de glutathione reduzida (GSH) e das atividades da SOD e da GPx, causando alterações histopatológicas e indução de morte celular por apoptose (Aydin et al., 2015).

Embora os efeitos da galactose em modelos de senescência sejam bastante estudados, a patogênese das galactosemias ainda não está estabelecida (Mumma et al, 2008; Lai et al, 2009). Recentemente, dois trabalhos do mesmo grupo de pesquisa demonstraram deficiência cognitiva, aumento da atividade da enzima AChE e morte celular por apoptose, além de diminuir as concentrações de GSH e de neurotrofinas em estruturas cerebrais de animais submetidos a um modelo experimental de galactosemia induzido pela administração intracerebroventricular de galactose (Rodrigues et al., 2016a; Rodrigues et al., 2016b). Outros achados demonstraram que altas concentrações de galactose inibem a síntese de receptores de serotonina, o que poderia estar relacionado à deficiência intelectual apresentada por pacientes galactosêmicos (Woolley e Gommi, 1964).

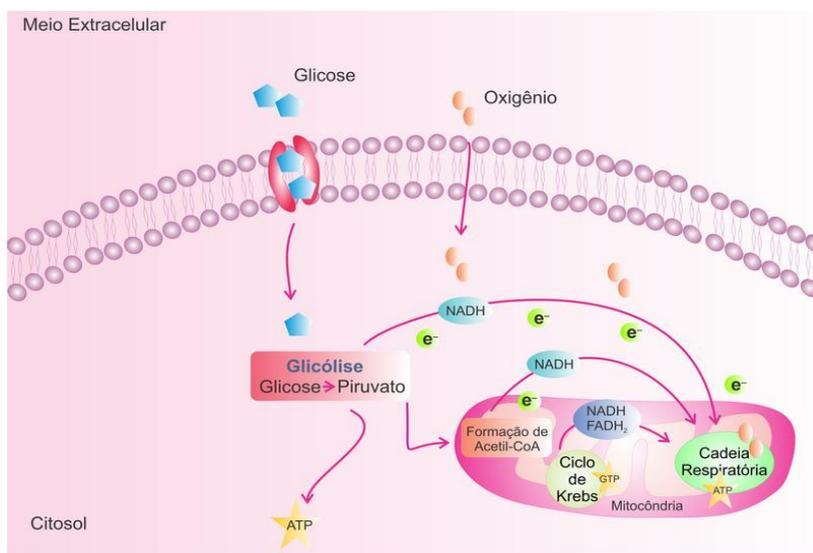
Adicionalmente, o estresse oxidativo parece estar envolvido nos mecanismos fisiopatológicos da galactosemia. Estudos demonstraram um aumento da produção de ER e possíveis danos oxidativos em tecidos de pacientes galactosêmicos e em modelos animais de galactosemia (Tsakiris et al., 2000; Schulpis et al., 2005; El-Bassyouni et al., 2006). Além disso, em um modelo de galactosemia clássica em *Drosophila melanogaster*, Jumbo-Lucioni et al. (2012) observaram indução de estresse oxidativo e sugeriram que este fator poderia contribuir para a fisiopatologia da galactosemia. Desta forma, estudos que focalizem o papel de oxidações biológicas (estresse oxidativo e bioenergética) podem acrescentar informações que ajudem a preencher as lacunas que ainda persistem no entendimento da fisiopatologia das galactosemias.

#### 1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO

Estudos em modelos murinos de envelhecimento induzidos por D-galactose demonstraram alterações em parâmetros bioenergéticos em estruturas cerebrais (Shen et al., 2002; Cui et al., 2006; Yanar et al., 2011; Hsia et al., 2012; Wang et al., 2015). A demanda energética do tecido cerebral, principalmente de neurônios, é alta em relação à sua pequena reserva energética, o que torna necessário um fornecimento contínuo de glicose, principal substrato energético cerebral

(Mergenthaler et al., 2013; Benarroch, 2014). A glicose cerebral pode ser obtida pela corrente sanguínea e captada pelo transportador de glicose 1 (GLUT 1) de forma independente de insulina (Giorgis e Veggiotti, 2013). Adicionalmente, há reservas cerebrais de glicogênio encontradas principalmente em astrócitos (Cataldo et al., 1986) e parecem ser de extrema importância para a manutenção do metabolismo energético neuronal (Secher e Quistorff, 2005).

A oxidação completa da glicose é responsável por fornecer a maior parte do ATP, principal moeda energética celular, consumido pelo cérebro, em um processo que se inicia com a glicólise e termina com a fosforilação oxidativa (Figura 3) (Nelson e Cox, 2014).



**Figura 3.** Principais vias metabólicas envolvidas na síntese de ATP. A glicose é captada pela célula por transportadores específicos e é oxidada na glicólise a piruvato. Este, por sua vez, entra na mitocôndria e é convertido a acetil-CoA, o qual é totalmente oxidado a CO<sub>2</sub> no ciclo de Krebs. Nesta via metabólica, há a formação de coenzimas reduzidas, que entregam seus elétrons aos complexos da cadeia respiratória, bem como de uma molécula de GTP. A síntese de ATP culmina na fosforilação oxidativa, em que o ADP é fosforilado a ATP. ADP = difosfato de adenosina; ATP = trifosfato de adenosina; FADH<sub>2</sub> = dinucleotídeo de flavina e adenina, forma reduzida; GTP = trifosfato de guanosina; NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida. Fonte: do autor.

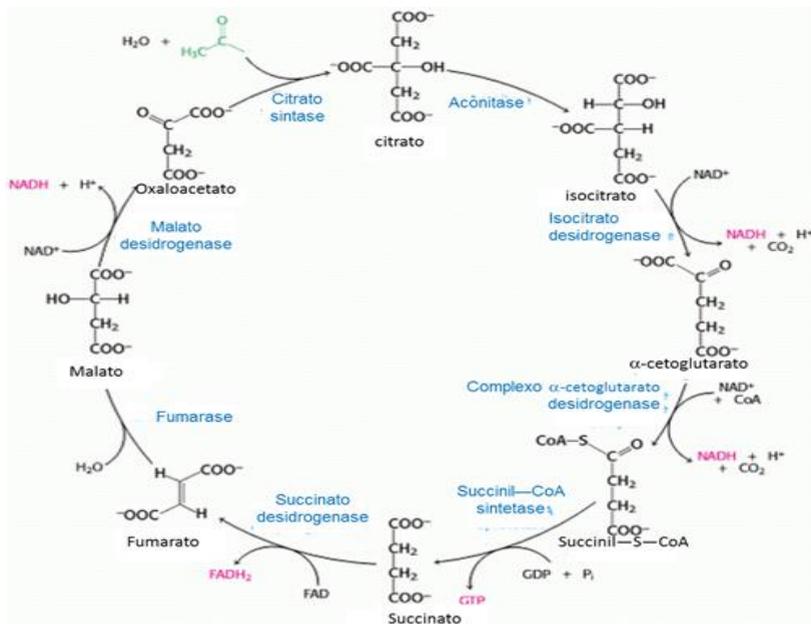
As reações de oxirredução pertencentes a essas vias metabólicas liberam equivalentes reduzidos das coenzimas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH<sub>2</sub>). Esses, por sua vez, entregam seus elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, ao final da qual ocorre a fosforilação oxidativa, processo pelo qual ocorre a síntese de ATP pela ATP-sintase (EC 3.6.3.14) (Harvey e Ferrier, 2012).

#### **1.4.1 Vias metabólicas que levam à síntese de ATP**

O ciclo do ácido cítrico, conhecido também como ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos, é uma via metabólica circular aberta que ocorre na matriz mitocondrial de todas as células que apresentam mitocôndria. É considerado um ponto de convergência do metabolismo de carboidratos, lipídeos e alguns aminoácidos, cujo intermediário comum é o acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Nelson e Cox, 2014), que é completamente oxidado a CO<sub>2</sub> no ciclo de Krebs (Figura 4).

A maior parte da energia disponível proveniente dos processos oxidativos do ciclo é conservada na forma das coenzimas reduzidas NADH e FADH<sub>2</sub> (Adam-Vizi e Tretter, 2013). A condensação de acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato, considerado didaticamente como a reação inicial do ciclo, é catalisada pela enzima citrato sintase (CS; EC 2.3.3.1). A seguir, o citrato é isomerizado a isocitrato pela enzima aconitase (EC 4.2.1.3). A isocitrato desidrogenase (EC 1.1.1.42) catalisa a descarboxilação oxidativa irreversível do isocitrato, originando a primeira das três moléculas de NADH e liberando a primeira molécula de CO<sub>2</sub>.

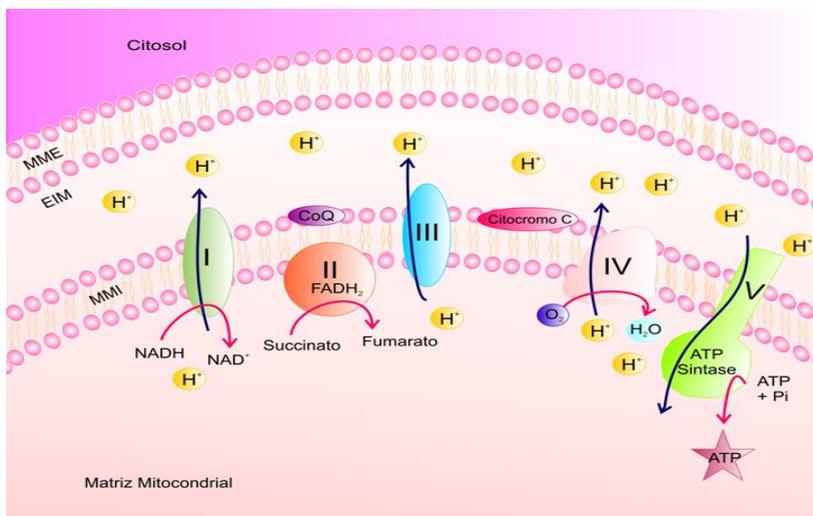
A conversão de  $\alpha$ -cetoglutarato em succinil-CoA é catalisada pelo complexo da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (EC 1.2.4.2), liberando a segunda molécula de CO<sub>2</sub> e o segundo NADH do ciclo. A succinil-CoA sintetase (EC 6.2.1.4) hidrolisa a ligação tioéster de alta energia do succinil-CoA. Esta reação está acoplada à fosforilação de difosfato de guanosina (GDP), produzindo trifosfato de guanosina (GTP). O succinato é, então, oxidado a fumarato pela SDH, concomitantemente à redução do FAD a FADH<sub>2</sub>. Por sua vez, o fumarato é hidratado, resultando em malato, em uma reação reversível catalisada pela enzima fumarase (EC 4.2.1.2). Finalmente, o malato é oxidado a oxaloacetato pela malato desidrogenase (EC 1.1.1.37), liberando a terceira molécula de NADH do ciclo (Harvey e Ferrier, 2012; Nelson e Cox, 2014).



**Figura 4.** Ciclo do ácido cítrico. A condensação do acetil-CoA (em verde) com o oxaloacetato forma citrato, o qual é isomerizado a isocitrato. A descarboxilação oxidativa do isocitrato libera a primeira das três moléculas de NADH produzidas pelo ciclo e a primeira liberação de  $\text{CO}_2$ . O  $\alpha$ -cetoglutarato é convertido a succinil-CoA, liberando o segundo  $\text{CO}_2$  e produzindo o segundo NADH. A clivagem de succinil-CoA a succinato produz uma molécula de GTP. Na sequência, o succinato é oxidado a fumarato, com redução de FAD a  $\text{FADH}_2$ . O fumarato, por sua vez, é hidratado formando malato, que é oxidado a oxaloacetato, produzindo o último NADH do ciclo. CoA = coenzima A;  $\text{FADH}_2$  = dinucleotídeo de adenina e flavina, forma reduzida; GTP = trifosfato de guanosina; NADH = dinucleotídeo de nicotinamida adenina, forma reduzida. Adaptado de Nelson e Cox, 2014.

Os equivalentes reduzidos das coenzimas liberados no ciclo de Krebs e em outras vias metabólicas são direcionados ao complexo I (elétrons provenientes do NADH) ou ao complexo II (elétrons provenientes do  $\text{FADH}_2$ ) da cadeia respiratória. A cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons, localizada na membrana mitocondrial interna, é a via final comum pela qual os elétrons oriundos de diferentes substratos energéticos do organismo fluem para o oxigênio, reduzindo-o a água (Figura 5). O transporte de elétrons está acoplado à fosforilação de difosfato de adenosina (ADP) pelo bombeamento de prótons ( $\text{H}^+$ )

através da membrana interna da mitocôndria. Os  $H^+$  são transportados da matriz para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV, criando através da membrana mitocondrial interna um gradiente eletroquímico, devido às diferenças de cargas e de pH. A energia obtida pelo gradiente de prótons é suficiente para impulsionar a síntese de ATP, fazendo com que este gradiente funcione como um acoplador da oxidação à fosforilação (Harvey e Ferrier, 2012; Nelson e Cox, 2014). Através da fosforilação oxidativa, a energia da dissipação deste gradiente pela ATP-sintase é utilizada para a fosforilação de ADP, formando ATP.



**Figura 5.** Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Moléculas ricas em energia química são metabolizadas por uma série de reações de oxirredução levando à produção de água ao final da cadeia respiratória. As coenzimas reduzidas  $\text{NADH}$  e  $\text{FADH}_2$  provenientes das oxidações de substratos energéticos entregam seus elétrons ao complexo I e ao complexo II, respectivamente. À medida que os elétrons fluem através dos complexos da cadeia respiratória, há transporte de prótons ( $\text{H}^+$ ) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico. Este, por sua vez, é dissipado pela ATP-sintase na fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. ADP = difosfato de adenosina; ATP = trifosfato de adenosina; EIM = espaço intermembranar; FAD = dinucleotídeo de adenina e flavina, forma oxidada;  $\text{FADH}_2$  = coenzima reduzida de adenina e flavina, forma reduzida; MME = membrana mitocondrial externa; MMI = membrana mitocondrial interna;  $\text{NAD}^+$  = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada;  $\text{NADH}$  = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida; Pi = fosfato inorgânico. Fonte: do autor.

Alterações no metabolismo energético cerebral podem levar a uma diminuição na síntese de ATP e contribuir para a fisiopatologia de doenças, como demonstrado em diversas doenças neurodegenerativas e em erros inatos do metabolismo (Atamna e Frey, 2007; Mergenthaler et al., 2013; Jumbo-Lucioni et al. 2013; Karadag et al 2013; Budni et al., 2016). Além disso, alterações das atividades dos complexos da cadeia respiratória estão intimamente relacionadas ao estresse oxidativo por levar a uma maior produção de espécies reativas (ER) deletérias à célula (Kovacic et al., 2005; Halliwell e Gutteridge, 2015; Çoban et al., 2015).

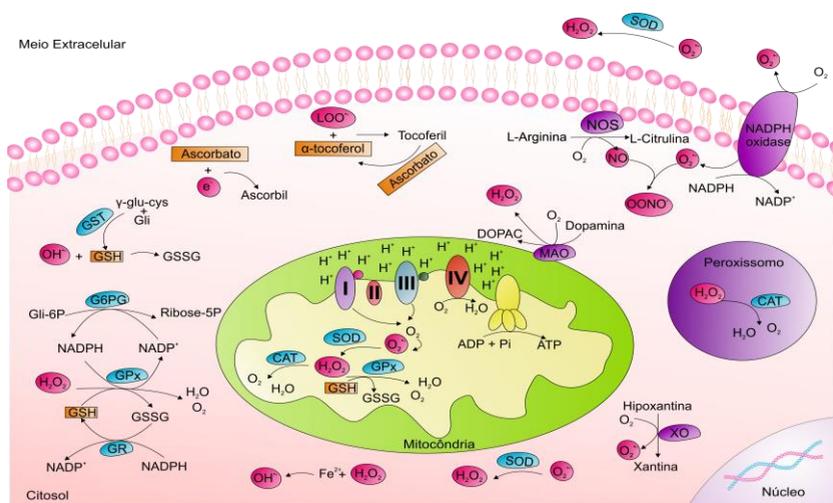
## 1.5 ESPÉCIES REATIVAS E SISTEMAS ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos descritos para os efeitos tóxicos da galactose em modelos de senescência (Yanar et al., 2011; Hsia et al., 2012; Wang et al., 2015). Esse mecanismo pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo decorrente da geração excessiva de ER associada à diminuição de defesas antioxidantes endógenas (Finkel e Holbrook, 2000).

As ER, tais como o ânion superóxido e os radicais hidroxila, alcóxila, peróxila, hidroperóxila e peroxinitrito, são quaisquer espécies oxidantes altamente reativas e instáveis e podem ser derivadas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (Lima e Abdalla, 2001). Fisiologicamente, essas moléculas exercem efeitos importantes no organismo, tais como sinalização celular, contração muscular e sistema imune (Finkel e Holbrook, 2000). As principais fontes de ER na célula incluem a cadeia respiratória (principal sítio de geração de ER), as reações das enzimas NOX, monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) e xantina oxidase (XO; EC 1.17.3.2), todas essas reações produzindo ânions superóxido que, através da reação de Fenton, forma radicais hidroxila. A essas fontes acrescenta-se a óxido nítrico sintase (NOS; EC 1.14.13.39), enzima que sintetiza o óxido nítrico (NO) e, a partir dele, pode ser formado o radical peroxinitrito (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Para impedir que essas ER produzidas causem dano a biomoléculas celulares, o organismo possui um acurado sistema de defesa composto por antioxidantes não enzimáticos endógenos, tais como bilirrubina, melatonina, ácido lipoico, coenzima Q, ácido úrico, GSH e estrógenos. Além disso, moléculas obtidas da dieta também exercem importante papel antioxidante, incluindo retinol (vitamina A), ascorbato (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (El-Bassouni et al., 2006; Uttara et al., 2009). Adicionalmente aos antioxidantes não enzimáticos, enzimas catalisam reações de remoção de ER. Dentre elas, destacam-se as duas importantes enzimas: SOD, que é responsável pela dismutação de ânions superóxido, a forma mais abundante de ERO, produzidos principalmente durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, e CAT, que neutraliza o peróxido de hidrogênio liberado nessa ação (Halliwell e Gutteridge, 2015). Outras enzimas também fazem parte do sistema antioxidante enzimático atuando direta ou indiretamente, tais como GPx, glutathione redutase (GR; 1.8.1.7), glutathione-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18),  $\gamma$ -glutamyl-cisteína ligase (GCL; EC 6.3.2.2) e glicose-6-fosfato desidrogenase

(G6PD; EC 1.1.1.49). Sob condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a formação de moléculas pró-oxidantes e sua remoção por antioxidantes (Valko et al. 2007), mantendo a homeostasia celular (Figura 6).



**Figura 6.** Fontes endógenas de espécies reativas e sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosine; CAT: catalase; DOPAC: Ácido 3,4- di-hidroxifenilacético; Gli: glicina; Gli-6P: glicose-6-fosfato; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GST: glutatona S-transferase; G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; MAO: monoamina oxidase; NADP<sup>+</sup>: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada; NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida; NOS: óxido nítrico sintase; Pi: fosfato inorgânico; Ribose-5P: ribose-5-fosfato; SOD: superóxido dismutase;  $\gamma$ -glu-cys:  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína. Fonte: Ferreira, 2016.

Quando a produção de ER ultrapassa a capacidade antioxidante, podem ocorrer danos oxidativos significativos a biomoléculas celulares. Perturbações no equilíbrio *redox* celular podem induzir dano a macromoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Pala e Gürkan, 2008; Halliwell e Gutteridge, 2015). O dano oxidativo a lipídeos, ou peroxidação lipídica, pode acarretar alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, com consequente perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo das organelas e

formação de produtos citotóxicos, tais como aldeídos, peróxidos, álcoois e cetonas (Mello Filho et al., 1983; Ridnour et al., 2005; Uttara et al., 2009; Prakash e Kumar, 2013). Além das membranas celulares, o dano oxidativo a lipídeos pode danificar membranas de organelas, tais como a mitocôndria, podendo levar alterações na produção de ATP e liberação de citocromo *c* para o citosol, este último envolvido no processo de morte celular por apoptose (Halliwell, 2001; Uttara et al., 2009).

Adicionalmente, a oxidação de proteínas resultará na perda de função destas, inativação de enzimas, perda da homeostase iônica, podendo levar à morte celular (Thorpe e Baynes, 2003; Ullah et al., 2015). Por sua vez, os danos oxidativos ao DNA provocam deleção e quebras de cadeias, podendo induzir novas mutações e alterando a expressão gênica, colaborando para o desenvolvimento de doenças crônicas (Lee et al., 2004).

Dano oxidativo a biomoléculas têm sido descrito nos mecanismos do envelhecimento (Cui et al., 2004; Anand et al. 2012; Hsia et al. 2012; Tsai e Yin 2012; Prakash e Kumar 2013). Além disso, participam da fisiopatologia de diversas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas (Cui et al. 2004; Wei et al., 2005; Long et al., 2007; Anand et al. 2012), câncer (Valko et al., 2006; Sardina et al. 2011) e doenças metabólicas (Hershko, 1989; Shan et al., 1990; Valko et al. 2006; Pala e Gürkan, 2008; Berry e Walter, 2011; Tang et al., 2012; Schuck et al., 2015). O cérebro é particularmente vulnerável a danos oxidativos devido ao seu alto consumo de oxigênio, alto teor de ácidos graxos insaturados e relativa deficiência de defesas antioxidantes em comparação aos demais tecidos (Li et al., 2014; Halliwell e Gutteridge, 2015).

## 1.6 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que altas concentrações de galactose podem induzir efeitos deletérios à célula e que estudos sobre os mecanismos do dano cerebral presente nas galactosemias são escassos, torna-se importante a investigação de sua fisiopatologia, principalmente em modelos experimentais de galactosemia em ratos jovens, visto que os sinais e sintomas da doença se iniciam logo após o nascimento e perduram por toda a vida do paciente. Desta forma, o desenvolvimento de modelos animais que permitam compreender o mecanismo fisiopatológico das galactosemias poderá estabelecer possíveis novas

estratégias terapêuticas para a melhora da qualidade de vida dos indivíduos galactosêmicos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração aguda de D-galactose sobre parâmetros de metabolismo energético e de estresse oxidativo em estruturas cerebrais de ratos jovens.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre a atividade de enzimas do ciclo de Krebs em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre os níveis de glicogênio em córtex cerebral e de proteínas totais em soro e líquido cefalo raquidiano de ratos com 30 dias de vida;
- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre marcador de dano oxidativo a lipídeos em córtex cerebral e cerebelo de ratos com 30 dias de vida em diferentes tempos de exposição;
- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre marcador de dano oxidativo a proteínas em córtex cerebral e cerebelo de ratos com 30 dias de vida em diferentes tempos de exposição;
- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre a atividade de enzimas antioxidantes em córtex cerebral e cerebelo de ratos com 30 dias de vida em diferentes tempos de exposição;
- Avaliar o efeito da administração aguda de D-galactose sobre os níveis de nitratos e nitritos em córtex cerebral e cerebelo de ratos com 30 dias de vida em diferentes tempos de exposição.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos e com 30 dias de vida, provenientes do Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram acondicionados em gaiolas, em grupos de 6 (seis) por gaiola. Os animais foram mantidos em ciclos claro-escuro de 12 horas, à temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com exaustão e alimento e água em livre acesso. A utilização dos animais seguiu a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) nº 465 (23/05/2013). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob protocolo nº 72/2010 (ANEXO A). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

#### 3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE D-GALACTOSE

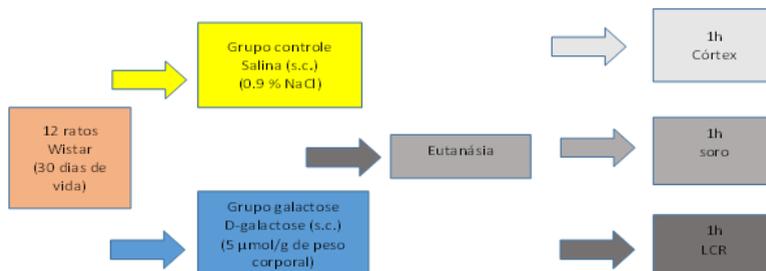
A D-galactose (Sigma-Aldrich®) foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9 %, p/v) e preparada no dia das administrações. O pH da solução foi verificado e, caso necessário, foi ajustado para 7,4.

#### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

##### 3.3.1 Administração de D-galactose

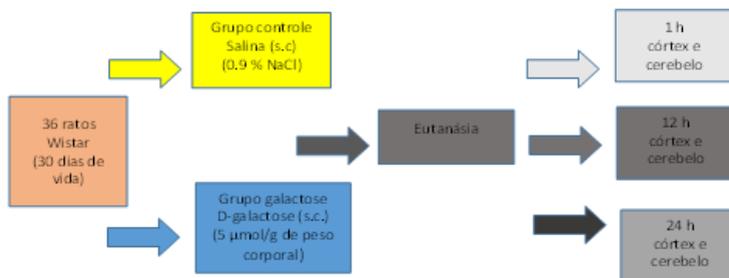
Para a determinação de parâmetros de metabolismo energético, os animais foram divididos randomicamente em dois grupos experimentais (6 animais por grupo): grupo controle, cujos animais receberam uma administração subcutânea de solução salina (NaCl 0,9 %; peso/volume), e grupo galactose, cujos animais receberam uma administração subcutânea de D-galactose (5  $\mu\text{mol/g}$  de peso corporal, equivalentes a 0,9 mg/g). Uma hora após a administração, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) e cloridrato de xilasina (75 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) e o LCR foi coletado por punção na cisterna magna com seringa nº 23, com auxílio de aparelho estereotáxico. Imediatamente

após a coleta, esses animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina ainda sob efeito da anestesia. O sangue periférico foi coletado para obtenção de soro. Em seguida, o crânio foi aberto e o cérebro foi exposto. Os córtices cerebrais foram dissecados, limpos e mantidos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises (Figura 7). No dia das análises, as estruturas foram homogeneizadas em tampão específico para cada parâmetro avaliado.



**Figura 7.** Desenho experimental para avaliação de parâmetros de metabolismo energético. Os marcadores foram avaliados em córtex cerebral, soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR) dos animais que sofreram eutanásia 1 hora após a administração de D-galactose. s.c. = subcutâneo.

Para a determinação de parâmetros de estresse oxidativo, os animais foram distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais (6 animais por grupo): grupo controle 1 h, controle 12 h e controle 24 h, cujos animais receberam solução de NaCl 0,9 % por via s.c., e grupos galactose 1 h, galactose 12 h e galactose 24 h, cujos animais receberam uma administração s.c. de D-galactose ( $5\text{ }\mu\text{mol/g}$  de peso corporal). Os animais dos grupos controle 1 h e galactose 1 h sofreram eutanásia 1 h após as administrações. Por sua vez, os animais dos grupos controle 12 h e galactose 12 h foram mortos 12 h após as administrações e, por fim, os animais dos grupos controle 24 e galactose 24 h foram mortos 24 h após as administrações. A eutanásia foi realizada por decapitação com guilhotina e sem anestesia. O crânio foi então aberto e o cérebro foi exposto. As estruturas cerebrais córtex e cerebelo foram dissecadas, limpas e mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises (Figura 8). No dia dos experimentos, as estruturas foram homogeneizadas em tampão específico para cada marcador avaliado.



**Figura 8.** Desenho experimental para avaliação de parâmetros de estresse oxidativo. Os marcadores foram avaliados em córtex cerebral e cerebelo dos animais que sofreram eutanásia 1, 12 ou 24 horas após a administração de D-galactose. s.c. = subcutâneo.

### 3.3.2 Ensaios bioquímicos para a análise de parâmetros bioenergéticos

#### Preparo das amostras

Os córtices cerebrais foram homogeneizados (1:20, peso/volume) em tampão SETH (250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM de Trizma base e 50 UI/mL de heparina), pH 7,4. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a  $800 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi reservado em alíquotas e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  até o momento da determinação das atividades enzimáticas.

#### 3.3.2.1 Atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons

##### 3.3.2.1.1 Determinação da atividade do complexo I+CoQ+III

A reação foi realizada em um meio contendo tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 8,0, 2 mM de KCN, 10  $\mu\text{M}$  de EDTA, 50  $\mu\text{M}$  de citocromo *c* e alíquotas de homogeneizado contendo aproximadamente 40-80 $\mu\text{g}$  de proteínas. O meio de incubação foi mantido a  $30^\circ\text{C}$  por 1 minuto. A reação se iniciou pela adição de 25  $\mu\text{M}$  de NADH. As absorvâncias foram registradas por 3 minutos, após os quais foram adicionados 10  $\mu\text{M}$  de rotenona. A atividade do complexo I+CoQ+III

foi medida pelo aumento na absorvância causada pela redução do citocromo *c* a 550 nm (Schapira et al., 1990). Os resultados estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### *3.3.2.1.2 Determinação da atividade do complexo II*

A atividade deste complexo enzimático foi determinada de acordo com Fischer et al. (1985). O meio de incubação constituiu-se de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, 16 mM de succinato de sódio e 8  $\mu\text{M}$  de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP). Inicialmente, pré-incubou-se o meio de incubação com 40-80  $\mu\text{g}$  de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 20 minutos. Logo após, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7  $\mu\text{M}$  de rotenona e iniciou-se a reação com a adição de 40  $\mu\text{M}$  de DCIP. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade do complexo II foi determinada pela diminuição da absorvância devida à redução do DCIP. Os resultados estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### *3.3.2.1.3 Determinação da atividade do complexo II+CoQ+III*

O meio de reação, constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, contendo 16 mM de succinato de sódio, foi pré-incubado com 40-80  $\mu\text{g}$  de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7  $\mu\text{M}$  de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  de citocromo *c*. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 550 nm. A atividade do complexo II+CoQ+III foi determinada pelo aumento da absorvância causado pela redução do citocromo *c* (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### *3.3.2.1.4 Determinação da atividade do complexo IV*

O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, N-dodecil-D-maltosídeo 0,6 mM e 10-20  $\mu\text{g}$  de proteínas. A reação foi iniciada com a adição de 0,7  $\mu\text{g}$  de citocromo *c* reduzido. A atividade enzimática foi medida a 25 °C por 10 minutos e foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 550 nm devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido (Rustin et al., 1994). Os resultados estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

### 3.3.2.2 Atividade das enzimas do ciclo de Krebs

#### 3.3.2.2.1 Atividade da enzima SDH

Essa atividade enzimática foi determinada em um meio de incubação constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, 16 mM de succinato de sódio e 8  $\mu\text{M}$  de DCIP. Inicialmente, pré-incubou-se o meio de incubação com 40-80  $\mu\text{g}$  de proteínas do homogeneizado a 30 °C por 20 minutos. Logo após, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica, 7  $\mu\text{M}$  de rotenona e 1 mM de metassulfato de fenazina e se iniciou a reação com a adição de 40  $\mu\text{M}$  de DCIP. As absorvâncias foram registradas por 5 minutos a 600 nm. A atividade da SDH foi determinada pela diminuição da absorvância devida à redução do DCIP (Fischer et al., 1985). Os resultados estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2.2.2 Atividade da enzima MDH

Esta atividade foi medida segundo o método descrito por Kitto (1969) em um meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, 10  $\mu\text{M}$  de rotenona, 0,3 % de Tween 20, 0,14 mM de NADH, 0,30 mM de oxaloacetato e 25  $\mu\text{g}$  de proteína. A atividade da MDH foi determinada acompanhando-se espectrofotometricamente a oxidação do NADH em comprimento de onda de 340 nm. Os resultados estão expressos em  $\text{nmol}$  de NADH.  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2.2.3 Determinação dos níveis de proteínas totais

Os níveis deste marcador foram avaliados em soro e LCR por kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 3.3.2.2.4 Determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo deste polissacarídeo foi medido em córtex cerebral de acordo com Krisman (1962), com algumas modificações. Os tecidos foram homogeneizados em KOH 33 % e fervidos a 100 °C durante 20 min, com agitação. Após resfriamento, às amostras foi acrescentado etanol 96 % e essas foram aquecidas outra vez à ebulição e depois resfriadas em banho de gelo para precipitar o conteúdo de glicogênio. Os homogeneizados foram centrifugados a 1,300 x g durante 15 min. O

sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram neutralizados com solução saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . O sedimento foi aquecido a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 min e solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado por tratamento com reagente de iodo e a absorvância foi medida a 460 nm. Os resultados estão expressos em mg de glicogênio/g de tecido.

### **3.3.3 Análise do estresse oxidativo**

#### **Preparo da amostra**

Imediatamente após a eutanásia, as estruturas cerebrais córtex e cerebelo foram homogeneizadas (1:20, peso/volume) em tampão fosfato de potássio 40 mM contendo KCl 120 mM, pH 7,4. O homogeneizado resultante foi centrifugado a  $750 \times g$  a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos, para descartar o núcleo e os detritos celulares (Evelson et al., 2001). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o sedimento, descartado. O sobrenadante foi utilizado para as análises.

#### **3.3.3.1 Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)**

A medida de níveis de TBA-RS foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Brevemente, ácido tricloroacético 10 % foi adicionado à amostra para desproteíntização. Após centrifugação, ao sobrenadante foi adicionado ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1 (volume/volume). A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com diferentes concentrações de 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados estão expressos em nmol TBA-RS/mg de proteína.

#### **3.3.3.2 Medida do conteúdo de grupos carbonila**

A medida de formação de grupos carbonilas foi realizada espectrofotometricamente, conforme descrito por Reznick e Packer (1994). Uma alíquota da amostra foi tratada com solução de 2,4-dinitrofenilidrazina 10 mM, preparada em HCl 2,5 N, ou com HCl 2,5 N

(branco) e deixada por 1 hora no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram então precipitadas com ácido tricloroacético 20 % e centrifugadas durante 5 min a  $9.000 \times g$ . Após a centrifugação, o sedimento obtido foi lavado 2 vezes com uma mistura de etanol:acetato de etila (1:1, volume/volume) e ressuspenso em guanidina 6 M. A diferença entre as leituras espectrofotométricas (370 nm) das amostras tratadas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina e as tratadas com HCl (branco) foi utilizada para calcular o conteúdo de carbonilas. Os resultados foram calculados como nmol de carbonilas/mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção de  $22.000 \times 10^6$  nmol/mL para hidrazonas alifáticas.

### 3.3.3.3 Medida das atividades das enzimas antioxidantes

#### Atividade da SOD

A atividade da SOD foi analisada pela medida da inibição da auto-oxidação da adrenalina, lido a 505 nm como descrito previamente por Bannister e Calabrese (1987). Os resultados da atividade da SOD foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### Atividade da CAT

Foi determinada a atividade desta enzima através do método de Aebi (1984). Ao sobrenadante foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % (volume/volume). Após a adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em espectrofotômetro a 240 nm, à temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C), durante 100 segundos. Para o cálculo da CAT, utilizou-se o coeficiente de extinção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $43.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados da atividade da CAT foram expressos em  $1 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2$  consumido  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

### 3.3.3.4 Determinação das concentrações de nitratos e nitritos

Os níveis de nitratos e nitritos, produtos finais do metabolismo do NO, foram quantificados de acordo com o protocolo estabelecido por Miranda et al. (2001), utilizando-se uma curva padrão de nitrito de sódio. Neste protocolo, os nitratos são reduzidos pelo vanádio a nitritos, que são detectados espectrofotometricamente a 540 nm pelo reação com

o reagente de Griess. Os resultados estão expressos em nmol de nitritos/mg de proteína.

### 3.3.3.5 Determinação da concentração de proteínas totais na amostra

A concentração de proteínas totais nas amostras foram medidas de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

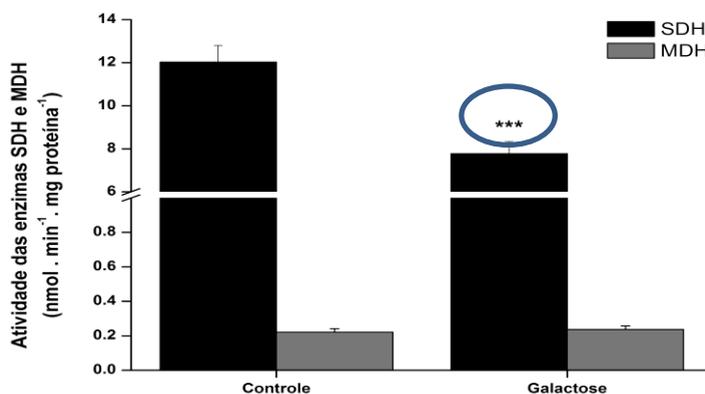
## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Amostras de seis animais foram avaliadas em duplicata ou triplicata e a média foi utilizada para a análise estatística. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Foram consideradas diferenças significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, Estados Unidos).

## 4. RESULTADOS

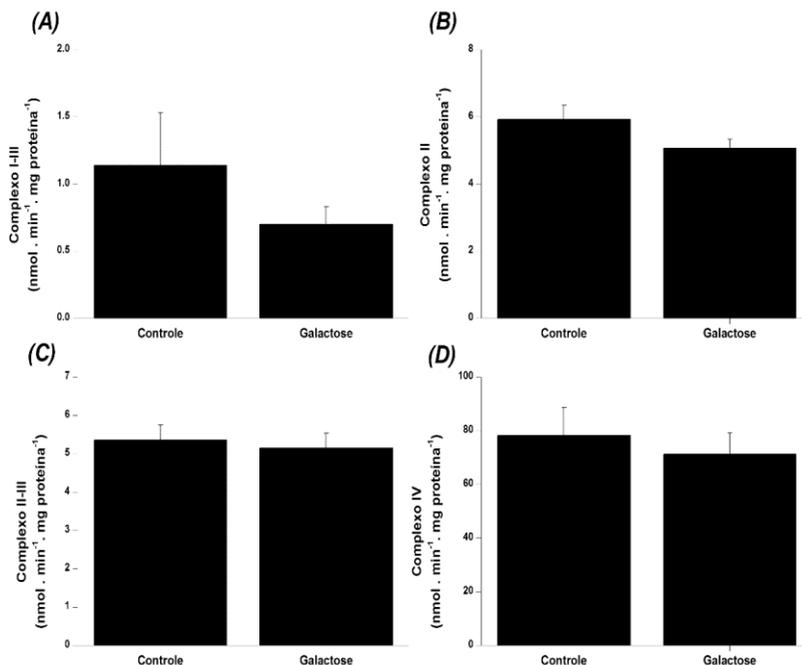
### 4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE D-GALACTOSE SOBRE PARÂMETROS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL

Inicialmente, foram avaliadas as atividades das enzimas do ciclo de Krebs SDH e MDH em córtex cerebral de animais 1 h após a administração aguda de D-galactose. A atividade da enzima SDH foi inibida nessa estrutura cerebral em comparação com o grupo controle (Figura 9A). Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre os grupos sobre a atividade da MDH.



**Figura 9.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) (A) e malato desidrogenase (MDH) (B) em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata e estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

A seguir foram avaliadas as atividades dos complexos da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos com 30 dias de vida, 1 h após a administração de D-galactose (Figura 10). Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos controle e galactose.



**Figura 10.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre a atividade dos complexos I-III (A), II (B), II-III (C) e IV (D) da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata e estão expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prote\u00edna}^{-1}$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Adicionalmente, foram mensurados as concentrações de glicogênio em córtex cerebral e os níveis de proteínas totais em soro e LCR de animais submetidos à administração aguda de D-galactose (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nestes parâmetros.

**Tabela 1. Concentrações de glicogênio em córtex cerebral e níveis de proteínas totais em soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de animais submetidos à administração aguda de D-galactose.**

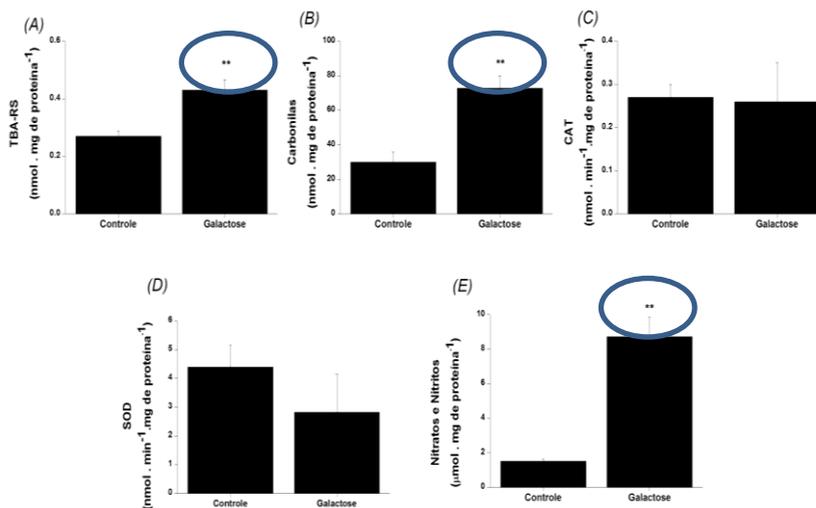
	Controle	Galactose
<b>Glicogênio</b>	0,696 ± 0,236	0,552 ± 0,079
<b>Proteínas Totais (soro)</b>	15,97 ± 0,495	16,92 ± 0,360
<b>Proteínas Totais (LCR)</b>	1,09 ± 0,329	1,97 ± 0,476

Os dados representam média ± erro padrão da média (6 animais por grupo). Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados de níveis de proteínas totais e concentrações de glicogênio estão expressos em mg/dL e mg de glicogênio/g de tecido, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Teste *t* de Student para amostras independentes).

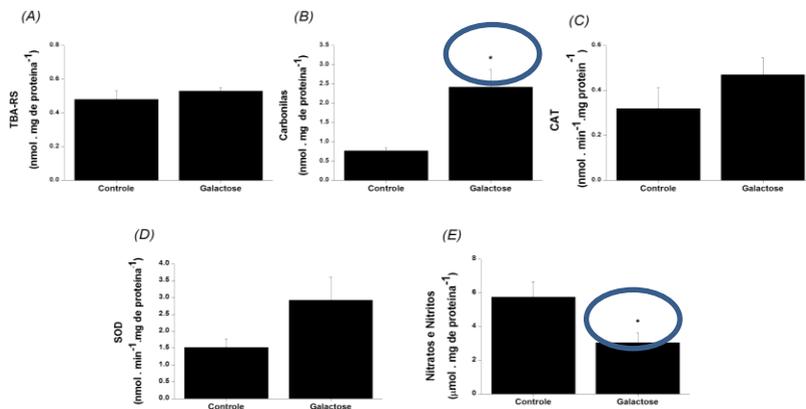
## 4.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.2.1 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 1 hora após a administração aguda de D-galactose

Inicialmente, investigaram-se os níveis de TBA-RS, concentrações de grupos carbonila e de nitratos e nitritos e as atividades das enzimas CAT e SOD em córtex cerebral e cerebelo de animais que receberam administração aguda de D-galactose e sofreram eutanásia 1 h após a administração. Em córtex cerebral, foram observados aumento dos níveis de TBA-RS (Figura 11A), do conteúdo de carbonilas proteicas (Figura 11B) e das concentrações teciduais de nitratos e nitritos (Figura 11E) no grupo que recebeu D-galactose. Por outro lado, em cerebelo desses mesmos animais, foram detectados um aumento apenas no conteúdo de carbonilas (Figura 12B), bem como uma diminuição estatisticamente significativa das concentrações de nitratos e nitritos (Figura 12E) em comparação ao grupo controle. As atividades das enzimas CAT e SOD não foram alteradas pela administração de D-galactose.



**Figura 11.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A), conteúdo de grupos carbonilas (B), atividade das enzimas catalase (CAT) (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) e concentração de nitratos e nitritos (E) em córtex cerebral de ratos que sofreram eutanásia 1 h após a administração. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata ou triplicata e estão expressos em nmol/mg de proteína (níveis de TBA-RS, conteúdo de carbonilas e concentrações de nitratos e nitritos) ou  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$  (atividades da CAT e da SOD). \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

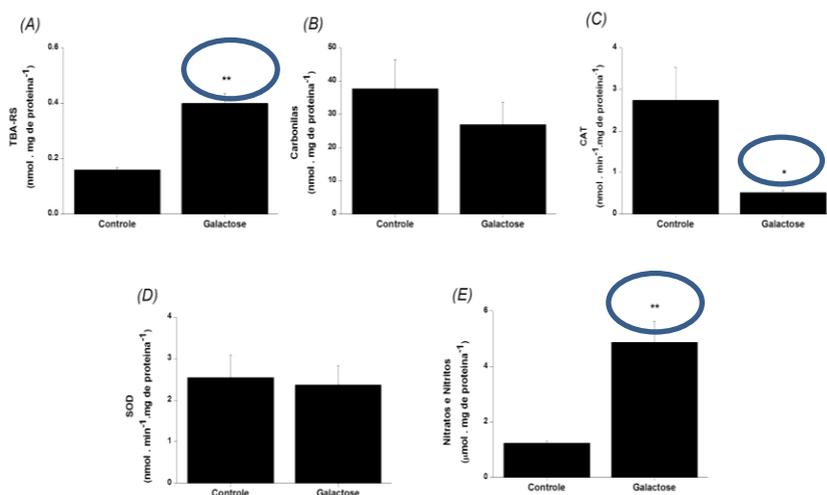


**Figura 12.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A), conteúdo de grupos carbonilas (B), atividade das enzimas catalase (CAT) (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) e concentração de nitratos e nitritos (E) em cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 1 h após a administração. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata ou triplicata e estão expressos em nmol/mg de proteína (níveis de TBA-RS, conteúdo de carbonilas e concentrações de nitratos e nitritos) ou nmol.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> (atividades da CAT e da SOD). \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

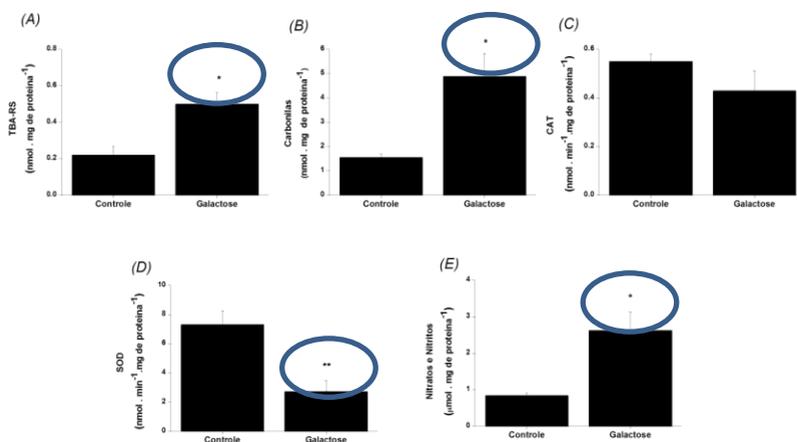
#### 4.2.2 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 12 horas após a administração aguda de D-galactose

A seguir, foram avaliados os mesmos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de animais submetidos à administração aguda de D-galactose e foram mortos 12 horas após essa administração. Pode-se observar na figura 13 que houve aumento estatisticamente significativo das concentrações de TBA-RS (Figura 13A) e das concentrações teciduais de nitratos e nitritos (Figura 13E) em córtex cerebral do grupo animal que recebeu D-galactose em comparação ao grupo controle. Por outro lado, a atividade da CAT foi reduzida nessa mesma estrutura cerebral (Figura 13C). O conteúdo de grupos carbonila e a atividade da SOD não foram alteradas nesse tecido.

Quando os parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados em cerebelo, observaram-se níveis aumentados de TBA-RS (Figura 14A), de grupos carbonila (Figura 14B) e de nitratos e nitritos (Figura 14E) nessa estrutura dos animais que receberam D-galactose em comparação aos animais do grupo controle. Por outro lado, a atividade da SOD encontrou-se marcadamente diminuída (Figura 14D). A atividade da CAT não foi alterada nessa estrutura 12 horas após a administração de D-galactose.



**Figura 13.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A), conteúdo de grupos carbonilas (B), atividade das enzimas catalase (CAT) (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) e concentração de nitratos e nitritos (E) em córtex cerebral de ratos que sofreram eutanásia 12 h após a administração. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata ou triplicata e estão expressos em nmol/mg de proteína (níveis de TBA RS, conteúdo de carbonilas e concentrações de nitratos e nitritos) ou nmol.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> (atividades da CAT e da SOD). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

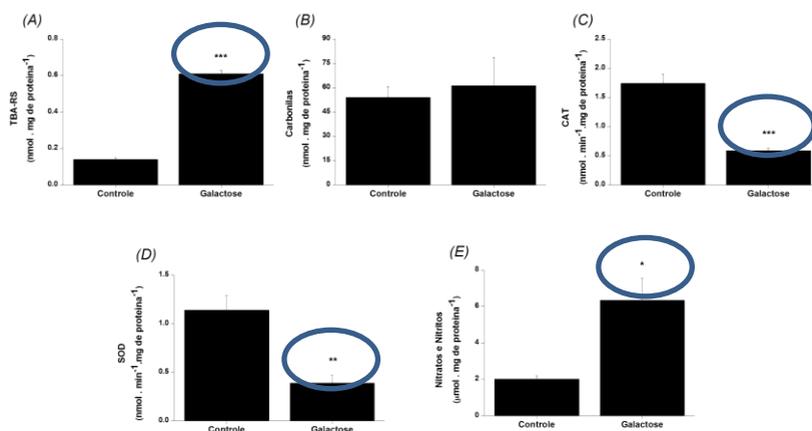


**Figura 14.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A), conteúdo de grupos carbonilas (B), atividade das enzimas catalase (CAT) (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) e concentração de nitratos e nitritos (E) em cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 12 h após a administração. Os valores representam média ± erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata ou triplicata e estão expressos em nmol/mg de proteína (níveis de TBA-RS, conteúdo de carbonilas e concentrações de nitratos e nitritos) ou nmol.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> (atividades da CAT e da SOD). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).

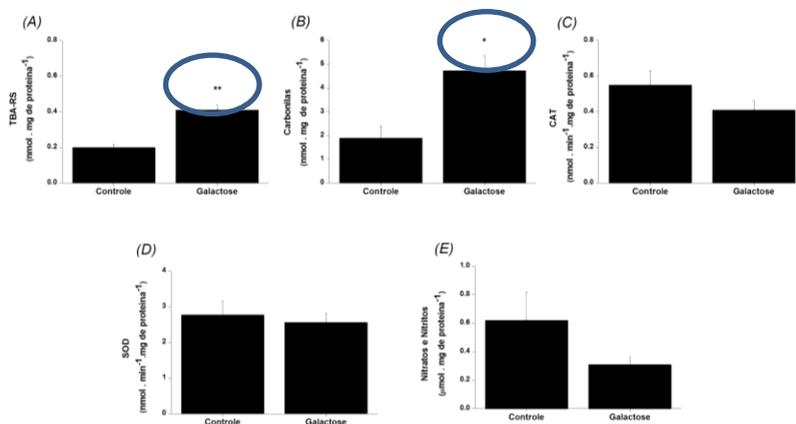
#### 4.2.3 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral e cerebelo de ratos que sofreram eutanásia 24 horas após a administração aguda de D-galactose

Por fim, foram avaliados os parâmetros de estresse oxidativo nos demais tempos de exposição à D-galactose em córtex cerebral e cerebelo de animais submetidos à administração aguda de D-galactose e que sofreram eutanásia 24 horas após a administração desse monossacarídeo. A figura 15 demonstra que os níveis de TBA-RS (Figura 15A) e concentrações de nitratos e nitritos (Figura 15E) encontraram-se aumentadas 24 horas após os animais receberem administração do carboidrato. A mesma figura ainda demonstra que as atividades das enzimas CAT (Figura 15C) e SOD (Figura 15D) foram diminuídas por

essa administração, ao passo que o conteúdo de grupos carbonilas proteicos não foram afetados (Figura 15B). Da mesma forma que em córtex cerebral, os níveis de TBA RS foram encontrados aumentados em cerebelo (Figura 16A) 24 horas após a administração de D-galactose. Entretanto, o tecido cerebelar respondeu à exposição a altas concentrações de D-galactose de forma diferente nos demais parâmetros. Foi observado um aumento do conteúdo de grupos carbonila (Figura 16B), sem apresentar qualquer alteração estatisticamente significativa das atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD (Figuras 16C e 16D, respectivamente) ou das concentrações de nitratos e nitritos (Figura 16E) nessas amostras.



**Figura 15.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A), conteúdo de grupos carbonilas (B), atividade das enzimas catalase (CAT) (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) e concentração de nitratos e nitritos (E) em córtex cerebral de ratos que sofreram eutanásia 24 h após a administração. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata ou triplicata e estão expressos em nmol/mg de proteína (níveis de TBA RS, conteúdo de carbonilas e concentrações de nitratos e nitritos) ou nmol.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> (atividades da CAT e da SOD). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).



**Figura 16.** Efeitos da administração aguda de D-galactose sobre níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (A), conteúdo de grupos carbonilas (B), atividade das enzimas catalase (CAT) (C) e superóxido dismutase (SOD) (D) e concentração de nitratos e nitritos (E) em cerebello de ratos que sofreram eutanásia 24 h após a administração. Os valores representam média  $\pm$  erro padrão da média (6 animais por grupo) de experimentos realizados em duplicata ou triplicata e estão expressos em nmol/mg de proteína (níveis de TBA RS, conteúdo de carbonilas e concentrações de nitratos e nitritos) ou nmol.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> (atividades da CAT e da SOD). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo controle (Teste *t* de Student para amostras independentes).



## 5. DISCUSSÃO

A exposição de animais adultos e senescentes a altas doses de galactose tem sido extensamente utilizada como modelos experimentais de envelhecimento e demência, por induzir alterações patológicas semelhantes aos que ocorrem nessas condições (Yanar et al., 2011; Hsia et al., 2012; Wang et al., 2015). Entretanto, poucos estudos foram realizados até o momento sobre a fisiopatogenia do dano cerebral apresentados por pacientes acometidos por galactosemia. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de modelos animais de galactosemia para a compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos e, a partir destes, estabelecer possíveis novas estratégias terapêuticas para melhorar a qualidade de vida de indivíduos galactosêmicos. Nesse sentido, no presente estudo foi utilizado um modelo experimental de galactosemia utilizando-se doses mais baixas de galactose e animais mais jovens do que os utilizados em modelos de envelhecimento, visto que os sinais e sintomas das galactosemias se iniciam logo após o nascimento e perduram por toda a vida do paciente (Ruiz et al., 2011; Karadag et al., 2013).

No modelo experimental de galactosemia utilizado no presente estudo, foram observadas alterações da homeostase *redox* celular em estruturas cerebrais de ratos com 30 dias de vida em diferentes tempos de exposição a altas concentrações de galactose. Foram avaliadas as estruturas cerebrais córtex e cerebelo, visto que são as principais estruturas do SNC afetadas na galactosemia (Morais et al., 2012; Dubroff et al., 2008; Banji et al., 2013). Tais estruturas estão envolvidas em processos de integração e execução de respostas, incluindo memória, cognição, linguagem, emoções, equilíbrio, tônus muscular e movimentos voluntários e involuntários, processos frequentemente afetados em pacientes galactosêmicos (Hao et al., 2014; Aydin et al., 2015).

O SNC é especialmente sensível a alterações na homeostase *redox* celular, visto que apresenta capacidade reduzida de regeneração celular em comparação a outros tecidos (Mergenthaler et al., 2013; Li et al., 2014). Outro fator que colabora para essa maior suscetibilidade é o alto consumo de oxigênio pelo encéfalo. Em humanos, o cérebro é responsável por aproximadamente 20 % do consumo total de O<sub>2</sub> do organismo. Esta alta demanda de O<sub>2</sub> deve-se à alta demanda energética especialmente de neurônios, para a manutenção do potencial de membrana celular e a neurotransmissão (Halliwell e Gutteridge, 2002).

Tal fato sugere que a mitocôndria desempenha papel central para a execução de funções neuronais e alterações nesta organela podem afetar intensamente o correto funcionamento do SNC (Bartasagui et al., 2007; Rubbo e Raddi, 2008).

Nesse contexto, foram avaliados parâmetros de metabolismo energético cerebral em ratos submetidos à administração aguda subcutânea de D-galactose e que foram mortos 1 hora após essa administração. Foi observada uma inibição da atividade da SDH em córtex cerebral, enzima do ciclo de Krebs responsável pela oxidação do succinato a fumarato com consequente doação de elétrons para o complexo II da cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2014). Porém, não houve nenhuma alteração, embora tenha sido observada uma tendência de diminuição da atividade do complexo I-III. Da mesma forma, não houve alteração da atividade da MDH, outra enzima que participa do ciclo do ácido cítrico, bem como nas concentrações de glicogênio nesse tecido e nos níveis de proteínas totais em soro e LCR dos animais pertencentes ao grupo que recebeu administração de galactose. Embora não se tenha observado nenhuma alteração das atividades da cadeia transportadora de elétrons, não se pode descartar que alterações possam ser observadas *in vivo* por mecanismos indiretos, tal como a interrupção do ciclo de Krebs pela inibição da SDH observada no presente trabalho, o que diminuiria o aporte de elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial. Outro fator que se deve considerar é o tempo de exposição à galactose. Possivelmente tempos maiores de exposição a altas concentrações desse monossacarídeo ou repetidas administrações poderiam desencadear modificações na respiração celular.

Long et al. (2007) investigaram o envolvimento da disfunção mitocondrial em cérebro de ratos submetidos à administração crônica de galactose (100 mg/kg de peso corporal) e verificaram uma redução da atividade do complexo II da cadeia respiratória. Por outro lado, Chang et al. (2014) demonstraram que a exposição a altas concentrações de galactose (125 mg/kg de peso corporal) durante 8 semanas ocasionou alteração no complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em músculo esquelético, além de anormalidades na ultraestrutura mitocondrial, o que poderia contribuir como fator de comprometimento tecidual. A administração crônica subcutânea de D-galactose em um modelo de obesidade também demonstrou disfunção mitocondrial em encéfalo de roedores, além de danos oxidativos a biomoléculas (Ma et al., 2014).

Em um estudo desenvolvido com pacientes adultos galactosêmicos conduzido por Dubroff et al. (2008), foram realizadas análises metabólicas cerebrais por escaneamento tomográfico por

emissão de pósitrons (PET-scan). Os resultados demonstraram alterações como reduções bilaterais significativas do metabolismo cerebral da glicose em diversas estruturas corticais dos pacientes, caudado, cerebelo, giro pré-central e tonsilas cerebelares. Por outro lado, foram observados aumentos bilaterais deste metabolismo em giro do cíngulo e polos temporais, bem como giro subcalosal e claustrum. Os autores sugerem que alterações nessas regiões cerebrais podem estar associadas a distúrbios neuropsicológicos em pacientes galactosêmicos. Entretanto, não foram sugeridos nessa publicação os mecanismos pelos quais o metabolismo da glicose estaria alterado. Porém, pode-se inferir que alterações mitocondriais como as observadas no presente estudo bem como nos estudos supracitados, poderiam desencadear tais alterações.

A disfunção mitocondrial está intimamente relacionada ao estresse oxidativo, visto que a mitocôndria é o principal sítio de geração de ER, além de ser alvo potencial dessas moléculas (Liu et al., 2009; Halliwell e Gutteridge, 2015). O estresse oxidativo pode ser definido como um processo não fisiológico caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e as defesas antioxidantes teciduais (Betteridge, 2000), tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, proteínas e lipídeos), comprometendo o funcionamento celular e podendo induzir morte celular por apoptose ou necrose (Halliwell, 2001). Neste contexto, níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo, tais como carbonilas proteicas, nitrotirosina, produtos de peroxidação lipídica e bases de DNA oxidadas foram detectados em modelos animais de envelhecimento, demência e doenças neurodegenerativas induzidos pela administração de D-galactose (Anand et al., 2012; Budni et al., 2016; Jayant et al., 2016; Li et al., 2016; Rehman et al., 2016). Adicionalmente, estudos sugerem a participação de estresse oxidativo na fisiopatologia das diferentes galactosemias, especialmente nas deficiências de GALT e GALE (Timson, 2016).

Na tentativa de se estabelecer o papel do estresse oxidativo no dano cerebral característico das galactosemias, o presente estudo investigou os efeitos de diferentes tempos de exposição à D-galactose sobre indicadores de dano oxidativo a proteínas e lipídeos em córtex cerebral e cerebelo de ratos. O córtex cerebral apresentou um aumento consistente dos níveis de TBA-RS (marcador de peroxidação lipídica) 1, 12 e 24 horas após a administração dessa hexose, enquanto este efeito foi observado em cerebelo apenas 12 h após a administração. Por outro lado, dano oxidativo a proteínas foi evidenciado 1 hora após a

administração, sem quaisquer alterações nos tempos maiores de exposição à D-galactose. Tal fato poderia ser explicado por uma ativação dos sistemas celulares de reparo proteico (degradação de proteínas danificadas) após uma exposição prolongada ao monossacarídeo em córtex cerebral. Nesse sentido, recentemente foi descoberto que a proteína de choque térmico 90 (Hsp90), uma chaperona associada ao enovelamento de proteínas e à degradação proteica via ubiquitinação (Neckers, 2007), está intimamente relacionada à via de metabolismo da galactose em leveduras (Gopinath e Leu, 2016). Diferentemente do córtex cerebral, a carbonilação de proteínas em cerebelo encontrou-se aumentada nos três tempos de exposição à D-galactose estudados, sugerindo um efeito mais contundente e/ou duradouro nesta estrutura cerebral.

Os sistemas antioxidantes enzimáticos do córtex cerebral e do cerebelo também responderam de forma diferenciada à administração aguda de D-galactose. A atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, em córtex cerebral foram afetadas em tempos maiores de exposição ao monossacarídeo (12 e 24 h), enquanto apenas a atividade da SOD foi inibida em cerebelo 12 h após a administração de D-galactose, tendo retornado a sua atividade a valores normais 24 horas após essa administração. Tal fato sugere uma maior suscetibilidade do córtex cerebral à presença de altas concentrações de D-galactose em comparação ao cerebelo.

Alterações de parâmetros de estresse oxidativo em cérebro também foram observadas por Haider e colaboradores (2015), que demonstraram que a administração subaguda de D-galactose em ratos adultos jovens ocasionou um aumento da peroxidação lipídica cerebral e da atividade da SOD, enquanto que a atividade da CAT e da GPx foram diminuídas por consequência da administração desse carboidrato. Outro estudo desenvolvido por Aydin et al. (2015) também demonstrou efeitos pró-oxidantes da administração crônica (8 semanas) de D-galactose, tais como aumento dos níveis de MDA (produto final da peroxidação lipídica) e de peróxido de hidrogênio e diminuição dos níveis de GSH e das atividades das enzimas SOD e GPx, que foram acentuados ao longo do tratamento. Esses achados foram revertidos pela administração de carnosina e taurina, moléculas com propriedades neuroprotetoras e antioxidantes.

As diferenças entre os resultados de dano oxidativo e atividades antioxidantes encontrados nas diferentes estruturas cerebrais de animais submetidos ao modelo experimental desenvolvido no presente trabalho podem ser atribuídas a um comportamento farmacocinético

diferenciado, levando a uma diferente distribuição do monossacarídeo nessas estruturas. Entretanto, no presente trabalho, não foi realizada a determinação das concentrações de galactose atingidas nas diferentes estruturas ao longo do tempo para que essa hipótese fosse comprovada ou refutada.

Adicionalmente aos marcadores de dano oxidativo e às atividades enzimáticas de antioxidantes, foram avaliados as concentrações de ERN. As concentrações de nitratos e nitritos, produtos finais do metabolismo do NO, encontraram-se aumentadas nas duas estruturas cerebrais em quase todos os tempos avaliados. Esses resultados corroboram um estudo recente de Dhaunsi e Al-Essa (2016), em que os níveis de nitritos e a expressão da enzima NOS encontravam-se aumentados em fibroblastos de pacientes galactosêmicos recém-nascidos. O aumento da produção de ERN poderia, portanto, colaborar para o dano oxidativo a proteínas e lipídeos demonstrado pelo presente trabalho.

Ellis et al. (2005), utilizando animais nocautes para diferentes isoformas da NOS, observaram que a induzível (iNOS) é responsável pela produção exacerbada de ERN ocasionadas pela administração de D-galactose. No SNC, a iNOS é encontrada nas células gliais ativadas durante processos de neuroinflamação, especialmente na microglia (Ghasemi e Fatemi, 2014). Nesse sentido, diversos trabalhos relataram efeitos pró-inflamatórios da galactose em cérebro de roedores (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2013; Woo et al., 2014; Ali et al., 2015; Gao et al., 2016). Adicionalmente, dois desses estudos citados demonstraram microgliose e ativação microglial em encéfalo de animais submetidos à administração de altas doses de D-galactose (Lu et al., 2010; Ali et al., 2015). Tais achados sugerem que o estresse nitrosativo desempenha um importante papel na fisiopatologia do dano cerebral apresentados por indivíduos galactosêmicos ocasionando dano oxidativo a biomoléculas e participando dos processos de neuroinflamação.

As consequências de alterações na homeostase *redox* são diversas e críticas para a função celular. Déficit energético associado ao estresse oxidativo podem induzir prejuízos a importantes atividades enzimáticas, tais como a inibição da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (enzima importante para a manutenção do gradiente iônico e, conseqüentemente, do potencial de membrana celular) observada em eritrócitos de pacientes e em modelos animais de galactosemia (Marinou et al., 2005; Schulpis et al., 2005; Tsakiris et al., 2005). Além disso, o estresse oxidativo pode desencadear processos de morte celular por apoptose pela via mitocondrial (Ullah et al., 2015; Wang et al., 2015).

Tomados em seu conjunto, os resultados apresentados no presente estudo sugerem que a administração aguda de D-galactose induz disfunção mitocondrial e estresse nitrosativo em cérebro de ratos jovens em períodos curtos (1 h) de exposição a esse monossacarídeo. Torna-se importante salientar que, nos estudos a respeito desses parâmetros em modelos animais de galactosemia descritos na literatura até o momento, a administração de D-galactose foi realizada de forma repetida ou crônica, sem informações quanto aos efeitos da intoxicação aguda deste carboidrato, o que mimetizaria os efeitos imediatos após o consumo de D-galactose por pacientes acometidos pelas galactosemias.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração aguda subcutânea de D-galactose inibiu a atividade da enzima SDH em córtex cerebral, bem como induziu dano oxidativo a lipídeos e proteínas, alterou defesas antioxidantes enzimáticas e aumentou a produção de ERN. Caso esses achados possam ser extrapolados para a condição humana, poderiam colaborar para o entendimento da fisiopatologia do dano cerebral apresentado por indivíduos galactosêmicos.



## REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.
- Adam-Vizi V, Tretter L. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress. *Neurochem Int.* 2013;62(5):757-63
- Ali T, Badshah H, Kim TH, Kim MO. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF-K B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *J Pineal Res.* 2015;58(1):71-85.
- Anand KV, Mohamed JA, Abir MS, Thomas PA, Geraldine P. Protective role of chrysin against oxidative stress in D-galactose-induced aging in an experimental rat model. *Geriatr. Gerontol.* 2012;Int.12,741-750.
- Atamna H, Frey WH. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion.* 2007;7:297-310.
- Aydin AF, Çoban J, Doğan-Ekici I, Betül-Kalaz E, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Carnosine and taurine treatments diminished brain oxidative stress and apoptosis in D-galactose aging model. *Metab Brain Dis.* 2015;31.
- Banji D, Banji OJ, Dasaraju S, Kranthi KC. Curcumin and piperine abrogate lipid and protein oxidation induced by D-galactose in rat brain. *Brain. Res.* 2013;17,1-11.
- Bannister J, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 1987;32,279-312.
- Benarroch EE. Brain glucose transporters: implications for neurologic disease. *Neurology.* 2014;15,82(15):1374-9.
- Bartesaghi S, Ferrer-Suetal G, Peluffo G, Valez V, Zhang, H, Kalyanaraman B, Radi R. Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino Acids.* 2007;32:501-515.

Berry GT, Segal S. Disorders of galactose metabolism. In C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (eds). *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disorders*. New York: McGraw Hill; 2000. p. 1553–1589.

Berry GT, Walter JH. Disorders of galactose metabolism. In: Fernandes J, Saudubray M, van den Berghe G, Walter JH (eds). *Inborn Metabolic Diseases – Diagnosis and Treatment*. 5th ed. Heidelberg, Germany: Springer; 2011.

Berry GT. Galactosemia: When is it a newborn screening emergency? *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012;106;7–11.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000.49,3–8.

Bosch AM, IJlst L, Oodtheim W. Identification of novel mutations in classical galactosemia. *Human Mutation*. 2005;801:1-7.

Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2006;29,516-525.

Bosch AM. Classical galactosaemia: dietary dilemmas. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011;34,257-260.

Budni J, Pacheco R, da Silva S, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, de Medeiros J, Voss BC, Steckert AV, Valvassori Sda S, Quevedo J. Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behav Brain Res*. 2016;1;302:35-43.

Cakatay U, Aydin 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. *Curr. Aging. Sci*. 2013;6,135-141.

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci*. 2005;15,233(1-2):145-62.

Calderon FR, Phansalkar AR, Crockett DK, Miller M, Mao R. Mutation database for the galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT) gene. *Hum. Mutat.* 2007;28;939–943.

Camelo Jr JS, Fernandes MIM, Maciel LMZ, Scrideli CA, Santos FJL, Camargo Jr AS, Passador CS, Leite PC, Resende DR, de Souza LO, Giugliani R, Jorge SM. Galactosaemia in a Brazilian population: High incidence and cost–benefit analysis. 2009;JIMD Online Report.

Camelo Jr JS, Fernandes MIM, Jorge SM, Maciel LMZ, Santos JLF, Camargo JR. AS, Passador CS, Camelo SHH. Newborn screening for galactosemia: a health economics evaluation. *Cad. Saúde Pública.* 2011;27(4):666-676.

Carr A, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20,1716–1723.

Cataldo AM, Broadwell RD. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J. Neurocytol.* 1986;15,511–524.

Chang L, Liu X, Liu J, Li H, Yang Y, Liu J, Guo Z, Xiao K, Zhang C, Liu J, Zhao-Wilson X, Long J. D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. *J Med Food.* 2014;17:357-64.

Choi J. H, Kim DW, Yoo DY, Jeong HJ, Kim W, Jung HY, Nam SM, Kim JH, Yoon YS, Choi SY, Hwang IK. Repeated administration of PEP-1-Cu, Zn, superoxide dismutase and PEP-1-peroxiredoxin-2 to senescent mice induced by D-galactose improves the hippocampal functions. *Neurochem. Res.* 2013;38,2046-2055.

Cui X, Wang L, Zuo P, Han Z, Fang Z, Li W, Liu J. D-Galactose caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress. *Biogerontology.* 2004;5,317-325.

Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J. Neurosci. Res.* 2006;84,647–654.

Çoban J, Betül-Kalaz E, Küçükgergin C, Aydın AF, Doğan-Ekici I, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Blueberry treatment attenuates D-galactose-induced oxidative stress and tissue damage in rat liver. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2014;14, 490–497.

Çoban j, Doğan-ekici i, Aydın af, Betül-Kalaz, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. *Metab. Brain Dis.* 2015;30,793–802.

De Giorgis V, Veggiotti P. GLUT1 deficiency syndrome 2013: current state of the art, *Seizure.* 2013;22,803–811.

De Iuliis A, Grigoletto J, Recchia A, Giusti P, Arslan P. A proteomic approach in the study of an animal model of Parkinson's disease. *Clin. Chim. Acta.* 2005;357,202–209.

Dhaunsi GS, Al-Essa M. Downregulation of Insulin-Like Growth Factor-1 via Nitric Oxide Production in a Hypergalactosemic Model of Neonate Skin Fibroblast Cultures. *Neonatology.* 2016;27,110:225-230.

Dubroff JG, Ficicioglu C, Segal S, Wintering NA, Alavi A, Newberg AB. FDG-PET findings in patients with galactosaemia. *J Inherit Metab Dis.* 2008;31:533-9.

Du Z; Yang Y, Hua Y, Sun Y, Zhang S, Peng W, Zhong Y, Huang X, Kong W. A long-term high-fat diet increases oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the inner ear of D-galactose-induced aging rats. *Hearing Research.* 2012;287:15-24.

Du Z, Yang Q, Zhou T, Liu L, Li S, Chen S, Gao C. D-galactose-induced mitochondrial DNA oxidative damage in the auditory cortex of rats. *Molecular medicine reports.* 2014;10: 2861-2867.

- El-Bassyouni HT, Ashour AM, Ezzat A, Bassiouni R, Fateen EM. The effect of diet on antioxidante status in patients with galactosemia. *J. Med. Sci.* 2006;6: 452-457.
- Elsas II LJ, Langley P, Paulk EM, Hjelm LN, Dembure PE. A molecular approach to galactosemia. *Eur J Pediatr.* 1995;154[Suppl 2]:S21-S27.
- Ellis EA, Sengupta N, Caballero S, Guthrie SM, Mames RN, Grant MB. Nitric oxide synthases modulate progenitor and resident endothelial cell behavior in galactosemia. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1413-22.
- Ericinska M, Silver JA. Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 1994;16:37-41.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-421.
- Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi E. Evaluation of total reactive antioxidant potential (trap) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001;388, 261-266.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408:239-247.
- Frey PA. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 1996;10,461-470.
- Fridovich-Keil JL. Galactosemia: the good, the bad, and the unknown. *J. Cell Physiol.* 2006;209,701-705.
- Fridovich-Keil JL, Walter JH. Galactosemia. The online metabolic & molecular bases of inherited disease. Part 7, Chapter 72 (eds) D. Valle, A. Beaudet, B. Vogelstein, K. Kinzler, S. Antonarakis and A. Ballabio. New York: McGraw Hill; 2008.

Fridovich-Keil JL, Gubbels CS, Spencer JB, Sanders RD, Land JA, Rubio-Gozalbo E. Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2011;34:357-366.

Gao J, Zhou R, You X, Luo F, He H, Chang X, Zhu L, Ding X, Yan T. Salidroside suppresses inflammation in a D-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease via SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway. *Metab Brain Dis.* 2016, *in press*.

Garcia DF, Camelo JS Jr, Molfetta GA, Turcato M, Souza CF, Porta G, Steiner CE, Silva WA Jr. Clinical profile and molecular characterization of Galactosemia in Brazil: identification of seven novel mutations. *BMC Med Genet.* 2016;17:39.

Ghasemi M, Fatemi A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;45:168-82.

Gupta RC, Milatovic D, Dettbarn W. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurology Toxicology.* 2001;22:271-282.

Hadzi-Petrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, Mladenov M. D-galactose induced inflammation lipid peroxidation and platelet activation in rats. *Cytokine.* 2014;69:150-3.

Hadzi-Petrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, Mladenov M. D-galactose induced changes in enzymatic antioxidant status in rats of different ages. *Physiol Res.* 2015;64:61-70.

Haider S, Liaquat L, Shahzad S, Sadir S, Madiha S, Batool Z, Tabassum S, Saleem S, Naqvi F. A high dose of short term exogenous D-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process. *Life Sciences.* 2015;124,110-119.

Halliwell B. *Drugs Aging.* 2001;18,685.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, Oxford:2002.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 5<sup>a</sup> ed. Oxford:2015.

Hao L, Huang H, Gao J, Marshall C, Chen Y, Xiao M. The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by Dgalactose in mice. *Neurosci. Lett.* 2014;571,45–49.

Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica Ilustrada*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Hebert SL, Lanza IR, Nair KS. Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging. *Mechanisms of ageing and development.* 2010;131:451-462.

Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.* 1989; 26:277-85.

Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* 2004;278,43885–43888.

Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosaemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly SW, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2000. p.1553–87.

Hsia CH, Wang CH, Kuo YW, Ho YJ, Chen HL. Fructo-oligosaccharide systemically diminished D-galactose-induced oxidative molecule damages in BALB/cJ mice. *Br. J. Nutr.* 2012;107,1787–1792.

Jayant S, Sharma BM, Sharma B. Protective effect of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) modulator, against behavioral, biochemical and structural damage in experimental models of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2016;1,1642:397-408.

Jumbo-Lucioni PP, Hopson ML, Hang D, Liang Y, Jones DP, Fridovich-Keil JL. Oxidative stress contributes to outcome severity in a *Drosophila melanogaster* model of classic galactosemia. *Dis Model Mech.* 2013;6:84-94.

Jumbo-Lucioni PP, Ryan EL, Hopson ML, Bishop HM, Weitner T, Tovmasyan A, Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Liang Y, Jones DP,

Fridovich-Keil JL. Manganese- based superoxide dismutase mimics modify both acute and long-term outcome severity in a *Drosophila melanogaster* model of classic galactosemia. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;20, 2361-2371.

Kalaz EB, Çoban J, Aydin AF, Doğan-Ekici I, Doğru-Abbasoğlu S, Öztezcan S, Uysal M. Carnosine and taurine treatments decreased oxidative stress and tissue damage induced by D-galactose in rat liver. *J Physiol Biochem.* 2014;70:15–25.

Karadag N, Zenciroglu A, Eminoglu FT, Dilli D, Karagol BS, Kundak A, Dursun A, Hakan N, Okumus N. Literature review and outcome of classic galactosemia diagnosed in the neonatal period. *Clin Lab.* 2013;59:1139-46.

Kaufman FR, McBride-Chang C, Manis FR, Wolff JÁ, Nelson MD. Cognitive functioning, neurologic status and brain imaging in classical galactosemia. *Eur J Pediatr.* 1995;154 [Suppl 2]:S2-S5.

Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'brien PJ. Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure–activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 2005;12,2601–2623.

Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 2009;380:431-441.

Lai K, Elsas LJ, Wierenga KJ. Galactose toxicity in animals. *IUBMB Life.* 2009;61,1063–1074.

Lan Z, Liu J, Chen L, Fu Q, Luo J, Qu R, Kong L, Ma S. Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in Dgalactose-induced senescent mice. *J. Ethnopharmacol.* 2012;141,386-395.

- Lawrence RM. Circumstances when breastfeeding is contraindicated. *Pediatr. Clin. North Am.* 2013;60,295-318.
- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen Species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Rev Food Sci Saf.* 2004;3:21-33.
- Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G. Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose-induced brain aging. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2008;369,1082-1087
- Leonard JV, Holton JB. Galactosaemia. *Lancet.* 1995;4,345(8949):581.
- Li JJ, Zhu Q, Lu YP, Zhao P, Feng ZB, Qian ZM, Zhu L. Ligustilide prevents cognitive impairment and attenuates neurotoxicity in D-galactose induced aging mice brain. *Brain Res.* 2015;21,1595:19-28.
- Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, Jia Y. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One.* 2015; 7;10:e0138904.
- Long J, Wang X, Gao H, Liu Z, Liu C, Miao M, Cui X, Packer L, Liu J. D-galactose toxicity in mice is associated with mitochondrial dysfunction: protecting effects of mitochondrial nutrient R-alpha-lipoic acid. *Biogerontology.* 2007;8:373-81.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF, Ye Q, Liu CM, Shan Q, Wang YJ. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation. *Cereb Cortex.* 2010;20:2540-8.
- Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. *Life Sciences.* 2014;110:53-60
- Marinou K, Tsakiris S, Tsopanakis C, Schulpis KH, Behrakis P. Suckling rat brain regional distribution of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-atpase activity in the

in vitro galactosaemia: the effect of L-cysteine and glutathione. *Metab Brain Dis.* 2005;20:45-54.

Marinou K, Tsakiris S, Tsopanakis C, Schulpis KH, Behrakis P. Suckling rat brain regional distribution of acetylcholinesterase activity in galactosaemia in vitro. *Metabolic Brain Disease.* 2005;Vol.20,No.3.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005;16,577–586.

Mello Filho AC, Hoffman ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J.* 1983;218:273-5

Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 2013;36:587-97.

Morais FA; Rodrigues LB; Ghedim FV; Fraga DB; Bristot SF; Streck EL; Ferreira GC; Zugno AI; Schuck PF. Acute D-galactose administration enhances acetylcholinesterase activity in cerebral cortex of rats in an age-dependent manner. *SBBq.* 2012.

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 uridylyltransferase (GALT) and UDP-galactose 4'-epimerase (GALE). *Mol Genet Metab.* 2008;93:160–171.

Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J. Biosci.* 2007;32:517–530.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* Porto Alegre: Artmed, 2014.

Novelli G, Reichardt JKV. Molecular Basis of Disorders of Human Galactose Metabolism: Past, Present, and Future. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2000;71, 62–65.

Otsyula M, King MS, Ketcham TG, Sanders RA, WS JB 3rd. Oxidative stress in rats after 60 days of hypergalactosemia or hyperglycemia. *Int J Toxicol.* 2003;22:423-7

Pala FS, Gürkan H. The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology.* 2008;1-9.

Petrosillo G, Matera M, Casanova G, Ruggiero FM, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochemistry international* 2008;53:126-131.

Prakash A, Kumar A. Pioglitazone alleviates the mitochondrial apoptotic pathway and mito-oxidative damage in the D-galactose-induced mouse model. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2013;40,644–651

Rehman SU, Shah SA, Ali T, Chung JI, Kim MO. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. *Mol Neurobiol.* 2016, *in press.*

Ridel KR, Leslie ND, Gilbert DL. An updated review of the long-term neurological effects of galactosemia. *Pediatr Neurol.* 2005;33:153-61.

Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolucci N. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem.* 2004;385,1–10.

Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:13147-52.

Rodrigues AF, Biasibetti H, Zanotto BS, Sanches EF, Schmitz F, Nunes VT, Pierozan P, Manfredini V, Magro DD, Netto CA1, Wyse AT. D-Galactose Causes Motor Coordination Impairment, and Histological and Biochemical Changes in the Cerebellum of Rats. *Mol Neurobiol.* 2016, *in press.*

Rodrigues AF, Biasibetti H, Zanotto BS, Sanches EF, Pierozan P, Schmitz F, Parisi MM, Barbé-Tuana F, Netto CA, Wyse AT. Intracerebroventricular d-galactose administration impairs memory and alters activity and expression of acetylcholinesterase in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 2016; 50:1-6.

Rubbo H, Radi R. Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008;1780:1318-1324.

Ruiz JD, Martínez AC, López JL, Ortiz AJ. Galactosemia. *An Pediatr (Barc).* 2011;75:65-66.

Sarkar M, Bose SS, Mondal G, Chatterjee S. Generalized epimerase deficiency galactosemia. *Indian J Pediatr.* 2010.

Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Sánchez B, Llanillo M, Hernández-Hernández A. Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis? *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2012;81: 257–274.

Segal S. Galactosemia unsolved. *Eur J Pediatr.* 1995;154(7 Suppl 2):S97-102.

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;125:374–381.

Schuck PF, Milanez AP, Felisberto F, Galant LS, Machado JL, Furlanetto CB, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Streck EL, Ferreira GC. Brain and muscle redox imbalance elicited by acute ethylmalonic acid administration. 2015; *PLoS ONE* 10: e 012660.

Schulpis KH, Michelakakis H, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of diet on total antioxidant status, erythrocyte membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities in patients with classical galactosaemia. *Clinical Nutr.* 2005;24,151-157.

Scriver CR, Beaudet A, Sky WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease* 8<sup>th</sup> New York: McGraw-Hill. 2001.

- Secher, NH, Quistorff, B. Brain glucose and lactate uptake during exhaustive exercise. *J. Physiol.* 2005, 568, 3.
- Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther.* 1990;47:61-71
- Shen YX; Xu SY; Wei W; Sun XX; Yang J; Liu LH; Dong C. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J. Pineal Res.* 2002; 32, 173–178.
- Stambolian D, Ai Y, Sidjanin D. Cloning of the galactokinase cDNA and identification of mutations in two families with cataracts. *Nat Genet.* 1995; 10:307–312.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 2004;72:111–127.
- Tang M, Odejinmi SI, Vankayalapati H, Wierenga KJ, Lai K. Innovative therapy for Classic Galactosemia - Tale of two HTS. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2012;105:44–55.
- Timson DJ. Functional analysis of disease-causing mutations in human UDP-galactose 4-epimerase. *FEBS J.* 2005;272:6170–7.
- Timson DJ. The structural and molecular biology of type III galactosemia. *IUBMB Life.* 2006 Feb;58:83-9.
- Timson DJ. The molecular basis of galactosemia - Past, present and future. *Gene.* 2016 Sep 10;589:133-41.
- Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino acids* 2003;25:275-281.
- Tsakiris S, Angelogianni P, Schulpis KH, Behrakis P. Protective effect of L-cysteine and glutathione on rat brain Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibition induced by free radicals. *Z. Naturforsch.* 2000;55c:271–277.
- Tsakiris S, Carageorgiou H, Schulpis KH. The Protective Effect of L-Cysteine and Glutathione on the Adult and Aged Rat Brain (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase Activities in Galactosemia In Vitro. *Metabolic Brain Disease.* 2005;Vol.20,No.1.

Ullah F, Ali T, Ullah N, Kim MO. Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochem Int* pii: 2015;S0197-0186,30004-8.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7:65-74.

Valko M., Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*. 2006;160,1–40.

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin M, Mazura M, Telser I. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84.

Xian YF, Lin ZX, Zhao M, Mao QQ, Ip SP, Che CT. *Uncaria rhynchophylla* ameliorates cognitive deficits induced by Dgalactose in mice. *Planta Med*. 2011; 77:1977–1983

Xu Y, Zhang J, Liu J, Li S, Li C, Wang W, Ma R., Liu Y. Luteolin attenuate the D-galactose-induced renal damage by attenuation of oxidative stress and inflammation. *Nat. Prod. Res*. 2015;29,1078–1082.

Waggoner DD, Buist NMR, Donnell GN. Long- term prognosis in Galactosaemia: Results of a Survey of 350 Cases. *J. Inher. Metab. Dis*. 1990;13:802–818.

Wang T, Di G, Yang L, Dun Y, Sun Z, Wan J, Peng B, Liu C, Xiong G, Zhang C, Yuan D Saponins from *Panax japonicus* attenuate D-galactose-induced cognitive impairment through its anti-oxidative and anti-apoptotic effects in rats. *J. Pharm. Pharmacol*. 2015;67,1284–1296.

Watanabe K, Shibuya S, Ozawa Y, Nojiri H, Izuo N, Yokote K, Shimizu T. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *BioMed Research International*.

Wei H, Li L, Song Q, Ai H, Chu J, Li W. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2005;28;157:245-51.

Woo JY1, Gu W, Kim KA, Jang SE, Han MJ, Kim DH. *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a D-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe.* 2014;27:22-6.

Woodruff-Pak DS, Green JT, Levin SI, Meisler MM. Inactivation of sodium channel *Scn8a* (*Nav1.6*) in Purkinje neurons impairs learning in Morris water maze and delay but not trace eye blink classical conditioning. *Behav. Neurosci.* 2006;120,229–240.

Woodruff-Pak DS, Foy M, Akopian GG, Lee KH, Zach J, Nguyen KP, Comalli DM, Kennard JA, Agelan A, Thompson RF. Differential effects and rates of normal aging in cerebellum and hippocampus. *Proc.Nat. Acad. Sci.U.S.A.* 2010;26,1624–1629.

Yanar K, Aydin S, Cakatay U, Mengi M, Buyukpinarbasili N, Atukeren P, Sitar ME, Sönmez A, Uslu E. Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 201

Yang DZ, Zhou T, Liu L, Li S, Chen S, Gao C. D-galactose-induced mitochondrial DNA oxidative damage in the auditory cortex of rats. *Mol Med Rep.* 2014;10:2861-7.1,109, 423–433.

Yu Y, Bai F, Liu Y, Yang Y, Yuan Q, Zou D, Qu S, Tian G, Song L, Zhang T, Li S, Liu Y, Wang W, Ren G, Li D. Fibroblast growth factor (FGF21) protects mouse liver against D-galactose-induced oxidative stress and apoptosis via activating Nrf2 and PI3K/Akt pathways. *Mol. Cell Biochem.* 2015;403,287–299.

Zhang WW, Sun QX, Liu YH, Gao W, Li YH, Lu K, Wang Z. Chronic administration of Liu Wei Dihuang protects rat's brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system. *Acta Physiol Sin.* 2011;63:245–255.

Zhang X, Jin C, Li Y, Guan S, Han F, Zhang S. Catalpol improves cholinergic function and reduces inflammatory cytokines in the

senescent mice induced by D-galactose. *Food Chem Toxicol.* 2013;58:50-5.

Zhong SZ, Ge QH, Qu R, Li Q, Ma SP. Paeonol attenuates neurotoxicity and ameliorates cognitive impairment induced by D-galactose in ICR mice. *J Neurol Sci.* 2009;277:58-64.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



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](http://www.unesc.net/propex/ceua)

Criciúma, 13 de dezembro de 2010.

Carina Rodrigues Boeck

Coordenadora do CEUA

## ANEXO B - PUBLICAÇÃO DO ARTIGO

Metab Brain Dis  
DOI 10.1007/s11011-016-9865-3



ORIGINAL ARTICLE

## Evidence of oxidative stress in brain and liver of young rats submitted to experimental galactosemia

Márcia B. Castro<sup>1,2</sup> · Bruna K. Ferreira<sup>1</sup> · José Henrique Cararo<sup>1</sup> ·  
Adália E. Chipindo<sup>1</sup> · Marina L. Magenis<sup>1</sup> · Monique Michels<sup>3</sup> · Lucinéia G. Danielski<sup>4</sup> ·  
Marcos R. de Oliveira<sup>5</sup> · Gustavo C. Ferreira<sup>6</sup> · Emilio L. Streck<sup>7</sup> · Fabricia Petronilho<sup>4</sup> ·  
Patrícia F. Schuck<sup>1</sup>

Received: 16 March 2016 / Accepted: 28 June 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016